

Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselektivität mikrobieller Hydantoinasen

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

vorgelegt von Thomas Waniek
aus Heidenheim

Hauptberichter:	Prof. Dr. C. Syldatk
Mitberichter:	Prof. Dr. R. D. Schmid
Tag der mündlichen Prüfung:	9. Dezember 1999

Institut für Bioverfahrenstechnik
Lehrstuhl Physiologische Mikrobiologie
Universität Stuttgart

2000

Diese Dissertation kann als gedruckte Ausgabe zum Selbstkostenpreis von DM 30.- (incl. Versandkosten) von Thomas Waniek, Ravensburger Str. 7, 89522 Heidenheim erhalten werden.

Diese Arbeit wurde überwiegend durch
die Konrad-Adenauer-Stiftung
finanziert

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Herrn Prof. Dr. C. Syldatk für die Bereitstellung des Themas, die große wissenschaftliche Freiheit und Unterstützung in der Forschung, sowie die Durchsicht des Manuskriptes,

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

Herrn Dr. M. Pietzsch für die Betreuung, Ideen und Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung beim Erstellen der zahlreichen Berichte und Anträge und die große Geduld und Mühe bei der Durchsicht des Manuskriptes,

Herrn PD Dr. S. Bienz für die freundliche Zusammenarbeit, Herrn N. Bild für die Aufnahme von MS-Spektren, Svetoslav für die Bereitstellung von Substraten und Richy für die Charakterisierung zahlreicher Substanzen,

Herrn PD Dr. P. Fischer für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen bei Strukturaufklärungen,

Herrn Dr. Stenz von Fa. Perkin-Elmer für die überaus freundliche Unterstützung meiner Arbeit durch die Bereitstellung eines Polarimeters,

meinen Kollegen und Freunden Harald und Olli für die Unterstützung im Labor und am Computer sowie die unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft bei allen mathematischen und experimentellen Problemen, Kerstin, Sandra und Kai für Trost und Verpflegung in harten Zeiten,

Martin für die großartige Unterstützung und seinen Beitrag durch eine Studienarbeit und die Hiwi-Tätigkeit,

Björn für die freundschaftliche Unterstützung dieser Arbeit durch FT-IR-Messungen,

allen Kollegen und Freunden im Labor und am IBVT, Petra, Schorni, Dirk, Olli, Achim, Markus, Ralf, Sabine, Klaus, Sven, Anja, Burkhard, Franz, Toy, Ester, Gerhard, Jochen, Kerstin, Andreas, Susi, Martin, Andrea, Uli Peckmann und den Hiwis Ester und Markus für eine schöne, unvergeßliche Zeit an diesem Institut.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	5
1.1 Bedeutung der Chiralität von Wirkstoffen	5
1.2 Enantiospezifische Wirkstoffsynthesen	5
1.3 Hydantoinasen zur Synthese enantiomerenreiner Aminosäuren	7
1.4 Beeinflussung der Enantioselektivität	11
1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung	15
2 Abkürzungsverzeichnis	17
2.1 Strukturformeln	17
2.2 Syntheseprodukte und -intermediate	20
2.3 Sonstiges	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Puffer	22
3.2.1 Ammoniumcarbonatpuffer	22
3.2.2 Tris-Puffer pH 8.5	22
3.2.3 Tris-Puffer, pH 2.5	22
3.2.4 Tris-Lösung	22
3.3 HPLC-Fließmittel	23
3.3.1 RP-18-Analytik	23
3.3.2 Chiralanalytik	23
3.4 Substratlösungen	23
3.4.1 D,L-Benzylhydantoin-Lösungen	23
3.4.2 D- und L-Benzylhydantoin-Lösungen	23
3.4.3 L-Benzylhydantoin mit Inhibitoren	24
3.5 Biokatalysatoren	24
3.6 Analytik	25
3.6.1 Analytische HPLC	26
3.6.1.1 HPLC-Anlagen	26
3.6.1.2 Trennsäulen und Retentionszeiten	27
3.6.1.3 Eichgeraden	29
3.6.2 Präparative HPLC	29
3.6.3 Charakterisierung von N-Carbamoylamino-säuren mittels HPLC nach nichtenzymatischer Hydrolyse des Hydantoins	30

3.6.4	Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von Hydantoinen ausgehend von Racematen	30
3.6.5	Polarimetrie	31
3.6.5.1	Bestimmung der spezifischen molaren Drehwerte	31
3.6.5.2	Messung der Racemisierung von Hydantoinen	32
3.6.6	Charakterisierungen.....	33
3.7	<i>Synthesen von Hydantoinen und N-Carbamoylaminosäuren</i>	34
3.8	<i>Synthesen von Hydantoinanaloga</i>	36
3.8.1	Variationen in der 1-Position	36
3.8.1.1	L-N-Methyl-N-carbamoylphenylalanin (CMePhe) und D,L-5-Benzyl-1-N-methylhydantoin (D,L-1MeBnH)	36
3.8.1.2	D,L-5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (D,L-BOD)	39
3.8.1.3	D,L-5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (D,L-POD).....	41
3.8.1.4	D,L-Benzylsuccinimid (D,L-BnSI)	42
3.8.1.5	D,L-5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion (D,L-BnTD).....	43
3.8.2	Variationen in der 3-Position	44
3.8.2.1	D,L-5-Benzyl-3-N-methylhydantoin (D,L-3MeBnH)	44
3.8.2.2	D,L-5-Benzyltetramsäure (D,L-BnTS)	45
3.8.3	Sonstige Variationen	48
3.8.3.1	5-Benzyl-2-thiohydantoin (BnTH)	48
3.8.3.2	D,L-Benzylbernsteinsäure (D,L-BnBS) und D,L-Benzylbernsteinsäureanhydrid (D,L-BnBA).....	49
3.8.4	Zusammenfassung der Synthesedaten	51
3.9	<i>Synthesen von Vergleichssubstanzen</i>	54
3.9.1	Synthese von D-N-Carbamoyltrimethylsilylalanin (D-CTMSAla) und D-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin (D-TMSMH)	54
3.9.2	Vergleichssubstanzen für die Umsetzung von D,L-5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	54
3.9.2.1	L- und D,L-Phenylmilchsäureamid (PhMA).....	55
3.9.2.2	Carbamoylphenylmilchsäure (CPHM)	55
3.9.3	Standards für die Umsetzung von Benzylsuccinimid	56
3.9.3.1	Synthese der als Standard benötigten Halbamide	58
3.9.3.2	Angereicherte Enantiomere der Halbamide	59
3.9.3.3	D,L-Benzylbernsteinsäurediamid (D,L-BnBDA)	60
3.10	<i>Biotransformationen</i>	61
3.10.1	Bestimmung der Aktivität	61
3.10.1.1	Mittels HPLC	61
3.10.1.2	Mittels Polarimetrie.....	61
3.10.2	Bestimmung der Enantioselektivität.....	63
3.10.2.1	Mittels chiraler HPLC	63
3.10.2.2	Online-Messungen mit Polarimeter und Photometer	63
3.10.2.3	Ermittlung der Enantioselektivität nach dem Modell von Chen et al.	67
3.10.2.4	Identifizierung der kinetischen Parameter.....	68
3.10.3	Inhibitionsuntersuchungen	69
4	Ergebnisse	72
4.1	<i>Vorgehensweise</i>	72

4.2 Analytik	74
4.2.1 Abstoppen der Reaktionen	74
4.2.2 Hydrolyse von BnH bei der Lagerung	77
4.2.3 Reproduzierbarkeit der Enantioselektivitätsbestimmung und Einfluß der Enzymkonzentration	77
4.3 Racemisierungsgeschwindigkeiten von 5-monosubstituierten Hydantoinen	79
4.4 Biotransformationen mit der Hydantoinase aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745	80
4.4.1 Untersuchungen mit Benzylhydantoin	80
4.4.1.1 Umsetzung von L-Benzylhydantoin	80
4.4.1.2 Umsetzung von D-Benzylhydantoin	85
4.4.1.3 Umsetzung von D,L-BnH und Ermittlung der Enantioselektivität bei Standardbedingungen	85
4.4.1.4 Einfluß der Temperatur auf die Enantioselektivität	88
4.4.1.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Enantioselektivität	90
4.4.2 Untersuchungen mit Phenylethylhydantoin	92
4.4.3 Untersuchungen zur Umsetzung von (Trimethylsilylmethyl)-hydantoin	95
4.4.4 Untersuchungen zur Umsetzung von Neopentylhydantoin	97
4.4.5 Untersuchungen zur Umsetzung von (Methylthioethyl)-hydantoin	98
4.4.6 Untersuchungen zur Umsetzung von D,L-1-N-Methyl-5-benzylhydantoin	100
4.4.7 Untersuchungen zur Umsetzung von 5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	101
4.4.7.1 Biotransformation	101
4.4.7.2 Identifizierung des Reaktionsprodukts	102
4.4.7.3 Ermittlung der Enantioselektivität	103
4.4.8 Untersuchungen zur Umsetzung von Benzylsuccinimid	105
4.4.8.1 Biotransformation	105
4.4.8.2 Identifizierung des Reaktionsprodukts	106
4.4.8.3 Bestimmung der Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse	107
4.4.9 Biotransformationen mit anderen Hydantoinasen	109
4.4.10 Zusammenfassung der Untersuchungen	112
4.5 Inhibitionsuntersuchungen mit <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745	115
5 Diskussion	117
5.1 Wahl von 5-Benzylhydantoin als Standardsubstrat	117
5.2 Etablierung einer Standardumsetzung	118
5.2.1 Analytik mittels HPLC	120
5.2.1.1 Meßfehler und Reproduzierbarkeit	120
5.2.1.2 Abstoppen der Reaktionen	120
5.2.2 Analytik mittels kontinuierlicher Meßmethoden	121
5.2.2.1 Meßfehler und Reproduzierbarkeit	121
5.2.2.2 Substratspezifitäts- und Enantioselektivitätsbestimmungen	124
5.2.3 Bestimmung der Enantioselektivität durch Parameteroptimierung	125
5.3 Umsetzung von D,L-BnH	127
5.3.1 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit	127
5.3.2 Abhängigkeit der Enantioselektivität vom pH-Wert	130
5.4 Wahl der untersuchten Substrate	130
5.5 Variation der 5-Substituenten	133

5.6	Substituenteneinfluß im Hydantoinring	139
5.7	Austausch von Heteroatomen im Hydantoinring.....	140
5.8	Schlußfolgerungen.....	146
5.8.1	Hydantoinase aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745	146
5.8.2	Untersuchungen mit weiteren Hydantoinasen	148
6	Zusammenfassung	151
7	Literaturverzeichnis.....	154
8	Anhang.....	161
8.1	Abhängigkeit des spezifischen molaren Drehwerts von der Wellenlänge	161
8.2	Zusammenfassung von spezifischen molaren Drehwerten	162
8.3	Zusammenfassung von spezifischen molaren Extinktionen	162
8.4	Herleitungen.....	163
8.4.1	Ermittlung der Halbwertszeit der chemischen Racemisierung.....	163
8.4.2	Berechnung der Produktkonzentrationen mittels Polarimetrie gemessener Umsetzungen enantiomerenreiner Substrate	165
8.4.3	Berechnung der Produktkonzentrationen mittels Polarimetrie und Photometrie gemessener Umsetzungen racemischer Substrate.....	166
8.4.4	Berechnung der maximalen Reaktionszeit bei einer Racemisierung enantiomerenreiner Hydantoine unter 5 %.	167
8.5	Inhibitionsuntersuchungen	168

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Chiralität von Wirkstoffen

Der Bedarf an chiralen Substanzen als Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel und als synthetische Bausteine ist in den letzten Jahren enorm gestiegen (Faber, 1997). Von vielen pharmazeutisch wirksamen chiralen Substanzen ist bekannt, daß lediglich ein Enantiomer voll wirksam ist, während das andere Stereoisomer eine geringere Wirkung zeigt oder bei Medikamenten sogar Nebenwirkungen hervorruft (Blumenstein, 1997). Als Beispiel sei das 1954 als Racemat synthetisierte Schlafmittel und Sedativum Thalidomid[®] genannt. Unter dem Handelsnamen Contergan[®] führte diese Substanz aufgrund seiner teratogenen Wirkung zu einer der größten Katastrophen der pharmazeutischen Industrie. Tierversuche zeigten, daß zwar beide Enantiomere pharmazeutisch wirksam waren, aber nur ein Enantiomer bei Mäusen teratogen wirkte (Witiak und Hopper, 1991). Hohe gesetzliche Auflagen für toxikologischen Untersuchungen von Arzneimitteln und Vorschriften zur Verringerung der Umweltbelastung im Agrarbereich zwingen daher inzwischen die Industrie, enantiomerenreine Wirkstoffe bereitzustellen (Commission on agrochemicals and the environment, 1997).

1.2 Enantiospezifische Wirkstoffsynthesen

Zur Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen wird in der organischen Synthesechemie in der Regel von prochiralen Substanzen ausgegangen (Astleford und Weigel, 1997). Die Einführung eines asymmetrischen Zentrums geschieht in der Folge oft mit Hilfe eines chiralen Katalysators, wie z. B. bei der Sharpless Epoxidierung. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von „chiralen Bausteinen“. Hierbei wird das Zielmolekül aus einer enantiomerenreinen Substanz synthetisiert, wobei am asymmetrischen Zentrum selbst keine Reaktion durchgeführt wird (Sheldon, 1993).

Auch Enzyme können zur asymmetrischen Synthese eingesetzt werden. **Enantiospezifische Enzyme** setzen lediglich ein Substratenantiomer zu einem enantiomerenreinen Produkt um. Wird dagegen in einer enzymkatalysierten Reaktion ein racemisches Substrat enantioselektiv umgesetzt, entsteht nur eine angereicherte Mischung von Produktenantiomeren. Auch mit **enantioselektiven Enzymen** können jedoch enantiomerenreine Substanzen gewonnen werden (Chen et al., 1982; Chen et al., 1987). Bei der **kinetischen Racematspaltung** setzt ein enantioselektiver Biokatalysator die beiden Enantiomere des Racemats einer Zielverbindung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten um. Dadurch reichert sich mit zunehmender Zeit das langsamer umgesetzte Substratenantiomer an, bis die Reaktion bei genügend hohem Enantiomerenüberschuß gestoppt wird.

Viele der natürlichen, enantiomerenreinen Aminosäuren werden in Maßstäben von bis zu 350 000 Tonnen pro Jahr fermentativ gewonnen. Über enzymkatalysierte Reaktionen werden mehr als 1000 Tonnen Aspartat jährlich im **Aspartaseverfahren** hergestellt. Methionin, Valin und Phenylalanin werden im 100-Tonnen-Maßstab mittels **Aminoacylaseverfahren** synthetisiert. D-p-Hydroxyphenylglycin ist die im größten Maßstab hergestellte unnatürliche Aminosäure. Im **Hydantoinaseverfahren** wird sie jährlich im 1000-Tonnen-Maßstab gewonnen und zur semisynthetischen Herstellung des Antibiotikums Amoxicillin verwendet. L-tert.-Leucin wird als „chiraler Baustein“ vor allem zur Synthese neuer Pharmaka eingesetzt. Diese unnatürliche Aminosäure kann durch **enantiospezifische Reduktion** von tert.-Butylketoessigsäure mit einer cofaktorabhängigen Leucindehydrogenase gewonnen werden. Das NAD^+ wird in diesem Prozeß kontinuierlich durch Umsetzung von Ammoniumformiat mit einer Formiatdehydrogenase regeneriert (Bommarius et al., 1995). Die **Transaminierung** bietet eine weitere Möglichkeit, enantiomerenreine, ungewöhnliche Aminosäuren herzustellen. Unter Einsatz von überwiegend pyridoxalphosphatabhängigen Transaminasen können 2-Ketocarbonsäuren mit einer Aminosäure reduktiv aminiert werden.

Die enzymatische Umsetzung von 2-Ketocarbonsäuren bietet den Vorteil, prinzipiell das gesamte Substrat zur enantiomerenreinen Aminosäure umzusetzen. Da es sich hierbei aber um Redox-Reaktionen handelt, müssen cofaktorabhängige Enzyme eingesetzt werden, deren Cofaktorregenerierung während des technischen Prozesses sichergestellt werden muß. Dagegen bietet die Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren durch Racematspaltungen den Vorteil, daß für die Prozesse keine Cofaktoren benötigt werden. Dafür kann aber höchstens ein Substratenantiomer quantitativ zum Produkt umgesetzt werden. In technischen Prozessen muß das nicht umgesetzte Substratenantiomer üblicherweise racemisiert und dem Prozeß erneut zugeführt werden. Die dynamische Racematspaltung kombiniert die Vorteile der genannten Verfahren. Die in dieser Reaktion eingesetzten Substrate racemisieren unter Reaktionsbedingungen kontinuierlich. Daher können durch eine enantiospezifische Racematspaltung aus beiden Substratenantiomeren enantiomerenreines Produkt gebildet werden. Das oben beschriebene Hydantoinaseverfahren beruht auf einer solchen dynamischen Racematspaltung (Abbildung 1.2-1). In diesem Verfahren wird als Substrat das Racemat eines 5-monosubstituierten Hydantoin eingesetzt. Je nach verwendetem Katalysator wird L- oder D-Hydantoin zu N-Carbamoylaminosäure gespalten. Da während der Reaktion das Hydantoin racemisiert (Reist et al., 1996; Lazarus, 1990), wird kontinuierlich das abreagierende Substratenantiomer nachgeliefert. Der zweite Schritt dieses Verfahrens bildet die Decarbamoylierung der N-Carbamoylaminosäure. Die Abspaltung der Carbamoylgruppe kann entweder nichtenzymatisch durch salpetrige Säure erfolgen oder enzymatisch mit einer Carbamoylase.

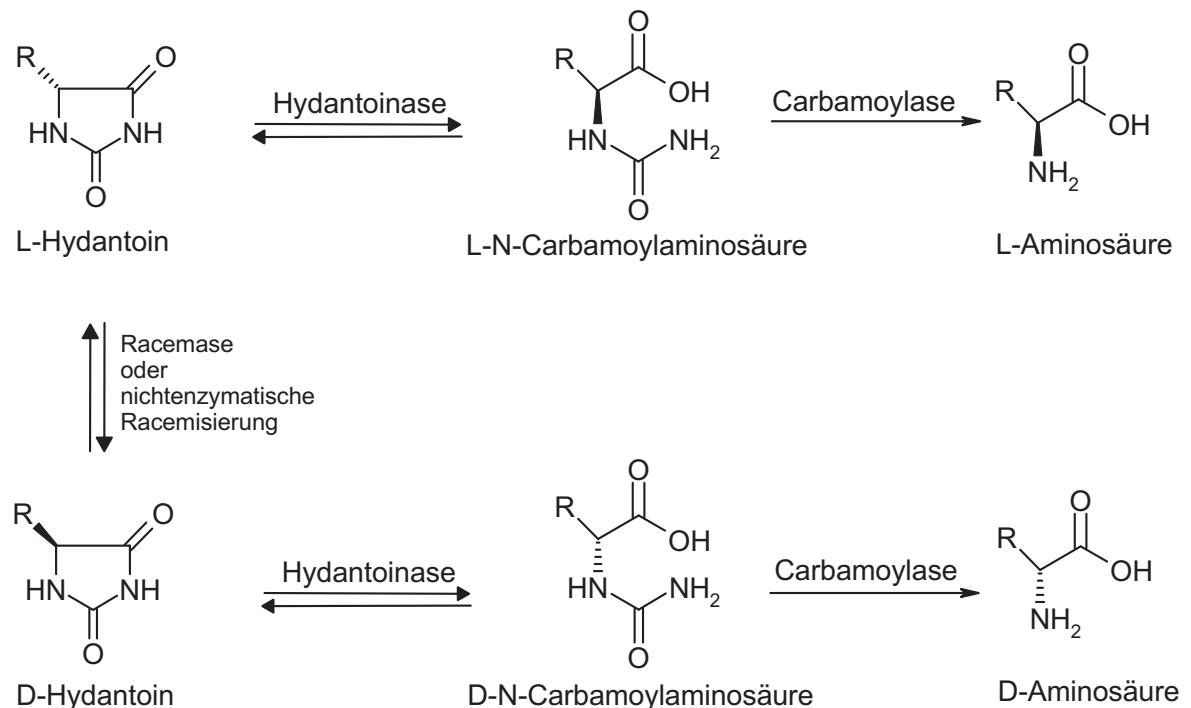


Abbildung 1.2-1: Synthese enantiomerenreiner Aminosäure im Hydantoinaseverfahren

1.3 Hydantoinasen zur Synthese enantiomerenreiner Aminosäuren

Hydantoinasen sind Hydrolasen, die in der EC-Nomenklatur in die Enzymklasse der Cyclischen Amidasen (EC 3.5.2) aufgenommen wurden. Die Hydantoinasen wurden dabei den Dihydropyrimidinasen gleichgesetzt (EC 3.5.2.2). Diese EC-Zuordnung ist historisch bedingt, denn neuere Untersuchungen zeigen, daß Hydantoinasen eine eigene Enzymklasse darstellen (Ogawa und Shimizu, 1997; May, 1998b; Sylatk, 1999), deren Substratspektrum sich nicht in allen Fällen mit dem der Dihydropyrimidinasen deckt. Nach ihrer Stereospezifität sollten Hydantoinasen in drei Klassen, die D-, L- und unselektiven Hydantoinasen, klassifiziert werden (Sylatk, et al., 1999).

Hydantoinasen haben eine wichtige Bedeutung in der industriellen biotechnologischen Synthese ungewöhnlicher Aminosäuren nach dem Hydantoinaseverfahren (Sylatk und Pietzsch, 1995). Den größten Einsatz findet dieses Verfahren in der Produktion von D-p-Hydroxyphenylglycin, welches zur semisynthetischen Produktion eines Antibiotikums benötigt wird (Sylatk et al., 1999). Bei industrieller Anwendung des Hydantoinaseprozesses werden Mikroorganismen als freie bzw. immobilisierte Zellen eingesetzt (Dinelli et al., 1978; Cecere et al., 1977; Sylatk et al., 1999). Neuerdings gewinnt der Einsatz von immobilisierten Enzymen zunehmend an Bedeutung. Trägerfixierte Enzyme bieten gegenüber dem Einsatz freier Zellen den Vorteil, daß zum einen die Produktauf-

arbeitung vereinfacht wird, zum anderen kann der Prozeß bei Einsatz räumlich getrennter Enzyme besser gesteuert werden (Syldatk et al., 1999).

Einige Hydantoinasen zeigen ein außerordentlich breites Substratspektrum (Syldatk und Pietzsch, 1995), was sie zu industriell interessanten Katalysatoren macht, da sie für die Produktion unterschiedlicher Aminosäuren flexibel einsetzbar sind. Üblicherweise werden enantiospezifische Hydantoinasen zur Synthese enantiomerenreiner Aminosäuren eingesetzt. Aber selbst, wenn die verwendete Hydantoinase ein gewünschtes Hydantoin nur enantioselektiv umsetzt, kann beim Einsatz einer enantiospezifischen Carbamoylase enantiomerenreine Aminosäure produziert werden. Dabei wird ausgenutzt, daß die Hydantoinasereaktion reversibel ist, die Carbamoylasereaktion hingegen nicht (Ishikawa, 1994). Wird das Hydantoinaseverfahren mit immobilisierten Enzymen z. B. als zweistufiger Prozeß betrieben, kann der Einsatz einer unselektiven Hydantoinase den Vorteil bieten, bei Verwendung von D- oder L-spezifischen Carbamoylasen, wahlweise zur Produktion von D- oder L-Aminosäuren genützt zu werden (Syldatk, 1999).

Die meisten **D-Hydantoinasen** setzen neben Hydantoinen auch Dihydropyrimidine um. Aus diesem Grund wurden die Begriffe Hydantoinase und Dihydropyrimidinase als Synonyme verwendet. Runser und Meyer (1993) fanden eine D-Hydantoinase ohne Dihydropyrimidinaseaktivität, daher ist zumindest die Einordnung dieser Hydantoinase als Dihydropyrimidinase nicht sinnvoll. D-Hydantoinasen mit Dihydropyrimidinaseaktivität wurden sowohl aus tierischen Zellen, z. B. der Leber von Ratten, isoliert (Kigugawa et al., 1994), als auch aus den unterschiedlichsten Mikroorganismen wie z. B. aus *Blastobacter species* (Soong et al., 1999; Ogawa und Shimizu, 1997; Ogawa et al., 1997; Ogawa et al., 1996; Ogawa et al., 1995). Im Gegensatz zur zweiten Klasse, den L-Hydantoinasen, setzten D-Hydantoinasen alle bisher getesteten Hydantoine fast ausschließlich enantiospezifisch um. Von lediglich zwei Substraten, dem n-Butyl- und dem Methylhydantoin wurden geringe Enantioselektivitäten der Umsetzungen mit einer Hydantoinase aus *Thermus spec.* gefunden (Keil, et al., 1995).

L-Hydantoinasen wurden bisher ausschließlich in Mikroorganismen nachgewiesen. Die Enantioselektivität der Umsetzungen wurden seither nur wenig untersucht. Tabelle 1.3-1 zeigt eine Übersicht literaturbekannter Untersuchungen zu Enantioselektivität von Umsetzungen mit isolierten L-Hydantoinasen. Dabei fällt auf, daß die Hydantoinase aus *Flavobacterium species* AJ-3912 D,L-Benzylhydantoin (**D,L-BnH**) L-selektiv umsetzte, für D,L-Benzylloxymethylhydantoin zeigte das Enzym dagegen eine D-Selektivität. Diese substratabhängige Umkehr der Enantioselektivität wurde auch für eine Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 beschrieben (May et al., 1998a). Während **D,L-BnH** L-selektiv umgesetzt wurde, konnte eine Umkehrung der Enantioselektivität für D,L-Methylthioethylhydantoin (**D,L-MTEH**) beobachtet werden. Diese Beispiele zeigen, daß die Enantioselektivität von L-Hydantoinasen vom Substrat abhängig sein kann. Daher scheint eine Klassifizierung dieser Hydantoinasen nach ihrer Stereospezifität wenig sinnvoll zu sein.

Die **1-N-Methylhydantoinase** bildet eine exotische Unterklasse der L-Hydantoinasen. Ogawa et al. (1995) fanden diese Hydantoinase in *Pseudomonas putida* 77. Diese Hydantoinase benötigt als Cofaktor ATP und erfordert deshalb, sofern sie als isoliertes Enzyme eingesetzt wird, eine aufwendige Cofaktorregenerierung.

Die **unselektiven Hydantoinasen** stellen die dritte Klasse der Hydantoinasen dar. Als Beispiel dieser Klasse sei die von Yokozeki et al. (1987b) isolierte Hydantoinase aus *Flavobacterium species* AJ-3912 genannt.

Im Vergleich zu den D-Hydantoinasen besitzen die weniger untersuchten L-Hydantoinasen (Tabelle 1.3-1) ein viel eingeschränkteres Substratspektrum und eine Substratabhängigkeit der Enantioselektivität. Beide Enzyme zeigen die identische Enantiospezifität, mit Ausnahme des Methylthioethylhydantoin, das nur von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 umgesetzt wird. Diese Hydantoinasen setzen nur Substrate um, die eine Methylengruppe im Substituenten haben, die sich in α -Position zum C-5-Atom des Hydantoinrings befindet. Alle aromatischen Substituenten, die eine α -Methylgruppe besitzen, wurden umgesetzt. Dagegen wurden aliphatisch substituierte Hydantoine, mit Ausnahme des oben beschriebenen 5-tert.-Butylhydantoin, nicht umgesetzt.

Tabelle 1.3-1: Übersicht der Substratspezifität und Enantioselektivität isolierter L-Hydantoinasen

5-Substituent des D,L-Hydantoin	Flavobacterium species AJ-3912 ^{e)}	Arthrobacter aureus DSM 3745, 3747
Benzyl-	L-selektiv	L-selektiv ^{b,c,d}
4-Hydroxybenzyl-	L-selektiv	keine Umsetzung ^b
Indolylmethyl-	L-selektiv	L-selektiv ^d
Benzylloxymethyl-	D-selektiv	Umsetzung ^a
3,4-Methylenedioxybenzyl-	L-selektiv	
3,4-Dimethoxybenzyl-	L-selektiv	Umsetzung ^c
Methylthioethyl-	keine Umsetzung	D-selektiv ^d
Isobutyl-	keine Umsetzung	
Isopropyl-	keine Umsetzung	keine Umsetzung ^{a,c}
Carbamoyl-ethyl-	keine Umsetzung	
Carbamoylmethyl-	keine Umsetzung	
Methoxymethyl-	keine Umsetzung	
Methyl-	keine Umsetzung	keine Umsetzung ^{a,c}
Carboxymethyl-	keine Umsetzung	
Carboxyethyl-	keine Umsetzung	keine Umsetzung ^{a,c}
4-Imidazolmethyl-	keine Umsetzung	
4-Aminopropyl-		keine Umsetzung ^c
4-Aminobutyl-	keine Umsetzung	keine Umsetzung ^{a,c}
tert.-Butyl-		Umsetzung ^a
H-		keine Umsetzung ^c
Phenyl-		keine Umsetzung ^a
Thienyl-		keine Umsetzung ^c
Phenylethyl-		Umsetzung ^b
4-Carboxylbenzyl-		keine Umsetzung ^b
4-Fluorbenzyl-		Umsetzung ^b
4-Chlorbenzyl-		Umsetzung ^b
4-Nitrobenzyl-		Umsetzung ^b
4-Aminobenzyl-		Umsetzung ^b
Pyridylmethyl-		Umsetzung ^b
Cyclohexylmethyl-		keine Umsetzung ^b
4-Methoxyphenyl-		Umsetzung ^{a,b}
3,4-Dihydroxybenzyl-		Umsetzung ^c
Methoxyphenyl-		Umsetzung ^{a,b}

a (Nöthe, 1993); b (Kölle, 1991); c (Dombach, 1989); d (May, 1998b)

Umsetzung: wurde ohne Angabe der Enantioselektivität umgesetzt

e) (Yokozeiki et al., 1987);

Seitherige Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselektivität der Hydantoinasen fanden hauptsächlich für pharmazeutisch interessante Aminosäuren statt. Daher wurden Modifikationen bisher überwiegend in der Seitenkette 5-monosubstituierter Hydantoine durchgeführt. Der Einfluß einzelner Strukturelemente des Hydantoinrings auf die Substratspezifität und Enantioselektivität wurde bisher nicht beschrieben. Derartige Untersuchungen sind in der Literatur hauptsächlich für Lipasen, Esterasen, Proteasen und Oxidasen beschrieben. Daher werden im nächsten Abschnitt Beispiele aus der Literatur vorgestellt, in denen Einflüsse auf die Enantioselektivität von Umsetzungen mit freien Enzymen untersucht wurden.

1.4 Beeinflussung der Enantioselektivität

Die bei der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bereits beschriebene Beeinflussung der Enantioselektivität durch Variation von Strukturelementen im 5-Substituenten (May, et al., 1998a) ist kein Einzelfall. Neben diesem Effekt zeigten auf andere literaturbeschriebene Enzyme auch selektive Inhibitoren, die Wahl des Lösungsmittels, die Flexibilität eines Enzyms, Variationen des Trägermaterials immobilisierter Enzyme, sowie Temperatur- und pH-Wert-Änderungen eine Änderung der Enantioselektivität untersuchter Reaktionen. Im Folgenden werden einige Beispiele vorgestellt.

Eine **Substratabhängigkeit** wird in der Literatur für viele enzymkatalysierte Reaktionen genannt. Z. B. konnten Kerridge et al. (1999) bei Untersuchungen mit ganzen Zellen feststellen, daß bei der Umsetzung von unterschiedlichen Sulfiden eine Umkehrung der Stereospezifität der Oxidation mit einer Naphthalin-Dioxygenase aus *Pseudomonas sp.* (rekombinant in *E. coli*) eintrat. Durch systematische Untersuchungen konnten sie zeigen, daß die Größe eines Substituenten für diese Umkehr verantwortlich ist. Während die Naphthalin-Dioxygenase fast alle Sulfide S-selektiv umsetzte, verursachte der Austausch einer Ethylgruppe im Substrat gegen ein Propyl- bzw. Isopropylgruppe die sprunghafte Umkehrung der Enantiospezifität.

Bei der Umsetzung von zwei Estern, die sich durch den Austausch einer Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom unterschieden, fanden Tuomi und Kazlauskas (1999) eine substratabhängige Umkehrung der Enantioselektivität. Trotz der Umkehrung der chiralen Erkennung war die Enantioselektivität beider Reaktionen mit E-Werten von 16 bzw. 17 sehr ähnlich. Untersuchungen beider Substrate hinsichtlich der molekularen Konformation und Flexibilität lieferten keine Erklärung für dieses Phänomen. Mittels rechnergestützter Modellierung des Übergangszustandes von Butyrat-analogen Phosphonaten gelang ihnen die Identifizierung unterschiedlicher Bindungstaschen im Enzym.

Auch die Zugabe eines selektiven **Inhibitors** kann die Enantioselektivität einer Umsetzung erhöhen, wie sich bei einer Racematspaltung von Chlorethylphenylpropionat mit einer Lipase aus *Candida cylindracea* zeigte. Durch die Zugabe eines Enantiomers

von Dextrometorphan wurde die Umsetzung eines Enantiomers selektiv inhibiert. Dadurch konnte die Enantioselektivität um das zehnfache gesteigert werden (Sih, 1990). Mit demselben Enzym sowie mit Carboxylesterase NP und α -Chymotrypsin gelang Rakels et al. (1994) eine Erhöhung der Enantioselektivität bei Hydrolysen von Methyl- und Ethylestern durch Produktinhibition mit dem entsprechenden Alkohol. Sie konnten durch eine Zugabe von 20 % (v/v) Ethanol die Enantioselektivität der Umsetzung von 4.7 auf 6.5 erhöhen. In einem weiteren Reaktionssystem untersuchten sie eine parallele Hydrolyse und Aminolyse eines Esters mit einer Lipase aus *Candida rugosa*. Da die Lipase für beide Reaktionen entgegengesetzte Enantioselektivitäten besaß, konnten die Autoren durch diese Simultanreaktion den Enantiomerenüberschuß der jeweiligen Produkte erhöhen (Rakels, 1996).

Zur **Lösungsmittelabhängigkeit** der Enantioselektivität enzymkatalysierter Reaktionen gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen. Als Beispiel sei eine Umesterung mit einer Protease aus *Aspergillus oryzae* in 18 verschiedenen nichtwäßrigen Lösungsmitteln genannt. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Enantioselektivität dieser Umsetzung mit zunehmender Hydrophobizität des Lösungsmittels (Tawaki, Klibanov, 1992). In Acetonitril wurde die höchste Enantioselektivität ($E = 7.1$) für das L-Enantiomer erreicht. Dagegen verlief die Reaktion in Cyclohexanon bzw. Dichlormethan nahezu unselektiv. Mit zunehmend hydrophoberem Lösungsmittel drehte sich die Selektivität des Enzyms schließlich um und erreichte in Tetrachlormethan die höchste Selektivität für das D-Enantiomer ($E = 5.3$). Lee publizierte 1995 thermodynamische Betrachtungen für neun verschiedene enzymkatalysierte Reaktionen in 33 nichtwäßrigen Lösungsmitteln und entwickelte eine mathematische Beschreibung der Enantioselektivität in Abhängigkeit physikalischer Konstanten von Lösungsmitteln. Wescott und Klibanov (1996) beschrieben Lösungsmiteleinflüsse auf die Enantioselektivität mittels „Molecular Modelling“, Ke et al. (1998) berücksichtigten zusätzlich den Einfluß des Wassers im Lösungsmittel.

Broos et al. (1995) konnten nachweisen, daß die **Flexibilität** von α -Chymotrypsin und Subtilisin Carlsberg mit zunehmender Hydratisierung des Enzyms zunahm. Erstaunlicherweise zeigte sich, daß mit der Flexibilität der Enzyme auch die Enantioselektivität zunahm. Als Begründung vermuteten sie eine mit zunehmender Flexibilität verbesserte Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat.

Bei Immobilisaten konnten **Trägereinflüsse** auf die Enantioselektivität bei Umesterungen mit Subtilisin Carlsberg festgestellt werden (Orsat et al., 1994). Es zeigte sich, daß in absolutem Acetonitril mit zunehmender Hydrophile des Trägers auch die Enantioselektivität der kovalent fixierten Enzyme anstieg.

Zum **Temperatureinfluß** auf die Enantioselektivität gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen. Dennoch konnte aus den erhaltenen Daten kein einheitliches Verhalten der Enantioselektivität gefunden werden. Holmberg und Hult (1991) untersuchten den Temperatureinfluß auf eine Umesterung und eine Hydrolyse eines Substrats mit einer Lipase aus *Candida cylindracea*. Sie stellten fest, daß die Stereoselektivität des Enzyms

für diese Reaktionen mit zunehmender Temperatur abnahm und leiteten eine mathematische Beschreibung dieser Temperaturabhängigkeit her (Holmberg, Hult, 1991). Eine temperaturabhängige Abnahme der Enantioselektivität konnte auch für eine Reaktion gefunden werden, die von einer Schweineleberesterase katalysiert wurde (Lam et al., 1986). Erstaunlicherweise konnte bei der Umsetzung einer anderen Verbindung mit demselben Enzym eine Zunahme der Enantioselektivität mit steigender Temperatur ermittelt werden (Boutelje et al., 1988). Dagegen fanden Barton et al. (1990) bei der Racematspaltung eines Substrats mit einer Lipase aus *Candida rugosa* keinerlei Temperaturabhängigkeit. Bei einer Variation der Enzympräparation konnten Noritomi et al. (1996) zeigen, daß mit zunehmender Temperatur die Enantioselektivität von Subtilisin Carlsberg und einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* je nach Präparationsbedingungen der Enzyme zu- oder abnimmt. Daher läßt sich aus den genannten Untersuchungen zusammenfassen, daß eine Vorhersage der Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität nicht ohne weiteres möglich ist.

Untersuchungen zur **pH-Abhängigkeit** der Enantioselektivität gibt es bisher nur selten. Für die Umsetzung eines Substrats mit Schweineleberesterase fanden Boutelje et al. (1988) eine mit dem pH-Wert abnehmende Enantioselektivität. In einer Umsetzung dieses Enzyms mit einem anderen Substrat konnte eine Enantioselektivitätszunahme durch Absenkung des pH-Werts erreicht werden. Allerdings nahm mit dem pH-Wert auch die spezifische Aktivität ab. Für eine Umsetzung mit einer Lipase aus *Candida rugosa* konnten Barton et al. (1990) die Enantioselektivität durch eine Absenkung des pH-Werts von 9.0 auf 7.5 von 3 auf 20 steigern. Interessanterweise nahm bei dieser Umsetzung die Enantioselektivität des Enzyms mit steigender spezifischer Aktivität zu. Ebenso beobachteten Pamperin et al. (1998) bei Umsetzungen von 4-Acetoxy[2.2]paracyclophan mit ganzen Zellen von *Candida rugosa* eine mit steigendem pH-Wert zunehmende Aktivität und Enantioselektivität. Dabei konnte durch eine Erhöhung des pH-Werts von 5.5 auf 7.0 die Enantioselektivität der Umsetzungen von 39 auf über 100 gesteigert werden. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes bis auf 8.0 nahmen sowohl die spezifische Aktivität als auch die Enantioselektivität des Katalysators rapide ab.

Aus der Vielzahl von Untersuchen, vor allem für lipasekatalysierte Reaktionen, ist es teilweise möglich, Vorhersagen des Einflusses von Reaktionsbedingungen auf die Enantioselektivität der Umsetzungen zu treffen. Sowohl die Korrelation der Hydrophobizität von Lösungsmitteln mit der Enantioselektivität einiger Enzyme als auch vorhandene Modelle zur Beschreibung einiger Systeme können bei der systematischen Optimierung von präparativ interessanten Umsetzungen behilflich sein. Auch der Einfluß einzelner Strukturelemente der Substrate wurde für Umsetzungen mit verschiedenen Enzymen gründlich untersucht. Aufbauend auf dem von Fischer (1894) entwickeltem Schlüssel-Schloß-Modell der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen wurde für eine Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber ein verfeinertes Modell von Jones und Jakovac (1982) entwickelt. Mit diesem „Box-Modell“ lassen sich Vorhersagen bezüglich der Sub-

stratabhängigkeit der Enantioselektivität treffen. Die Enantioselektivität der Umsetzungen von Estern sekundärer Alkohole verhält sich bei den meisten der gebräuchlichen Lipasen nach der „Kazlauskas-Regel“ (Kazlauskas et al., 1991). In Abhängigkeit der beiden Reste im Alkohol ist es mit dieser Regel möglich, das stereochemisch bevorzugte Enantiomer vorherzusagen.

Im Vergleich zu D-Hydantoinasen wurden L-Hydantoinasen seither weniger intensiv untersucht. Eine Ursache könnte der Bedarf der pharmazeutischen Industrie sein, für die Synthese von bestimmten Antibiotika kostengünstig über enantiomerenreine D-Aminosäuren zu verfügen. Ein weiterer Grund könnte sein, daß L-Hydantoinasen im Vergleich zu D-Hydantoinasen ein kleineres Substratspektrum verbunden mit einer häufig geringeren Stereoselektivität zeigen. Daher gibt es erst wenig systematische Untersuchungen zur Substratspezifität und überhaupt keine zur Enantioselektivität.

Die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 gehört zu den bisher am besten untersuchten Hydantoinasen. Dieses Enzym stammt aus einem Mikroorganismus, der ursprünglich für die Biotransformation von D,L-5-Indolylmethylhydantoin (**D,L-IMH**) zur Synthese von L-Tryptophan gescreent wurde (Syldatk et al., 1992). Neuerdings wurden mit diesem Enzym erste Arbeiten zur Bestimmung der Kristallstruktur durchgeführt (May et al., 1996).

Für diese Hydantoinase ist in zahlreichen Untersuchungen ein breites Substratspektrum gefunden worden (Tabelle 1.3-1). Daraus wurden unterschiedliche empirische Modelle, ähnlich dem „Box-Modell“ für Schweineleberesterase (Jones und Jakovac, 1982), zur Beschreibung der Substratspezifität vorgeschlagen (Dombach, 1990; Kölle, 1991). In diesen Modellen wird unter anderem als notwendiges Strukturelement die Methylgruppe des 5-Substituenten in Nachbarstellung zum C-5-Atom des Hydantoinrings beschrieben. Obwohl die Umsetzung von vielen unterschiedlichen Substraten getestet wurde, fanden bisher nur wenige systematische Untersuchungen zur Substratspezifität statt. Z. B. wurde Trimethylsilylalanin als „Bio-Isoster“ für Phenylalanin diskutiert, was bedeutet, daß es in biologisch aktiven Peptiden Phenylalanin substituieren kann (Weidmann, 1992). Systematische Untersuchungen zur Enantiospezifität wurden seither überhaupt nicht durchgeführt. Für lediglich drei Substanzen ist die Enantioselektivität von Umsetzungen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bekannt. Dieses Enzym wurde für die Substrate D,L-5-Methylthioethylhydantoin (**D,L-MTEH**) und D,L-5-Benzylhydantoin (**D,L-BnH**) als L-selektiv beschrieben (Völkel, 1993). Die einzigen quantitativen Untersuchungen zur Enantioselektivität der **Umsetzung von D,L-MTEH und D,L-IMH** mit diesem Enzym wurden von May (1998b) beschrieben. Es ist bekannt, daß sowohl Benzyl- als auch das dazu homologe Phenylethylhydantoin von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 umgesetzt werden. Aber der Einfluß der Kettenverlängerung auf die Enantioselektivität der Umsetzung ist bisher unbekannt. Ebenso stehen quantitative Untersuchungen, ob sich unter nicht umgesetzten Substraten Inhibitoren für die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*

DSM 3745 finden lassen, aus. Gerade diese Frage ist aber für ein besseres Verständnis von Substrat-Enzym-Wechselwirkungen von ausschlaggebender Bedeutung.

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Zu Beginn der Untersuchungen sollte zunächst eine Standardumsetzung für enantiomerenreines und racemisches 5-Benzylhydantoin mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 etabliert und die kinetischen Parameter ermittelt werden. Dafür mußte zur quantitativen Bestimmung aller an der Reaktion beteiligten Enantiomere eine Chiralanalytik entwickelt werden. Von dieser Standardumsetzung sollte der Enantiomerenüberschuß ermittelt werden und die pH- bzw. Temperaturabhängigkeit untersucht werden.

Zur systematischen Untersuchung des Einflusses des Substituenten in 5-Position sollten zum einen Hydantoine synthetisiert werden, bei denen die Phenylgruppe durch isostere Gruppen ersetzt wird, zum anderen sollte D,L-5-Phenylethylhydantoin als Homologes zu D,L-5-Benzylhydantoin dargestellt werden. Die spezifischen Aktivitäten und die Enantioselektivitäten der Umsetzungen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 sollten mit der Umsetzung von D,L-5-Benzylhydantoin verglichen werden.

Die Klärung der Bedeutung der einzelnen Strukturelemente des Hydantoinrings sollte durch Austausch einzelner Atome bzw. -gruppen im Hydantoinring erfolgen. Dafür war die Synthese entsprechender hydantoinanaloger Verbindungen erforderlich, die, wie oben beschrieben, untersucht und mit der Umsetzung von D,L-5-Benzylhydantoin verglichen werden sollten. Zusätzlich sollte die Bedeutung der Wasserstoffatome der 1- und 3-NH-Gruppen untersucht werden, in dem die entsprechenden methylierten Hydantoine synthetisiert und anschließend mit der Hydantoinase umgesetzt werden sollten.

Alle umgesetzten Substrate sollten mit Umsetzungen der kommerziell erhältlichen immobilisierten D-Hydantoinase 1 und der freien D-Hydantoinase 2, sowie einer immobilisierten Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 hinsichtlich ihrer Enantioselektivität verglichen werden.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die nicht umgesetzten Substrate einen inhibitorischen Einfluß auf die Umsetzung von L-5-Benzylhydantoin mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* zeigen und gegebenenfalls der K_i -Wert bestimmt werden.

Eine Übersicht der durchzuführenden Untersuchungen ist in Abbildung 1.5-1 dargestellt.

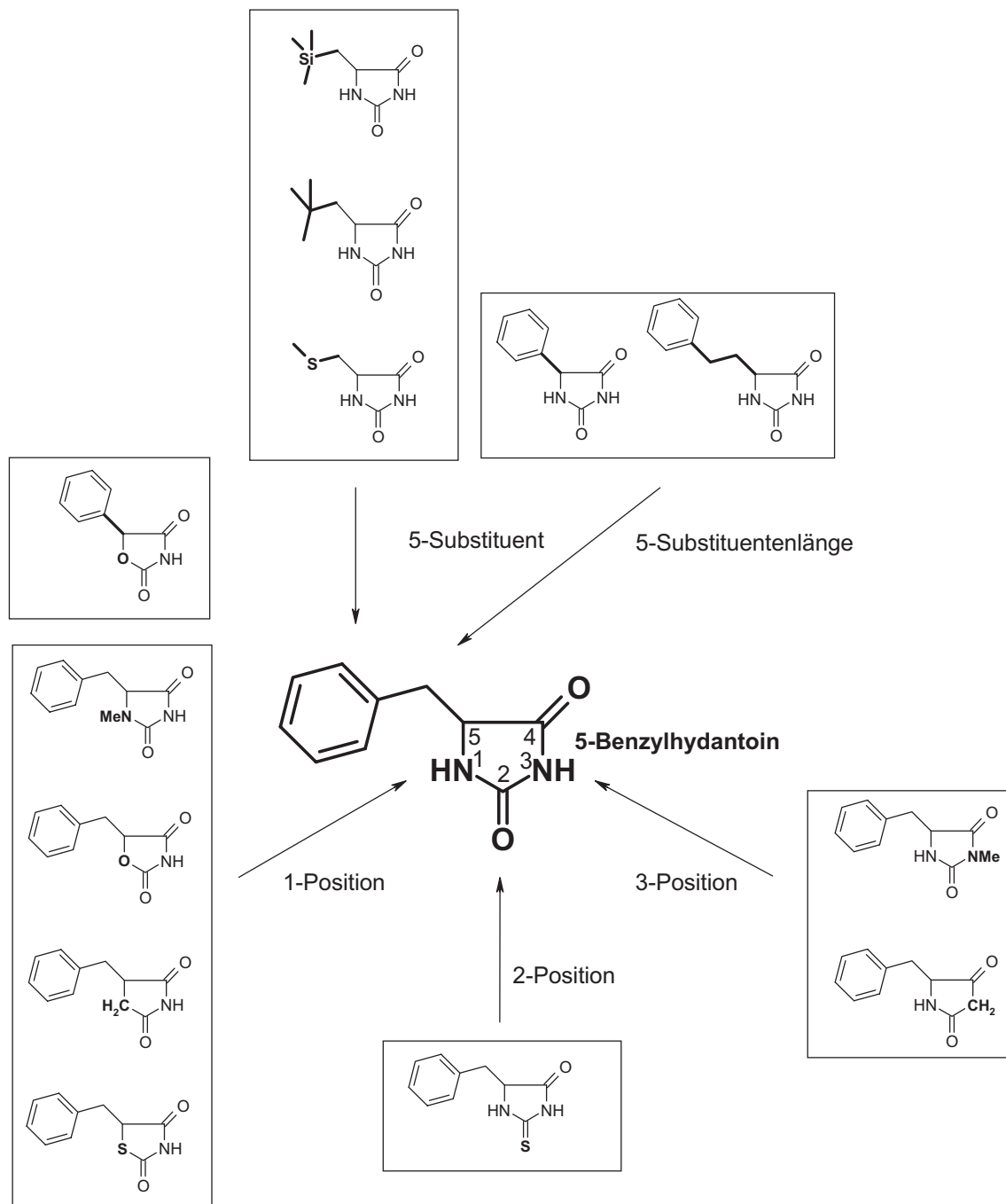
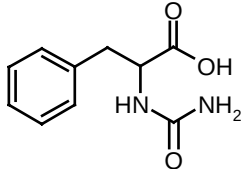
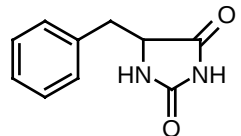
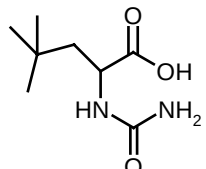
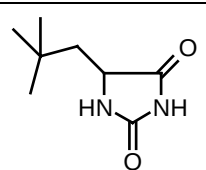
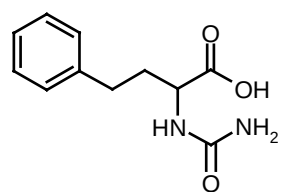
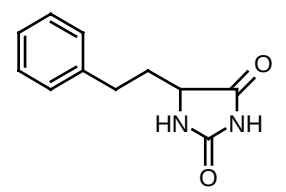
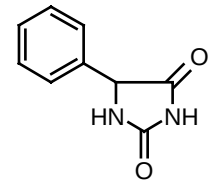
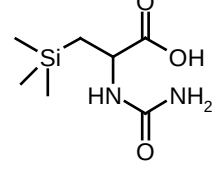


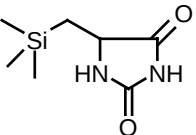
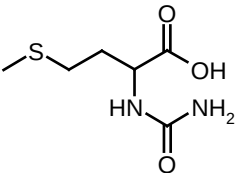
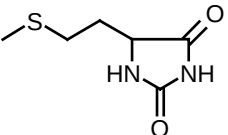
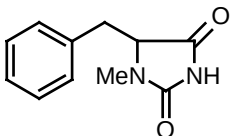
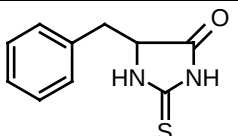
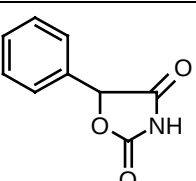
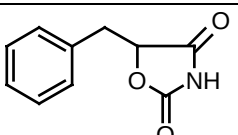
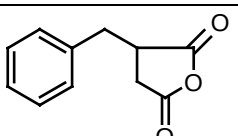
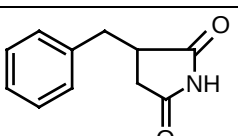
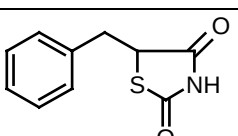
Abbildung 1.5-1: Übersicht der durchzuführenden Untersuchungen zur Bestimmung der Substratspezifität und Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 und einer Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 sowie einer D-Hydantoinase 1 und einer D-Hydantoinase 2.

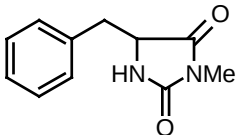
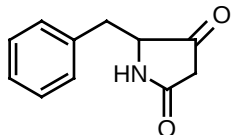
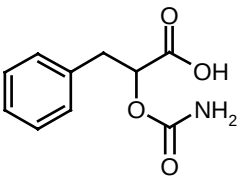
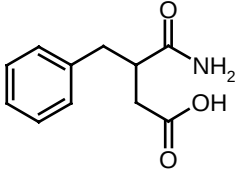
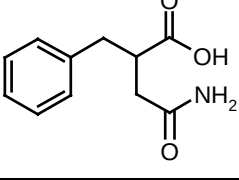
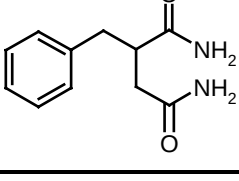
2 Abkürzungsverzeichnis

2.1 Strukturformeln

Tabelle 2.1-1: Strukturformeln von Produkten und Intermediaten der Synthesen

Strukturformel	Name	Abkürzung
	N-Carbamoylphenylalanin	CPhe
	5-Benzylhydantoin	BnH
	N-Carbamoylneopentylglycin	CNPG
	5-Neopentylhydantoin	NPH
	N-Carbamoylhomophenylalanin	CHPhe
	5-(Phenylethyl)-hydantoin	PhEH
	5-Phenylhydantoin	PhH
	N-Carbamoyltrimethylsilylalanin	CTMSAla

	5-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin	TMSMH
	N-Carbamoylmethionin	CMet
	5-(Methylthioethyl)-hydantoin	MTEH
	5-Benzyl-1-N-methylhydantoin	1MeBnH
	5-Benzyl-2-thiohydantoin	BnTH
	5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	POD
	5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	BOD
	Benzylbernsteinsäureanhydrid	BnBA
	Benzylsuccinimid	BnSI
	5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion	BnTD

	5-Benzyl-3-N-methylhydantoin	3MeBnH
	5-Benzyltetramsäure	BnTS
	Carbamoylphenylmilchsäure	CPhM
	2-Benzylbernsteinsäurehalbamid	2BnBHA
	3-Benzylbernsteinsäurehalbamid	3BnBHA
	Benzylbernsteinsäurediamid	BnBDA

2.2 Syntheseprodukte und -intermediate

Tabelle 2.2-1: Abkürzungen von Produkten und Intermediaten der Synthesen

Abkürzung	Substanzname
BnBS	Benzylbernsteinsäure
BnBA	Benzylbernsteinsäureanhydrid
BnBD	Benzylbernsteinsäurediamid
BnDEM	2-Benzyl-diethylmalonat
BnEOCTS	5-Benzyl-3-ethoxycarbonyltetramsäure
CPhM	O-Carbamoylphenylmilchsäure
DEM	Diethylmalonat
EM	Ethylmalonat
EMCl	Ethylmalonylchlorid
EOCAPHM	N-(Ethoxycarbonylacetyl)-phenylalaninmethylester
MePhe	N-Methylphenylalanin
MSA	Mandelsäureamid
PhAA	Phenylacetaldehyd
PhAAC	Phenylacetaldehydcyanhydrin
PhM	Phenylalaninmethylester
PhMA	Phenylmilchsäureamid
PhM	Phenylmilchsäure
TCE	Tricarbonsäureester: 2-Benzyl-2-(ethoxycarbonyl)-diethylsuccinat

2.3 Sonstiges

Tabelle 2.3-1: sonstige Abkürzungen

IR	Infrarotspektroskopie
auf 1/100 verdünnte Probe	ein Volumenteil der Probe + 99 Volumenteile des Lösungsmittels
Bn	Benzyl
BGIT	2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl-isothiocyanat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Enantioselektivität nach Chen et al. bestimmt
EA	Elementaranalyse
FP	Festpunkt
MH ⁺	In der Massenspektroskopie detektiertes Molekül-H ⁺ -Signal
MS	Massenspektrum
n. b.	nicht bestimmt
ORD	Optische Rotations-Dispersion
PC	Personalcomputer
Ph	Phenyl
RT	Raumtemperatur (25 °C)
Smp.	Schmelzpunkt
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umsatz
U (als Einheit)	Units [μ mol/min] wurden Racemate umgesetzt, bezieht sich die Angabe auf die Umsetzung von 3 mM D,L-BnH, 37 °C, 0.1 M Tris-Puffer. Bei der Umsetzung von enantiomerenreinen Verbindungen bezieht sich die Angabe der eingesetzten Aktivität auf eine Umsetzung von 2.7 mM L-BnH unter oben genannten Bedingungen
V+V	Volumenprozent getrennt abgemessener Flüssigkeiten

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die Herkunft oder Synthese nicht kommerziell erhältlicher Substanzen wird an entsprechender Stelle genannt. Alle anderen verwendeten Chemikalien, auch getrocknete Lösungsmittel, wurden in den handelsüblichen Reinheitsgraden reinst oder purum von den Firmen Fluka AG (Buchs, Schweiz), Sigma (München, Deutschland), Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA), Merck KGaA, (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Zum Herstellen von Lösungen und für alle Reaktionen wurde Reinstwasser aus einer NANOpure II-Anlage (Firma Barnstead, Newton, Massachusetts, USA) verwendet.

3.2 Puffer

Bei allen Puffern wurde der pH-Wert bei Raumtemperatur eingestellt und nach Substratzugabe korrigiert. Ebenso wurden alle in dieser Arbeit angegebenen pH-Werte bei Raumtemperatur gemessen.

3.2.1 Ammoniumcarbonatpuffer

0.1 mol (9.61 g) Ammoniumcarbonat wurden auf 1 l mit Reinstwasser aufgefüllt. Der pH-Wert betrug bei frisch angesetzttem Puffer 8.1. Während der Lagerung stieg der pH-Wert auf über 9 an.

3.2.2 Tris-Puffer pH 8.5

0.1 mol (12.11 g) Tris wurde in Reinstwasser gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 8.5 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt.

3.2.3 Tris-Puffer, pH 2.5

Um die Racemisierung enantiomerenreiner Hydantoine beim Auflösen zu verhindern, wurde der Tris-Puffer auf einen niedrigen pH-Wert eingestellt. Dazu wurden 0.1 mol (12.11 g) Tris in Reinstwasser gelöst, anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf etwa 2.5 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt.

3.2.4 Tris-Lösung

Mit Reinstwasser wurde eine 0.1 M Trislösung hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösung betrug ca. 10.

3.3 HPLC-Fließmittel

3.3.1 RP-18-Analytik

Für die HPLC-Analytik mit einer RP-18-Trennsäule wurde eine 20%ige Methanollösung in 0.3%iger Phosphorsäure eingesetzt. Dazu wurden 500 ml Methanol zu 2 l Reinstwasser gegeben und anschließend 7 ml 85%ige Phosphorsäure zupipettiert. Die Lösung wurde über 0.45 µm Membranfilter (Nylon, Gelman Science, Deutschland) filtriert.

3.3.2 Chiralanalytik

Für die Chiralanalytik mit einer Cyclodextrin-Trennsäule wurde ebenfalls eine 20%ige Methanollösung in 0.3%iger Phosphorsäure eingesetzt, aber hierfür wurde zusätzlich der pH-Wert auf 3.7 eingestellt. Dazu wurden 500 ml Methanol zu 2 l Reinstwasser gegeben und anschließend 7 ml 85%ige Phosphorsäure zupipettiert. Die Lösung wurde über 0.45 µm Membranfilter (Nylon, Gelman Science, Deutschland) filtriert. Anschließend wurde mit konzentrierter Natronlauge an einer pH-Elektrode ein pH-Wert von 3.7 eingestellt.

3.4 Substratlösungen

3.4.1 D,L-Benzylhydantoin-Lösungen

In einem 100 ml Meßkolben wurden 57 mg (0.3 mmol) **D,L-BnH** in etwa 90 ml 0.1 M Tris-Lösung im Ultraschallbad bei ca. 45 °C gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure bei RT auf 8.5 eingestellt und mit 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 auf das Endvolumen aufgefüllt.

3.4.2 D- und L-Benzylhydantoin-Lösungen

In einem 100 ml Meßkolben wurden 57 mg (0.3 mmol) nach Abschnitt 3.7 (S. 34), hergestelltes, enantiomerenreines **BnH** in etwa 90 ml 0.1 M Tris-Puffer, pH 2.5 im Ultraschallbad bei ca. 45 °C gelöst. Unter diesen Bedingungen konnte über eine Woche hinweg keine Racemisierung des Hydantoins nachgewiesen werden. Unmittelbar vor dem Experiment wurde der pH-Wert mit konzentrierter Natronlauge bei RT auf 8.5 eingestellt und mit 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 auf das Endvolumen aufgefüllt. Durch die Neutralisation der im Überschuß vorliegenden Salzsäure des sauren Tris-Puffers betrug die Natriumchloridkonzentration etwa 0.1 M. Diese Salzkonzentration zeigte keinen Einfluß auf die untersuchten Enzymreaktionen. Die so angesetzte Lösung wurde maximal 30 Minuten lang verwendet, um die Racemisierung auf höchstens 5 % zu begrenzen (siehe 4.3, S. 79).

3.4.3 L-Benzylhydantoin mit Inhibitoren

In einem 100 ml Meßkolben wurden 57 mg (0.3 mmol) **L-BnH** und der Inhibitor gemeinsam eingewogen und im Ultraschallbad bei 45 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 2.5 gelöst. Unmittelbar vor dem Experiment wurde der pH-Wert mit konzentrierter Natronlauge bei RT auf 8.5 eingestellt und mit 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 auf das Endvolumen aufgefüllt. Für Inhibitionsuntersuchungen wurden mehrere Lösungen mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen angesetzt, wobei als höchste Konzentration die Löslichkeitsgrenze des Inhibitors gewählt wurde (siehe 4.5, S. 115). Die so angesetzten Lösungen wurden maximal 30 Minuten lang verwendet.

3.5 Biokatalysatoren

Für eine Großzahl der Umsetzungen wurde eine Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 eingesetzt. Dazu wurde am Institut durch O. May der Mikroorganismus kultiviert und daraus hochgereinigte Hydantoinase isoliert (May, 1998a). Eine immobilisierte D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 stammte ebenfalls aus Beständen des Instituts (Alvarado-Marin, 1997). Die D-Hydantoinasen 1 bzw. 2 wurden von Roche-Diagnostics (Penzberg, Deutschland) bezogen. Tabelle 3.5-1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Hydantoinasen und deren Herkunft.

Tabelle 3.5-1: Verwendete Hydantoinasen und deren Herkunft

Hydantoinase	Herkunft
Aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745, Fraktion Nr. 1 Proteinkonzentration 0.4 g/l Aktivitäten für die Umsetzung von 3 mM L-BnH (D,L-BnH) in 0.1 M-Tris-Puffer, pH 8.5, 37 °C: $A_{\text{spez.}} = 288 \text{ (77.6) U/mg}_{\text{Enzym}}$ $A_{\text{Vol.}} = 115 \text{ (31) U/ml}_{\text{Enzymlösung}}$	Zur Verfügung gestellt von O. May
Aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745, Fraktion Nr. 2 Proteinkonzentration 0.4 g/l Aktivitäten für die Umsetzung von 3 mM L-BnH in 0.1 M-Tris-Puffer pH 8.5, 37 °C: $A_{\text{spez.}} = 605 \text{ U/mg}_{\text{Enzym}}$ $A_{\text{Vol.}} = 242 \text{ U/ml}_{\text{Enzymlösung}}$	
D-Hydantoinase aus <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117, immobilisiert an Eupergit C	Doktor- und Post-Doktorarbeit (Alvarado-Marin, 1997; Schwämmle et al., in prep.)
D-Hydantoinase aus <i>Bacillus thermo-glucosidasius</i> , immobilisiert (rekombinant in <i>Escherichia coli</i>)	Fa. Roche-Diagnostics, Pensberg, Deutschland Produktname: D-Hydantoinase 1
D-Hydantoinase aus <i>Thermus species</i> (rekombinant in <i>Escherichia coli</i>)	Fa. Roche-Diagnostics, Pensberg, Deutschland Produktname: D-Hydantoinase 2, bis zur Homogenität gereinigt und zur Verfügung gestellt von O. May

3.6 Analytik

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Untersuchung von enzymatischen Umsetzungen hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Enantioselektivität. Eine Produktisolierung im präparativen Maßstab war daher nicht geplant und bei Umsetzungen mit niedriger enzymatischer Aktivität auch oft nicht möglich. In einigen Fällen, wie z. B. bei der Identifizierung des Reaktionsproduktes bei der Umsetzung von **BnSI** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 (4.4.8.2, S. 106), konnte das Reaktionsprodukt nur mittels HPLC nachgewiesen werden. In solchen Fällen wurde eine Identifizierung durch Vergleichsmessungen mit synthetisierten Substanzen durchgeführt.

3.6.1 Analytische HPLC

3.6.1.1 HPLC-Anlagen

Für die Analytik mit einer RP-18- bzw. einer chiralen Trennsäule wurden unterschiedliche Anlagen eingesetzt, da zur Charakterisierung von Substanzen in vielen Fällen beide Methoden benötigt wurden.

Anlage 1: Analytik mit RP-18-Trennsäule,
Spectra Series, Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA)

Komponente	Typ
Pumpe	P2000
Autosampler	AS3000
Variabler Wellenlängendetektor	UV1000
Auswertungssoftware	TSP PC 1000
Probenschleife	100 µl

Anlage 2: Analytik mit chiraler Trennsäule,
Spectra Series, Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA)

Komponente	Typ
Pumpe	P100
Autosampler	AS100
Variabler Wellenlängendetektor	UV150
Integrator	Chrom Jet
Probenschleife	20 µl

3.6.1.2 Trennsäulen und Retentionszeiten

Für die qualitative Zuordnung und die quantitative Bestimmung aller für Biotransformationen eingesetzten Substanzen wurden RP-18 Säulen (250*4.6, 5 µm, Sil ODS-1 PE, Firma Grom, Herrenberg, Deutschland) verwendet.

Die Retentionszeiten der Substanzen nahmen mit zunehmender Betriebszeit der Trennsäule stark ab. Die in der Tabelle 3.6-1 (S. 27) zusammengefaßten Retentionszeiten wurden mit einer seit etwa 2 Jahre in Betrieb befindlichen Trennsäule erhalten. Vergleiche mit einer neuen Trennsäule zeigten eine Zunahme der Retentionszeiten von bis zu 70 %.

Tabelle 3.6-1: Retentionszeiten der untersuchten Substanzen auf einer RP-18-HPLC-Trennsäule. Trennbedingungen: F=1.0 ml/min, 20 % Methanol, 80 % 0.3%ige Phosphorsäure (genaue Herstellung siehe 3.3.1 (S. 23)), Detektionswellenlänge: 210 nm

Substanz	Abkürzung	Retentionszeit [min]
2-Benzylbernsteinsäurehalbamid	2BnBHA	18.3
3-Benzylbernsteinsäurehalbamid	3BnBHA	20.0
Benzylbersteinsäurediamid	BnBDA	12.2
Benzylbernsteinsäure	BnBS	43.5
5-Benzyl-Hydantoin	BnH	15.3
Benzyl-Succinimid	BnSI	31.7
5-Benzyl-Tetramsäure	BnTS	24.1
5-Benzyl-2-Thiohydantoin	BnTH	17.9
5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	BOD	26.2
Homophenylalanin	HPhe	16.8
N-Carbamoylhomophenylalanin	CHPhe	44.0
N-Carbamoylneopentylglycin	CNPG	15.3
Carbamoylphenylmilchsäure	CPhM	23.1
N-Carbamoylphenylalanin	CPhe	13.8
N-Carbamoyl-TMS-alanin	CTMSAla	28.0
Neopentylglycin	NPG	7.0
5-Neopentylhydantoin	NPH	24.7
5-Benzyl-3-N-methylhydantoin	3MeBnH	38.8
5-Benzyl-1-N-methylhydantoin	1MeBnH	24.0
N-Methyl-N-carbamoylphenylalanin	CMePhe	22.9
N-Methylphenylalanin	MePhe	9.7
5-(Methylthioethyl)-hydantoin	MTEH	6.7
Phenylalanin	Phe	8.0
5-(Phenylethyl)-hydantoin	PhEH	50.5
5-Phenylhydantoin	PhH	10.3
Phenylmilchsäure	PhM	14.5
Phenylmilchsäureamid	PhMA	11.0
5-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin	TMSMH	35.2

Für die Analytik mit einer chiralen Trennsäule wurde eine Cyclodextrinsäule (Nucleodex β -pm 200/4, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Da die Trennleistung der Säule mit abnehmender Flußrate zunimmt, wurden die meisten Proben bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.2 ml/min gemessen.

Tabelle 3.6-2: Retentionszeiten der untersuchten Substanzen auf einer Cyclodextrin- β -pm-Trennsäule. Trennbedingungen: 20 % Methanol, 80 % 0.3%ige Phosphorsäure, pH 3.7 (genaue Herstellung siehe 3.3.2 (S. 23)), Detektionswellenlänge: 210 nm

Substanz	Abkürzung	R _{t-L} [min]	R _{t-D} [min]	Fließgeschwindigkeit [ml/min]
5-Neopentylhydantoin	NPH	27.0	23.9	0.2
		14.4	12.8	0.5
		9.14	8.13	0.8
N-Carbamoylneopentylglycin	CNPG	nicht detektierbar	4.5	0.8
5-Benzyl-3-N-methylhydantoin	3MeBnH	42.4, 44.7 keine Zuordnung		0.2
5-Benzyl-1-N-methylhydantoin	1MeBnH	10.7	10.0	0.8
5-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin	TSMH	77.0	92.8	0.2
N-Carbamoyltrimethylsilylalanin	CTMSAla	28.2	25.6	0.2
5-Benzyltetraamssäure	BTS	24.0, 26.0 keine Zuordnung		0.2
5-Benzylhydantoin	BnH	43.4	41.5	0.2
		9.2	8.8	0.8
N-Carbamoylphenylalanin	CPhe	27.3	23.4	0.2
		5.4	4.7	0.8
N-Carbamoylhomophenylalanin	CHPhe	49.9	42.2	0.3
5-(Phenylethyl)-hydantoin	PhEH	87.5	84.8	0.3
Carbamoylphenylmilchsäure	CPhM	19.2	18.1	0.2
		7.2	6.5	0.8
Benzylsuccinimid	BnSI	123	110	0.2
		25.0	22.7	0.8
5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	BOD	33.9	28.5	0.8
		62.0	56.5	0.2
3-Benzylbernsteinsäurehalbamid	3BnBHA	45.8	43.1	0.2
		15.1	14.3	0.8
2-Benzylbernsteinsäurehalbamid	2BnBHA	33.8	31.5	0.2
		11.4	10.8	0.8

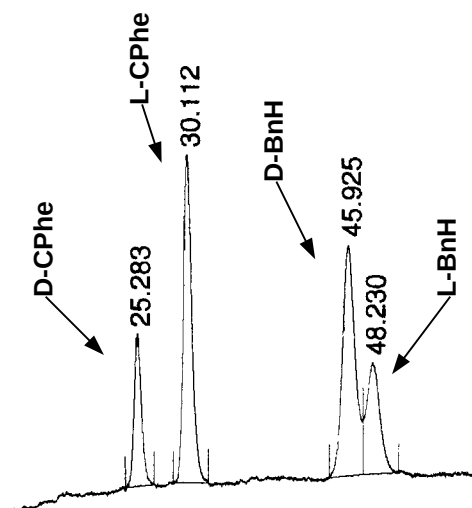


Abbildung 3.6-1: Chiral-HPLC-Messung einer Umsetzung von **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745. Im Gegensatz zum **CPhe** werden die Enantiomere von **BnH** nicht bis zur Basislinie getrennt.

3.6.1.3 Eichgeraden

Für alle Eichungen wurden in Puffer angesetzte Stammlösungen von Substraten und Produkten einer Reaktion derart gemischt, daß alle Proben die gleiche Molsumme enthielten, die identisch mit der Startkonzentration an Substrat der zu untersuchenden Reaktion war. Um ein Verfälschen der Messungen durch das Stoppreagenz auszuschließen, wurden den Eichproben dieselbe Menge (4 % v/v) konzentrierte TFA zugesetzt, die auch zum Abstoppen der Reaktionsproben verwendet wurde. Um den Einfluß der Lagerzeit der Proben im Autosampler der HPLC zu untersuchen, wurden sowohl die Eich- als auch die Reaktionsproben in variierender Reihenfolge gemessen. Dazu wurde z. B. zunächst die zuerst genommene Probe, dann die zuletzt genommene Probe usw. gemessen.

3.6.2 Präparative HPLC

Zur Isolierung einer Substanzmenge einer hydantoinanalogen Verbindung (siehe 3.8.1.1, S. 36) wurde auf der HPLC-Anlage 1 (siehe 3.6.1.1, S. 26) eine präparative RP-18-Trennsäule (250*20, Nucleosil 100 C 18.5 μ , Grom, Herrenberg, Deutschland) bei einem Fluß von 7 ml/min eingesetzt. Die Detektionswellenlänge betrug 210 nm. Als Fließmittel wurde 20%iges Methanol verwendet. Dazu wurde zu 2 l Reinstwasser 500 ml Methanol gegeben und die Mischung über einen 0.45 μ m Membranfilter (Nylon, Gelman Science, Deutschland) filtriert.

Um die etwa 1.5 ml der Reaktionsmischung auf die Trennsäule zu geben, wurde die HPLC-Pumpe gestoppt und über die Fließmittelzufuhr die Reaktionsmischung bis auf einen Rest von wenigen Tropfen bei einem Fluß von 1 ml/min auf die Säule gepumpt. Anschließend wurde der Schlauch wieder in das Fließmittel gehängt, die Pumpe eingeschaltet und der Fluß auf 7 ml/min erhöht. Wenn am Detektor keine Substanz detektiert werden konnte, wurde das Fließmittel in den Vorratsbehälter rückgeführt. Pro detektiertem Peak wurde jeweils eine Fraktion gesammelt. Die ca. 1000 ml produktthaltige Fraktion wurde bei 40 °C im Hochvakuum am Rotationsverdampfer mit zwischengeschalteter Stickstoffkühlfalle bis zur Trockne eingengt.

3.6.3 Charakterisierung von N-Carbamoylaminosäuren mittels HPLC nach nichtenzymatischer Hydrolyse des Hydantoins

Bei qualitativen Untersuchungen, mit denen festgestellt werden sollte, ob ein 5-substituiertes Hydantoin als Substrat akzeptiert wurde, war es nicht unbedingt erforderlich, die erwartete N-Carbamoylaminosäure zu synthetisieren. Für Untersuchungen, bei denen nur das Hydantoin, nicht aber die entsprechende N-Carbamoylaminosäure zur Verfügung stand, wurde für die Zuordnung der HPLC-Peaks eine Probe des Hydantoins hydrolysiert. Analog einer Methode von Cromwell und Stark (1969) wurde zu einer kleinen Menge des Hydantoins in einem 5 ml-Rundkolben soviel 10%ige Natronlauge gegeben, daß sich das Hydantoin vollständig löste. Über Nacht wurde die Lösung bei RT stehen gelassen. Danach konnte mittels HPLC und einer RP-18-Trennsäule der Peak der entstehenden N-Carbamoylaminosäure nachgewiesen werden. Um bei Verunreinigungen den Peak der Carbamoylaminosäure zu identifizieren, wurde die Hydrolysemischung mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 0 angesäuert und kurze Zeit bis zum Kochen erhitzt. Eine zweite HPLC-Messung zeigte dann die Rückreaktion zum Hydantoin.

3.6.4 Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von Hydantoinen ausgehend von Racematen

Für **TMSMH** (4.3, S. 79) mußte die Racemisierungsgeschwindigkeit bestimmt werden, ohne daß enantiomerenreines Hydantoin verfügbar war. Die Voraussetzung für diese Methode war eine bestehende Analytik zum Trennen der beiden Hydantoinenantiomere mittels chiraler HPLC. Da die Anreicherung eines Hydantoinenantiomers enzymatisch erfolgte, mußte eine immobilisierte Hydantoinase verfügbar sein, die dieses Hydantoin enantioselektiv hydrolysierte. Mittels chiraler HPLC wurde die Anreicherung bestimmt und nach dem Entfernen des Immobilisats die Racemisierungsgeschwindigkeit des Hydantoins verfolgt. Dazu wurde eine kleine Probe des racemischen Hydantoins in einem Eppendorfgefäß 1 ml 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 gelöst und der pH-Wert bei RT kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Der Lösung wurde in dem selben Puffer

gewaschene immobilisierte Hydantoinase zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nachdem mittels chiraler HPLC ein Enantiomerenüberschuß des Hydantoins nachgewiesen werden konnte, wurde das Immobilisat durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand wurde weiterhin bei 37 °C inkubiert. Stündlich wurden 100 µl Proben entnommen, die sofort in HPLC-Probegläschen gefüllt und mit 900 µl Fließmittel verdünnt wurden, um den pH-Wert zu erniedrigen und damit die weitere Racemisierung zu unterdrücken. Aus der Annäherung der Flächen der getrennten Enantiomerenpeaks wurde die Halbwertszeit bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der halben Peakflächendifferenzen zur Ausgangsfläche logarithmiert und über der Racemisierungszeit aufgetragen. Durch lineare Regression wurde die Halbwertszeit der Racemisierung aus der Steigung der Geraden erhalten (Berechnung siehe 3.6.5.2, S. 32).

3.6.5 Polarimetrie

Für alle Drehwertmessungen wurde ein Polarimeter (Model 341, Perkin-Elmer Bodenseewerk, Überlingen, Deutschland) mit variabler Detektionswellenlänge verwendet. Um die Empfindlichkeit der Messungen zu erhöhen, wurden Filter für den UV-Bereich eingesetzt. Die kürzeste Wellenlänge, die zur Verfügung stand, betrug 253 nm. Mit einer 50 mm langen Durchflußküvette aus Quarzglas mit einem Volumen von 90 µl wurde das Polarimeter bei einer Wellenlänge von 253 nm als zusätzlicher HPLC-Detektor eingesetzt. Für alle anderen polarimetrischen Messungen wurde eine thermostatisierbare Quarzglasküvette (100 mm, 1 ml) verwendet. Zur kontinuierlichen Datenaufnahme wurde das Polarimeter über eine serielle Schnittstelle mit einem PC verbunden. Die Daten wurden als Textdatei gespeichert und mit einem Tabellenkalkulationsprogramm weiterverarbeitet.

3.6.5.1 Bestimmung der spezifischen molaren Drehwerte

Alle Stoffmengen wurden in Konzentrationen umgerechnet. Deshalb wurde im Gegensatz zu der sonst üblichen Angabe des spezifischen Drehwerts der spezifische, molare Drehwert verwendet. Alle spezifischen molaren Drehwerte wurden in einer 100 mm langen Meßküvette bei konstanter Temperatur, pH-Wert und Pufferkonzentration bestimmt, üblicherweise bei 37 °C, pH 8,5 in 0.1 M Tris-Puffer.

Somit wurde $\langle \alpha \rangle$ folgendermaßen berechnet:

$$\langle \alpha \rangle = \frac{\alpha_{obs}}{c} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

$\langle \alpha \rangle$	spezifischer molare Drehwert [°/mM]
α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
c	Konzentration der Substanz [mM]

Um die spezifischen molaren Drehwerte möglichst genau zu erhalten, wurden Maßlösungen hergestellt, deren Wägefehler unter einem Prozent lag. Da enantiomerenreine Hydantoine bereits beim Ansetzen der Lösungen racemisieren, wurden die Maßlösungen bei saurem pH-Wert, wie unter 3.4.2 (S. 23) beschrieben, hergestellt. Die polarimetrische Messung wurde dann unmittelbar nach der Einstellung des pH-Werts durchgeführt.

Die absoluten Beträge der spezifischen molaren Drehwerte aller untersuchten Hydantoine und N-Carbamoylaminosäuren stiegen dramatisch bei der Verwendung kürzerer Wellenlängen. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Messungen und zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde möglichst kurzwelliges Licht eingesetzt. Da aber bei allen Hydantoinen auch die spezifische Extinktion mit abnehmender Wellenlänge zunahm, führte dies zu einem erhöhten Rauschen der Meßwerte. Daher bildete die üblicherweise verwendete Wellenlänge von 296 nm ein Kompromiß zwischen diesen beiden Effekten.

Eine Zusammenfassung der spezifischen molaren Drehwerte befindet sich im Anhang unter 8.2 (S. 162).

3.6.5.2 Messung der Racemisierung von Hydantoinen

Zur polarimetrischen Messung der Racemisierung von enantiomerenreinen Hydantoinen wurde eine Lösung des enantiomerenreinen Hydantoins in Tris-Puffer hergestellt (3.4.2, S. 23). Ein Vorteil an dieser Methode ist, daß zur Bestimmung der Halbwertszeit der freien Racemisierung eine Kenntnis des spezifischen molaren Drehwerts nicht nötig ist. Ebenso wenig muß der Enantiomerenüberschuß des Hydantoins zu Beginn der Messung bekannt sein. Bei den Messungen wurde der Drehwert üblicherweise über mehrere Stunden hinweg verfolgt. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten als Verhältnis zum Startdrehwert zu Meßbeginn logarithmiert und über der Meßzeit aufgetragen. Aus der Steigung k wurde nach folgender Beziehung die Halbwertszeit der freien Racemisierung berechnet.

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \qquad \text{Gleichung 3-2}$$

$T_{1/2}$	Halbwertszeit der Racemisierung [s]
k	Steigung der Regressionsgeraden [1/s]

Eine Auflistung der Racemisierungsgeschwindigkeiten der Hydantoine befindet sich in Tabelle 4.3-1 (S. 79).

3.6.6 Charakterisierungen

NMR-Messungen:

Die NMR-Messungen wurden entweder dankenswerter Weise von Dipl.-Chem. Richard J. Smith, Universität Zürich, Schweiz oder am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart durchgeführt. Als Meßfrequenzen wurden 250, 300 und 500 MHz für die ^1H -NMR-spektroskopischen Messungen und 60, 75 und 125 MHz für die ^{13}C -NMR-spektroskopischen Messungen verwendet.

Elementaranalysen, Massenspektren, Infrarotspektren:

Diese Analysen wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Zürich, Schweiz oder am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart gemessen.

Fourier-Transform-Infrarotspektren:

Alle FT-IR-Messungen wurden freundlicherweise von Dipl.-Chem. Björn Schmid, Institut für Physikalische Chemie der Universität Stuttgart, durchgeführt.

Schmelzpunkte:

Alle Schmelzpunkte wurden am eigenen Institut bestimmt.

3.7 Synthesen von Hydantoinen und N-Carbamoylaminosäuren

Alle in 5-Position substituierten Hydantoine wurden nach einer am Institut optimierten Vorschrift synthetisiert (Dukin, Dudley, 1914; Vielhauer, 1995). Ausgehend von enantiomerenreinen oder racemischen Aminosäuren wurden die Carbamoylaminosäuren durch Umsetzung mit Kaliumcyanat erhalten. Aus den Carbamoylaminosäuren wurden die Hydantoine durch Behandlung mit Salzsäure hergestellt.

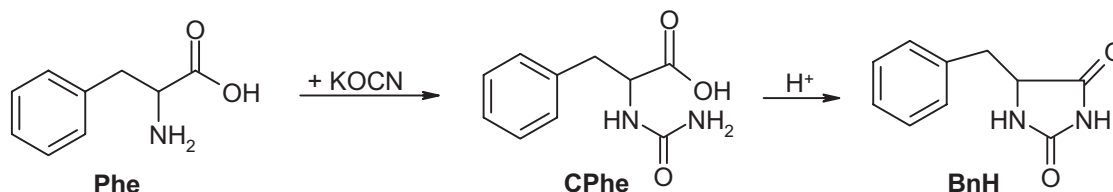


Abbildung 3.7-1: Synthese von 5-Benzylhydantoin aus Phenylalanin über N-Carbamoylphenylalanin

Standardvorschrift:

Zu einer Lösung von 50 mmol der Aminosäure in 34 ml Wasser wurden 55 mmol (4.46 g) Kaliumcyanat gegeben und 30 Minuten auf 80 °C erwärmt. Die klare Lösung wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml verdünnt. Anschließend wurde die Carbamoylaminosäure durch Ansäuern mit 95 ml 0.5 M Salzsäure ausgefällt. Nach dem Absaugen des voluminösen, farblosen Niederschlags mittels einer Vakuumpumpe wurde fünfmal mit je 20 ml Wasser gewaschen und die Reinheit mittels HPLC, NMR und Elementaranalyse bestimmt.

Zur Synthese des Hydantoins wurden 34 mmol der Carbamoylaminosäure in 68 ml Wasser gegeben und unter Rühren und Rückfluß mit 27 ml 32%iger Salzsäure erhitzt, bis die Lösung klar war. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 5 °C stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Kristalle abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Bei der Herstellung größerer Mengen Benzylhydantoin lagerte sich Wasser in die Kristalle ein. Die genaue Zusammensetzung betrug $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Um das Kristallwasser zu entfernen, wurde das Hydantoin aus Ethanol umkristallisiert.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 3.7-1 zusammengestellten Hydantoine synthetisiert. Die Charakterisierung der Hydantoine und die Bestimmung der Reinheit erfolgten mittels EA, NMR, HPLC und FP.

Tabelle 3.7-1: Charakterisierung der synthetisierten Substanzen

Substanz	Formel	Mol- masse	Ausbeute [%] (Lit.)	Charakterisierung ^{a)}	Löslichkeit pH 3 / 8.5 [mM]	FP (Lit.)
L-BnH	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	190	87.5	EA, FP, HPLC	3 / 10 ^{b)}	(175)
D-BnH	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	190	89.0	EA, FP, HPLC	3 / 10 ^{b)}	(175)
L-CPhe	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	208	73.7	EA, FP, HPLC	n.b.	(175- 207)
D-CPhe	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	208	83.0	EA, FP, HPLC	n.b.	(175- 207)
L-NPH	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	170	95.0	¹ H-, ¹³ C-NMR, FP	0.5 / n.b.	(-)
L-CNPG	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	188	89.0 (-)	¹ H-, ¹³ C-NMR, FP	n.b.	(-)
D,L-PhEH	C ₉ H ₈ N ₂ O ₂	176	79 (-)	EA, HPLC	n.b.	168 (165- 169)
L-PhEH	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	176	n. b (-)	EA, HPLC	n.b.	(-)
D,L-C-HPhe	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂	222	57 (-)	EA, HPLC	n.b.	179- 180 (D:196- 198)
L-C-HPhe	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂	222	63 (-)	EA, HPLC	n.b.	(-)

a) Daten für EA und NMR siehe Tabelle 3.7-2 und Tabelle 3.7-3

b) die Löslichkeit der Racemate ist doppelt so groß

Tabelle 3.7-2: Elementaranalysen der synthetisierten Substanzen, in Klammern stehen die berechneten Werte [%]

	C	H	O	N
L-BnH	63.63 (62.82)	5.33 (5.27)	- (17.26)	14.72 (14.65)
D-BnH	63.05 (62.82)	5.30 (5.27)	- (17.26)	14.60 (14.65)
L-NPH	56.47 (56.45)	8.26 (8.29)	- (18.80)	16.29 (16.46)
L-CNPG	51.02 (51.05)	8.56 (8.57)	- (25.50)	14.70 (14.88)
D,L-PhEH	64.68 (64.69)	5.58 (5.92)	- (15.67)	13.63 (13.72)
D,L-CHPhe	58.44 (61.36)	4.81 (4.58)	- (18.16)	14.84 (15.90)

Tabelle 3.7-3: NMR-Daten

Substanz, Lösungsmittel	Charakterisierung ^{13}C -NMR	Charakterisierung ^1H -NMR
L-NPH , DMSO- d_6	$\delta=177.3, 158.1$ (2 CO); 55.9 (CH); 46.5 (CH_2); 30.4 (C_{tert}); 29.9 (3 CH_3)	$\delta=10.60$ (s, 1H, NH); 7.83 (s, 1H, NH); 3.98 (m, 1H, CH); 1.71 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.2, 2.6$ Hz); 1.32 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.2, 9.1$ Hz); 0.91 (s, 9H, CH_3)
L-CNPG , DMSO- d_6	$\delta=176.0, 158.3$ (2 CO); 50.3 (CH); 45.9 (CH_2); 30.7 (C_{tert}), 29.9 (3 CH_3)	$\delta=12.32$ (s, 1H, OH); 6.10 (d, 1H, NH, $J=8.8$ Hz); 5.49 (s, 2H, NH_2); 4.11 (m 1H, CH); 1.58 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.1, 3.4$ Hz); 1.35 (dd, 1H CH_2 , $J=14.1, 9.2$ Hz); 0.9 (s, 9H CH_3)

3.8 Synthesen von Hydantoinanaloga

Die meisten der im folgenden beschriebenen Synthesen sind literaturbekannt. Bei Synthesen, die analog der Literatur durchgeführt wurden, und bei starken Abweichungen von den literaturbekannten Synthesevorschriften wird die gesamte Darstellung im Detail beschrieben.

3.8.1 Variationen in der 1-Position

3.8.1.1 L-N-Methyl-N-carbamoylphenylalanin (CMePhe) und D,L-5-Benzyl-1-N-methylhydantoin (D,L-1MeBnH)

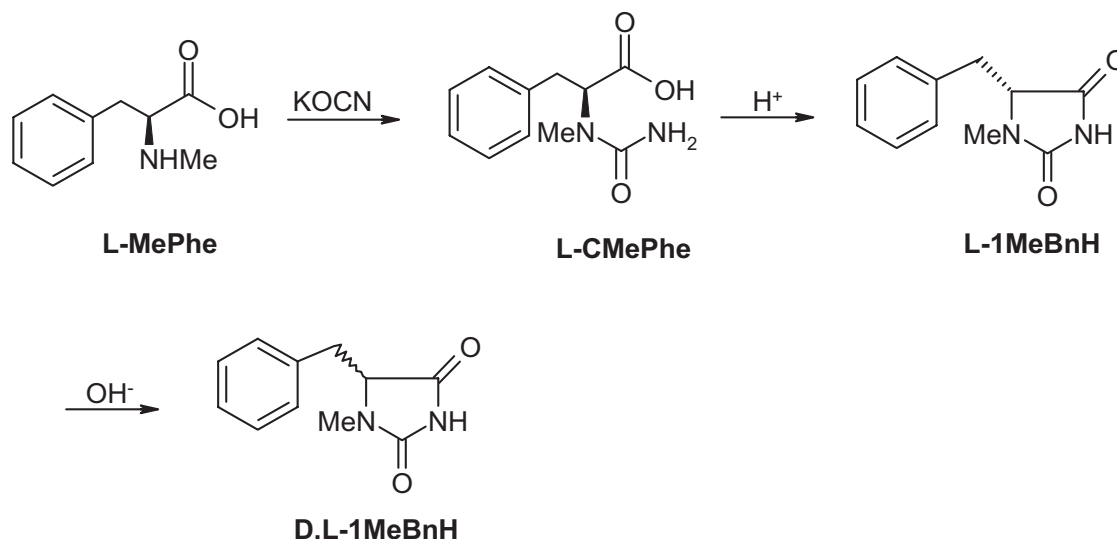


Abbildung 3.8-1: Reaktionsschema zur Synthese von D,L-5-Benzyl-1-N-methylhydantoin

5-Benzyl-1-N-methylhydantoin (**1MeBnH**) wurde bereits 1928 als Hydrolyseprodukt bei der Umsetzung von Benzylcreatinin mit Bariumhydroxid beschrieben (Nicolet, Rousset, 1928). Ausgehend von 2-Brompropionsäure, N-Methylamin und Kaliumcyanat gelang es, N-Methyl-N-Carbamoylalanin und 1-N-Methyl-5-methylhydantoin (1,5-Dimethylhydantoin) in einem Reaktionsansatz darzustellen (Gabriel, 1906). Die gleichen Verbindungen wurden ausgehend von N-Methyl-N-carbamoylalanin mit Kaliumcyanat nach einer der Synthese von Hydantoinen aus Aminosäuren (siehe 3.7, S. 34) ähnlichen Methode hergestellt (Rousset et al., 1980). In keiner der Vorschriften wird jedoch die Isolierung der als Zwischenprodukt auftretenden N-Methyl-N-carbamoylaminosäure beschrieben.

Ausgehend von diesen literaturbekannten Synthesen wurden in dieser Arbeit N-Methyl-N-Carbamoylphenylalanin (**CMePhe**) und **1MeBnH** synthetisiert. Dazu wurden 100 mg (0.56 mmol) der Aminosäure in etwa 2 ml Reinstwasser mit 50 mg (0.62 mmol) Kaliumcyanat als Suspension auf 80 °C erhitzt. Nach etwa 30 Minuten war die Lösung klar. Nach einigen Stunden weiteren Erhitzen, wurde die Reaktionsmischung über Nacht eingefroren. Zu diesem Zeitpunkt konnte mittels HPLC ein Umsatz von ca. 90 % der Aminosäure bestimmt werden. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur mit Salzsäure auf einen pH-Wert nahe unter 5 angesäuert. 5 Minuten später fielen farblose Kristalle aus. Nach dem Waschen der Kristalle mit viel Wasser wurden 10 mg (0.04 mmol) feinfaserige Kristalle von **L-CMePhe** erhalten. Eine HPLC-Probe der Kristalle, die in HPLC-Fließmittel aufgelöst wurden, zeigte eine Zusammensetzung von etwa 95 % **L-C1MePhe** und 5 % **L-1MeBnH**. Die Aminosäure konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Deswegen wurden die Kristalle nicht weiter gereinigt. Das entspricht einer Ausbeute von 7 %. Die Analysedaten von **CMePhe** sind in *Tabelle 3.8-4* (S. 52) zusammengefaßt.

Um aus **L-CMePhe** **L-1MeBnH** herzustellen, wurde zu etwa 1 mg der Carbamoylaminosäure 1 ml Wasser und 1 ml konzentrierte Salzsäure gegeben und kurze Zeit bis zum Rückfluß erhitzt. Eine Messung mit der chiralen HPLC zeigte, daß der ursprüngliche Peak der Carbamoylaminosäure verschwunden war. Dafür hatte die Fläche des Peaks von **L-1MeBnH** stark zugenommen. Die Reaktionsmischung wurde am Hochvakuum bis zur Trockne eingengt und ergab ca. 1 mg **L-1MeBnH**, das nicht weiter charakterisiert wurde.

Die Bestimmung der Enantioselektivität der Enzyme erfolgte mit dem Racemat von **1MeBnH** (4.4.6, S. 100 und 3.8.1.1, S. 36), zu dessen Herstellung einige Kristalle des L-Hydantoin in 1.5 ml 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 gelöst und über Nacht bei 37 °C racemisiert wurden. Anschließend wurde mittels chiraler HPLC die vollständige Racemisierung nachgewiesen (Abbildung 3.8-2). Diese Lösung wurde für alle enzymatischen Untersuchungen eingesetzt.

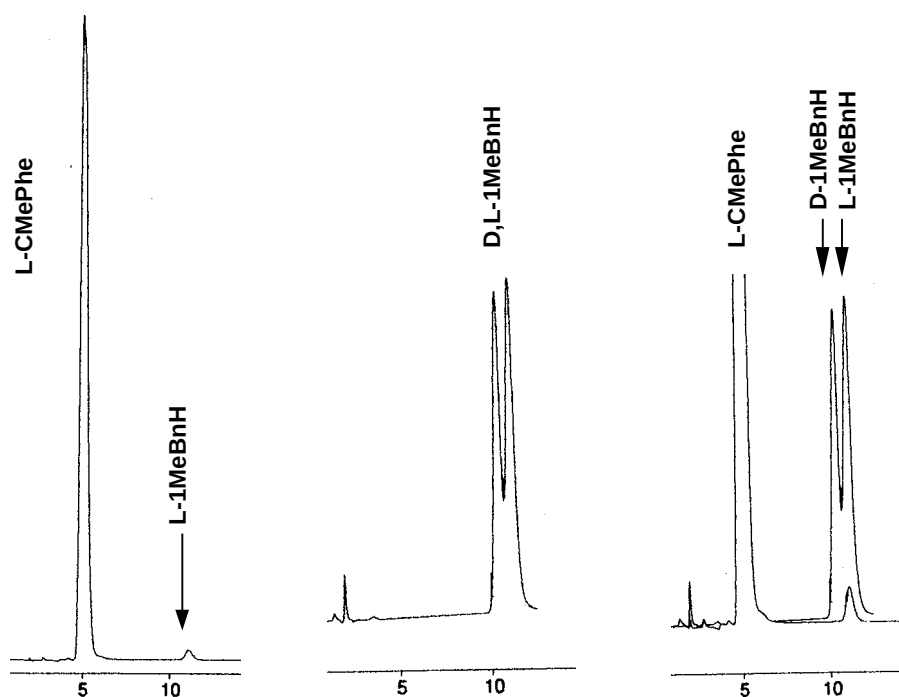


Abbildung 3.8-2: Chiral-HPLC-Chromatogramme der Synthese von **D,L-1MeBnH** aus **L-CMePhe**: Links: **L-CMePhe** mit einer geringen Menge **L-1MeBnH**. Mitte: Umsetzung von **L-CMePhe** mit Salzsäure und anschließender Racemisierung. Rechts: Zuordnung der Enantiomere von **1MeBnH** durch Vergleich beider Chromatogramme.

Da bis dahin noch unklar war, ob mittels chiraler HPLC auch die Enantiomere von **D,L-CMePhe** getrennt werden konnten, wurde versucht, im alkalischen Medium das L-Hydantoin zu racemisieren und gleichzeitig zur D,L-Carbamoylaminosäure zu hydrolysieren. Dazu wurden einige Kristalle von **L-1MeBnH** in 10%iger Kalilauge gelöst

und einige Stunden auf 37 °C erwärmt. Eine Messung mit der chiralen HPLC-Säule zeigte das entstandene Racemat des Hydantoins und nur *einen* weiteren Peak, der die gleiche Retentionszeit wie **L-CMePhe** hatte. Daraus wurde geschlossen, daß die Chiralsäule nicht in der Lage ist, die beiden Enantiomere der Carbamoylaminosäure unter den oben genannten Meßbedingungen zu trennen. Die Charakterisierungen von **L-CMePhe** und **L-1MeBnH** sind in *Tabelle 3.8-3* (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.1.2 D,L-5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (D,L-BOD)

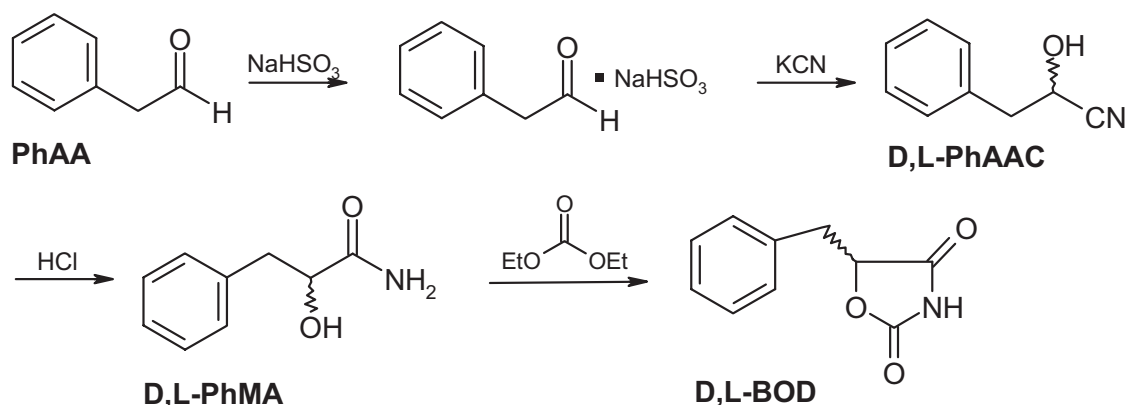


Abbildung 3.8-3: Reaktionsschema zur Synthese von D,L-5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion

5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (**BOD**) wurde analog einer Literaturvorschrift (Ruggli, Hegedüs, 1942) synthetisiert. Dazu wurden zu 41.9 ml (45.4 g, 389 mmol) Phenylacetaldehyd eine Lösung von 90.8 g (873 mmol) Natriumhydrogensulfit in 180 ml Wasser gegeben. Die Mischung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur mit einem KPG-Rührer gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung abgenutscht und der Feststoff nacheinander mit 25 ml Wasser, 115 ml Ethanol und 115 ml Diethylether gewaschen. Das weiße Produkt wurde über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid getrocknet. Es wurden 105 g Phenylacetaldehyd-Hydrogensulfitaddukt erhalten.

Die Synthese von **PhAAC** wurde analog zur selben Vorschrift durchgeführt. Dazu wurde in einen 2 l 3-Hals-Rundkolben mit KPG-Rührer und Gasableitungsrohr eine Lösung von 102.9 g (1.581 mol) Kaliumcyanid in 340 ml Wasser gegeben. Unter Rühren und Eiskühlung wurde portionsweise über eine Stunde 105 g Phenylacetaldehyd-Hydrogensulfitaddukt zugegeben. Nach 4-stündigem Rühren bei 0° C wurden 570 ml Wasser zugegeben und weitere 15 Minuten ohne Kühlung gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung dreimal mit je 230 ml Ether ausgeschüttelt. Danach wurden die vereinigten Etherphasen erst mit Natriumhydrogensulfitlösung, anschließend mit Wasser, gesättigter Natriumcarbonatlösung und nochmals mit Wasser gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Etherphase wurde zur besseren Kristallbildung mit 2 Tropfen

konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und im Rotationsverdampfer bei 50 °C eingengt. Anschließend wurde im Hochvakuum der größte Teil des Lösungsmittels abgezogen. Zurück blieb ein gelbes, dickflüssiges Öl, das über Nacht bei -20° C aufbewahrt wurde. Bei dieser Lagerung bildeten sich einige Kristalle. Bei weiterer Entfernung von Lösungsmittel im Hochvakuum bei Raumtemperatur erstarrte das Öl. Diese Mischung wurde mit 24 ml n-Hexan verrieben und die Kristalle abgenutscht. Der Schmelzpunkt der Kristalle betrug 49° C (Literatur 58° C). Nachdem das **PhAAC** aus Toluol umkristallisiert und über Paraffin und Phosphorpentoxid getrocknet wurde, betrug der Schmelzpunkt der schwachgelben Kristalle 56° C. Es wurden 26.1 g (177 mmol) **PhAAC** erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 50 % des theoretischen Wertes bezogen auf **PhAA**.

Zur Synthese von **PhMA** erfolgte nach einer am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart im Arbeitskreis von Prof. Effenberger optimierten Methode. Dazu wurde in einem 1 l Rundkolben zu 26.1 g (177 mmol) **PhAAC** 354 ml konzentrierte Salzsäure gegeben und bei RT stark gerührt, bis sich nach etwa 10 Minuten alles Edukt gelöst hatte. Nach weiteren 15 Minuten wurde die Reaktionsmischung auf 3.5 l Eis-Wasser-Mischung filtriert und mit konzentrierter Natronlauge neutralisiert. Da keine Möglichkeit gefunden wurde, das Amid zu extrahieren, wurde in einem 2 l Rundkolben im Rotationsverdampfer das Wasser bei 65° C Badtemperatur entfernt. Nach der Extraktion des festen Rückstands mit Aceton wurde nach der Entfernung des Lösungsmittels 35.47 g Rohprodukt erhalten. Dieses wurde fraktionsweise aus 1 l Toluol umkristallisiert. Nach dem Trocknen über Paraffin wurden 21.8 g (132 mmol) fettig aussehende, weiße Kristallplättchen von **PhMA** erhalten. Der Schmelzpunkt betrug 111 - 112° C und entsprach genau dem Literaturwert (Kwong et al., 1965). Die Ausbeute betrug 75 % der Theorie bezogen auf das eingesetzte **PhAAC**.

Die Cyclisierung zu **BOD** wurde analog einer Synthesevorschrift für 5-substituierte Oxazolidine durchgeführt (Wallingford et al., 1945). Dazu wurde zu 21.8 g (132 mmol) **PhMA** und 19 ml (158 mmol) Kohlensäurediethylester soviel trockenes Methanol gegeben, bis sich das Amid vollständig löste. Zur Synthese von Natriummethanolat wurde unter Rühren und Rückflußkühlung zu 55.5 ml (1.3 mol) trockenem Methanol 3.31 g (148 mmol) Natrium gegeben. Nachdem die Methanolatlösung auf 35 °C abgekühlt war, wurde die Lösung des Amids zugegeben und die Reaktionsmischung bei 52 °C gerührt. Mittels DC (Fließmittel: Ethylacetat + Petrolether, 1:1) wurde nachgewiesen, daß nach 60 Minuten Reaktionszeit das gesamte Amid umgesetzt worden war. Die Reaktionsmischung wurde eingengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und zweimal mit Ether extrahiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei sich das Produkt in öligen Tröpfchen absetzte. Danach wurde dreimal mit insgesamt 600 ml Diisopropylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Als Rohausbeute blieben 24.4 g (128 mmol) weißer Feststoff zurück. Die Umkristallisation aus Toluol ergab 19.7 g (103 mmol) weiße Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 87 °C (Literatur 100 °C). Das entspricht einer Ausbeute von 75 %

der Theorie bezogen auf das **PhMA**. Die Gesamtausbeute über alle Synthesestufen betrug 26 % der Theorie. Der Schmelzpunkt stimmte nicht mit den Literaturdaten überein: 105 °C (Stadlbauer, Kappe, 1985), 100 °C (Aspelund, 1936; Aspelund, 1939; Aspelund, 1938). In beiden Artikeln wird **BOD** aus Benzylbarbitursäure durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid gewonnen. In der Publikation von Stadlbauer und Kappe wurde **BOD** mittels Schmelzpunkt, Elementaranalyse und IR charakterisiert. Die beschriebenen IR-Daten (Tabelle 3.8-1) zeigten keine Übereinstimmung mit eigenen Messungen. Sowohl die NMR-Spektren als auch die Elementaranalyse zeigten jedoch die Identität und Reinheit des synthetisierten **BOD**. Daher ist anzunehmen, daß in den genannten Publikationen eine andere Verbindung synthetisiert wurde.

Tabelle 3.8-1: Vergleich der Charakterisierung von **BOD** mittels IR mit Literaturdaten

IR-Messung (KBr-Preßling) [cm^{-1}]	IR-Messung (KBr-Preßling) (Literaturwerte) (Stadlbauer, Kappe, 1985) [cm^{-1}]
3320 m, 2910 w, 1890 vw, 1830 s, 1720 s, 1530 m	3150 m, 2980 m, 1810 m, 1740 sh, 1730 s, 1510 w

Die Charakterisierungen von **D,L-BOD** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.1.3 D,L-5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (D,L-POD)

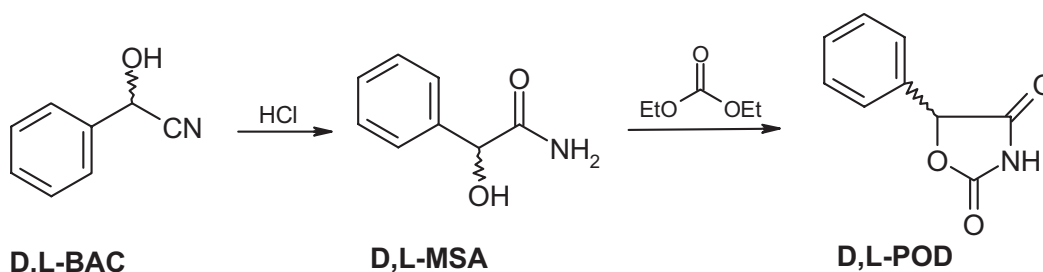


Abbildung 3.8-4: Reaktionsschema zur Synthese von D,L-5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion

Die Darstellung von 5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (**POD**) erfolgte nach der gleichen Methode wie die Synthese von **BOD** (3.8.1.2). Da Benzaldehydcyanhydrin (**BAC**) käuflich erhältlich ist, wurde ausgehend von dieser Verbindung das Mandelsäureamid (**MSA**) nach einer am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart im Arbeitskreis von Prof. Effenberger optimierten Methode hergestellt. Dazu wurde zu 13 g (98 mmol) **D,L-BAC** bei 0 °C 196 ml vorgekühlte konzentrierte Salzsäure gegeben. **D,L-BAC** löste sich nach etwa 20 Minuten vollständig. Die hellgelbe Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Als ein weißer Niederschlag von **D,L-MSA** ausfiel, wurde die Reaktion abgebrochen, indem die Mischung auf 2 Liter Eis-Wasser-Mischung gegossen wurde. Nach dem Neutralisieren mit 10 M Natronlauge wurde das Wasser bei 60 °C Badtemperatur am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Zu dem

Rückstand wurden 500 ml Aceton gegeben und über Nacht stehen gelassen. Danach wurde die Mischung 30 Minuten unter Rückfluß erhitzt und anschließend das Aceton im Vakuum abgezogen. Das Rohprodukt wurde aus 1 Liter Toluol fraktionsweise kristallisiert. Es wurden 9.3 g (63 mmol) fettig glänzende Kristallplättchen mit einem Schmelzpunkt von 131 °C (Literatur: 133-134 °C) erhalten. Die Ausbeute an **D,L-MSA** betrug 67 % der Theorie.

Zur Synthese von **POD** aus **MSA** wurde wie auch bei der Synthese von **BOD** die Methode von Wallingford et al. (1945) angewendet (3.8.1.2, S. 39). Dafür wurde zu 8.5 ml (8.3 g, 70 mmol) Kohlensäurediethylester 9.2 g (61 mmol) Mandelsäureamid gegeben. Zum vollständigen Lösen wurden 25 ml trockenes Methanol zugegeben und erwärmt. In einem 250 ml 2-Hals-Rundkolben mit Rückflußkühler wurde 1.5 g (64 mmol) Natrium unter Rühren in 22.3 ml trockenem Methanol gelöst. Nachdem sich die Lösung abgekühlt hatte, wurde die Mandelsäureamidlösung unter Rühren zugegeben. Die Reaktionslösung erstarrte zu einer weißen Masse, verflüssigte sich aber nach Erhitzen der Reaktionsmischung auf 50° C wieder. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (Fließmittel: Ethylacetat + Petrolether, 1:1) verfolgt. Selbst nach 2,5 Stunden wurde noch Edukt gefunden. Da ein dritter Fleck auftauchte (Nebenprodukt?), wurde die Mischung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand unter Kühlung in Wasser aufgenommen. Durch Extraktion mit Diethylether wurde noch vorhandenes Edukt entfernt. Die Wasserphase wurde mit 10%iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 4 angesäuert. Dabei fiel ein farbloser Stoff aus, der abgesaugt, mit 100 ml Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 8.61 g (49 mmol) **D,L-5-POD** mit einem FP von 106° C (Literaturwert: 108° C (Aspelund, 1936)). Die Ausbeute an **D,L-POD** betrug 80 % der Theorie bezüglich des Amids. Über die gesamte Synthese betrug die Ausbeute 50 % bezogen auf **BAC**. Die Charakterisierungen von **D,L-POD** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.1.4 D,L-Benzylsuccinimid (D,L-BnSI)

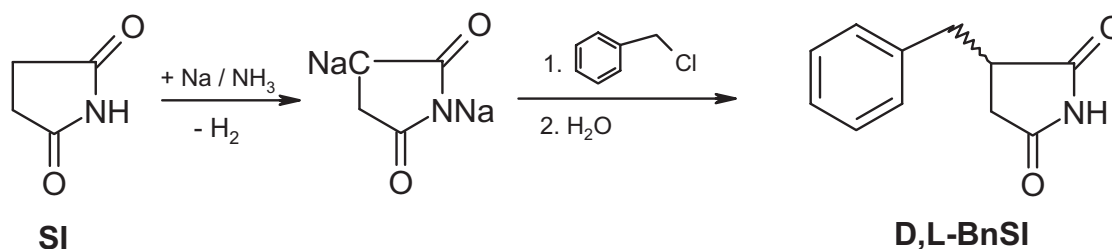


Abbildung 3.8-5: Reaktionsschema der Synthese von Benzylsuccinimid

Benzylsuccinimid (**BnSI**) wurde aus Succinimid (**SI**) nach einer Literaturvorschrift zur generellen Synthese von 2-Benzylsuccinimiden in identischer Ansatzgröße wie für das beschriebene 5-Methoxybenzylsuccinimid hergestellt (Goehring et al., 1991). Da nach 6 Stunden das Natrium im Ammoniak nicht zum Amid umgesetzt war, wurden entspre-

chend einer Literaturvorschrift (Bergstrom, Fernelius, 1933) kleine Mengen Kaliumiodid und Eisenoxid-hydrat zugegeben. Danach entfärbte sich die blaue Lösung. In Abweichung zur Vorschrift wurde aus einer Ethanol-Wasser-Mischung umkristallisiert, da bei der in der Vorschrift verwendeten Mischung von Ethylacetat und Heptan keine Kristallisation eintrat. Die Ausbeute betrug 7.15 g (38 mmol) hellgelbe Kristalle **BnSI**, was 35 % der Theorie entspricht. Der Schmelzpunkt betrug 86 °C. Der Literaturwert für die Umkristallisation aus Ethanol beträgt 94 °C (Matsuda, Matsuda, 1957). Mittels HPLC konnten neben dem Peak von Succinimid noch die 2 Peaks der beiden Benzylbernsteinsäurehalbamide (**2BnBHA**, **3BnBHA**) nachgewiesen werden. Unter der Annahme, daß die Halbamide ähnliche Extinktionskoeffizienten wie das **BnSI** besitzen, betrug die Verunreinigung durch die Halbamide etwa jeweils 5 %. Das erklärt auch den niedrigen Schmelzpunkt und das Abweichen der Elementaranalyse von den berechneten Werten. Die Charakterisierungen von **D,L-BnSI** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.1.5 D,L-5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion (**D,L-BnTD**)

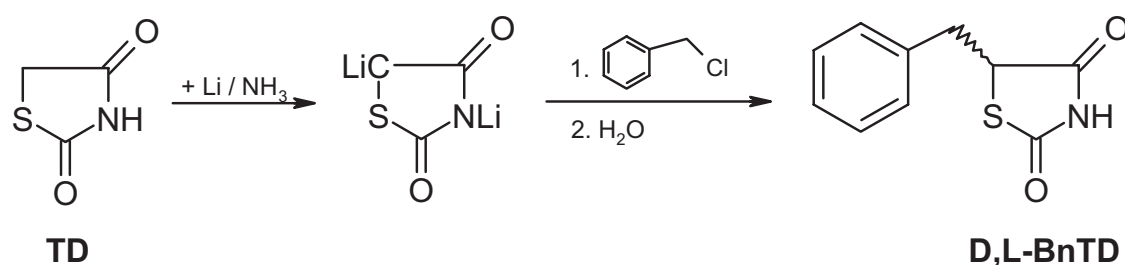


Abbildung 3.8-6: Reaktionsschema der Synthese von 5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion

5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion (**BnTD**) wurde nach einer Vorschrift (Talyor, Wolfe, 1971) in identischer Ansatzgröße hergestellt. Wie in dieser Vorschrift beschrieben, wurde das Lithiumamid nach der Methode von Dunnivant und Hauser (1960) hergestellt. Nach der Aufarbeitung der Reaktionsmischung wurden 2.7 g (Literatur: 11.6 g) hellgelbes Öl isoliert. Mittels DC (Fließmittel: Petrolether + Ethylacetat, 1+1) konnten neben **BnTD** noch Verunreinigungen von Thiazolidindion ($R_f=0.47$), Benzylchlorid ($R_f=0.83$) und vermutlich Benzylalkohol ($R_f=0.67$) nachgewiesen werden. Da noch Edukt nachgewiesen werden konnte, die Rohausbeute aber viel geringer als in der Literaturvorschrift war, wurde davon ausgegangen, daß die Reaktionszeit zu gering war. Laut Vorschrift wurden das ölige Rohprodukt mit etwas Petrolether versetzt. Dabei bildeten sich Kristalle. Durch Umkristallisation aus Toluol und Petrolether konnte das Thiazolidin entfernt werden. Um die beiden anderen Verunreinigungen abzutrennen, wurde das Produkt entgegen der Literaturvorschrift über eine Kieselgelsäule chromatographiert, als Fließmittel wurde eine Mischung von Petrolether und Ethylacetat (1+1) verwendet. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurden 895 mg farblose Kristalle erhalten. Bei einer Untersuchung dieser Kristalle mittels DC konnte nachgewiesen werden, daß immer noch eine Verunreinigung des **BnTD**, vermutlich durch Benzylalkohol, vorlag. Deshalb wurde erneut über eine Kieselgelsäule chromatographiert. Als

Fließmittel wurde allerdings eine Mischung aus Methylenchlorid und Methanol (99 + 1 V/V) verwendet. Danach zeigte eine Untersuchung mittels DC nur noch den Fleck des **BnTD**. Nach dem Einengen wurden 426 mg (2 mmol) **D,L-BnTD** erhalten, was einer Ausbeute von 3 % entspricht (Literatur: 56 %). Der Schmelzpunkt betrug 70 °C (Literatur: 103 °C aus Ethanol + Wasser). Mittels DC und HPLC konnte **BnTD** als einheitliches Produkt nachgewiesen werden. Die Charakterisierungen von **D,L-BnTD** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.2 Variationen in der 3-Position

3.8.2.1 D,L-5-Benzyl-3-N-methylhydantoin (D,L-3MeBnH)

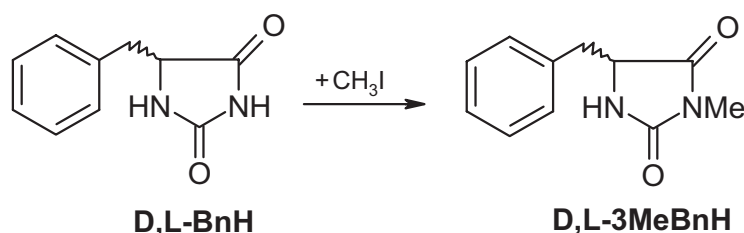


Abbildung 3.8-7: Reaktionsschema der Synthese von **3MeBnH**

Analog einer Vorschrift (Hoffmann, C., 1950) wurde zur Synthese von D,L-5-Benzyl-3-N-Methylhydantoin (**D,L-3MeBnH**) zu 834 mg (4.5 mmol) **D,L-BnH** in einer Stickstoffatmosphäre 2.25 ml einer 2 M Kaliumhydroxidlösung in 80%igem wäßrigen Methanol gegeben. Anschließend wurden nochmals 2.25 ml Methanol zugegeben und solange gerührt, bis sich das gesamte Hydantoin gelöst hatte. Danach wurden 0.28 ml Methyljodid zugeben und 36 Stunden bei 60 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Eine HPLC-Probe zeigte, daß die Umsetzung nicht quantitativ verlief. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Der Feststoff wurde anschließend mit 22 ml Wasser versetzt und erhitzt. Beim Abkühlen fielen Kristalle aus, die abgenutscht und über Phosphorpentoxid getrocknet wurden. Nach einer Untersuchung mittels HPLC konnte eine Verunreinigung des Produkts mit maximal 2 % **BnH** nachgewiesen werden. Es konnten 367 mg (1.8 mmol) **D,L-3MeBnH** isoliert werden (Ausbeute 40 %). Die farblosen Kristalle wurde mit ¹H- und ¹³C-NMR charakterisiert und hatten einen Schmelzpunkt von 139 °C (Literatur: 125 - 130 °C (Fujiwara et al., 1980)). Die Charakterisierungen von **D,L-3MeBnH** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.2.2 D,L-5-Benzyltetramsäure (D,L-BnTS)

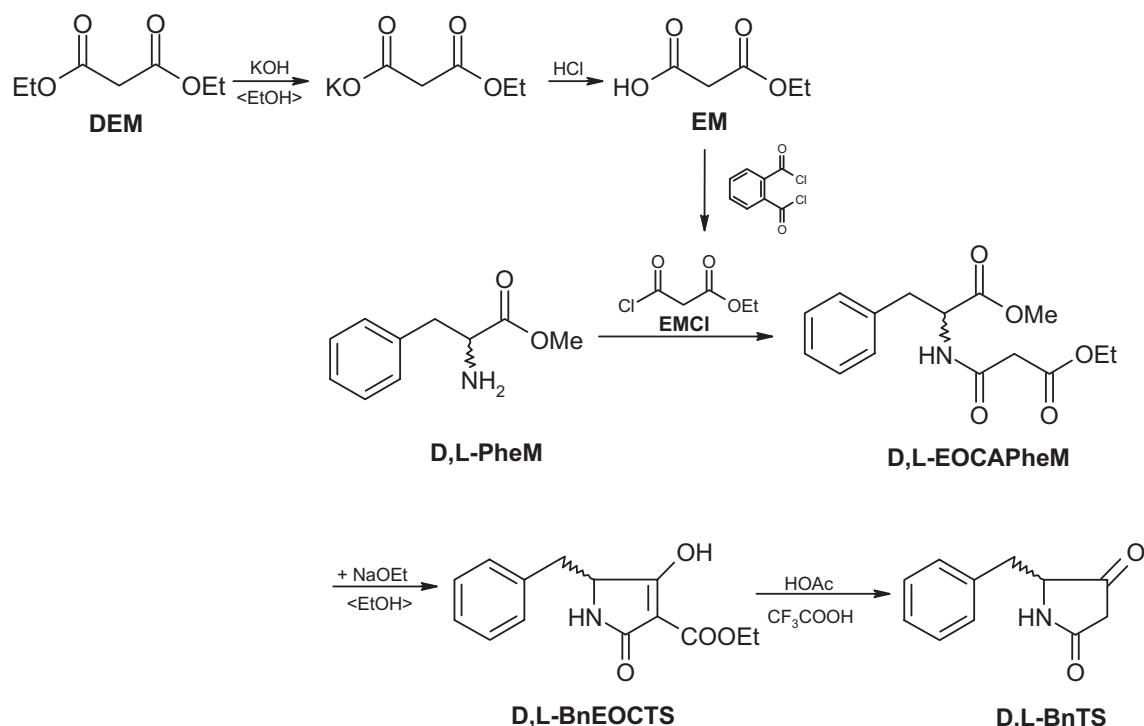


Abbildung 3.8-8: Reaktionsschema der Synthese von D,L-5-Benzyltetramsäure

Zur Synthese von D,L-5-Benzyltetramsäure (**D,L-BnTS**) wurde zunächst Ethylmalonylchlorid (**EMCl**) nach einer Literaturvorschrift synthetisiert (Breslow et al., 1944). Dazu wurde zu 100 ml absolutes Ethanol in einem 2-l-3-Hals-Rundkolben mit Tropftrichter und Rückflußkühler 100 ml (105.5 g, 660 mmol) Diethylmalonat (**DEM**) gegeben. Unter heftigem Rühren wurde dazu eine Lösung von 37 g (660 mmol) Kaliumhydroxid in 400 ml absolutem Ethanol zugetropft. Die Mischung wurde 4 Stunden gerührt, anschließend wurde sie über Nacht bei RT stehen gelassen. Danach wurde die Mischung unter Rückfluß erhitzt, dabei löste sich der gesamte Niederschlag auf. Deshalb konnte, im Gegensatz zur Vorschrift, auf das Abnutschen des Dikaliummalonats verzichtet werden. Die Lösung wurde unter Rühren auf RT abgekühlt, wobei das Monokaliumsalz wieder ausfiel. Nachdem die Mischung über Nacht bei 8 °C in den Kühlschrank gestellt worden war, wurden die farblosen Kristalle abgesaugt und mit wenigen ml Diethylether gewaschen. Die Mutterlauge wurde im Rotationsverdampfer auf ¼ des Volumens eingengt und ebenfalls nochmals bei 8 °C der Kristallisation überlassen. Die farblosen Kristalle wurden im Vakuum vom restlichen Lösungsmittel befreit und ergaben 88.7 g (522 mmol) Kaliummonoethylmalonat. Die Ausbeute betrug 79 % (Literaturausbeute: 82 %). Anschließend wurde unter Rühren und Eiskühlung zu diesem Feststoff langsam 46 ml konzentrierte Salzsäure getropft. Danach wurde die Reaktionsmischung mit 3 mal 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten Etherphasen über Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der farblose, flüssige Rückstand noch einige Stunden im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Es wurden 51.2 g (433 mmol) Ethylmalonat (**EM**) erhalten. Die Ausbeute betrug

83 % bezogen auf das Monokaliumsalz (Literatur: 96 % (Breslow et al., 1944)). Zur Chlorierung des **EM** wurde in einen 250 ml Rundkolben 111 g (544 mmol) Phthaloylchlorid vorgelegt. Bei 100 °C wurden das **EM** über eine halbe Stunde zugetropft, wobei stark gerührt wurde. Dabei entwickelte sich eine große Menge Chlorwasserstoff. Nach weiterem 2-stündigen Rühren bei 105 °C wurde mit einer Vigreuxkolonne das Ethylmalonylchlorid abdestilliert, wobei sich ein Teil des Produktes zersetzte, was an der Entwicklung einer großen Menge von Chlorwasserstoffgas erkennbar war. Es wurden 3 Fraktionen **EMCl** erhalten. Da sich mittels DC (Fließmittel: Methylenchlorid) bei allen Fraktionen mehrere Flecken zeigten, die nicht zugeordnet werden konnten, wurde erneut im Vakuum destilliert.

Tabelle 3.8-2: Ausbeuten und Literaturvergleich der Vigreux-Destillation von EMCl

Destillation	Ausbeute [%]	Fraktion	Druck [Torr]	Temperatur [°C]
1	78	11.5 g (76 mmol)	32-39	80
		37.5 g (248 mmol)	46	87
		1.8 g (12 mmol)	22	89
2	58	38.0 252 mmol)	25-35	70-80
Literatur	75		22	83

Ausgehend von Phenylalaninmethylester (**PhM**) wurde **BnTS** analog mehrerer Literaturvorschriften synthetisiert, (Jones, Sumaria, 1978; Jones et al., 1990; Mulholland et al., 1972; Lowe, Yeung, 1973), in denen für die Darstellung verschiedener Tetramsäuren einzelne Syntheseschritte unterschiedlich genau beschrieben werden.

Zur Synthese von Ethoxycarbonylacetylphenylalaninmethylester **EOCAPHM** aus **PhM** wurden zu einer Lösung von 25 g (116 mmol) **PhM** in 80 ml 50%iger wäßriger Kaliumcarbonatlösung (w/w) über 2 Stunden unter Eiskühlung 17.5 g (116 mmol) **EMCl** zugetropft. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei abgeschaltetem Rührer stehengelassen. Danach wurde die Reaktionsmischung drei mal mit je 20 ml Diethylether extrahiert, die Etherphase mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Ethers am Rotationsverdampfer wurden 21.55 g gelbe, hochviskose Flüssigkeit erhalten. Eine DC dieser Flüssigkeit zeigte mit Methylenchlorid als Fließmittel 4 Flecken ($R_f = 0.54, 0.4, 0.31, 0.0$). Da im Gegensatz zur Literaturvorschrift bei 8 °C keine Kristallbildung beobachtet werden konnte, wurde das Produkt über eine Kieselgelsäule mit Methylenchlorid chromatographiert. Mit dieser Methode konnten nur 200 mg Produkt isoliert werden. Da noch die Hauptmenge des Produkts auf dem Kieselgelträger adsorbiert sein mußte, wurde das Säulenmaterial aus der Säule entfernt und durch Ausschütteln mit insgesamt 20 l Methylenchlorid extrahiert. Nach Einengen wurden 7.59 g (26 mmol) gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 61 °C erhalten (Literatur: 54 – 58 °C (Jones, Sumaria, 1978)). Die Ausbeute von **EOCAPHM** betrug 22 % bezogen auf das eingesetzte **PhM**.

Zur Darstellung von **BnEOCTS** wurde in einen 100 ml Rundkolben zu 38 ml Toluol 7.59 g (26 mmol) **PhM** gegeben. Die Mischung wurde auf 60 °C erwärmt und unter Rühren das Edukt gelöst. Zur Herstellung von Natriumethanolat wurden zu 15 ml absolutem Ethanol 0.8 g Natrium gegeben. Nachdem sich das Natrium vollständig gelöst hatte, wurde die Mischung auf RT abgekühlt und zu der Lösung von **EOCAPHM** in Toluol gegeben. Nach 4-stündigem Erhitzen unter Rückfluß wurde die braune, klebrige Masse über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend mit 25 ml Wasser versetzt. Nach etwa 30-minütigem heftigen Rühren wurde die wäßrige Phase abgetrennt und zweimal mit Diethylether gewaschen und anschließend mit 50%iger Schwefelsäure angesäuert (pH 0), worauf sich eine ölige Verbindung abtrennte. Nach 2 Stunden war aus der öligen Verbindung eine spröde, gelbbraune Masse geworden, in der Lösung befanden sich zudem noch cremefarbene Kristallnadeln. Nach dem Abnutschen des Feststoffs und anschließendem Trocknen über Phosphorpentoxid wurden 3.56 g (14 mmol) **BnEOCTS** erhalten. Die Ausbeute betrug 54 % (Literatur: 40 %), bezogen auf das **EOCAPHM**. Der Schmelzpunkt betrug 116 °C (Literatur: 120 °C (Jones, Sumaria, 1978)).

Zur Decarboxylierung wurden 3.56 g (14 mmol) **BnEOCTS** in eine Mischung von 36 ml Eisessig und 3.6 ml TFA gegeben, dabei löste sich die Tetramsäure unter Rühren vollständig. Die Lösung wurde eine Stunde unter Rückfluß erhitzt, dabei trat eine Gasentwicklung auf. Anschließend wurde die Mischung im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit 14 ml Diethylether versetzt. Die trübe Lösung wurde über Nacht bei 5 °C stehen gelassen, dabei fielen 2 g (11 mmol) Benzyltetramsäure als beiger Feststoff aus, das entspricht einer Ausbeute von 79 % bezogen auf das eingesetzte **EOCAPHM** (Literatur: 95 %), bzw. 10 % über die gesamte Synthese bezogen auf das eingesetzte **PhM**. Der Schmelzpunkt der beigen Kristalle betrug 133 - 136 °C, der Literaturwert beträgt 136 °C (Jones et al., 1990). Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Diethylether konnten keine Kristalle mit höherem Schmelzpunkt isoliert werden. Nach Literaturangaben hat bereits die unsubstituierte, reine Tetramsäure eine gelbe Farbe (Römpp, 1995). Untersuchungen mittels DC und HPLC zeigten nur eine Substanz. Die Charakterisierungen von **D,L-BnTS** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.3 Sonstige Variationen

3.8.3.1 5-Benzyl-2-thiohydantoin (BnTH)

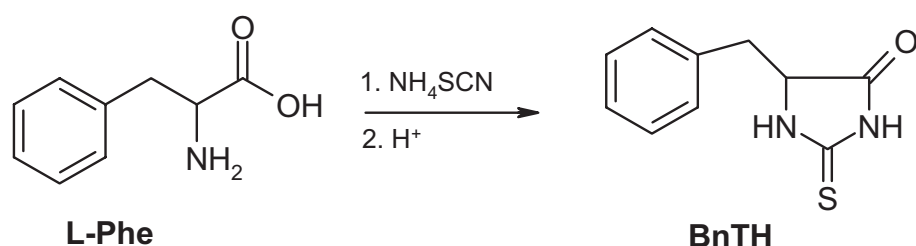


Abbildung 3.8-9: Reaktionsschema der Synthese von 5-Benzyl-2-Thiohydantoin

Analog einer Literaturvorschrift (Cromwell, Stark, 1969) wurde zu einer Mischung aus 10 ml Essigsäureanhydrid und 1.3 ml Eisessig 0.91 g (12 mmol) Ammoniumthiocyanat und 1.65 g (10 mmol) L-Phenylalanin gegeben und 90 Minuten bei 100 °C erhitzt. Die gelbe Lösung wurde im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedunstet und zum Rückstand bei Raumtemperatur 200 ml konzentrierte Salzsäure gegeben. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten gerührt und danach wieder bis zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde in heißem Wasser gelöst, beim Abkühlen auf Raumtemperatur fielen Kristalle aus, die abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen wurden. Es wurden 1.5 g (6.8 mmol) farblose Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 172 °C (Literatur 182 °C) isoliert, das entspricht einer Ausbeute von 57 % (Literatur: 87 %). Mittels HPLC konnte ein einheitliches Produkt nachgewiesen werden. Die Verbindung wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe 3.8.4, S. 51). Die Charakterisierungen von **BnTH** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.3.2 D,L-Benzylbernsteinsäure (D,L-BnBS) und D,L-Benzylbernsteinsäureanhydrid (D,L-BnBA)

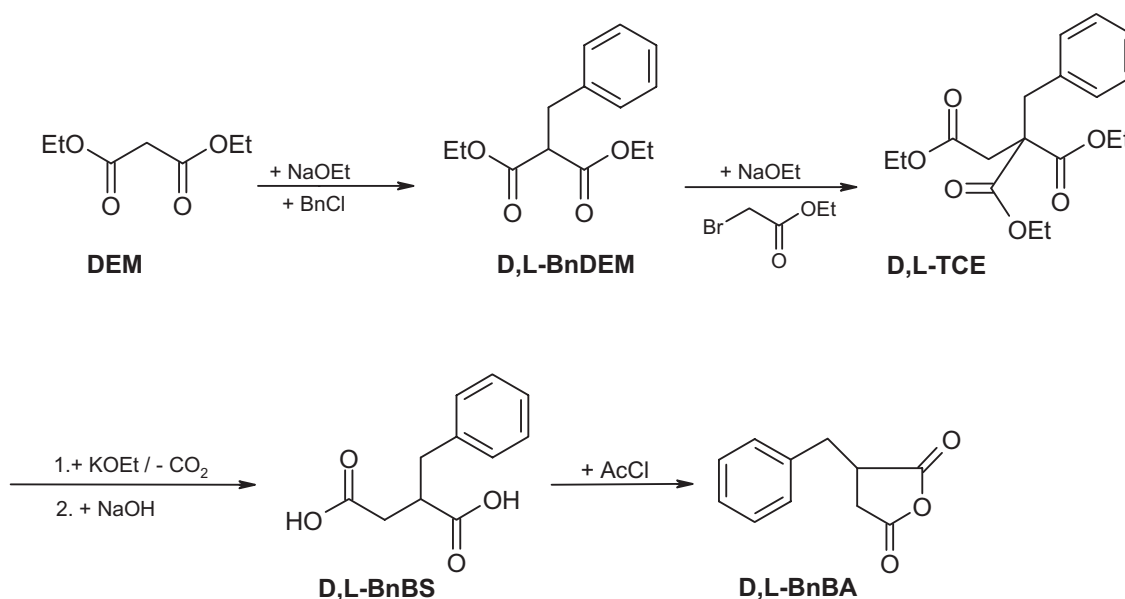


Abbildung 3.8-10: Reaktionsschema der Synthese von D,L-Benzylbernsteinsäureanhydrid

Benzylbernsteinsäure (**BnBS**) wurde unter Verwendung von mehreren Literaturvorschriften synthetisiert (Ramart-Lucas, 1932; Fittig, 1890; Cohen, Milovanovic, 1968).

Zur Synthese von 2-Benzyl-diethylmalonat (D,L-**BnDEM**) wurde zunächst Natriumethanolat hergestellt. Dazu wurden in einem 250 ml Rundkolben mit Rückflußkühler 5.3 g (230 mmol) Natrium in kleinen Portionen in 90 ml absolutem Ethanol gelöst. Danach wurde auf RT abgekühlt und 35 ml (36.9 g, 230 mmol) Diethylmalonat (**DEM**) zugegeben. Die Mischung wurde eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurden bei 65 °C 29 g (230 mmol) Benzylchlorid schnell zugetropft, dabei fiel Natriumchlorid aus. Nach 4 Stunden wurde die Reaktionsmischung im Rotationsverdampfer eingedunstet und dreimal mit etwa 150 ml Diethylether extrahiert. Die gelartige Masse wurde abgenutscht und die vereinigten Etherphasen mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Rotationsverdampfer eingedunstet. Der ölige Rückstand wurde im Vakuum über eine Vigreux-Kolonne bei einem Druck von 2 Torr destilliert. Bei einem Siedepunkt von 95 °C wurden 7.2 g (29 mmol) **D,L-BnDEM** erhalten (Literatur: 169 °C, 12 Torr). Die Ausbeute betrug 13 % (Literatur: 60 %).

Da die Ausbeute an **D,L-BnDEM** bei diesem Ansatz sehr gering war, wurde die Synthese in einem größeren Ansatz wiederholt. Dazu wurde aus 28.2 g (1.22 mol) Natrium und 480 ml Ethanol Natriumethanolat hergestellt und nach der oben beschriebenen Vorschrift mit 186 ml (1.22 mol) **DEM** und 154 g (1.22 mol) Benzylchlorid umgesetzt. Die Ausbeute betrug 41.61 g (166 mmol) **BnDEM** (14 %, 90-95 °C / 2 Torr).

Zur Darstellung vom Tricarbonsäureester (**D,L-TCE**) wurden zu 100 ml absolutem Ethanol 4.5 g (195 mmol) Natrium gegeben. Nachdem sich das Metall vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung auf RT abgekühlt und über einen Tropftrichter 48.8 g (195 mmol) **BnDEM** zugetropft. Anschließend wurden unter Eiskühlung 32.7 g (195 mmol) Bromessigsäureethylester zugetropft, dabei fiel ein weißer Niederschlag von Natriumbromid aus. Nach der Zugabe wurde die Lösung über Nacht auf 100 °C erhitzt. Mittels DC (Fließmittel: Methylenchlorid) konnte anschließend immer noch Edukt nachgewiesen werden. Deshalb wurden nochmals unter Eiskühlung 7 g (42 mmol) Bromessigsäureethylester zugegeben und weitere 6 Stunden bei 100 °C erhitzt. Eine weitere Untersuchung der Reaktionsmischung mittels DC zeigte, daß immer noch Edukt vorhanden war, daraufhin wurde die Reaktionsmischung im Rotationsverdampfer eingengt und der dickflüssige Rückstand mit der dreifachen Menge Diethylether versetzt. Diese Etherlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Rotationsverdampfer eingengt.

Zur Umsetzung des **TCE** zum Trikaliumsalz wurde Kaliummethanolat statt Kaliumhydroxid eingesetzt. Da bei dieser Reaktion nicht der Ester gespalten wurde, sondern eine Decarboxylierung des **TCE** zu Benzylbernsteinsäurediethylester eintrat, wurde die Reaktionslösung eingengt und der ölige Rückstand im Vakuum über eine Vigreux-Kolonne destilliert. Es wurden 15.6 g (75 mmol) Benzylbernsteinsäurediethylester erhalten (114 – 127 °C bei 0.08 – 0.1 Torr, Literatur: 169 – 171 °C bei 5 Torr (Cohen, Milovanovic, 1968)). Die Ausbeute betrug 38 % bezogen auf das eingesetzte **BnDEM**.

Die Verseifung des Benzylbernsteinsäurediethylesters wurde nach einer Vorschrift von Cohen und Milovanovic (1968) durchgeführt. Dazu wurden 10.8 g (41 mmol) des Diesters in 115 ml Ethanol gelöst. Zu der Lösung wurden 115 ml 1 M Natronlauge gegeben und die Mischung 18 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit der 5-fachen Menge Diethylether extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit 2 M Salzsäure auf pH 0 angesäuert, dabei trübte sich die Lösung. Danach wurde dreimal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Ethers im Rotationsverdampfer wurden 10.7 g (40.6 mmol) D,L-Benzylbernsteinsäure (**D,L-BnBS**) erhalten. Die Ausbeute betrug 99 % (Literatur 85 %). Der Schmelzpunkt der weißen Kristalle betrug 154 °C (Literatur: 161 °C), wobei diese Bestimmung sehr schwierig war, da die Säure beim Erhitzen Wasser abspaltete und das entstandene Anhydrid einen geringeren Schmelzpunkt besitzt.

Benzylbernsteinsäureanhydrid (**BnBA**) wurde nach einer Literaturvorschrift aus Organic Synthesis (Fieser, Martin, 1943) hergestellt. Dazu wurde zu 2 g (9.6 mmol) **BnBS** 2.2 ml Acetylchlorid (2.4 g, 31 mmol) gegeben. Die Mischung wurde 90 Minuten unter Rückfluß und Rühren im kochenden Wasserbad erhitzt, dabei löste sich nach etwa 10 Minuten die Säure vollständig auf. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und unter Schütteln und Kühlen die etwa 10-fache Menge Wasser zugegeben. Die dabei ausfallenden Kristalle wurden abgutscht und unter Rückfluß in Diethylether gelöst. Innerhalb von drei

Tagen fielen aus dieser Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ farblose Kristalle aus. Diese wurden abgenutscht und an der Luft getrocknet. Es wurde 544 mg (2.8 mmol) **D,L-BnBS** erhalten, der Schmelzpunkt betrug $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Literatur: $118\text{ }^{\circ}\text{C}$), die Ausbeute 28 % (Literatur: 93 %). Die Charakterisierungen von **D,L-BnBA** und **D,L-BnBS** sind in Abschnitt 3.8.4 (S. 51) zusammengefaßt.

3.8.4 Zusammenfassung der Synthesedaten

Tabelle 3.8-3: Charakterisierung der synthetisierten Substanzen

Substanz (Abk.)	Formel	Molmasse [g/mol]	Ausbeute [%] (Lit.) [*]	Charakterisierung	Löslichkeit pH3 / 8.5 [mM]	FP [$^{\circ}\text{C}$] (Lit.)	siehe
L-Carbamoyl-N-methylphenylalanin L-CMePhe	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$	222.2	8 (-)	EA	n.b.	(-)	3.8.1.1 S. 36
L-5-Benzyl-1-N-methylhydantoin L-1MeBnH	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	204.2	n. b. (-)	RP-18, chirale HPLC (Methode 3.6.3, S. 30)	n.b.	126-129 (106)	3.8.1.1 S. 36
5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion D,L-BOD	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$	191.2	26 (-)	EA, ^1H , FP	n.b.	87 (-)**	3.8.1.2 S. 39
5-Phenyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion D,L-POD	$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_3$	177.2	80 (-)	EA, ^1H , FP	n.b.	106 (108)	3.8.1.3 S. 41
Benzylsuccinimid D,L-BnSI	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	189.2	35 (-)	^1H , ^{13}C , HPLC, FP, EA	> 9	90 (94)	3.8.1.4 S. 42
5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion D,L-BnTD	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$	207.3	3 (57)	^1H , ^{13}C	n.b.	73-76 (103)	3.8.1.5 S. 43
5-Benzyl-3-N-methyl-hydantoin D,L-3MeBnH	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	204.2	40 (-)	^1H , ^{13}C , HPLC, FP	n.b.	139 (125-141)	3.8.2.1 S. 44
5-Benzyltetramsäure D,L-BnTS	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	189.2	10 (-)	^1H , ^{13}C , MS: $(\text{MH}^+)=190.1$ g/mol, HPLC, FP	3	133-136 (126-140)	3.8.2.2 S. 45
5-Benzyl-2-thiohydantoin BnTH	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$	206.3	57 (87)	^1H , ^{13}C , HPLC, FP	hydrolysiert im Puffer bei pH 8.5	178-180 (175-180)	3.8.3.1 S. 48
Benzylbernsteinsäureanhydrid D,L-BnBA	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$	190.2	28 (93)	^{13}C , FP, EA	hydrolysiert im Puffer bei pH 8.5	94 (95-102)	3.8.3.2 S. 49
Benzylbernsteinsäure D,L-BnBS	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$	208.2	4 (47)	^1H , ^{13}C , HPLC, FP	n.b.	154 [#] (157-163)	3.8.3.2 S. 49

^{*} Die Literaturwerte einiger Synthesen sind nicht verfügbar, da die Literaturvorschrift für die Synthese ähnlicher Verbindungen verwendet wurden.

^{**} die Literaturwerte sind vermutlich fehlerhaft (siehe Tabelle 3.8-1, S. 41)

[#] Der Schmelzpunkt war nicht genau bestimmbar, da sich durch Wasserabspaltung das Anhydrid bildete.

Tabelle 3.8-4: Elementaranalysen der synthetisierten Substanzen, in Klammern sind berechnete Werte angegeben [%]

	C	H	O	N	S
L-CMePhe	59.39 (59.45)	6.32 (6.35)	- (21.60)	12.63 (12.60)	
D,L-BOD	62.94 (62.82)	4.73 (4.74)	- (25.21)	7.33 (7.23)	
D,L-POD	60.04 (61.02)	3.90 (3.98)	- (27.09)	7.87 (7.91)	
D,L-BnSI	70.14 (69.83)	5.91 (5.86)	- (16.91)	7.05 (7.40)	
D,L-BnTD	59.59 (57.95)	4.47 (4.38)	- (15.44)	6.58 (6.76)	- (15.47)
D,L-3MeBnH	64.44 (64.69)	5.89 (5.92)	- (15.64)	13.70 (13.72)	
D,L-BnTS	68.76 (69.83)	5.92 (5.86)	- (16.91)	7.08 (7.40)	
BnTH	58.14 (58.23)	4.91 (4.89)	- (7.76)	13.49 (13.58)	15.38 (15.54)
D,L-BnBS	68.54 (69.40)	5.40 (5.26)	- (25.24)		

Tabelle 3.8-5: NMR-Daten

Substanz, Lösungsmittel	Charakterisierung ^{13}C -NMR	Charakterisierung ^1H -NMR
D,L-BOD , CDCl_3	$\delta=172.5$ (CO), 153.9 (CO); 132.9 , 129.7 , 128.8 , 127.8 (Ph); 81.3 (CH); 36.5 (CH_2)	$\delta=8.17$ (s, 1H, NH); 7.36 - 7.21 (m, 5H, Ph); 5.08 (dd, 1H, CH, $J=5.8$, 4.4 Hz); 3.33 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.8$, 4.3 Hz); 3.16 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.8$, 5.7 Hz)
D,L-POD , CDCl_3	n.b.	$\delta=8.86$ (s, 1H, NH); 7.43 (m, 5H, Ph), 5.8 (s, 1H, CH)
D,L-BnSI ,* CDCl_3	$\delta=177.0$ (CO), 180.0 (CO); 127.1 , 128.9 , 129.0 , 137.1 (Ph); 42.7 (CH); 36.2 (Bn- CH_2); 34.4 (CH_2)	$\delta=7.22$ - 7.30 (m, 5H, Ph); 3.21 (1H, CH); 3.14 ; 2.88 (2H, Bn- CH_2); 2.67 ; 2.41 (2H, CH_2);
D,L-BnTD , CDCl_3	$\delta=174.5$, 170.74 (2 CO); 135.8 , 129.2 , 128.9 , 127.7 (Ph); 53.5 (CH); 38.6 (CH_2)	$\delta=7.17$ - 7.38 (m, 5H, Ph); 4.54 (dd, 1H, CH, $J=9.9$, 3.9 Hz); 3.56 (dd, 1H, CH_2 , $J=14.1$, 3.9 Hz); 3.13 (dd 1H CH_2 , $J=14.0$, 9.9 Hz)
D,L-3MeBnH , DMSO-d_6	$\delta=180.0$, 157.1 (2 CO); 135.9 , 129.9 , 128.4 , 127.1 (Ph); 57.7 (CH); 36.9 (CH_2); 24.2 (CH_3)	$\delta=8.17$ (s, 1H, NH); 7.14 - 7.28 (m, 5H, Ph); 4.35 (dt, 1H, CH, $J=5.2$, 1.2 Hz); 2.94 (m, 2H, CH_2); 2.64 (s, 3H, CH_3)
D,L-BnTS , CDCl_3	$\delta=206.5$, 170.6 (2 CO); 135.2 , 129.4 , 129.0 , 127.5 (Ph); 65.2 (C-3); 40.8 (C-5), 38.3 (Bn- CH_2)	$\delta=7.14$ - 7.36 (m, 5H, Ph); 6.59 (s, 1H, NH); 4.25 (dd, 2H, CH_2 (C-3)), $J=8.2$, 2.4 Hz), diese Signale fehlten bei Messung in TFA; 3.17 (dd 1H, CH, $J=13.9$, 4.0); 2.67 - 2.99 (m, 2H, Bn- CH_2)
BnTH , DMSO-d_6	$\delta=182.6$ (CO), 176.0 (CO); 135.4 , 130.0 , 128.5 , 127.2 (Ph); 61.7 (CH); 36.0 (CH_2)	$\delta=11.41$ (s, 1H, NH); 10.03 (s, 1H, NH); 7.14 - 7.29 (m, 5H, Ph); 4.54 (dt, 1H, CH $J=4.9$, 0.9 Hz); 2.97 (d, 2H, CH_2 , $J=5$ Hz)
D,L-BnBA ,* CD_3OD	$\delta=173.2$ (CO), 169.6 (CO); 135.8 , 129.2 , 128.9 , 127.6 (Ph); 36.00 (Bn- CH_2); 42.1 (CH); 32.9 (CH_2)	$\delta=7.22$ - 7.30 (m, 5H, Ph); 3.45 (1H, CH); 3.24 ; 3.02 (2H, Bn- CH_2); 2.95 ; 2.72 (2H, CH_2)
D,L-BnBS ,* CDCl_3	$\delta=178.0$ (1-CO), 175.6 (2-CO); 139.9 , 130.1 , 129.5 , 127.6 (Ph); 44.4 (CH) 38.6 (Bn- CH_2); 35.9 (CH_2)	$\delta=7.22$ - 7.30 (m, 5H, Ph); 3.04 (1H CH); 3.02 ; 2.81 (2H, Bn- CH_2); 2.56 ; 2.36 (2H, CH_2)

* für Kopplungskonstanten siehe (Fischer et al., in prep.)

3.9 Synthesen von Vergleichssubstanzen

Um auch bei sehr geringen Umsatzraten später Produkte zuordnen zu können, wurden Standards möglicher Reaktionsprodukte synthetisiert und ebenso wie die Reaktionsansätze per HPLC vermessen. Die Identifizierung der jeweiligen Reaktionsprodukte erfolgte durch Zuordnung der Peaks. Zur Synthese der analytischen Standards wurden dabei teilweise sehr kleine Reaktionsansätze gemacht. Die Charakterisierung der einzelnen Verbindungen wird jeweils im Anschluß an die Synthese genau beschrieben.

3.9.1 Synthese von D-N-Carbamoyltrimethylsilylalanin (D-CTMSA_{la}) und D-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin (D-TMSMH)

D-N-Carbamoyltrimethylsilylalanin (**CTMSA_{la}**) wurde aus enantiomerenreinem D-Trimethylsilylalanin hergestellt, welches zuvor mittels Biotransformation aus D,L-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin (**D,L-TMSMH**) synthetisiert worden war (Waniek, 1996). Dazu wurde eine Spatelspitze D-Trimethylsilylalanin und eine Spatelspitze Kaliumcyanat in ein Eppendorfgefäß in 100 µl Wasser gelöst und 30 Minuten auf 80 °C erhitzt. Von dieser Lösung wurden 10 µl entnommen, mit 990 µl HPLC-Fließmittel verdünnt und mittels chiraler HPLC gemessen. Mit diesem Standard gelang eine Zuordnung der Enantiomere von **D,L-CTMSA_{la}** (siehe Tabelle 3.6-2, S. 28 und Abbildung 4.4-14, S. 96). Eine weitere Aufarbeitung und Charakterisierung wurde nicht durchgeführt.

Zur Synthese von **D-TMSMH** wurde zu der oben erhaltenen Reaktionslösung ein Tropfen konzentrierte Salzsäure gegeben und eine Stunde auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde nach dem Abkühlen auf RT mit NaOH auf pH 3 eingestellt. Der Lösung wurden 10 µl entnommen, mit 990 µl Laufmittel verdünnt und mittels Chiral-HPLC gemessen. Mit diesem Standard gelang eine Zuordnung der Enantiomere von **D,L-TMSMH** (siehe Tabelle 3.6-2, S. 28). Eine weitere Aufarbeitung und Charakterisierung wurde nicht durchgeführt.

3.9.2 Vergleichssubstanzen für die Umsetzung von D,L-5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion

Zur Identifizierung des mittels HPLC gefundenen Reaktionsproduktes aus der enzymatischen Umsetzung von 5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (**BOD**), wurden die möglichen Reaktionsprodukte synthetisiert (siehe Abbildung 4.4-20, S. 102).

3.9.2.1 L- und D,L-Phenylmilchsäureamid (PhMA)

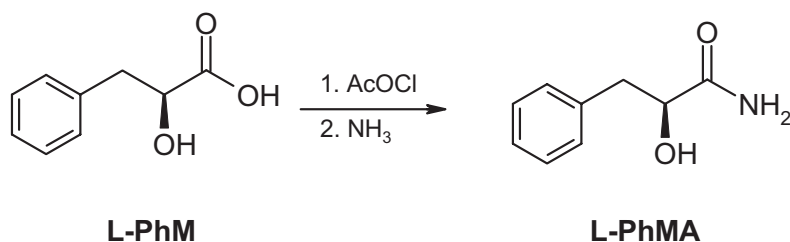


Abbildung 3.9-1: Reaktionsschema der Synthese von L-Phenylmilchsäureamid

Die Synthese von Phenylmilchsäureamid (**PhMA**) wurde analog einer Literaturvorschrift durchgeführt (Meyers, Slade, 1980). Dazu wurden 166 mg (1 mmol) D,L- bzw. L-Phenylmilchsäure (**PhM**) in 4.4 ml Methanol gelöst. Unter Eiskühlung wurden 72 mg (0.9 mmol) Acetylchlorid zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 750 µl Methanol verdünnt und 1.8 ml (30 mmol) 25%ige wässrige Ammoniaklösung zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 5 °C im Kühlschrank stehen gelassen. Danach wurde die Reaktionsmischung im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Mittels RP-18-HPLC konnte ein einheitliches Produkt nachgewiesen werden. Die Untersuchung einer Mischung des synthetisierten **PhMA** mit einer Probe der Enzymreaktion zeigte mittels RP-18-HPLC keine Übereinstimmung der Retentionszeiten beider Peaks (Produkt der Enzymreaktion: $R_t = 23.1$ min, **PhMA**: $R_t = 11.0$ min, Trennbedingungen siehe 3.6.1.2, S. 27). Daher wurden die Reaktionsansätze weder weiter aufgereinigt noch näher charakterisiert.

3.9.2.2 Carbamoylphenylmilchsäure (CPhM)

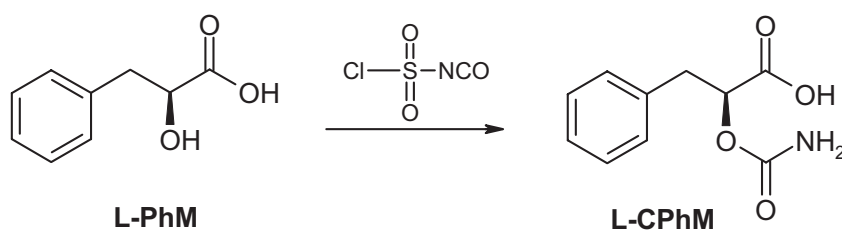


Abbildung 3.9-2: Reaktionsschema der Synthese von L-Carbamoylphenylmilchsäure

Carbamoylphenylmilchsäure (**CPhM**) wurde analog zweier Literaturvorschriften synthetisiert (Battistini et al., 1986; Hofmann et al., 1971). Dazu wurde in zwei 5 ml Rundkolben zu je 82 mg (0.5 mmol) L- bzw. D,L-Phenylmilchsäure (**L-** bzw. **D,L-PhM**) in 1 ml absolutes Toluol gegeben. Zu den Suspensionen wurde unter Rühren und Eiskühlung tropfenweise eine Lösung von jeweils 45 µl Chlorsulfonylisocyanat in 300 µl absolutem Toluol gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung des **D,L-PhM** war nach einigen Stunden zu einer festen Masse

erstarrt, während die Umsetzung des **L-PhM** noch flüssig war und eine leicht gelbe Färbung zeigte. Entsprechend der Vorschrift wurden deshalb zu der kristallinen Reaktionsmischung des **D,L-PhM** einige Tropfen Dioxan gegeben, worauf der kristalline Niederschlag verschwand und eine farblose Lösung entstand. Anschließend wurde das überschüssige Isocyanat beider Ansätze durch Zugabe von jeweils 1 ml Wasser bei Eiskühlung eine Stunde unter heftigem Rühren hydrolysiert. Danach wurde die Reaktionsmischung zweimal mit 3 ml Diethylether extrahiert, die Etherphase mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Ethers im Rotationsverdampfer, wurden die Produkte kristallin erhalten. Aus der D,L-Umsetzung wurden 25.5 mg (0.112 mmol) **D,L-CPhM** erhalten, die Ausbeute betrug 22 %. Eine Untersuchung mittels HPLC mit RP-18-Trennsäule (siehe 3.6.1.2, S. 27) zeigte eine Übereinstimmung der Retentionszeit (23.1 Minuten) mit dem Produkt der enzymatischen Umsetzung von **D,L-BOD** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* (4.4.7.1, S. 101). Die Charakterisierung von **D,L-CPhM** erfolgte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren. Von **L-CPhM** wurde keine Ausbeute bestimmt. Mit dieser Substanz wurde mittels chiraler HPLC die Zuordnung der Peaks von **D,L-CPhM** durchgeführt.

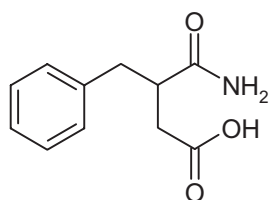
Tabelle 3.9-1: NMR-spektroskopische Charakterisierung von **D,L-CPhM** (CDCl_3)

Charakterisierung ^{13}C -NMR	Charakterisierung ^1H -NMR
$\delta=177.42$ (CO), 159.0 (CO); 138.84 , 132.43 , 131.53 , 130.14 (Ph); 76.59 (CH); 39.59 (CH_2)	$\delta=7.37$ - 7.27 (m, 5H, Ph); 5.10 (dd, 1H, CH, $J=7.2$, 5.0 Hz); 3.09 - 3.22 (m, 2H, CH_2)

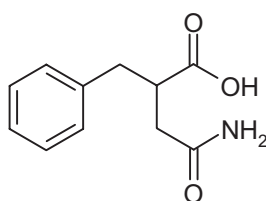
3.9.3 Standards für die Umsetzung von Benzylsuccinimid

Die im folgenden genannten Synthesen wurden in enger Zusammenarbeit mit Oliver Vielhauer vom Institut für Bioverfahrenstechnik durchgeführt (Waniek et al., in prep.).

Wie unter 4.4.8.2 (S. 106) beschrieben, konnte gezeigt werden, daß bei der Umsetzung von D,L-Benzylsuccinimid (**D,L-BnSI**) hauptsächlich ein Enantiomer eines Benzylbernsteinsäurehalbamids gebildet wurde. Da es sich bei den 4 möglichen Verbindungen (2 Enantiomere von 2 Halbamiden) um Konstitutions- bzw. Konfigurationsisomere handelt, erforderte die Identifizierung des Reaktionsproduktes besondere Untersuchungen.



2-Bn-Bernsteinsäurehalbamid
2BnBHA



3-Bn-Bernsteinsäurehalbamid
3BnBHA

Abbildung 3.9-3: Strukturformeln der beiden möglichen Benzylbernsteinsäurehalbamide

Das 3-Benzylbernsteinsäurehalbamid (**3BnBHA**) unterschied sich in seinem chemischen Verhalten von dem 2-Benzylbernsteinsäurehalbamid (**2BnBHA**) nur geringfügig.

Wie unter 3.9.3.1 (S. 58) und 4.4.8.2 (S. 106) beschrieben, hydrolysierte im HPLC-Fließmittel eines der beiden Halbamide schneller. Da über diese Substanzklasse bisher nur wenig publiziert wurde, konnten die Konstitutionsisomere über diese Eigenschaft nicht identifiziert werden. Eine weitere Untersuchung zeigte, daß bei der Aminolyse von Benzylbersteinsäureanhydrid (**BnBA**) in Ammoniumcarbonatpuffer bevorzugt *ein* Halbamid gebildet wurde (4.4.8.2, S106). Auch diese Eigenschaft konnte nicht zur Identifizierung des entstandenen Halbamids genutzt werden, da für das einzige literaturbekannte Beispiel, der Aminolyse von Phenylbernsteinsäureanhydrid, widersprüchliche Zuordnungen getroffen wurden (Anschütz et al., 1907; Anschütz und Walter, 1908). Viele der klassisch eingesetzten Analysemethoden, wie z. B. Elementaranalyse und Molmassenbestimmung eigneten sich nicht zur Aufklärung dieses analytischen Problems, da sich das **2BnBHA** vom **3BnBHA** nicht unterscheidet. Mittels NMR-spektrometrischer Methoden gelang es in Zusammenarbeit mit PD Dr. Fischer aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart, die Konstitution des enzymatisch gebildeten Halbamids nachzuweisen. Dazu wurde eine äquimolare Halbamidmischung durch Aminolyse von **BnBA** und eine angereicherte Halbamidmischung durch alkalische Hydrolyse von **BnSI** hergestellt (3.9.3.1 S. 58). Durch Vergleiche der ^{13}C -NMR-Spektren der Halbamidmischungen mit den Spektren von **BnBS** und Benzylbernsteinsäurediamid konnten das angereicherte Halbamid als **2BnBHA** identifiziert werden (Fischer et al. in prep.). Durch einen Vergleich der HPLC-Chromatogramme dieser angereicherten Halbamidmischung mit einer Probe der enzymatischen Umsetzung von **BnSI** konnte das enzymatisch gebildete Produkt als **3BnBHA** identifiziert werden (siehe 4.4.8.2, S. 106).

Mittels chiraler HPLC gelang es unter den 3.6.1.2 S. 27 beschriebenen Bedingungen, die Enantiomere der beiden Halbamide zu trennen. Um die Enantioselektivität der enzymatischen Umsetzungen untersuchen zu können, mußten chiral angereicherte Halbamide zur Verfügung stehen. Dies gelang durch eine Diastereomerentrennung der **D,L-BnBS** nach einer Literaturvorschrift (Fredga, 1948), anschließender Synthese des Anhydrids (Groutas et al., 1989) und der Aminolyse zu den Halbamiden (Waniek et al., in prep.). Ein mittels chiraler HPLC durchgeführter Vergleich des enzymatisch gebildeten Halbamidenantiomers mit der chiral angereicherten Halbamidmischung ermöglichte eine Bestimmung der Enantioselektivität der enzymatischen Umsetzungen (siehe 4.4.8.3, S. 107).

3.9.3.1 Synthese der als Standard benötigten Halbamide

a) aus Benzylbernsteinsäureanhydrid

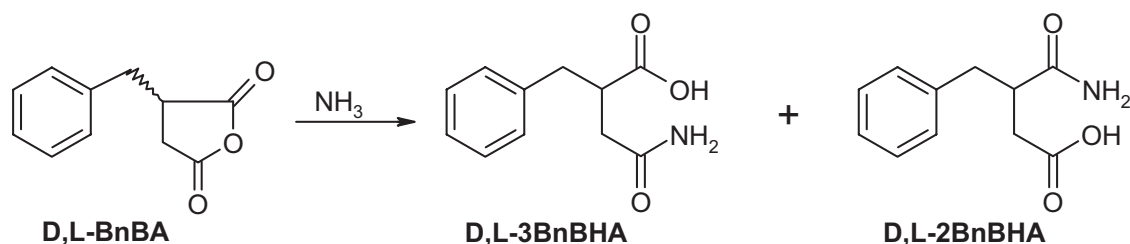


Abbildung 3.9-4: Aminolyse von Benzylbernsteinsäureanhydrid

Analog verschiedener Literaturvorschriften wurde untersucht, ob sich die Halbamide durch Aminolyse von **BnBA** herstellen lassen (Ghate und Bhide, 1957; Anschütz und Walter, 1908; Anschütz et al., 1907). Beim Lösen weniger Kristalle von **BnBA** (Synthese nach 3.8.3.2, S. 49) in 0.1 M Ammoniumcarbonatpuffer, konnten mittels HPLC zwei Peaks detektiert werden ($R_f = 16.44, 17.93$) (siehe 4.4.8.2, S. 106). Dabei war der Peak bei 16.44 Minuten geringfügig angereichert, das Peakverhältnis betrug 57 % zu 43 %. Da sich neben der Halbamidmischung auch **BnBS** bildete, wurden zur Stabilitätsuntersuchung der beiden Halbamide im Laufmittel beide Peaks mittels HPLC getrennt. Dazu wurden nach dem HPLC-Detektor bei der Detektion eines Halbamids 100 µl-Fractionen entnommen. Diese nach 5 Tagen nochmals eingespritzten Fractionen zeigten, daß das Halbamid mit der kürzeren Retentionszeit etwa dreimal schneller hydrolysierte. Später (4.4.8.2, S. 106) stellte sich heraus, daß es sich hierbei um das **2BnBHA** handelte.

Mit oben genannter Methode gelang es nicht, präparative Mengen der Halbamide herzustellen, da bei größeren Ansätzen hauptsächlich freie Säure gebildet wurde. Das gleiche Phänomen wurde beobachtet, wenn statt Ammoniumcarbonatpuffer 25%iger wäßriger Ammoniak eingesetzt. Deshalb wurde eine Synthese im nichtwäßrigen Lösungsmittel durchgeführt. Nach einer Literaturvorschrift (Naps, Johns, 1940) wurden 60 mg (0.35 mmol) **BnBA** (Synthese nach 3.8.3.2, S. 49) in einen 5 ml Rundkolben gegeben und in 2 ml absolutem Diethylether gelöst. Durch eine Glaskapillare wurde bei RT trockenes Ammoniakgas in die Lösung geleitet, dabei fiel ein gummiartiger Niederschlag aus. Mittels RP-18-HPLC konnte eine äquimolaren Mischung von Halbamiden nachgewiesen werden. Durch eine Variation der Konzentration von Anhydrid und des Ammoniaks bzw. eine Erniedrigung der Reaktionstemperatur, wurde untersucht, ob sich das Mengenverhältnis der gebildeten Halbamide beeinflussen läßt. Dazu wurde eine Spatelspitze **BnBA** in absoluten Diethylether gelöst. Zu der Lösung wurde bei 0 °C eine Spatelspitze Ammoniumcarbamat gegeben. Durch eine über Stunden auftretende Trübung konnte die Bildung der Halbamide beobachtet werden. Eine mittels HPLC

gemessene Probe der Reaktionslösung zeigte aber, daß auch unter diesen Reaktionsbedingungen eine äquimolare Mischung der Halbamide gebildet wurde.

b) aus Benzylsuccinimid

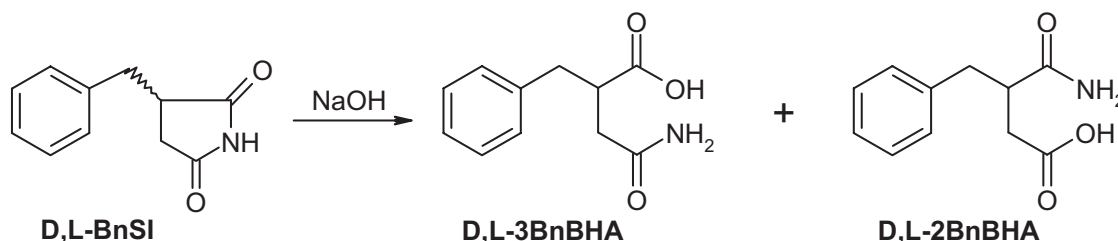


Abbildung 3.9-5: Alkalische Hydrolyse von Benzylsuccinimid

Die Halbamide wurden durch eine Hydrolyse von **BnSI** (Synthese nach 3.8.1.4, S. 42) analog einer Literaturvorschrift durchgeführt (Moreno-Manas et al., 1993) und von O. Vielhauer zur Verfügung gestellt. Bei dieser Synthese wurde das Halbamid, das später (4.4.8.2, S. 106) als **2BnBHA** identifiziert wurde, im Unterschuß (**2BnBHA** : **3BnBHA** 45 : 65) gebildet.

3.9.3.2 Angereicherte Enantiomere der Halbamide

Chiral angereicherte Benzylbernsteinsäure (**BnBS**) wurde nach einer Vorschrift mittels Diastereomerentrennung als (+)-Phenylethylaminsalz gewonnen (Fredga, 1948). Die absolute Konfiguration der chiral angereicherten **BnBS** wurde durch einen Vorzeichenvergleich des gemessenen Drehwerts mit Literaturdaten erhalten (Cohen, Milovanovic, 1968). Die Anreicherung wurde mittels chiraler HPLC gemessen und ergab ein Verhältnis von 25 : 75 (S(-) : R(+)), wobei S dem D- und R dem L-Enantiomer entspricht. Daraus wurden die chiral angereicherten Halbamidmischungen nach dem unter 3.9.3 (S. 56) beschriebenen Methode synthetisiert und von O. Vielhauer zur Verfügung gestellt (Waniek et al., in prep.). Die Bestimmung der Enantioselektivität enzymatischer Umsetzungen von **BnSI** erfolgte durch Vergleiche von Retentionszeiten der gebildeten Halbamide mit den synthetisierten chiral angereicherten Halbamiden.

3.9.3.3 D,L-Benzylbernsteinsäurediamid (D,L-BnBDA)

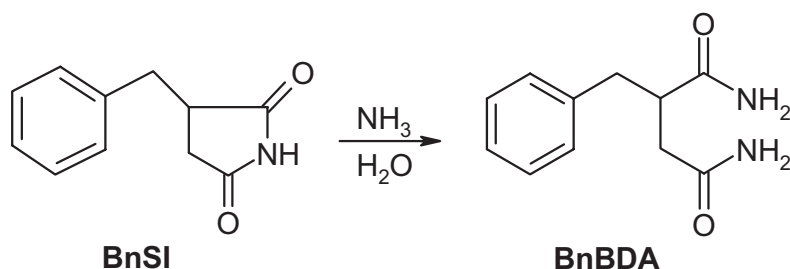


Abbildung 3.9-6: Synthese von Benzylbernsteinsäurediamid aus Benzylsuccinimid

Analog einer Literaturvorschrift (Menschutkin, 1872) wurde zu 2 ml mit Ammoniak gesättigtem absoluten Ethanol 200 mg (1.1 mmol) Benzylsuccinimid (Synthese nach 3.8.1.4, S. 42) gegeben und in ein Reagenzglas eingeschmolzen. Das Glas wurde 5 Stunden bei 100 °C erhitzt und am nächsten Tag Ethanol an der Hochvakuumanlage abgezogen. Eine Untersuchung mittels HPLC zeigte, daß nur etwa 10 % des Imids zum Diamid umgesetzt wurden.

In einem neuen Versuch wurden analog einer Literaturvorschrift (Sondheimer, Holley, 1954) 100 mg Benzylsuccinimid in 10 ml einer gesättigten wäßrigen Ammoniaklösung gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und war am nächsten Tag entgegen der Vorschrift immer noch klar. Am dritten Tag trat eine Trübung auf. Die Lösung wurde über einen 0.45 µm-Membranfilter abgesaugt und ergab etwa 1 mg Feststoff, der mit konzentriertem Ammoniak gewaschen wurde. Ein HPLC-Chromatogramm des Feststoffs zeigte viele Peaks. Erst einen Monat später waren aus der Reaktionslösung bei 4 °C 85 mg (0.43 mmol) farblose Kristalle ausgefallen, die zu etwa 95 % das Diamid enthielten, das entspricht einer Ausbeute von 39 %.

3.10 Biotransformationen

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung von Umsetzungen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 (siehe auch 4.1 S. 72). Zur Umsetzung des Standardsubstrats **L-BnH** wurde in den meisten Fällen die Enzymlösung (3.5, S. 24) auf 1/100 mit 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 verdünnt und zu 1 ml Substratlösung 100 µl (0.074 U) gegeben. Für andere Substrate wurde die Enzymmenge so berechnet, daß mit bekannter Anfangsaktivität das Substrat in 30 Minuten vollständig umgesetzt wurde, um eine etwaige Racemisierung des Substrats zu minimieren. Aus parallel laufenden Arbeiten im Arbeitskreis war bekannt, daß die Aktivität dieses Enzyms durch wiederholte Auftauzyklen abnimmt. Deshalb wurde der gesamte Enzymvorrat nach einmaligem Auftauen in 100 µl-Portionen aliquotiert.

Im Vergleich zu diesen Umsetzungen wurden Untersuchungen mit 2 kommerziell erhältlichen Hydantoinasen und einer weiteren am Institut isolierten Hydantoinase durchgeführt (siehe auch 3.5 S. 24). Bei Untersuchungen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 wurden üblicherweise neben der Enantiospezifität auch die spezifischen Aktivitäten für die Umsetzungen ermittelt. Dagegen wurden bei den drei anderen Enzymen nur die Enantioselektivität der Umsetzungen bestimmt.

3.10.1 Bestimmung der Aktivität

3.10.1.1 Mittels HPLC

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität mittels HPLC wurden der Reaktionsmischung üblicherweise Proben von 100 µl entnommen und in HPLC-Vials zu 20 µl konzentrierter TFA gegeben, dabei fiel das Enzym nicht aus. Anschließend wurde auf 1000 µl mit Fließmittel aufgefüllt und alle Proben innerhalb von 12 Stunden gemessen, siehe hierzu 4.2.1 (S. 74) und 8.4.2 (S. 165).

3.10.1.2 Mittels Polarimetrie

Voraussetzung für den Einsatz der Polarimetrie zur kontinuierlichen Aktivitätsmessung ist die Kenntnis der spezifischen molaren Drehwerte von Substrat und Produkt. Außerdem muß sichergestellt sein, daß weder Nebenreaktionen ablaufen noch eine Reaktion ohne Enzym stattfindet. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung von **L-BnH** wurde eine Maßlösung des enantiomerenreinen Hydantoin nach der unter 3.4.2 beschriebenen Methode hergestellt. In einem Eppendorfgefäß wurde zu 1000 µl 2.7 mM **L-BnH** 100 µl einer 1/100 verdünnten Enzymlösung (0.115 U) gegeben. Gleichzeitig wurde die Übertragung der Polarimetermeßwerte an einen über RS-232 Schnittstelle verbundenen PC gestartet. Anschließend wurde die Reaktionslösung kurz gemischt und mit einer Eppendorfpipette in die thermostatisierte Polarimeterküvette (100 mm, 1 ml, Quarzglas) gegeben. Nach einer Kontrolle, ob der Strahlengang frei von Gasblasen war, wurde die Küvette im Polarimeter befestigt und

bei einer Wellenlänge von 296 nm und üblicherweise bei 37 °C gemessen. Mit dieser Methode konnte die Reaktion mit einer Verzögerung von etwa einer Minute nach der Enzymzugabe kontinuierlich verfolgt werden. Die Umrechnung der gemessenen Drehwerte der Reaktionslösung in Konzentrationen von Substrat und Produkt (**L-CPhe**) erfolgte nach folgender Formel (Herleitung im Anhang 8.4.2, S. 165):

$$c_{L-CPhe} = \frac{\alpha_{obs} - \langle \alpha_{L-BnH} \rangle \cdot c_{ges}^0}{\langle \alpha_{L-CPhe} \rangle - \langle \alpha_{L-BnH} \rangle} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

c_{L-CPhe}	Konzentration von L-CPhe [mM]
α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
$\langle \alpha \rangle$	spezifische molare Drehwerte [°/mM]
c_{ges}^0	Anfangskonzentration

Um Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhalten, wurde der lineare Bereich der Konzentrations-Zeit-Verläufe über ca. 60 Sekunden nach dem Äquilibrieren der Reaktionslösungen gewählt und die Steigung mittels linearer Regression bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten auch unmittelbar aus dem gemessenen zeitlichen Verlauf der Drehwerte berechnet werden. Dazu wurde der lineare Bereich der Drehwert-Zeit-Verläufe über 60 Sekunden nach der Äquilibrierung der Reaktionslösung gewählt. Die Steigungen wurde mittels linearer Regression bestimmt und die Reaktionsgeschwindigkeiten mit folgender Beziehung berechnet.

$$\frac{dc_{L-CPhe}}{dt} = \frac{1}{\langle \alpha_{L-CPhe} \rangle - \langle \alpha_{L-BnH} \rangle} \cdot \frac{d\alpha_{obs}}{dt} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$\frac{dc_{L-CPhe}}{dt}$	zeitliche Konzentrationsänderung von L-CPhe
--------------------------	--

$\frac{d\alpha_{obs}}{dt}$	zeitliche Drehwertänderung [°/s]
----------------------------	----------------------------------

$\langle \alpha \rangle_{L-BnH},$	
$\langle \alpha \rangle_{D-BnH}$	spezifische molare Drehwerte [°/mM]

Inhibitionsuntersuchungen wurden nach derselben Methode durchgeführt. Beim Einsatz von enantiomerenreinen Inhibitoren, wie z. B. **L-1MeBnH**, wurde der konstante Beitrag

zum Drehwert von den gemessenen Daten abgezogen. Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten wurde nach der unter 3.10.3 (S. 69) beschriebenen Methode durchgeführt.

3.10.2 Bestimmung der Enantioselektivität

3.10.2.1 Mittels chiraler HPLC

Um den Einfluß der Racemisierung der Hydantoine möglichst gering zu halten, wurde die Reaktionszeit immer so kurz gewählt, daß weniger als 5 % des enantiomerenreinen Hydantoin innerhalb dieser Zeit racemisiert wäre. Dazu wurde aus der Halbwertszeit der Racemisierung (siehe 4.3, S. 79) die maximale Reaktionszeit errechnet. (Siehe Anhang 8.4.4, S. 167).

Zum Starten der Reaktion wurde in einem Eppendorfgefäß 100 µl verdünnte Enzymlösung (3.5, S. 24) zu 1000 µl Substratlösung gegeben. Der Reaktion wurden alle zwei Minuten 50-µl-Proben entnommen, die sofort mit 2 µl TFA in HPLC-Probengläser gemischt wurden. Nach dem Verdünnen mit 948 µl Fließmittel wurden die Proben mittels chiraler HPLC gemessen, wobei die Probenreihenfolge variiert wurde, um den systematischen Fehler zu minimieren (siehe auch 3.6.1, S. 26).

3.10.2.2 Online-Messungen mit Polarimeter und Photometer

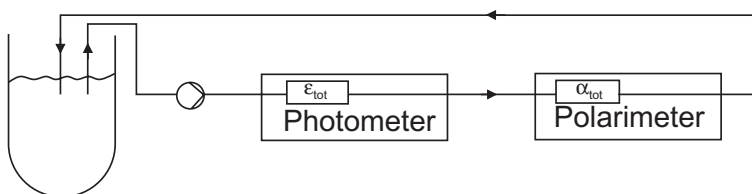


Abbildung 3.10-1: Reihenschaltung von Photometer und Polarimeter im Bypassbetrieb. Das Reaktionsgefäß und die Küvetten wurden thermostatisiert.

Mit dem in Abbildung 3.10-1 gezeigten Versuchsaufbau konnten gleichzeitig alle 4 Enantiomerenkonzentrationen kontinuierlich über die Reaktionszeit ermittelt werden. Die Umsetzung einer racemischen Hydantoinlösung wurde in einem thermostatisierten 40-ml-Reaktor durchgeführt. Zur kontinuierlichen Messung der Extinktion und des Drehwerts wurde ein Teil der Reaktionslösung mit 60 ml/min durch einen geschlossenen Bypass gepumpt (Modell 101 U/R, Watson Marlow, Falmouth, GB). Die Extinktion wurde mit einem Photometer (Model LKB Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) mit einer thermostatisierten Durchflußküvette (100 mm, 1 ml, Quarzglas) gemessen, der Drehwert mit dem Polarimeter und einer 100 mm thermostatisierbaren Küvette, die zu einer Durchflußküvette umgebaut war. Beide Geräte waren mittels RS-232-Schnittstelle zur Datenübertragung mit PC verbunden, die Daten wurden alle 2 Sekunden übertragen.

Die kontinuierliche Methode läßt sich nur einsetzen, wenn die Racemisierung des Hydantoins innerhalb der Reaktionszeit zu vernachlässigen ist. In diesem Fall vereinfacht sich das Reaktionssystem insofern, daß die Bilanzen der Enantiomere konstant bleiben (4.4.1). Deshalb wurde die Reaktionszeit üblicherweise kürzer als 40 Minuten gewählt, um die Racemisierung des Hydantoins unter 5 % zu halten.

Vor der Reaktion wurde der Reaktor und der Bypass mit Substratlösung gefüllt und äquilibriert. Dazu wurde die üblicherweise auf 37 °C thermostatisierte Substratlösung so lange im Kreis gepumpt, bis das System frei von Luftblasen war und Photometer und Polarimeter konstante Meßwerte anzeigten. Anschließend wurde nur der Reaktor, nicht aber der Bypass, entleert und mit genau 40 ml 3 mM frischer Substratlösung gefüllt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 150 µl (4.65 U) unverdünnter Enzymlösung (3.5, S. 24) gestartet und gleichzeitig mit der Aufzeichnung der Meßdaten begonnen. Die zugegebene Enzymmenge errechnete sich dabei aus der maximal zulässigen Reaktionszeit und der im Vorversuch bestimmten volumetrischen Aktivität für das jeweils eingesetzte Hydantoin. Die im Bypass noch vorhandene Substratlösung aus der Äquilibriumprozedur wurde verworfen. Dazu wurde dem Bypass nach den Durchflußküvetten eine mindestens dem Totvolumen des Bypass von etwa 15 ml entsprechende Menge Substratlösung entnommen. Um die momentane Konzentration von z.B. L-BnH zu berechnen, wurde folgende Beziehung verwendet (Herleitung im Anhang unter 8.4.3 (S. 166):

$$c_{L-BnH} = \frac{\alpha_{obs} + c_{BnH}(\langle \alpha \rangle_{L-BnH} - \langle \alpha \rangle_{L-CPh})}{2(\langle \alpha \rangle_{L-BnH} - \langle \alpha \rangle_{L-CPh})} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

mit

$$c_{BnH} = \frac{\epsilon_{obs} - c_{BnH}^0 \langle \epsilon \rangle_{CPh}}{\langle \epsilon \rangle_{BnH} - \langle \epsilon \rangle_{CPh}} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

c_{L-BnH}	Konzentration von L-BnH [mM]
c_{BnH}	Gesamtkonzentration von D- und L-BnH [mM]
c_{BnH}^0	Ausgangskonzentration von D,L-BnH [mM]
α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
ϵ_{obs}	gemessene Extinktion [1]
$\langle \alpha \rangle_{L-BnH}$	spezifische molare Drehwerte [°/mM]
$\langle \alpha \rangle_{D-BnH}$	
$\langle \epsilon \rangle_{BnH}$	
$\langle \epsilon \rangle_{CPh}$	spezifische molare Extinktion [1/mM]

Aus den Gleichungen wird ersichtlich, daß die Konzentration eines Enantiomers nur von dem gemessenen Drehwert und der gemessenen Extinktion abhängt. Alle anderen Größen bleiben während der Messung konstant.

Bestimmung der spezifischen molaren Extinktion:

Durch die Messung der Extinktionen in Abhängigkeit von der Konzentration der Standards **BnH** und **CPhe** wurde mittels linearer Regression aus den Steigungen die spezifischen molaren Extinktionen beider Substanzen erhalten. Eine Zusammenfassung von spezifischen molaren Extinktionen befindet sich im Anhang (8.3, S. 162). Üblicherweise werden Extinktionen bei einem Absorptionsmaximum gemessen. Dies hat den Vorteil, daß geringe Schwankungen der Wellenlänge, die z. B. durch Ungenauigkeiten des Geräts verursacht sein können, nur geringfügige Extinktionsschwankungen zur Folge haben. Bei der verwendeten Meßmethode (Abbildung 3.10-1, S. 63) mußte wegen der Nachweisgrenze des Polarimeters eine mindestens 3 mM **BnH**-Lösung eingesetzt werden. Bei dieser Konzentration war aber die Extinktion der Lösung außerhalb des Meßbereichs. Daher mußte eine Wellenlänge verwendet werden, bei der nicht im Maximum der Absorptionsbande gemessen wurde.

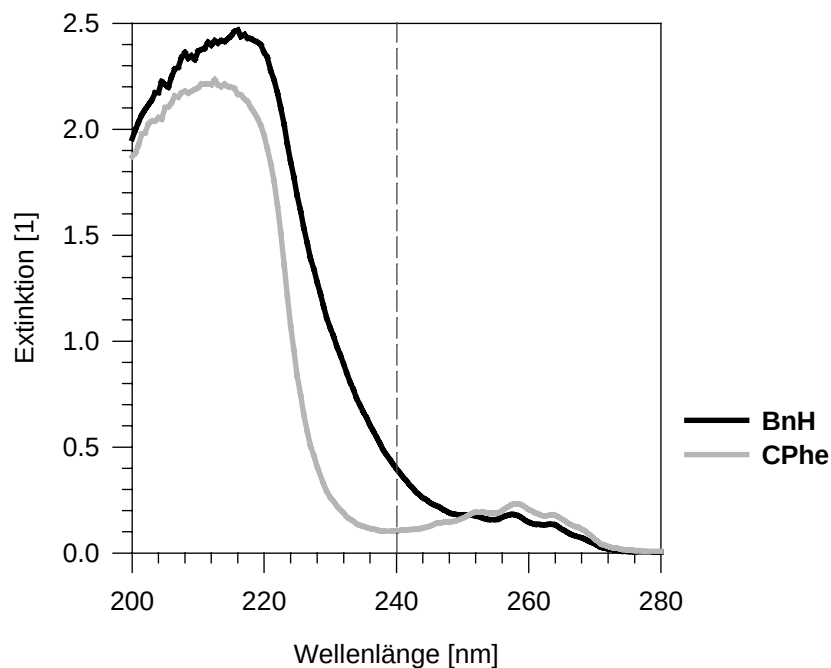


Abbildung 3.10-2: UV-Spektren von 0.5 mM **BnH** und 1.5 mM **CPhe** in 0.1 M Tris pH 8.5, RT. Die senkrechte Linie bei 240 nm markiert die für die Messungen verwendete Wellenlänge.

Es zeigte sich, daß das Photometer beim Einschalten niemals dieselbe Extinktion einer identischen Maßlösung anzeigte. Dies hätte zur Konsequenz gehabt, daß vor jeder Messung die molaren Extinktionskoeffizienten von Substrat und Produkt jeweils hätten neu bestimmt werden müssen. Um diesen zusätzlichen Schritt zu vermeiden, wurde eine Eichung des Gerätes vor jeder Messung durchgeführt. Dazu wurden die Extinktio-

nen von 3 mM Lösungen von **BnH** und **CPhe** in Intervallen von etwa 5 nm über und unter der verwendeten Meßwellenlänge bestimmt und ein Diagramm erstellt, indem die Extinktionen der Substanzen in diesem Bereich gezeigt werden.

Abbildung 3.10-3 zeigt beim **BnH** eine starke Abhängigkeit der Extinktion von der Wellenlänge, während die Beeinflussung von **CPhe** nur gering ist.

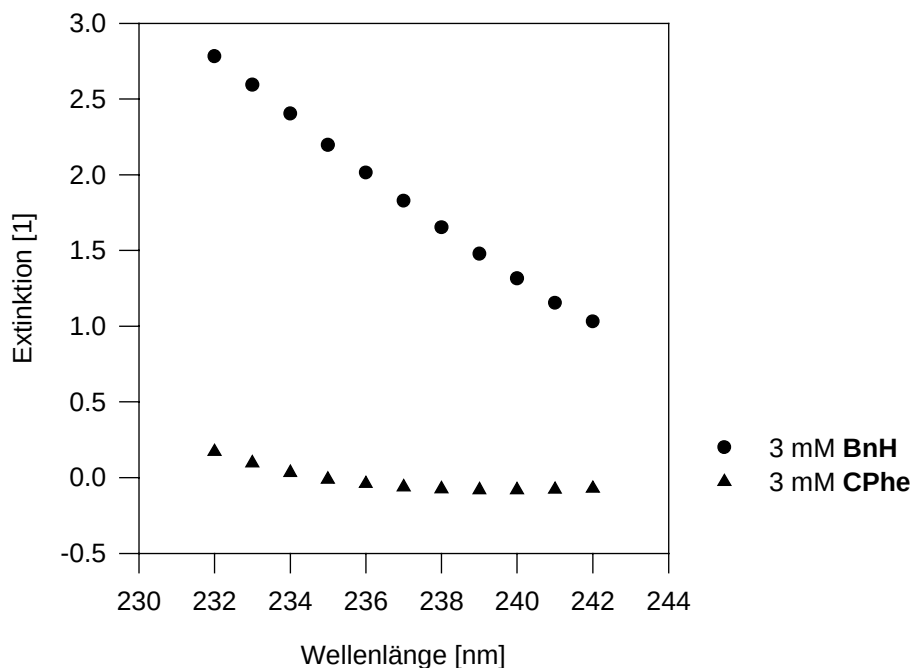


Abbildung 3.10-3: Ausschnitt der UV-Spektren 3 mM Lösungen von **BnH** und **CPhe** im Bereich der verwendeten Wellenlänge

Um die bei der Messung variierende (s. o.) unbekannte Wellenlänge zu eliminieren, wurden die Extinktionen von **BnH** und **CPhe** gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.10-4) und mittels quadratischer Regression eine mathematische Beziehung zwischen diesen ermittelt.

Aus der Regressionskurve wurde folgende Formel erhalten:

$$AE_{CPhe} = 0.14 AE_{BnH}^2 - 0.39 AE_{BnH} + 0.19 \quad \text{Gleichung 3-7}$$

AE Extinktion [1]

Mit Hilfe dieser Beziehung war es möglich, zu Beginn einer neuen Messung vor der Enzymzugabe den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten von **CPhe** aus der Anfangsextinktion von **BnH** zu berechnen.

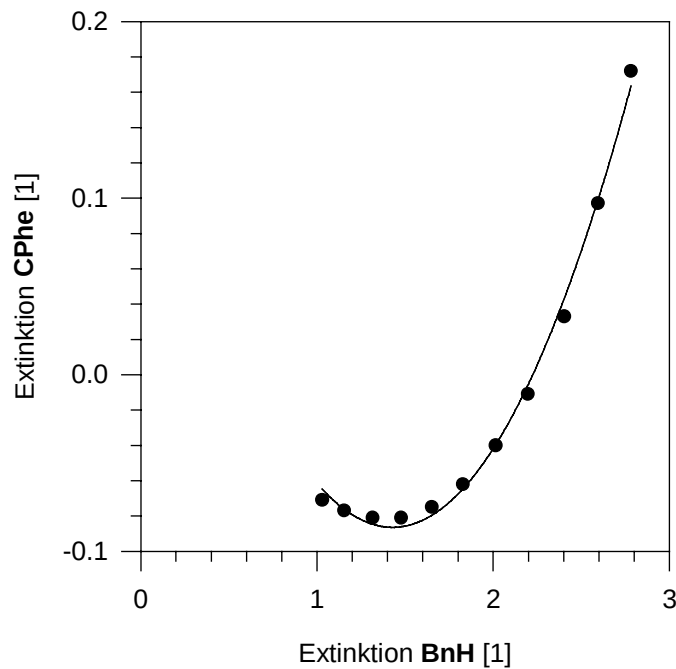


Abbildung 3.10-4: Zusammenhang der molaren Absorptionen von **BnH** und **CPhe** bei unbekannter Wellenlänge

3.10.2.3 Ermittlung der Enantioselektivität nach dem Modell von Chen et al.

Aktivität und Enantioselektivität E eines Enzyms für ein bestimmtes Substrat stellen wichtige Parameter für die enzymatische Produktion chiraler Verbindungen dar. Zur Bestimmung von E wurden die Meßwerte des Enantiomerenüberschusses über dem Umsatz aufgetragen und die Enantioselektivität durch Parameteroptimierung nach dem Modell von Chen et al. ermittelt (siehe auch 3.10.2.4, S. 68). Da die Umsetzung von Hydantoinen zu N-Carbamoylaminosäuren eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, wurde die mathematische Beziehung für den reversiblen Fall verwendet (Chen et al., 1987).

$$E = \frac{\ln \left[1 - (1 + K_{eq}) \left(1 - \frac{c_{BnH}^0}{c_{BnH}} \right) (1 + ee_{L-CPhe}) \right]}{\ln \left[1 - (1 + K_{eq}) \left(1 - \frac{c_{BnH}^0}{c_{BnH}} \right) (1 - ee_{L-CPhe}) \right]}$$

Gleichung 3-8

E	Enantioselektivität [1]
K	Gleichgewichtskonstante [1]
c_{BnH}^0	Anfangskonzentration von D,L-BnH [mM]
c_{BnH}	Gesamtkonzentration von D-BnH + L-BnH [mM]
ee_{L-CPhe}	Enantiomerenüberschuß von L-CPhe

Definition:

$$ee_{L-CPhe} = \frac{c_{L-CPhe} - c_{D-CPhe}}{c_{L-CPhe} + c_{D-CPhe}} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

3.10.2.4 Identifizierung der kinetischen Parameter

Zur Ermittlung der Enantioselektivität wurde der Enantiomerenüberschuß über dem Umsatz aufgetragen. Um die Datenmenge der Messung zu reduzieren, wurden über die Reaktionszeit etwa 40 Meßwerte mit dem gleichen zeitlichen Abstand ausgewählt. Aus den Meßwerten und Gleichung 3-8 wurde die absolute Fehlerquadratsumme berechnet und iterativ durch eine Optimierung die kinetischen Parameter E und K_{eq} mit dem Softwarepaket OpdesX minimiert.

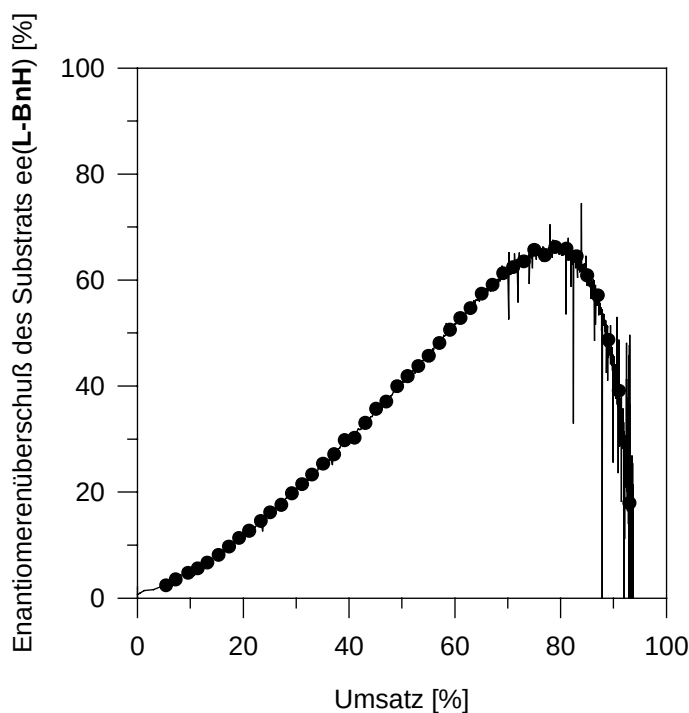


Abbildung 3.10-5: Abhängigkeit des Enantiomerenüberschusses des Substrats vom Umsatz. Die durchgezogene Kurve wurde aus den kontinuierlich aufgenommenen Meßwerten berechnet. Die Symbole zeigen die über den Umsatz äquidistant ausgewählten Daten, welche zur Anpassung verwendet wurden.

Die senkrechten Striche in Abbildung 3.10-5 sind durch den mit steigendem Umsatz zunehmenden Fehler des bestimmten Enantiomerenüberschusses. Der Enantiomerenüberschuß wurde mit dem Polarimeter bestimmt, welches einen konstanten Meßfehler über den verwendeten Meßbereich zeigte. Da mit zunehmendem Umsatz die absoluten Konzentrationen der Substratanomere kleiner werden, verursachte der konstante Fehler des Polarimeters in zunehmendem Maße ein Verrauschen der Meßwerte. Im

Vergleich zu irreversiblen Reaktionen unterscheiden sich die Kurven der Enantiomerenüberschüsse in Abhängigkeit vom Umsatz bei reversiblen Reaktionen vor allem bei höheren Umsätzen. Da genau dieser Bereich der Kurven die Aussage über die Gleichgewichtskonstante der Reaktion liefert, ist deren Bestimmung nach dieser Methode mit einem relativ großen Fehler behaftet.

3.10.3 Inhibitionsuntersuchungen

Bei allen Inhibitionsuntersuchungen wurden die Inhibitoren als Racemate eingesetzt und die Hemmung der Standardumsetzung von 3 mM **L-BnH** in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C untersucht (siehe 3.4.3, S. 24). Zuvor wurde sichergestellt, daß die Inhibitoren unter den Reaktionsbedingungen für **L-BnH** innerhalb der Reaktionszeit nicht vom Enzym umgesetzt wurden. Zur Beschreibung einer reversiblen Reaktion mit der Annahme, daß die Hin- und Rückreaktion jeweils vom Typ einer Michaelis-Menten-Gleichung mit kompetitiver Inhibition durch einen Inhibitor sind, kann nach Segel analog (1975) folgende Gleichung erhalten werden:

$$v = \frac{v_{max} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}} \right)}{K_{mL-BnH} \left(1 + \frac{c_{L-CPhe}}{K_{mCPhe}} + \frac{c_i}{K_i} \right) + c_{L-BnH}} \quad \text{Gleichung 3-10}$$

v	Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{M}/(\text{g}_{\text{Enzym}}\text{S})$]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei hoher Substratkonzentration [$\mu\text{M}/(\text{g}_{\text{Enzym}}\text{S})$]
c_{L-BnH}	Konzentration von L-BnH [mM]
c_{L-CPhe}	Konzentration von L-CPhe [mM]
c_i	Inhibitorkonzentration [mM]
K_{mL-BnH}	Michaelis-Menten-Konstante von L-BnH [mM]
$K_{mL-CPhe}$	Michaelis-Menten-Konstante von L-CPhe [mM]
K_i	Inhibitionskonstante [mM]

Für den Fall, daß die K_m -Werte viel größer als die eingesetzten Konzentrationen von **L-BnH** und **L-CPhe** sind, vereinfacht sich Gleichung 3-10 zu:

$$v = \frac{k \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}} \right)}{1 + \frac{c_i}{K_i}} \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Außerdem ist anzunehmen, daß zu jeder Zeit die Summe von Substrat und Produkt gleich der Ausgangskonzentration von **L-BnH** ist:

$$c_{L-BnH}^0 = c_{L-BnH} + c_{L-CPhe} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

Diese Gleichungen wurde zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten verwendet.

Die Messungen wurden nach der unter 3.10.1.2 beschriebenen Methode in der Polarmeterküvette durchgeführt. Zur Ermittlung der Geschwindigkeits- und Inhibitionskonstanten wurden die Konzentrations-Zeit-Verläufe bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen aufgenommen. Um die Datenmenge der Online-Messung zu reduzieren, wurden über die Reaktionszeit 15 Meßwerte ausgewählt. Ausgehend von den gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufen wurden die Parameter k und K_i mit Gleichung 3-11 geschätzt, indem die relative Fehlerquadratsumme, die sich für gegebene Parameter aus der numerisch integrierten Gleichung 3-11 (ACSL, Mitchell & Gauthier Associates Inc., MA, USA) und den Meßwerten berechnet, iterativ durch Optimierung der Parameter (OptdesX, Design Synthesis Inc. UT, USA) minimiert wurde.

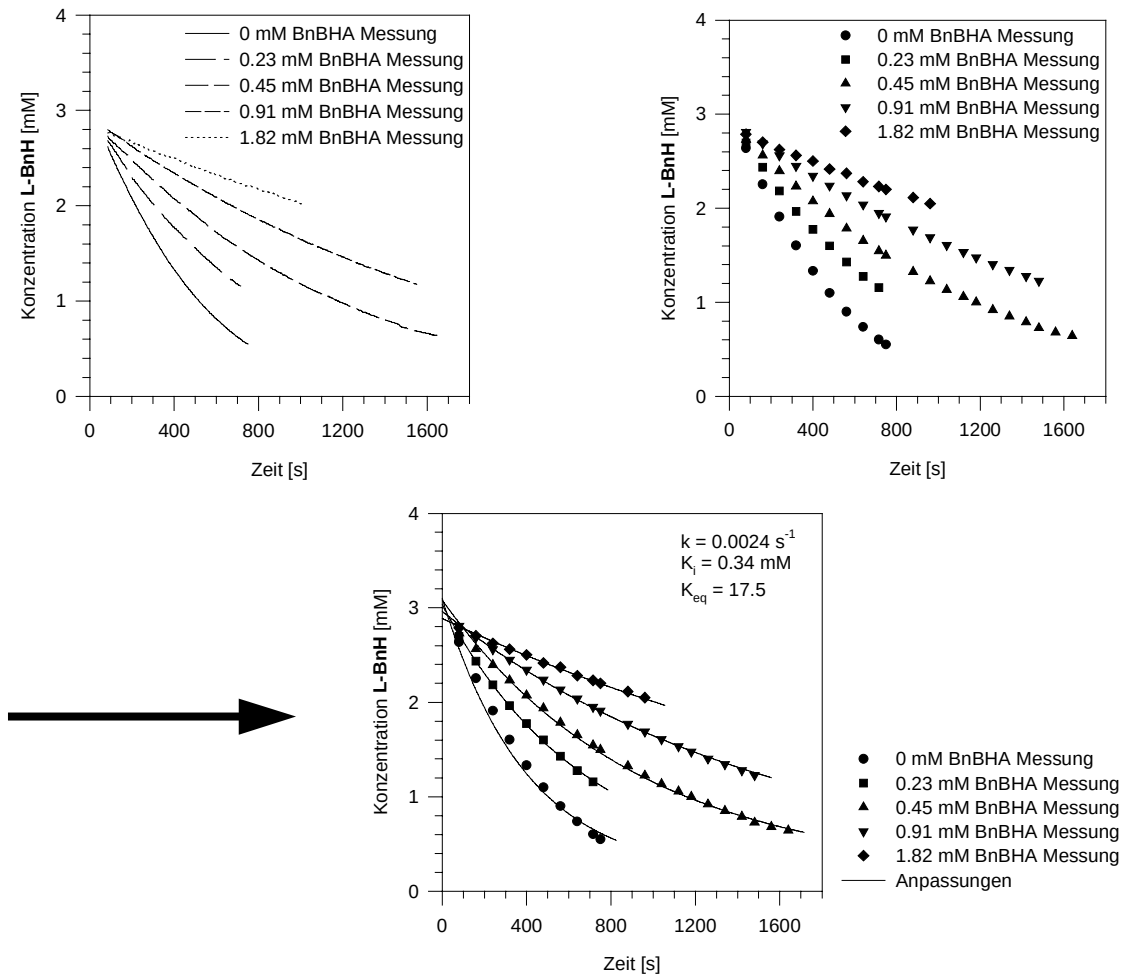


Abbildung 3.10-6: Vorgehensweise bei der Bestimmung von Inhibitionskonstanten. Oben links: kontinuierlich gemessene Konzentrations-Zeit-Verläufe einer Umsetzung von **L-BnH** mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Oben rechts: Auswahl von Meßpunkten. Unten: Bestimmung von k und K_i mittels Parameteroptimierung durch Fehlerminimierung zwischen den Meßdaten und den simulierten Kurvenverläufen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorgehensweise

Ziel dieser Arbeit war es, systematische Untersuchungen zur Substrat- und Enantioselektivität von Hydantoinasen durchzuführen. Im Mittelpunkt der Arbeiten sollte die Untersuchung der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 stehen. Von dieser Hydantoinase waren bereits aus früheren Arbeiten ein weites Substratspektrum und einige Untersuchungen zur Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Enantioselektivität für einige Substrate bekannt (Kölle, 1995; Dombach, 1989; Nöthe, 1993). Außerdem hatten für dieses Enzym schon Arbeiten zur Untersuchung der Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse stattgefunden (May, 1996). Ebenso beschäftigen sich aktuelle Arbeiten am Institut mit der Immobilisierung dieser Hydantoinase und dem Einsatz zur Synthese von L-Aminosäuren in einer Pilotanlage (Ragnitz et al., in prep.).

Untersuchungen von der Substratseite her wurden bisher ausschließlich mit Hydantoinen durchgeführt, die sich in den Substituenten in 5-Position unterschieden. In der vorliegenden Arbeit sollten neben einer systematischen Untersuchung der Substituenten in der 5-Position der Hydantoinen vor allem hydantoinanaloge Verbindungen als Substrate bzw. Inhibitoren getestet werden. Reaktionen mit diesen Verbindungen sollten Hinweise auf die Bedeutung der Heteroatome im Hydantoinring und ihren Einfluß auf die Enantioselektivität und die Aktivität dieses Enzyms zeigen.

Als Standardreaktion wurde die Umsetzung von 5-Benzylhydantoin (**BnH**) in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C definiert. Neben der enantioselektiven enzymatischen Umsetzung von **D,L-BnH** findet gleichzeitig eine nichtenzymatische Racemisierung des Substrats unter den genannten Reaktionsbedingungen statt (Abbildung 4.1-1).

Bis zu dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Enantioselektivität entweder mittels chiraler HPLC oder enzymatisch durchgeführt. Bei der Bestimmung von enzymkinetischen Parametern hat die Verwendung von chromatographischen Methoden gegenüber den Online-Methoden Nachteile. Entweder müssen in Voruntersuchungen die optimalen Probenahmezeiten bestimmt werden oder über den gesamten Reaktionsverlauf viele Proben genommen werden. Beide Möglichkeiten sind üblicherweise sehr zeitintensiv. Außerdem muß für jedes Substrat eine individuelle Methode etabliert werden.

In dieser Arbeit wurde versucht, durch polarimetrische Online-Methoden eine leicht übertragbare Chiralanalytik zu etablieren. Als weiterer Vorteil zeigte sich, daß die entwickelte Methode ohne aufwendige Anpassungen bei unterschiedlichen Substraten eingesetzt werden konnte. Allerdings setzten die unter 3.10.1.2 (S. 61) und 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Online-Methoden voraus, daß die Racemisierung während der Messung vernachlässigbar klein ist. Deshalb wurde die Enzymmenge für die einzelnen Reaktionen so berechnet, daß die Racemisierung innerhalb der Meßzeit unter 5 %

blieb. Dadurch vereinfacht sich die in Abbildung 4.1-1 gezeigte Reaktionsgleichung zu zwei getrennt ablaufenden Reaktionen (siehe Abbildung 4.1-2).

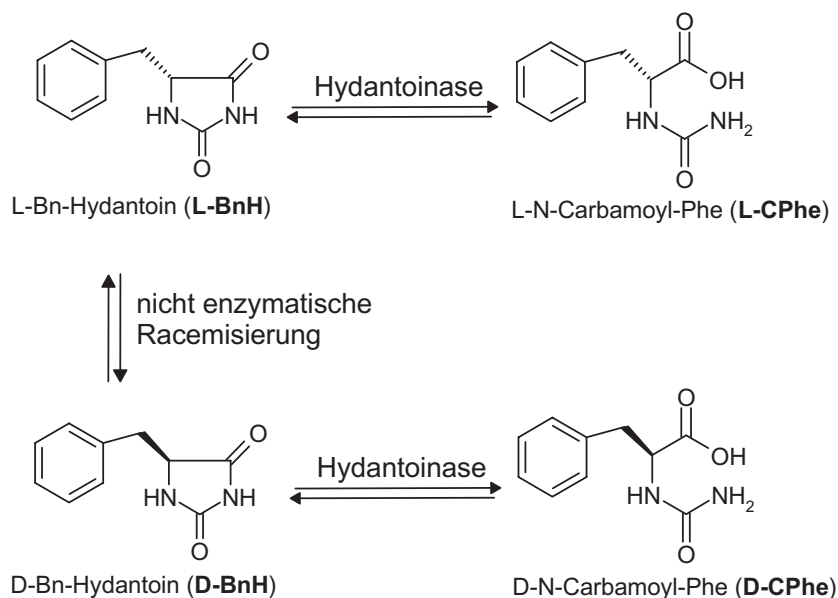


Abbildung 4.1-1: Enantioselektive enzymkatalysierte Hydantoinspaltung bei gleichzeitiger nichtenzymatischer Racemisierung der Hydantoine

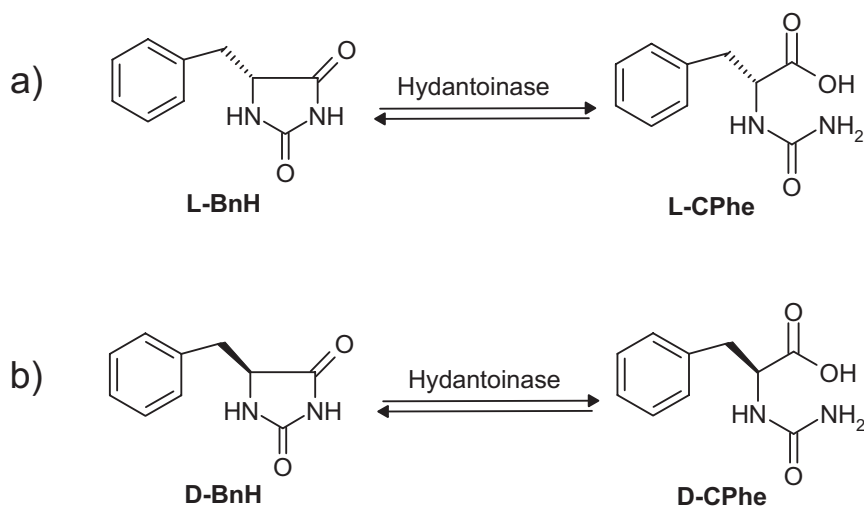


Abbildung 4.1-2: Enzymkatalysierte Hydantoinspaltung ohne Racemisierung

Zu Beginn der Arbeit wurden unterschiedliche Hydantoine bzw. hydantoinanaloge Substanzen hergestellt. Die Synthesen dieser Substanzen sind in den Kapiteln 3.7 (S. 34) und 3.8 (S. 36) beschrieben, eine Übersicht aller untersuchten Verbindungen ist in Abbildung 6-1 (S. 153) dargestellt. Anschließend wurde die enzymatische Umsetzung des Standardsubstrats **BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM

3745 genau untersucht. Dazu mußte eine Analytik entwickelt werden, die zum einen möglichst gut auf andere Substrate übertragbar sein und zum anderen möglichst genaue Meßergebnisse liefern sollte, um auch kleine Effekte beobachten zu können. Mit den im vorigen Kapitel beschriebenen polarimetrischen und chromatographischen Methoden konnte für nahezu alle synthetisierten Substanzen eine quantitative Enantiomerenanalytik etabliert werden.

4.2 Analytik

Einige der analytischen Methoden erforderten zur genauen und reproduzierbaren Bestimmung der kinetischen Parameter besondere Reaktions- und Probenahmebedingungen, die im folgenden erläutert werden.

4.2.1 Abstoppen der Reaktionen

Bei Untersuchungen zum Abstoppen von Proben aus Umsetzungen mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 fiel auf, daß sich in den Proben das Verhältnis der Substrat- zu Produktkonzentration beim Lagern änderte. Eine Untersuchung zeigte, daß eine Zugabe von 0.5 % (v/v) konzentrierter TFA genügte, um Reaktionsproben einer Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 auf einen pH-Wert unter 4 einzustellen. Bei diesem pH-Wert findet selbst nach tagelanger Lagerzeit der Proben im Autosampler der HPLC keine meßbare Racemisierung mehr statt (Abendschein, 1998). Wurden mit der oben beschriebenen Menge TFA gestoppte Proben allerdings einige Stunden bei RT gelagert und dann erst mit Fließmittel (3.3.2, S. 23) verdünnt, konnte gezeigt werden, daß die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 noch eine deutliche Aktivität zeigte. In Abbildung 4.2-1 ist der Konzentrations-Zeit-Verlauf einer Umsetzung von 5 mM **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C dargestellt. Die durchgezogenen Kurven entsprechen den online bestimmten Konzentrationsverläufen (3.10.2.2, S. 63). Zum Vergleich wurden über die Reaktionszeit Proben entnommen und sofort mit 0.5 % (v/v) konzentrierter TFA gestoppt. Nach einigen Stunden Lagerzeit wurden von diesen Proben 50 µl mit 950 µl Fließmittel verdünnt. Da die Meßzeit jeder Probe etwa eine Stunde dauerte, befanden sich die letzten Proben, die nach fortschreitender Reaktionszeit sortiert waren, über 10 Stunden im Autosampler der HPLC. Die mittels HPLC gemessenen Konzentrationen lagen alle über den polarimetrisch bestimmten. Daraus wurde geschlossen, daß die verwendete Menge TFA nicht zur vollständigen Inaktivierung der Hydantoinase genügte. Die Hydantoinase zeigte selbst nach der Verdünnung mit Fließmittel noch eine merkliche Aktivität. Dies wurde besonders deutlich bei den zuletzt gemessenen Proben mit höherer Reaktionszeit. Die in der Abbildung mit Pfeil markierten Konzentrationen wurden aus Reaktionsproben bestimmt, die unmittelbar nach dem Abstoppen mit TFA mit Fließmittel verdünnt wurden. Bei die-

ser Probenbehandlung konnte eine bessere Übereinstimmung beider Methoden festgestellt werden.

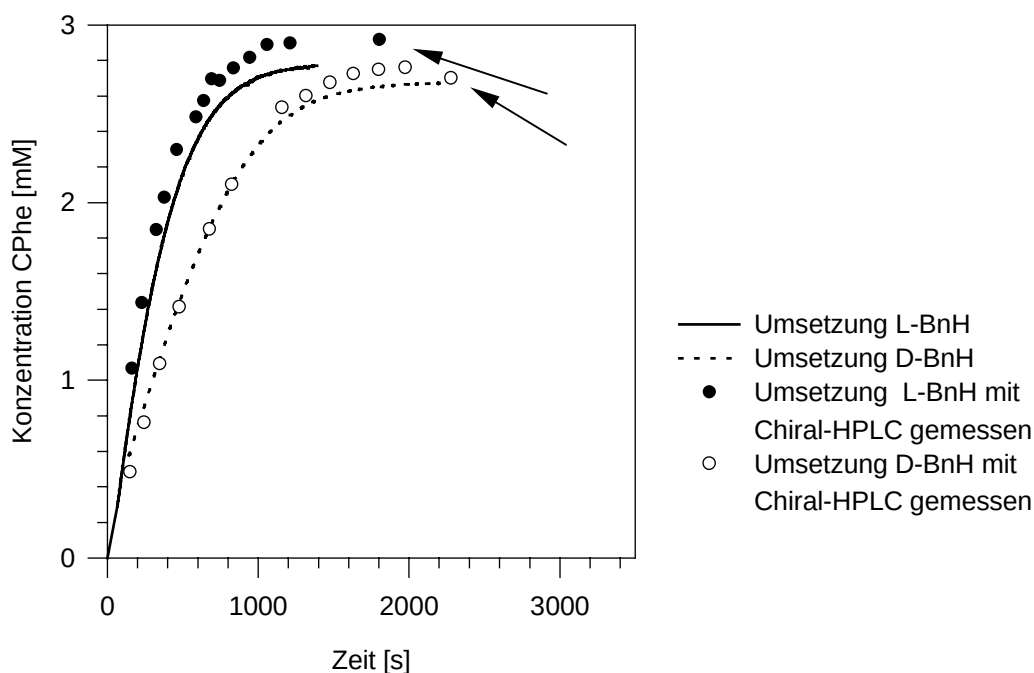


Abbildung 4.2-1: Umsetzung von 5 mM **D,L-BnH** in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5, 37 °C mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden online polarimetrisch (durchgezogene Kurven) und nach Abstoppen mit 0.5 % (v/v) TFA chromatographisch (Symbole) bestimmt. Die mit Pfeilen markierten Punkte zeigen Messungen von Reaktionsproben, die nach dem Abstoppen mit TFA unmittelbar mit Fließmittel verdünnt wurden.

Daraufhin wurde versucht, eine größere Menge TFA zum Stoppen der Reaktionslösung einzusetzen. Bei einer identischen Umsetzung wurden die Proben mit 4 % (v/v) TFA gestoppt, einige Stunden bei RT gelagert und anschließend wie oben beschrieben verdünnt und die Konzentrationen mittels chiraler HPLC bestimmt (Abbildung 4.2-3). Hier zeigte sich, daß die polarimetrisch online gemessenen Konzentrationen (durchgezogenen Kurven) über den mittels HPLC bestimmten Konzentrationen lagen (Abbildung 4.2-3). Dies wurde besonders deutlich bei den zuletzt gemessenen Proben mit höherer Reaktionszeit. Die in der Abbildung mit Pfeil markierten Konzentrationen wurden aus Reaktionsproben bestimmt, die unmittelbar nach dem Abstoppen mit TFA mit Fließmittel verdünnt wurden. Bei dieser Probenbehandlung kann eine bessere Übereinstimmung beider Methoden festgestellt werden. Die Abweichung wurde in diesem Fall vermutlich durch die pH-abhängige nichtenzymatische Verlagerung des Gleichgewichts zwischen **CPhe** zu **BnH** verursacht (Abbildung 4.2-2).

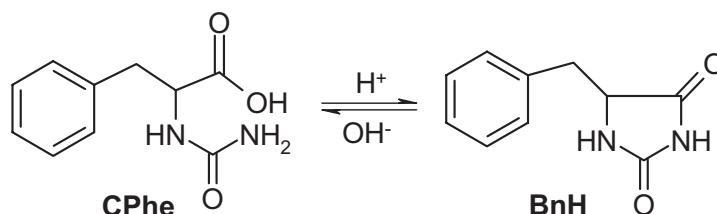


Abbildung 4.2-2: Nichtenzymatische Reaktion von CPhe zu **BnH** durch eine Absenkung des pH-Werts

Bei einer Wiederholung des Versuchs wurde die Proben ebenfalls mit 4 % (v/v) TFA gestoppt, aber dann sofort 50 μl der gestoppten Probe mit 950 μl Fließmittel verdünnt. Die anschließend mittels HPLC bestimmten Konzentrationen zeigten Abweichungen der unterschiedlichen Methoden von maximal 5 %. In allen folgenden Untersuchungen wurden auch die Eichlösungen mit 4 % TFA versetzt und die Probenreihenfolge variiert (3.6.1, S. 26). Somit konnte bereits bei der Eichung sichergestellt werden, daß die in Abbildung 4.2-2 dargestellte Reaktion nicht ablief. Mit dieser Abstoppmethode konnte nach 12-stündiger Meßzeit kein Unterschied zwischen polarimetrisch und mittels HPLC bestimmten Konzentrationen nachgewiesen werden (Abbildung 5.2-1, S. 122). Zum Vergleich beider analytischer Methoden siehe auch (Teves et al., 1999).

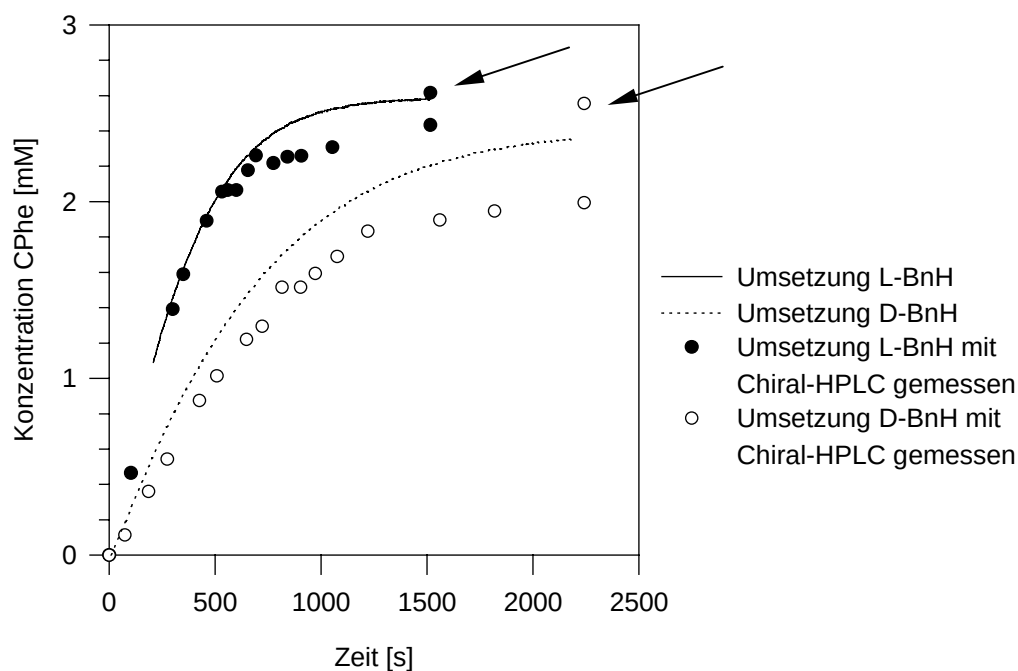


Abbildung 4.2-3: Umsetzung von 5 mM **D,L-BnH** in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5, 37 °C mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden online polarimetrisch (durchgezogene Kurven) und nach Abstoppen mit 4 % (v/v) TFA chromatographisch (Symbole) bestimmt. Die mit Pfeilen markierten Punkte zeigen Messungen von Reaktionsproben, die nach dem Abstoppen mit TFA unmittelbar mit Fließmittel verdünnt wurden.

4.2.2 Hydrolyse von BnH bei der Lagerung

Eine 5 mM **D,L-BnH** wurde nach Methode 3.4.1 (S. 23) angesetzt und 4 Wochen gelagert. Danach betrug der pH-Wert der Lösung etwa 9 und eine HPLC-Messung zeigte, daß ca. 11 % des **D,L-BnH** zu **D,L-CPhe** hydrolysiert waren. Daher wurden die Hydantoinlösungen für alle danach durchgeführten Untersuchungen immer frisch angesetzt.

4.2.3 Reproduzierbarkeit der Enantioselektivitätsbestimmung und Einfluß der Enzymkonzentration

Um die Reproduzierbarkeit der Bestimmung von E abschätzen zu können, wurde eine Umsetzung von **BnH** bei pH 7.5 und 37 °C zweimal mit unterschiedlichen Enzymmengen wiederholt. Dabei zeigte sich, daß die Kurvenverläufe sehr dicht beieinander lagen. Diese Messung zeigte wie erwartet, daß eine Variation der Enzymmenge zwischen 3.1 U und 9.3 U (bezüglich **D,L-BnH**) lediglich einen Einfluß auf die Umsetzungsgeschwindigkeit, nicht aber auf die Enantioselektivität hat. Abbildung 4.2-4 und Abbildung 4.2-5 zeigen die Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** bei pH 7.5 in 0.1 M Tris-Puffer mit 3.1 U bzw. 9.3 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745. In Abbildung 4.2-6 ist die gute Übereinstimmung der beiden Kurvenverläufe der Umsetzungen mit 3.1 U und 9.3 U Enzymlösung zu erkennen. Damit konnte gezeigt werden, daß zum einen die Messungen reproduziert werden könnten und zum anderen die Enzymaktivität in diesem Aktivitätsbereich keinen Einfluß auf die Enantioselektivität zeigte.

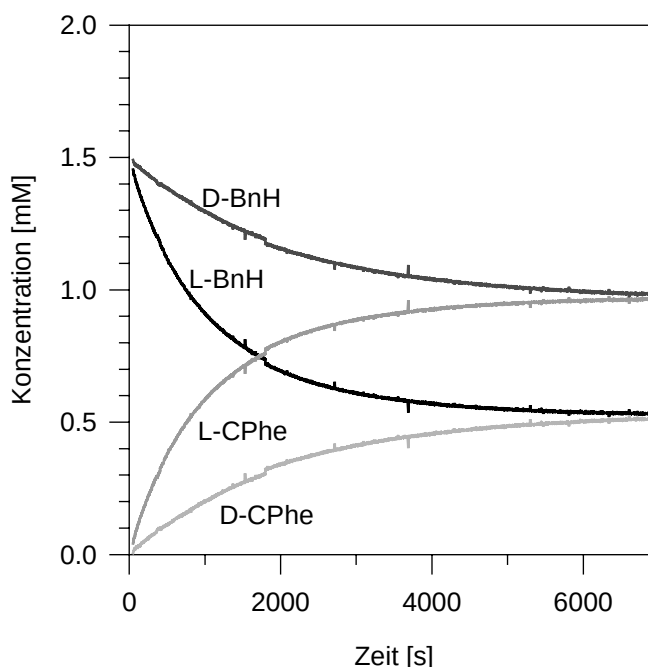


Abbildung 4.2-4: Darstellung der kontinuierlich aufgenommenen Meßwerte der Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** mit 3.1 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 bei pH 7.5 und 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer

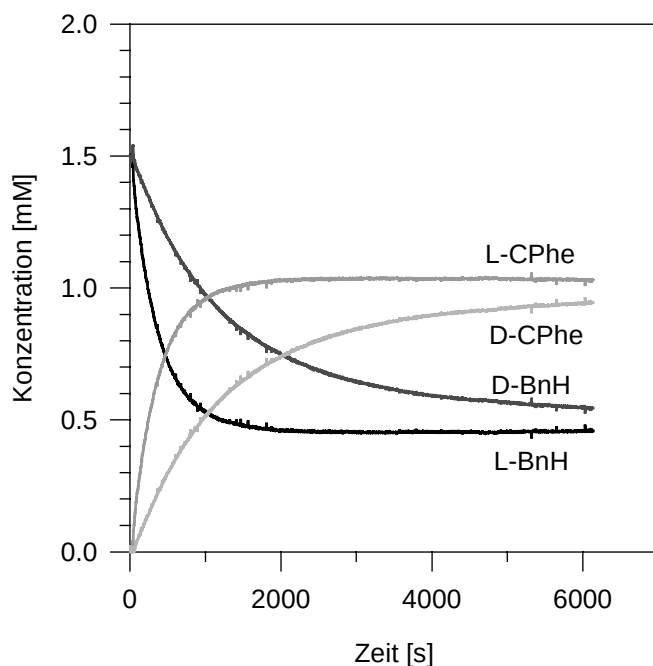


Abbildung 4.2-5: Darstellung der kontinuierlich aufgenommenen Meßwerte der Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** mit 9.3 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bei pH 7.5 und 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer

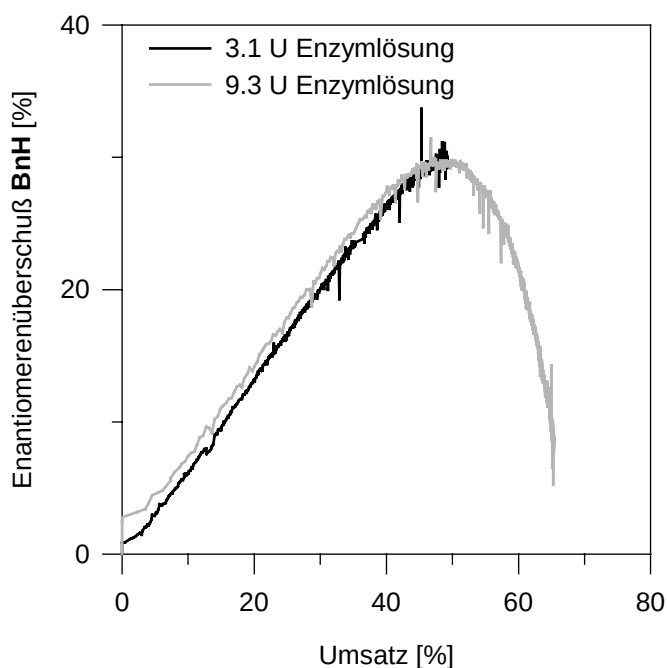


Abbildung 4.2-6: Darstellung vom Enantiomerenüberschuß in Abhängigkeit vom Umsatz aus den in Abbildung 4.2-4 und Abbildung 4.2-5 gezeigten kontinuierlich gemessenen Umsetzungen von 3 mM **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bei pH 7.5 und 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer. Außer der Enzymmenge wurden alle anderen Reaktionsbedingungen konstant gehalten.

4.3 Racemisierungsgeschwindigkeiten von 5-monosubstituierten Hydantoinen

Zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter wurde die maximal zulässige Reaktionszeit der Umsetzungen so kurz gewählt, daß die unerwünschte Racemisierung der Hydantoine während der Messung vernachlässigt werden konnte. Um die dafür erforderlichen Racemisierungskonstanten aller untersuchten Hydantoine unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen zu messen, wurden die unter 3.6.4 (S. 30) und 3.6.5.2 (S. 32) beschriebenen Methoden eingesetzt. Tabelle 4.3-1 zeigt eine Auflistung der Racemisierungsgeschwindigkeiten der untersuchten Hydantoine.

Tabelle 4.3-1: Racemisierungsgeschwindigkeiten verschiedener Hydantoine

Substanz	pH	T [°C]	Racemisierungs- konstante k [1/h]	Halbwertszeit der Racemi- sierung ^{a)} [h]	max. Reaktions- zeit bei 5 % Racemisierung [h]	Methode ^{b)}
BnH	8.5	37	0.133	5.2	0.39	p
	7.5	37	0.031	22.4	1.67	
	9.5	37	0.169	4.1	0.31	
	8.5	25	0.041	16.9	1.27	
	8.5	45	0.082	8.5	0.63	
	3	37	0.017 ^{c)}	41.3	3.05	
PhEH	8.5	37	0.144	4.8	0.36	cR
MTEH	8.5	37	0.144	4.8	0.36	p
TSMH	8.5	37	0.067	10.4	0.78	cR
NPH	8.5	37	0.108	6.4	0.48	p

^{a)} die Zeit, zu der die Hälfte der Gleichgewichtskonzentration an **D,L-BnH** entstanden ist, also aus 25 % des eingesetzten **L-BnH** **D-BnH** entstanden ist.

^{b)} p: polarimetrisch (3.6.5.2, S. 32); cR: chromatographisch, ausgehend vom Racemat (3.6.4 S. 30); mittels HPLC

^{c)} (Abendschein, 1998)

4.4 Biotransformationen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745

4.4.1 Untersuchungen mit Benzylhydantoin

4.4.1.1 Umsetzung von L-Benzylhydantoin

Zur Ermittlung der Kinetik von Reaktionen mit **L-BnH** (Abbildung 4.1-2a, S. 73) wurde die Reaktion in einer Polarimeterküvette nach 3.10.1.2 (S. 61) bei 37 °C durchgeführt. Der mit dem PC aufgenommene zeitliche Drehwertverlauf (Abbildung 4.4-1) wurde nach 3.10.1.2 (S. 61) in einen Konzentrations-Zeit-Verlauf umgerechnet (Abbildung 4.4-2).

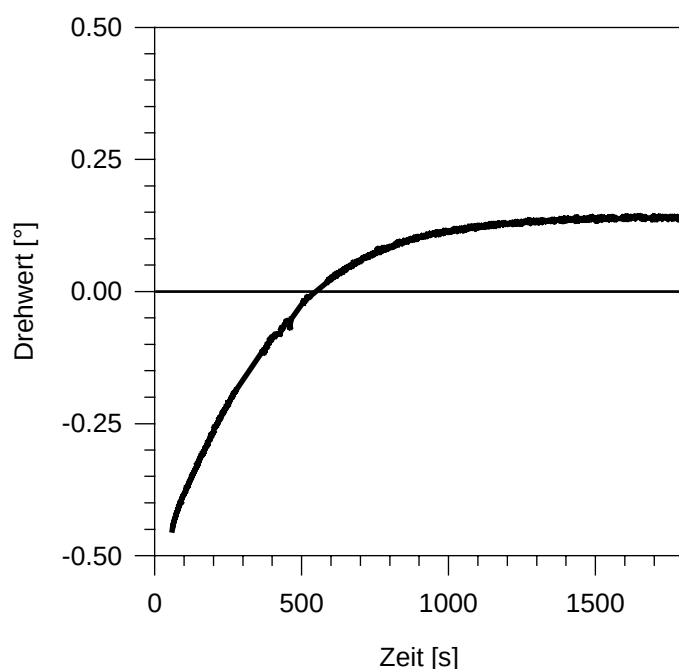


Abbildung 4.4-1: Kontinuierlich gemessener Drehwertverlauf der Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C.

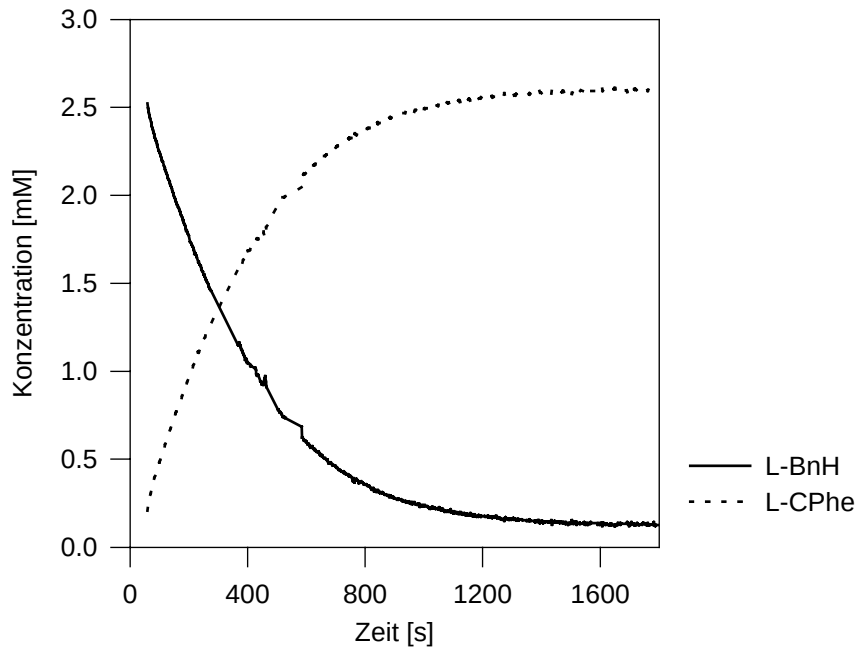


Abbildung 4.4-2: Berechneter Konzentrations-Zeit-Verlauf der Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit 0.12 U Hydantoinase von *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 mM Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C. Die Berechnung erfolgte aus dem Drehwertverlauf dieser Reaktion (siehe Abbildung 4.4-1).

Abbildung 4.4-2 zeigt, daß die Reaktion reversibel ist. Mit der Annahme, daß Hin- und Rückreaktion jeweils vom Typ einer Michaelis-Menten-Gleichung sind, ergibt sich folgende Reaktionsgeschwindigkeitsgleichung (Segel, 1975):

$$v = \frac{v_{\max} \left(c_{L-BnH} - \frac{c_{L-CPhe}}{K_{eq}} \right)}{K_{mL-BnH} \left(1 + \frac{c_{L-CPhe}}{K_{mCPhe}} \right) + c_{L-BnH}} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

v	Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{M}/(\text{g}_{\text{Enzym}}\text{s})$]
$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei hoher Substratkonzentration [$\mu\text{M}/(\text{g}_{\text{Enzym}}\text{s})$]
c_{L-BnH}	Konzentration von L-BnH [mM]
K_{mL-BnH}	Michaelis-Menten-Konstante von L-BnH [mM]
$K_{mL-CPhe}$	Michaelis-Menten-Konstante von L-CPhe [mM]

Da bei der Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten die Konzentration des Produkts vernachlässigt werden kann, vereinfacht sich Gleichung 4-1 zu der Michaelis-Menten-Gleichung für eine irreversible Reaktion:

$$v = \frac{v_{\max} c_{L-BnH}}{K_{mL-BnH} + c_{L-BnH}} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Um die kinetischen Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung zu schätzen, wurden Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten für unterschiedliche Konzentrationen von **L-BnH** bis zur Löslichkeitsgrenze in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 und 37 °C bestimmt. Dazu wurden die unterschiedlich konzentrierten Substratlösungen nach der unter 3.4.2 (S. 23) beschriebenen Methode angesetzt und der Aktivitätstest nach der unter 3.10.1.2 (S. 61) genannten Methode durchgeführt. Bei der Verwendung einer 5 mM **L-BnH**-Konzentration zeigte sich, daß die Lösung bereits übersättigt war und in einigen Fällen während der Reaktion spontan auskristallisierte. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden aus den gemessenen Anfangsdrehwertänderungen nach Gleichung 3-4 (S. 62) berechnet und über der Anfangssubstratkonzentrationen von **L-BnH** aufgetragen. Mit Hilfe der erhaltenen Meßdaten wurden durch nichtlineare Regressionen (Sigmaplot, Jandel Cooperation) die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4-2) zu $v_{\max} = 7.4 \mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{Enzym}} \text{s})$ und $K_m = 4.3 \text{ mmol/l}$ bestimmt (Abbildung 4.4-3, S. 82). Allerdings zeigt die Abbildung, daß die maximal eingesetzte Konzentration von **L-BnH** nicht genügte, um $v_{\max}$ zu erreichen.

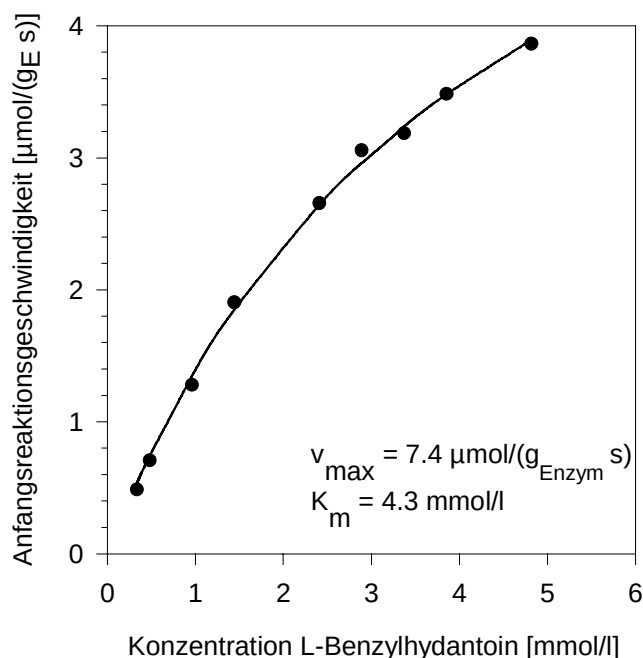


Abbildung 4.4-3: Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von **L-BnH** in Abhängigkeit von der Konzentration von **L-BnH** (Symbole). Die durchgezogene Kurve zeigt die Anpassung der Michaelis-Menten-Funktion

Die in Abbildung 4.4-3 dargestellten Symbole zeigen die nach Methode 3.10.1.2 (S. 61) ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzung von **L-BnH** bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Die durchgezeichnete Kurve zeigt eine Regression der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4-2) an die Meßwerte.

Um festzustellen, ob sich eine Umsetzung von **L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* mit einer Anfangssubstratkonzentration von maximal 3 mM durch eine reversible Kinetik pseudo-erster Ordnung beschreiben läßt, wurde ein entsprechender Konzentrations-Zeit-Verlauf ermittelt (3.10.1.2., S. 61). Die zugehörige Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit (Gleichung 4-3) resultiert aus Gleichung 4-1 für den Fall $K_{M\text{ L-BnH}} \gg c_{\text{L-BnH}}$ und $K_{M\text{ L-Cphe}} \gg c_{\text{L-Cphe}}$:

$$v = -k \left(c_{\text{L-BnH}} - \frac{c_{\text{L-Cphe}}}{K_{eq}} \right) \quad \text{Gleichung 4-3}$$

In integrierter Form:

$$c_{\text{L-BnH}} = \frac{c_{\text{L-BnH}}^0 \left(1 + K_{eq} e^{-k t \left(1 + \frac{1}{K_{eq}} \right)} \right)}{1 + K_{eq}} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

v	Reaktionsgeschwindigkeit von L-BnH [mM/s]
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante [1/s]
t	Zeit [s]
$c_{\text{L-BnH}}$	Konzentration von L-BnH (zum Zeitpunkt t)
$c_{\text{L-BnH}}^0$	Anfangskonzentration von L-BnH

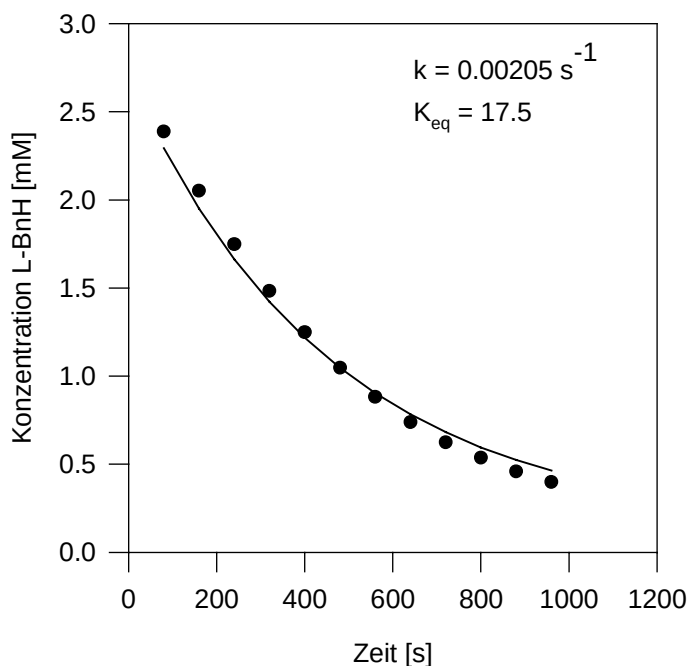


Abbildung 4.4-4: Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit Hydantoinase von *Arthrobacter aureus* DSM 3745. Die Symbole zeigen eine Auswahl der kontinuierlich bestimmten Konzentrationen dar (siehe Abbildung 4.4-2, S. 81). Die durchgezogene Kurve zeigt die nichtlineare Regression von Gleichung 4-4 an die Meßwerte.

Abbildung 4.4-4 zeigt als Symbole eine Auswahl der Meßdaten des in Abbildung 4.4-2 (S. 81) dargestellten Konzentrations-Zeit-Verlauf der Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit 0.12 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 in 0.1 mM Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C. Die durchgezogene Kurve zeigt eine nichtlineare Regression von Gleichung 4-4 an die Meßwerte. Bei einer vorgegebenen Gleichgewichtskonstante von $K_{eq} = 17.5$, welche aus der in Abschnitt 4.4.1.4 (S. 88) beschriebenen Untersuchung erhalten wurde, konnte die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zu $k = 0.002 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Da die Meßwerte gut mit der Regression einer Reaktion erster Ordnung beschrieben werden konnten, läßt sich festhalten, daß aufgrund der geringen Löslichkeit des Hydantoinos die kinetischen Parameter K_m und v_{max} für die Umsetzung von **L-BnH** nicht bestimmbar sind.

Die Geschwindigkeitskonstante k und damit auch die Aktivität hängt stark von der verwendeten Enzymfraktion ab. Vor allem ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer Enzymlösung zeigte eine Abnahme der spezifischen Aktivität (May, persönliche Mitteilung). Zur besseren Vergleichbarkeit mußte daher zur Bestimmung der spezifischen Aktivität unterschiedlicher Umsetzungen immer dieselbe Enzymfraktion verwendet werden und parallel die Aktivitätsbestimmung der Standardumsetzung von **L-BnH** durchgeführt werden (siehe auch 3.10, S. 61). Eine Auflistung der Enzymaktivitäten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen befindet sich in Kapitel 4.4.9 (S. 109).

4.4.1.2 Umsetzung von D-Benzylhydantoin

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, daß **L-BnH** nach einer Kinetik erster Ordnung umgesetzt wurde. Im folgenden wurde untersucht, ob sich die kinetischen Parameter K_M und $v_{\max}$ der Michaelis-Menten-Gleichung für die Umsetzung von **D-BnH** bestimmen lassen. Die Vorgehensweise für dieses Substrat war identisch mit der unter 4.4.1.1 (S. 80) beschriebenen.

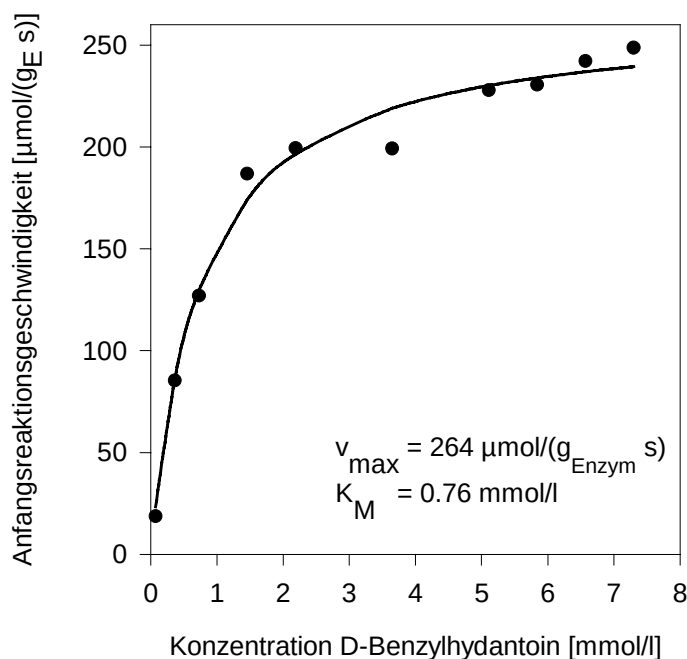


Abbildung 4.4-5: Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von **D-BnH** in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration (Symbole). Die durchgezeichnete Kurve zeigt die nicht-lineare Regression einer Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung 4-2, S. 82) an die Meßwerte.

Die in Abbildung 4.4-5 gezeigten Symbole stellen die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen dar. Mittels Kurvenregression einer Michaelis-Menten-Funktion mit Hilfe des Softwarepakets Sigmaplot (Jandel Cooperation) wurden die kinetischen Parameter mit $v_{\max} = 264 \text{ U/g}_{\text{Enzym}}$ und $K_m = 0.76 \text{ mM}$ bestimmt (durchgezogene Kurve).

4.4.1.3 Umsetzung von D,L-BnH und Ermittlung der Enantioselektivität bei Standardbedingungen

Zur Bestimmung der Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 wurden Umsetzungen von 3 mM **D,L-BnH**-Lösungen durchgeführt. Zur Ermittlung der Online-Konzentrationsverläufe aller Enantiomere über der Reaktionszeit wurde der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebene Versuchsaufbau verwendet. Nach der Auswertung der vom PC aufgenommenen Meßdaten wurden die Meßwerte graphisch aufgetragen.

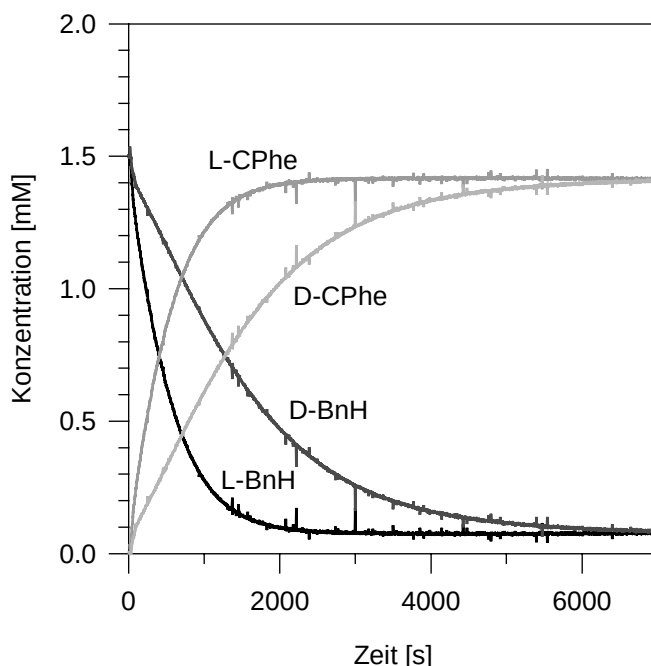


Abbildung 4.4-6: Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Enantiomere bei der enantioselektiven Umsetzung einer 3 mM **D,L-BnH**-Lösung in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5, 37 °C mit 4.65 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745.

In Abbildung 4.4-6 sind die Konzentrationsverläufe aller vier bei der Hydantoinase-reaktion beteiligten Enantiomere gezeigt. Die Konzentration an **L-BnH** nimmt schneller ab als die Enantiomerenkonzentration des D-Substrats. Entsprechend ist die schnelle Zunahme des **L-CPhe** gegenüber der Konzentration des D-Produkts zu erkennen. Die Zacken in den Kurven werden durch Luftblasen in den Küvetten hervorgerufen. Es ist zu erkennen, daß die Substratenantiomere bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von insgesamt 0.13 mM abnehmen. Daraus errechnet sich eine Gleichgewichtskonstante von 22.1. Mittels HPLC-Messung derselben Reaktionslösung (Abbildung 4.4-6) wurde aber eine um 14 % höhere Gleichgewichtskonstante von 25.3 berechnet. Zur Erklärung dieser Abweichung muß berücksichtigt werden, daß die Größe des Meßfehlers bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten mit dem Meßaufbau aus Polarimeter-Photometer von der Genauigkeit des Photometers abhängt. Da aber weder der Grundliniendrift noch die Konstanz der Wellenlänge während der Messung kontrolliert werden konnte, ist der mittels HPLC bestimmten Gleichgewichtskonstanten mehr zu vertrauen (siehe hierzu auch 5.2.2.1 (S. 121)). Ein weiterer Nachteil der oben beschriebenen online Meßmethode (3.10.2.2, S. 63) ist, daß sich Meßfehler immer auf die Konzentrationen aller vier Enantiomere auswirken. Die Ursache hierfür ist die in den Berechnungen zugrunde gelegte konstante Molsumme aller Enantiomere (siehe 8.4.3, S. 166).

Nach der unter 3.10.2.4 (S. 68) beschriebenen Methode wurde an die Meßwerte die Funktion von Chen et al. (Gleichung 3-8, S. 67) zur Ermittlung der Enantioselektivität angepaßt (Abbildung 4.4-7).

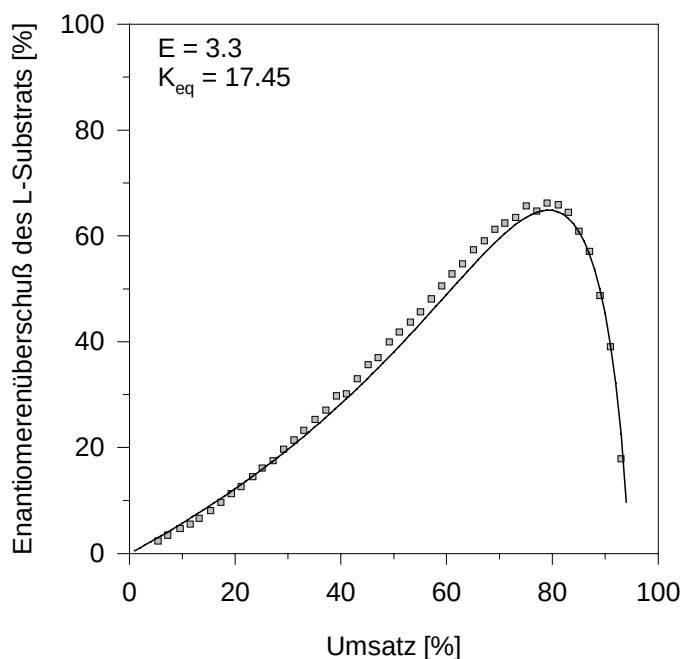


Abbildung 4.4-7: Auftragung des Enantiomerenüberschusses von **L-BnH** über dem Umsatz für die Umsetzung von **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 bei 37 °C. Durch Anpassung (durchgezogene Linie) der Gleichung von Chen et al. an ausgewählte Meßwerte der Umsetzung (Symbole) wurde die Enantioselektivität ermittelt.

Der Verlauf des Enantiomerenüberschusses über die Reaktionszeit (Abbildung 4.4-7) zeigt, daß die Umsetzung von **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 reversibel verläuft und enantioselektiv bezüglich des L-Enantiomers ist. Bei einer irreversiblen Reaktion müßte die Kurve einen Enantiomerenüberschuß von 100 % **L-BnH** erreichen. Wäre die Reaktion zusätzlich noch enantiospezifisch, würde dies bei 50 % Umsatz der Fall sein. Reversible, enantioselektive Reaktionen sind also ungeeignet um enantiomerenreine Verbindungen zu erhalten. Die in Abbildung 4.4-7 als Symbol dargestellten Meßdaten konnten durch eine Simulation der Funktion von Chen et al. zufriedenstellend beschrieben werden. Mit Hilfe der Methode 3.10.2.4 (S. 68) wurde für diese Reaktion eine Enantioselektivität von 3.3 und eine Gleichgewichtskonstante von 17.45 bestimmt (Tabelle 4.4-1).

Tabelle 4.4-1: kinetische Daten aus der Anpassung

Temperatur [°C]	pH-Wert	Gleichgewichtskonstante [1]	Enantioselektivität [1]
37	8.5	17.45	3.3

4.4.1.4 Einfluß der Temperatur auf die Enantioselektivität

Das ‚induced fit‘-Modell der Substrat-Enzym-Wechselwirkung basiert auf einer konformativen Änderung des aktiven Zentrums eines Enzyms infolge der Bindung des Substrates (Koshland, 1973; Koshland, 1994). Da mit steigender Temperatur die Eigenbewegung der Moleküle zunimmt, vergrößern sich durch die Erhöhung der Molekülschwingungsniveaus auch die Bindungsabstände. Vor allem nichtkovalente Bindungen mit geringer Bindungsdissoziationsenergie, wie z.B. Wasserstoffbrücken oder ionische Wechselwirkungen sind bezüglich ihrer Bindungslänge stark temperaturabhängig. Da die Tertiärstruktur von Enzymen vor allem über nichtkovalente Bindungen stabilisiert wird, ist ein großer Temperatureinfluß auf die räumliche Struktur des aktiven Zentrums zu erwarten. Somit könnte eine Temperaturerhöhung zu einer Abnahme der Enantioselektivität führen, da mit zunehmender Molekülbewegung die für die Substratbindung notwendigen Gruppen undefinierter binden müßten. Z. B. publizierten Holmberg und Hult eine mathematische Beziehung zwischen der Temperatur und der Enantioselektivität für eine Lipase aus *Candida cylindracea* (Holmberg, Hult, 1991).

$$E_1^{T_1} = E_2^{T_2} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

T_1, T_2 Temperaturen 1 und 2 [K]

E_1 Enantioselektivität der Substanz bei Temperatur T_1 [1]

E_2 Enantioselektivität der Substanz bei Temperatur T_2 [1]

Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Zusammenhang auch für die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 besteht, wurde die Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** Lösung mit diesem Enzym nach 3.10.2.2 (S. 63) bei den Temperaturen 25, 37 und 45 °C in 0.1 M Tris-Puffer bei pH 8.5 durchgeführt. Da es von Interesse war, welchen Einfluß eine Temperaturschwankung auf die Enantioselektivität zeigt, wurde der pH-Wert, wie unter 3.2 (S. 22) beschrieben, bei RT eingestellt und anschließend bei der entsprechenden Reaktionstemperatur nicht mehr korrigiert.

Abbildung 4.4-8 zeigt wieder die zufriedenstellende Übereinstimmung der angepaßten Kurven an die Meßdaten, wobei die Güte der Übereinstimmung mit zunehmender Temperatur zunimmt. Auffällig ist die unterschiedliche Höhe der Maxima der drei Kurven, was folgendermaßen erklärt werden kann:

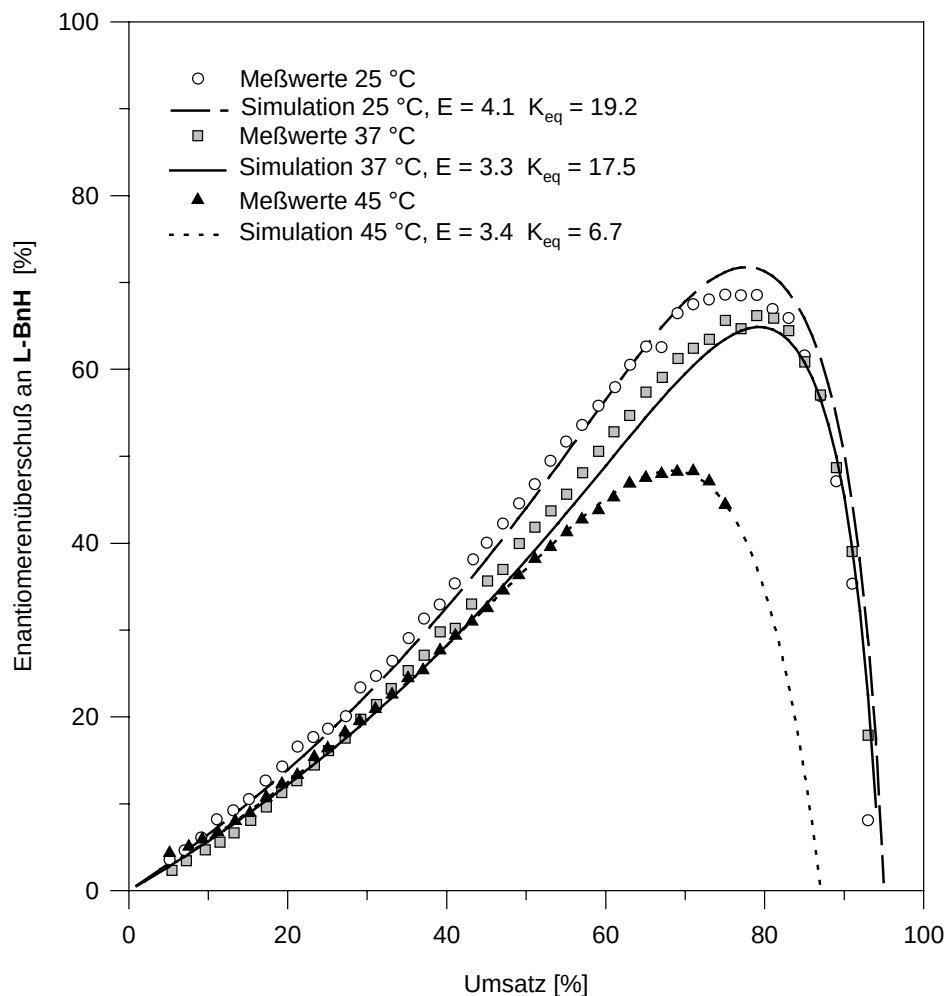


Abbildung 4.4-8: Auftragung des Enantiomerenüberschusses von **L-BnH** über dem Umsatz für die Umsetzung von **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 bei 3 verschiedenen Temperaturen. Die durchgezogenen Kurven stellen die jeweiligen Anpassungen an die als Symbole dargestellten Meßwerte dar.

Die Gleichgewichtskonstante ist nach folgender Beziehung temperaturabhängig:

$$\Delta_R G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

$\Delta_R G^0$ freie Standardreaktionsenthalpie [kJ/mol]
 R Gaskonstante [kJ/(mol K)]
 T Temperatur [°C]
 K_{eq} Gleichgewichtskonstante [1]

Diese Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante wirkt sich auf die Höhe der Maxima in den Kurven aus. Die Anpassungen ergaben folgende Parameter:

Tabelle 4.4-2: Einfluß der Temperatur auf die Umsetzung von **D,L-BnH**

T [°C]	pH-Wert	K _{eq} [1]	E [1]	A _{spez.} [U/mg]	
				L	D
25	8.5	19.2	4.1	28.5	7.8
37	8.5	17.5	3.3	58.3	19.3
45	8.5	6.7	3.4	35.3	15.8

Den ermittelten Parametern ist zu entnehmen, daß eine Variation der Temperatur zwischen 25 und 45 °C keinen nennenswerten Einfluß auf die Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 für dieses Substrat zeigt. Da die Untersuchungen von Holmberg und Hult eine Variation des E-Wertes um 3 in einem Temperaturintervall von 30 ° zeigten, läßt sich deren Modell auf die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 nicht übertragen.

4.4.1.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Enantioselektivität

Neben dem Einfluß der Temperatur (siehe 4.4.1.4) können sich auch pH-Wert-Variationen auf die Eigenschaften des aktiven Zentrums auswirken. Die Ladung von Hydroxyl-, Carboxyl- und Aminogruppen ist pH-abhängig. Es ist denkbar, daß solche Effekte Auswirkungen auf die Konformation des Enzyms zeigen können und damit auch auf dessen Enantioselektivität. In den folgenden Untersuchungen wurde die Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** Lösung mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 bei den pH-Werten 7.5, 8.5 und 9.5 in 0.1 M Tris-Puffer bei 37 °C durchgeführt.

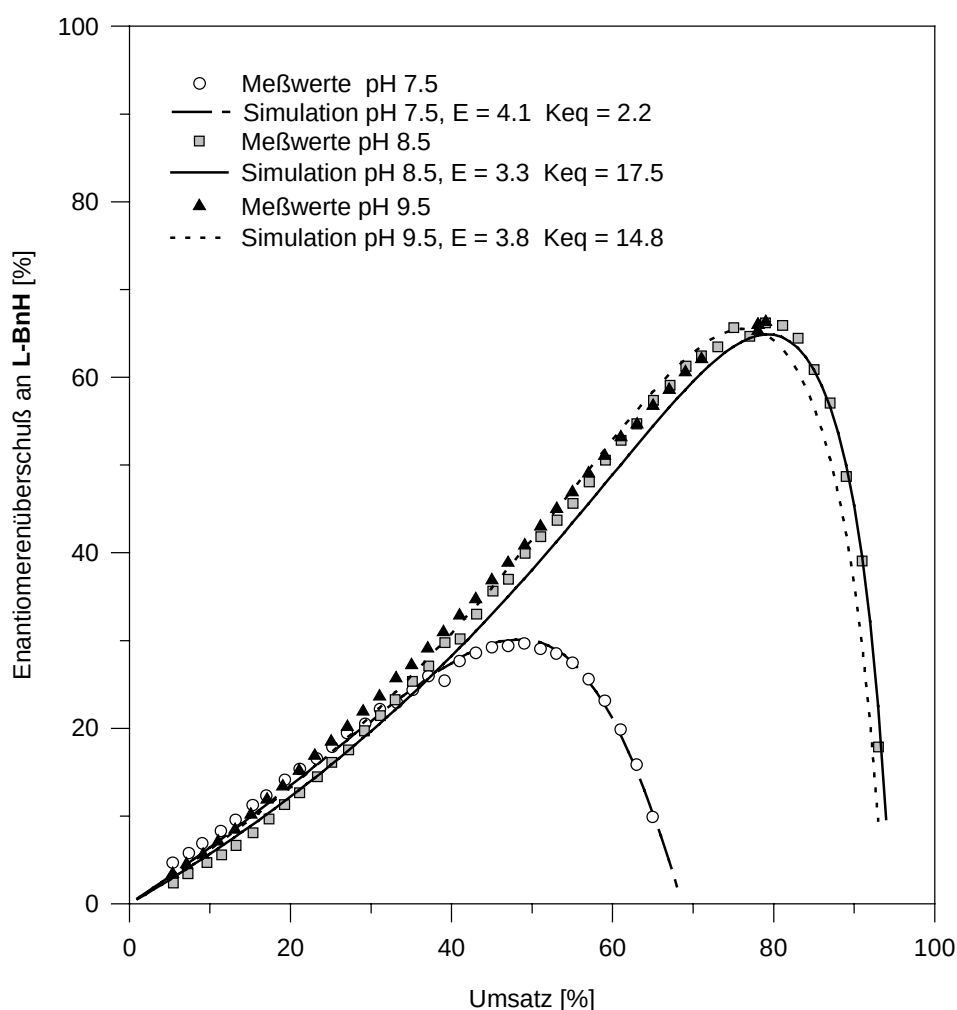


Abbildung 4.4-9: Auftragung des Enantiomerenüberschusses von **L-BnH** über dem Umsatz für die Umsetzung von **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 bei drei verschiedenen pH-Werten. Die durchgezogenen Kurven stellen die jeweiligen Anpassungen an die als Symbole dargestellten Meßwerte dar.

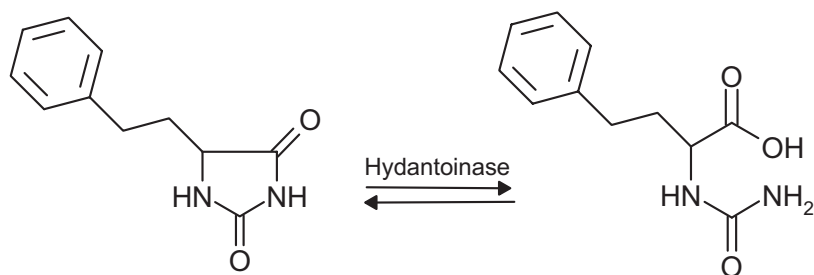
In der Abbildung ist eine zufriedenstellende Übereinstimmung der simulierten Funktionen mit den Meßdaten zu erkennen. Während die Kurvenverläufe bei pH 8.5 und 9.5 nahezu identisch sind, unterscheidet sich die Kurvenform bei pH 7.5 beträchtlich. Auch der pH-Wert hat einen Einfluß auf die Lage des Gleichgewichts und damit auf die Gleichgewichtskonstante. Diese pH-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstante wird auch bei der Synthese von Hydantoinen aus Carbamoylaminosäuren genutzt, bei denen der Ringschluß durch konzentrierte Säuren katalysiert wird. Aus den Anpassungen konnten folgende Daten ermittelt werden:

Tabelle 4.4-3: Einfluß des pH-Werts auf die Umsetzung von **D,L-BnH**

pH-Wert	T [°C]	K _{eq} [1]	E[1]	A _{spez.} [U/mg]	
				L	D
7.5	37	2.2	4.1	39.5	14.0
8.5	37	17.5	3.3	58.3	19.3
9.5	37	14.8	3.8	54.8	14.8

Aus den Daten in *Tabelle 4.4-3* und *Abbildung 4.4-9* ist festzustellen, daß in dem untersuchten pH-Bereich kein nennenswerter Einfluß der Enantioselektivität vorliegt. Wie auch im Falle des Temperatureinflusses (4.4.1.4, S. 88) scheint die mit dem 5-Substituenten wechselwirkende Region zur stereospezifischen Erkennung vom pH-Wert nicht beeinflusst zu werden. Dagegen zeigt die enzymatische Aktivität für **BnH** eine deutliche pH-Abhängigkeit. So führt z. B. eine pH-Wert-Erhöhung von 7.5 auf 8.5 zu einer Erhöhung der Aktivität um 50 % (siehe *Tabelle 4.4-7*, S. 112).

4.4.2 Untersuchungen mit Phenylethylhydantoin

Abbildung 4.4-10: Enzymatische Umsetzung von **D,L-PhEH**

Um den Einfluß der Länge des Substituenten der 5-Position zu untersuchen, wurde die Anzahl der Methylengruppen variiert. Dazu wurden D,L-5-Benzylhydantoin (**D,L-BnH**) und D,L-5-Phenylethylhydantoin (**D,L-PhEH**) synthetisiert (siehe 3.7, S. 34), D,L-5-Phenylhydantoin (**D,L-PhH**) stammte aus Beständen des Institutes. Bei diesen Untersuchungen sollte getestet werden, ob die Verbindungen **PhH** und **PhEH** ebenfalls Substrate der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 sind und wie sich die Anzahl der Methylengruppen zwischen Hydantoinring und der Phenylgruppe auf die Enantioselektivitäten der Umsetzungen auswirkt. Es zeigte sich, daß **PhH** als Substrat nicht akzeptiert wurde (siehe dazu *Tabelle 4.4-8*, S. 113). Dagegen wurde **D,L-PhEH** als Substrat akzeptiert. Die Bestimmung der Enantioselektivität der Hydantoinase für diese Umsetzung erfolgte mit einer 3 mM **D,L-PhEH**-Lösung in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C. Dabei waren die Reaktionsbedingungen identisch mit der Umsetzung von **D,L-BnH** 3.10.2.2 (S. 63).

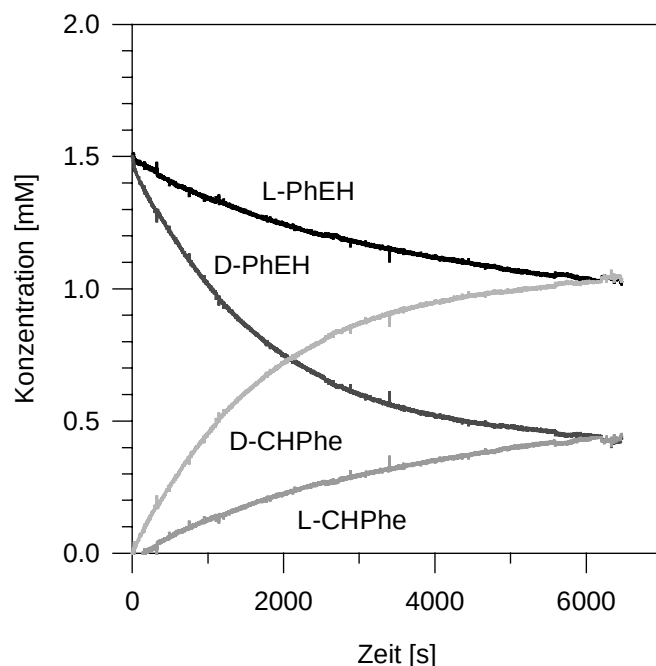


Abbildung 4.4-11: Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Enantiomere bei der Umsetzung einer 3 mM **D,L-PhEH**-Lösung in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5, 37 °C mit 720 μ l (22.3 U) Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745.

Die Kurven in Abbildung 4.4-11 zeigen die Konzentrationsverläufe der Substrat- und Produktenantiomere der Umsetzung von **D,L-PhEH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Im Gegensatz zur Umsetzung von **D,L-BnH** (Abbildung 4.4-6, S. 86) verhält sich die Enantioselektivität der Hydantoinase für diese Umsetzung genau umgekehrt. Im Vergleich zum L-Enantiomer des Substrates ist eine schnellere Abnahme der **D-PhEH**-Konzentration zu erkennen. Entsprechend nimmt die Konzentration an **D-CHPhe** schneller zu als die des L-Produktes. Da die Messung der Reaktion aufgrund der geringen Aktivität der Hydantoinase für dieses Substrat nicht bis zum Gleichgewicht gemessen wurde, kann die Gleichgewichtskonstante aus dieser Abbildung nicht ermittelt werden.

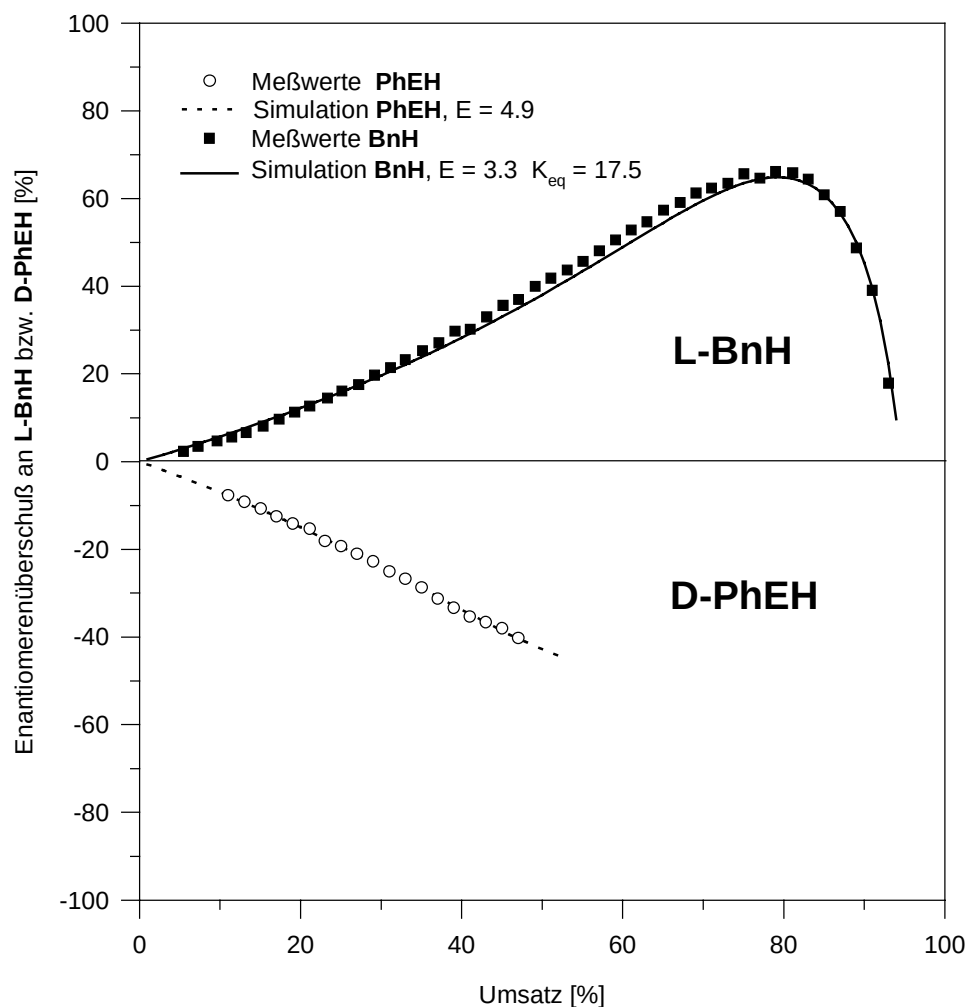


Abbildung 4.4-12: Auftragung des Enantiomerenüberschusses von **D-BnH** bzw. **L-PhEH** über dem Umsatz für die Umsetzung von 3 mM **D,L-PhEH** und 3 mM **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Die Menge des zugegebenen Enzyms betrug bei der Umsetzung von **D,L-BnH** 150 μ l (4.65 U) bzw. 720 μ l (22.32 U). Die durchgezogenen Kurven stellen die jeweiligen Anpassungen an die als Symbole dargestellten Meßwerte dar.

Die Abbildung zeigt eine zufriedenstellende Übereinstimmung der angepaßten Kurve mit den Meßdaten der Umsetzung von **PhEH**. Allerdings wurden nur Meßwerte für Umsätze bis ca. 50 % erhalten, da die spezifische Aktivität der Hydantoinase für dieses Substrat nur 1/15 von der für das **BnH** betrug (siehe Tabelle 4.4-7, S. 112).

Unter der Voraussetzung, daß sich die Kinetik nicht ändert, ergeben sich folgende Parameter:

Tabelle 4.4-4: aus der Anpassung in Abbildung 4.4-12 ermittelte Parameter

Substrat	pH-Wert	T [°C]	K _{eq} [1]	E [1]	A _{spez.} [U/mg]	
					L	D
BnH	8.5	37	17.5	3.3 (L)	58.3	19.3
PhEtH	8.5	37		4.9 (D)	3.8	1.3

Interessanterweise verursacht eine Verlängerung des Rests um eine Methylengruppe eine Umkehr der Enantioselektivität der Hydantoinase. Die Gleichgewichtskonstante dieser Umsetzung ist vermutlich mit einem großen Fehler behaftet, da zur genaueren Bestimmung Meßdaten bei höheren Umsätzen als 50 % notwendig wären.

4.4.3 Untersuchungen zur Umsetzung von (Trimethylsilylmethyl)-hydantoin

1992 stellte Weidmann fest, daß L-TMS-Alanin in Peptiden ein biologisches Isoster zu Phenylalanin darstellt. Der Trimethylsilylrest besitzt nach diesen Ausführungen in etwa die gleiche Raumerfüllung wie der Phenyl-Rest im Phenylalanin (Weidmann, 1992). Es konnte gezeigt werden, daß TMS-Alanin im Gegensatz zu Phenylalanin unempfindlich gegenüber enzymatischer Hydroxylierung ist. Darüber hinaus zeigte sich, daß TMS-Alanin-haltige Peptide im Gegensatz zu Phenylalanin-haltigen durch die Protease α -Chymotrypsin nicht gespalten werden (Walkup et al., 1995).

Im Vergleich zur maximalen Löslichkeit von **BnH** zeigt 5-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin (**TMSMH**) nur eine geringe Löslichkeit von 1 mM bei pH 8.5 in 0.1 M Tris-Puffer. Außerdem waren keine analytischen Standards von enantiomerenreinem **TMSMH** und N-Carbamoyl-TMS-Alanin (**CTMSAia**) verfügbar. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß diese Substanzen über das gesamte UV-Spektrum nur eine sehr geringe Absorption zeigen. Alle HPLC-Messungen mußten deshalb mit unverdünnten Proben bei 210 nm Detektionswellenlänge durchgeführt werden (Waniek, 1996). Diese Gründe sprachen gegen einen Einsatz der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen photometrischen Methode. Deshalb wurde versucht, eine quantitative Enantiomerenanalytik mittels Chiral-HPLC zu entwickeln.

Mittels chiraler HPLC konnten die Enantiomerenpaare von **CTMSAia** und **TMSMH** getrennt werden. Die Zuordnung der Peaks von **CTMSAia** und **TMSMH** geschah nach Synthese von Vergleichssubstanzen (3.7, S. 34), die aus der enantiomerenreinen D-Aminosäure, die früher mittels mikrobieller Biotransformation gewonnen worden war (3.9.1, S. 54).

Zur Bestimmung der Enantioselektivität wurde 1 ml einer 1 mM **D,L-TMSMH**-Lösung in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 0.031 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 zugegeben und einige Stunden bei 37 °C inkubiert.

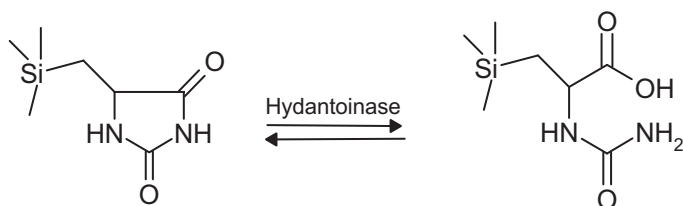


Abbildung 4.4-13: Enzymatische Umsetzung von **D,L-TMSMH**

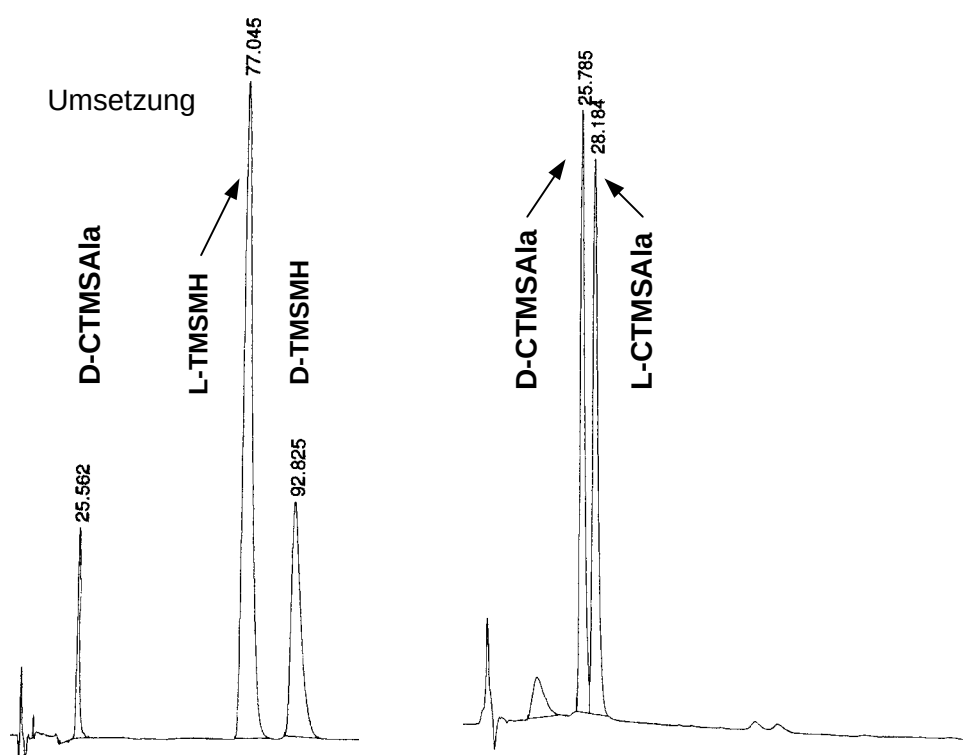


Abbildung 4.4-14: links: Chiral-HPLC-Messung einer Umsetzung von **D,L-TMSMH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745. Rechts: zum Vergleich eine Messung von **D,L-CTMSAla**.

Abbildung 4.4-14 zeigt eine Messung der Umsetzung. Dennoch wurde nur enantiomerenreines **D-CTMSAla** gebildet. Im Vergleich dazu ist eine Chiral-HPLC-Messung von **D,L-CTMSAla** gezeigt, die zusätzlich noch einen Peak von **L-CTMSAla** bei 28.2 Minuten zeigt.

Obwohl sich die Benzylgruppe und die Trimethylsilylmethyl-Gruppe bezüglich der Raumerfüllung sehr ähnlich sind, findet eine Umkehr der Enantioselektivität des Enzyms für TMSMH statt. Interessanterweise stellt **TMSMH** das erste Substrat dar, das von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* enantiospezifisch umgesetzt wurde. Um die

Bedeutung des Siliziumatoms genauer zu untersuchen wurde in dem folgenden Experiment das Siliziumatom gegen ein Kohlenstoffatom ausgetauscht.

4.4.4 Untersuchungen zur Umsetzung von Neopentylhydantoin

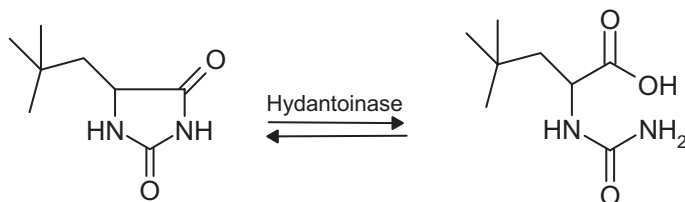


Abbildung 4.4-15: Enzymatische Umsetzung von **D,L-NPH**

Die L-Enantiomere von **NPH** und der Carbamoylaminosäure wurden nach der unter 3.7 (S.34) beschriebenen Methode synthetisiert. Mit einer maximalen Löslichkeit von 0.5 mM in 0.1 M Tris-Puffer bei pH 8.5 und 37 °C ist **D,L-NPH** schlechter löslich als **D,L-TSMH**. Um zu testen, ob die polarimetrische Methode zur Bestimmung der Enantioselektivität angewendet werden kann, wurden zunächst ORD-Spektren beider Substanzen gemessen. Bei der geringen Löslichkeit von 0.5 mM betrug der Drehwert des Hydantoins bei 253 nm -0.167° , der der Carbamoylaminosäure -0.098° . Da der maximale Meßwert theoretisch höchstens 0.069° betragen würde, konnte bei einem absoluten Meßfehler des Polarimeters von $\pm 0.02^\circ$ die Methode aufgrund der geringen Empfindlichkeit nicht eingesetzt werden. Bei der Entwicklung einer Analytik mittels HPLC zeigte sich, daß **NPH** selbst in gesättigter Lösung bei 210 nm äußerst gering absorbierte. Daher konnten Umsetzungen nur qualitativ bestimmt werden. Mittels chiraler HPLC gelang es, die Enantiomere von **D,L-NPH** zu trennen, nicht dagegen aber die von **D,L-CNPG**. Daher mußte die Ermittlung der Enantioselektivität über die Abnahme der Substratenantiomerenpeaks erfolgen.

Zur Bestimmung der Enantioselektivität dieses Enzyms für die Umsetzung von **D,L-NPH** wurde eine 0.5 mM Lösung von **L-NPH** in 0.1 M Tris-Lösung nach Methode 3.2.4 (S. 22) zur Racemisierung zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Nachdem mittels chiraler HPLC eine vollständige Racemisierung des Hydantoins nachgewiesen wurde, erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 8.5. Anschließend wurden zu 100 µl dieser Lösung 100 µl (3.1 U) Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es zeigte sich, daß die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 **D,L-NPH** mit einer sehr geringen spezifischen Aktivität von weniger als 1 U/mg_{Enzym} unselektiv umsetzte.

4.4.5 Untersuchungen zur Umsetzung von (Methylthioethyl)-hydantoin

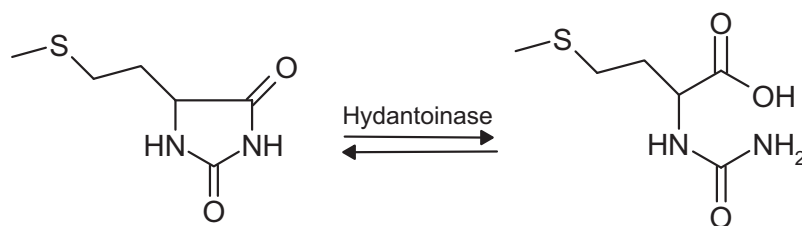


Abbildung 4.4-16: Enzymatische Umsetzung von **D,L-MTEH**

Die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 wurde für das Substrat D,L-(Methylthioethyl)-hydantoin (**D,L-MTEH**) als D-selektiv beschrieben (May et al., 1998a). Der angegebene E-Wert von 3 wurde in dieser Untersuchung aus getrennten Umsetzungen von **D-** und **L-MTEH** ermittelt. Um zu untersuchen, ob die Umsetzung des Racemats von **MTEH** zu den gleichen Ergebnissen führte, wurde die Umsetzung mit **D,L-MTEH** wiederholt. Dazu wurde nach der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Methode 3 mM **D,L-MTEH** mit 300 µl (9.3 U) Enzymlösung der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 73745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C umgesetzt.

Abbildung 4.4-17 zeigt die langsame Abnahme des **D-MTEH**, während das L-Substrat über die einstündige Reaktionszeit nahezu nicht umgesetzt wird. **D-MTEH** wird etwa 200 mal schneller umgesetzt als das L-Enantiomer. Die spezifischen Aktivitäten betragen 0.14 U für das L-Enantiomer und 30.4 U für das D-Enantiomer. Wie bereits oben erwähnt, wurde bei der Umsetzung der getrennten Enantiomere lediglich eine 3.6-fache Aktivität des **D-MTEH** im Vergleich zum L-Enantiomer unter den sonst identischen Reaktionsbedingungen beschrieben (May et al., 1998a). Zur Untersuchung, ob dieses abweichende Ergebnis vom gegenseitigen Einfluß der Enantiomere verursacht wird, wurden getrennte Umsetzungen mit enantiomerenreinen Substraten nach der unter 3.10.1.2 (S. 61) beschriebenen Methode durchgeführt.

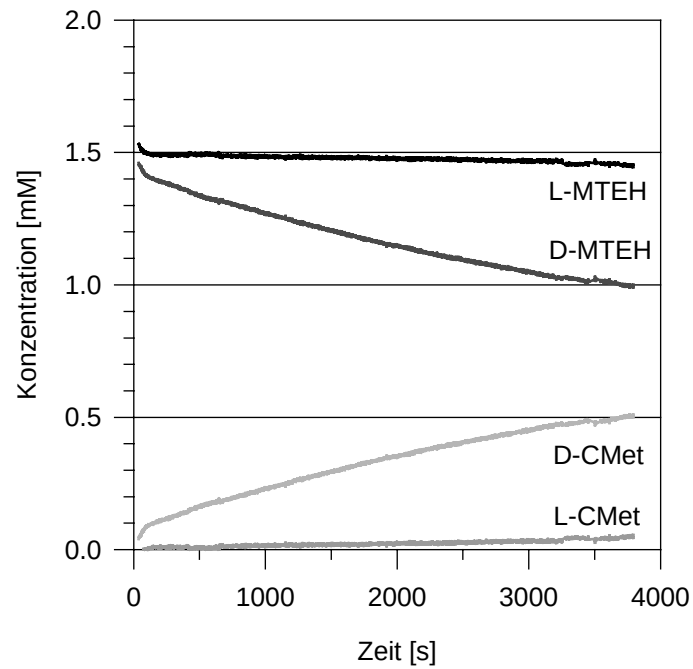


Abbildung 4.4-17: Umsetzung von 3 mM **D,L-MTEH** mit 300 μ l (9.3 U für **D,L-BnH**)
Enzymlösung der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745

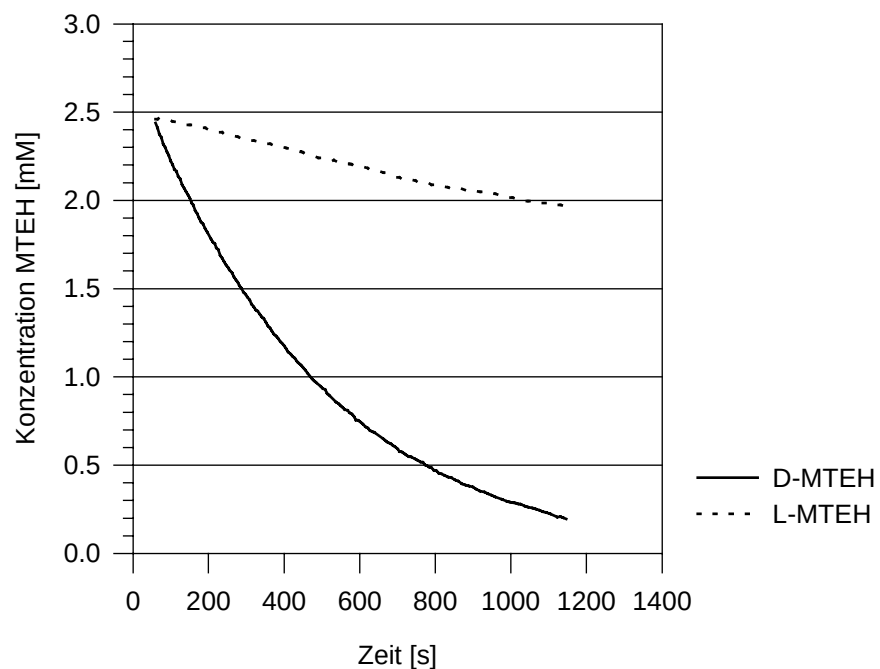


Abbildung 4.4-18: Umsetzung von **D-** bzw. **L-MTEH** mit 100 μ l (3.1 U für **D,L-BnH**)
Enzymlösung von *Arthrobacter aureus* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C.

Aus den Konzentrations-Zeit-Kurven in Abbildung 4.4-18 kann für **D-MTEH** eine spezifische Aktivität von 7.43 U/mg_{Enzym} und für **L-MTEH** 0.88U/mg_{Enzym} berechnet werden. Damit würde **D-MTEH** etwa 8-fach schneller umgesetzt als das L-Enantiomer. Damit konnten die früheren Ergebnisse von May, zumindest in der Größenordnung, bestätigt werden. Die relativen Aktivitäten der Enantiomere der Umsetzungen von **D,L-MTEH** von den getrennt gemessenen Umsetzungen der beiden Enantiomere unterschieden sich stark. Um den gegenseitigen Einfluß der Enantiomere genauer zu untersuchen, sollten daher in Zukunft Inhibitionsmessungen durchgeführt werden.

4.4.6 Untersuchungen zur Umsetzung von **D,L-1-N-Methyl-5-benzylhydantoin**

Um zu untersuchen, ob das Wasserstoffatom in der 1-Position für die Ringspaltung essentiell ist oder ein Austausch gegen eine Methylgruppe die Spaltung des Hydantoins verhindert, wurde 1-N-Methyl-5-benzylhydantoin (**1MeBnH**) synthetisiert (3.8.1.1, S. 36) und als Substrat eingesetzt.

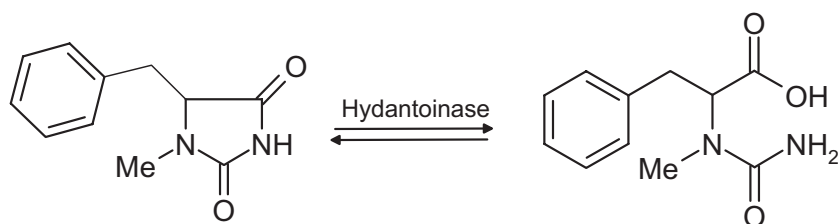


Abbildung 4.4-19: Enzymatische Umsetzung von **D,L-1MeBnH**

Zur Untersuchung, ob überhaupt eine Aktivität nachweisbar ist, wurde zu 500 µl einer Lösung von **1MeBnH** 10 µl 0.31 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 zugegeben und 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Vergleich wurde die identische Substratlösung ohne Enzym ebenfalls 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es konnte eine äußerst geringe enzymatische Aktivität mittels Chiral-HPLC nachgewiesen werden. Über die Enantioselektivität dieser Umsetzung konnte keine Aussage gemacht werden, da die Enantiomere von **D,L-CMePhe** mittels Chiral-HPLC nicht getrennt werden konnten (siehe

Tabelle 3.6-2, S. 28). Außerdem war die Aktivität der Hydantoinase kleiner als 0.1 U/g_{Enzym}, so daß infolge der spontanen Racemisierung des Hydantoins auch keine Anreicherung eines Enantiomers gemessen werden konnte.

4.4.7 Untersuchungen zur Umsetzung von 5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der NH-Gruppe in 2-Position wurden Verbindungen getestet, bei denen sich in dieser Position eine Methylengruppe (**BnSI**), ein Schwefelatom (**BnTD**) oder, wie im Fall des 5-Benzylloxazolidin-2,4-dion (**BOD**), ein Sauerstoffatom befanden.

4.4.7.1 Biotransformation

Nachdem in einem Vorversuch qualitativ gezeigt werden konnte, daß die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 **D,L-BOD** umsetzt, wurde zur Charakterisierung des Reaktionsprodukts eine präparative Umsetzung durchgeführt. Dafür wurden 120 mg (0.63 mmol) **BOD** mit 600 µl (18.6 U für **D,L-BnH**) unverdünnter Enzymlösung in 15 ml 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 8.5 bei 37 °C inkubiert. Von dem sonst üblichen Tris-Puffer wurde in dieser Reaktion abgewichen, da der Phosphatpuffer, als mögliche Verunreinigung des aufgearbeiteten Produkts, bei einer NMR-Messung nicht stört. Der Fortschritt der Reaktion wurde online am Polarimeter verfolgt (3.10.1.2, S. 61). Die spezifische Aktivität der Hydantoinase betrug für diese Reaktion etwa 1 U/mg_{Enzym}. Nachdem keine Drehwertänderung mehr festgestellt werden konnte, zeigte eine HPLC-Messung, daß größtenteils noch **BOD** vorlag. Deshalb wurden nochmals 500 µl (**15.5 U** für **D,L-BnH**) Enzymlösung zugegeben und die Reaktion solange inkubiert, bis der Drehwert konstant blieb. Mittels HPLC konnte ein Umsatz von etwa 45 % nachgewiesen werden. Zur Aufreinigung des Produktes wurde die Mischung mit konzentrierter TFA angesäuert bis der pH unter 4 lag, danach wurde zur Abtrennung des Enzyms und des Puffers mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase, die das Reaktionsprodukt und nicht umgesetztes **BOD** enthielt, wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Um noch Spuren von TFA aus den 111 mg Rohprodukt zu entfernen, wurde das Produkt einige Stunden im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in wenigen ml heißem Deuteriumoxid aufgenommen, dabei setzten sich beim Abkühlen ölige Tropfen ab, die mittels HPLC als **BOD** identifiziert werden konnten. Die Mischung wurde zentrifugiert, um möglichst viel **BOD** abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend zur NMR-Messung gegeben. Eine mittels RP-18-HPLC gemessene Probe zeigte den Peak eines Reaktionsproduktes mit einer Retentionszeit von 23.1 Minuten.

4.4.7.2 Identifizierung des Reaktionsprodukts

Zur Charakterisierung des entstandenen Produktes wurde davon ausgegangen, daß die Hydantoinase **BOD** auf drei unterschiedliche Möglichkeiten spalten könnte.

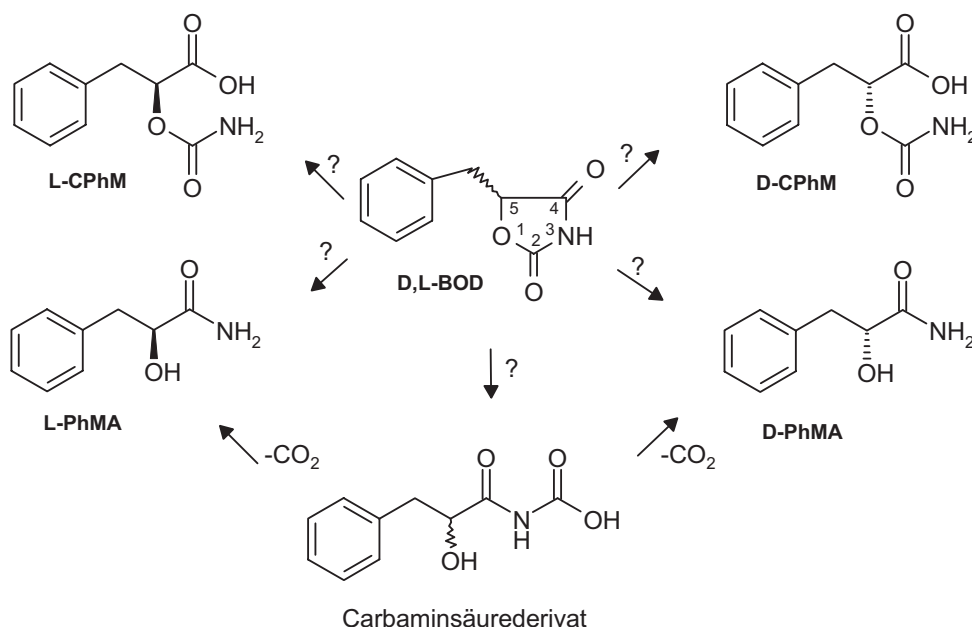


Abbildung 4.4-20: Mögliche Reaktionsprodukte der enzymatischen Umsetzung von **D,L-BOD**

Wie Abbildung 4.4-20 zeigt, ist prinzipiell ein nucleophiler Angriff auf beide Carbonylgruppen vorstellbar. Bei der „klassischen“ Spaltung zwischen der 3- und 4-Position müßte Carbamoylphenylmilchsäure (**CPhM**) entstehen. Dagegen wäre bei der Spaltung zwischen der 2- und 3-Position Phenylmilchsäureamid (**PhMA**) das Produkt. Das gleiche Produkt müßte auch bei der Spaltung zwischen der 1- und 2-Position entstehen, denn ein hypothetische, intermediär gebildete Carbaminsäure würde unter Kohlendioxidabspaltung zu **PhMA** hydrolysieren.

Um nachzuweisen, ob bei der Reaktion von 4.4.7.1 (S. 101) **PhMA** entstanden ist, wurde das Amid wie unter 3.9.2.1 beschrieben als Vergleichssubstanz synthetisiert. Jedoch zeigten mittels HPLC gemessene Proben ($R_{t(\text{PhMA})} = 11.0$ min) keine Übereinstimmung mit dem entstandenen Produkt aus der enzymatischen Umsetzung ($R_{t(\text{PhMA})} = 23.5$ min). Dagegen konnte durch HPLC-Messungen eine Übereinstimmung des Reaktionsproduktes mit der nach Methode 3.9.2.2 (S. 55) synthetisierten D-Carbamoylphenylmilchsäure (**D-CPhM**) gezeigt werden (Abbildung 4.4-21).

Auch die NMR-Messung zeigte, daß bei der Umsetzung **CPhM** gebildet wurde. Aus dem Vergleich der ^{13}C -Spektren der enzymatischen Umsetzung (4.4.7.1, S. 101) mit den Spektren der synthetisierten **CPhM** (3.9.2.2, S. 55) und des **BOD** (3.8.1.2, S. 39) konnten alle Signale dem Substrat **BOD** bzw. dem Produkt **CPhM** zugeordnet werden.

Damit konnte bestätigt werden, daß die unter 4.4.7.1 (S. 101) beschriebene NMR-Probe der Umsetzung von **D,L-BOD** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 eine Mischung von **BOD** und **CPhM** enthielt.

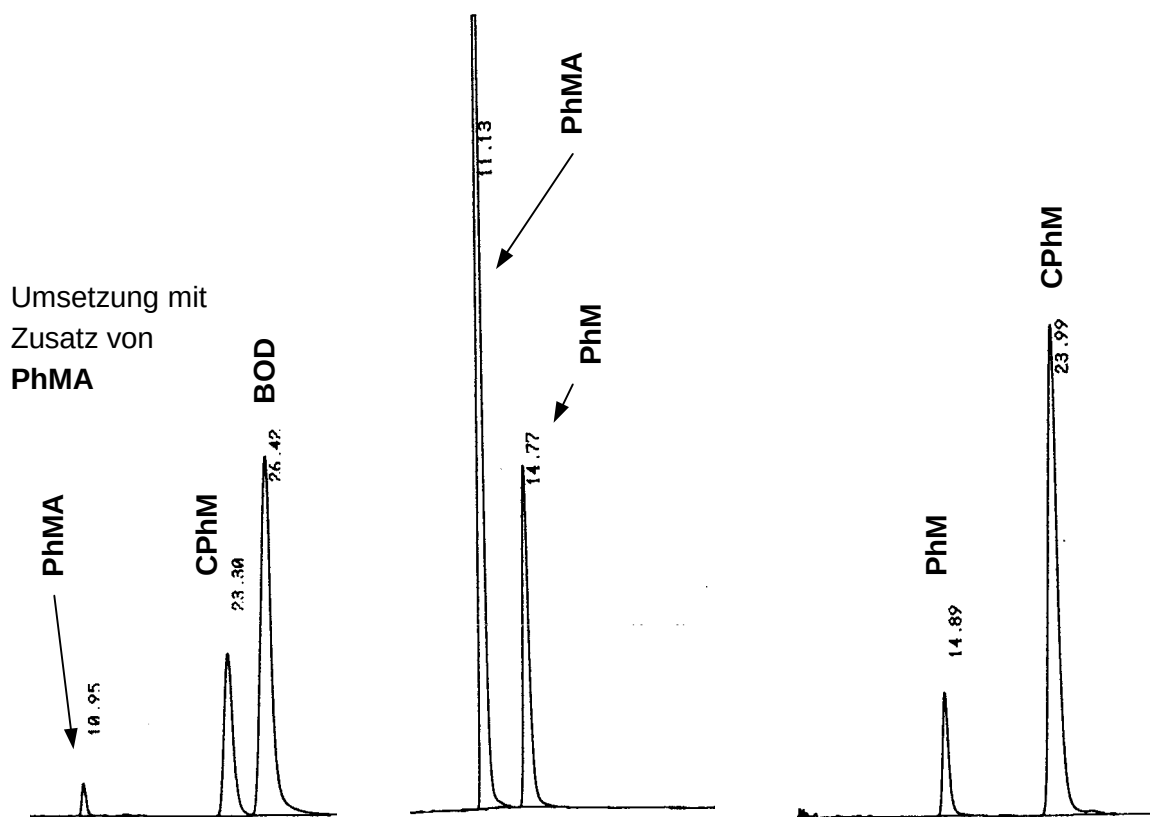


Abbildung 4.4-21: links: RP-18-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von **D,L-BOD** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C. Der Probe wurde synthetisiertes **PhMA** zugesetzt. Mitte: Synthese von **PhMA** aus **PhM**. Rechts: Synthese von **CPhM** aus **PhM**.

Tabelle 4.4-5: NMR-Daten, siehe auch 3.9.2.2 (S. 55)

Substanz, Lösungsmittel	Charakterisierung ^{13}C -NMR
Reaktionsmischung der enzymatischen Umsetzung (Mischung aus CPhM und BOD), D_2O	$\delta=177.2, 161.0$ (2 CO Produkt); 138.8, 132.4, 131.5, 130.2 (Ph, Produkt); 76.4 (CH Produkt); 39.5 (CH_2 Produkt); 172.1 (1 CO Substrat, sehr schwach, 2. CO fehlt); 136.5, 132.7, 131.7, 130.6 (Ph, Substrat); 84.5 (CH Substrat); 38.4 (CH_2 Substrat)
synthetisierte D,L-CPhM , D_2O	$\delta=177.4, 161.0$ (2 CO); 138.8, 132.4, 131.5, 130.1 (Ph); 76.6 (CH); 39.6 (CH_2);
D,L-BOD , CDCl_3	$\delta=172.5, 153.9$ (2 CO); 132.9, 129.7, 128.8, 127.8 (Ph); 81.3 (CH); 36.5 (CH_2)

4.4.7.3 Ermittlung der Enantioselektivität

Da die spezifische Aktivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 nur etwa 1 U/mg_{Enzym} betrug, wäre es nur mit einer sehr großen Katalysatormenge

möglich gewesen, die Enantioselektivität dieser Umsetzung mit der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Methode zu ermitteln. Mittels chiraler HPLC konnte aber gezeigt werden, daß bei der Umsetzung mit der Hydantoinase fast ausschließlich **D-CPhM** gebildet wurde (siehe Abbildung 4.4-22, S. 104). Zur Kontrolle, ob das Enzym ausschließlich **L-BOD** umsetzte, wurde untersucht, ob sich die Rückreaktion von **L-CPhM** zu **L-BOD** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 durchführen ließ.

Dazu wurde zu einer kleinen Menge **L-CPhM** in 1 ml Tris-Puffer pH 8.5 gelöst und 100 µl (3.1 U) unverdünnte Enzymlösung von *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 gegeben und über 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Reaktionslösung mit 1 ml HPLC-Fließmittel verdünnt. Mittels Chiral-HPLC konnte ein Peak mit der Retentionszeit von **L-BOD** detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, daß die Umsetzung reversibel ist und D-selektiv, aber nicht D-spezifisch stattfindet.

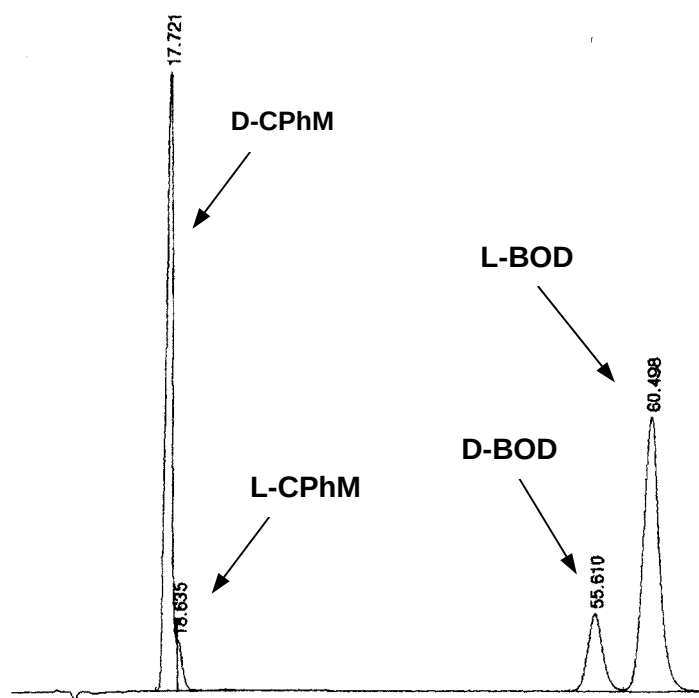


Abbildung 4.4-22: Chiral-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von **D,L-BOD** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C

Zur Untersuchung, ob die Rückreaktion von **CPhM** zu **BOD** auch nichtenzymatisch erfolgen kann, wurde analog der Hydantoin synthese (3.7, S. 34) eine Lösung von **D,L-CPhM** mit Salzsäure auf pH 0 angesäuert und einige Minuten zum Kochen erhitzt. Es konnte jedoch keine Bildung von **BOD** nachgewiesen werden.

Es konnte somit gezeigt werden, daß die Umsetzung von **D,L-BOD** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* nach der folgenden Reaktionsgleichung abläuft:

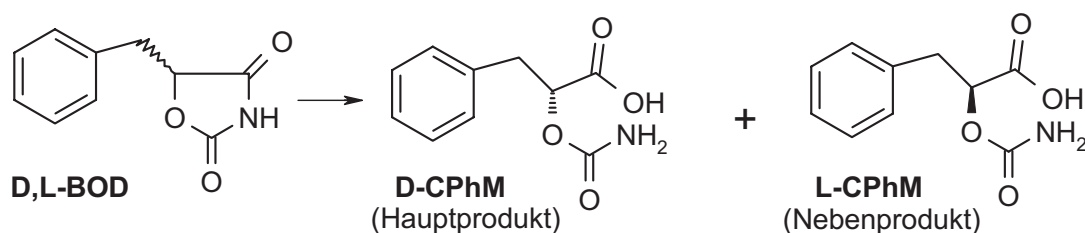


Abbildung 4.4-23: Bei der enzymatischen Umsetzung von **D,L-BOD** entsteht enantioselektiv **D-CPhM**

Die Bildung **PhMA** konnte ausgeschlossen werden. Die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 spaltet **BOD** also auf die „klassische“ Art zwischen der 3- und 4-Position des Ringes.

4.4.8 Untersuchungen zur Umsetzung von Benzylsuccinimid

Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, daß die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* **BOD** offenbar ausschließlich an der Bindung zwischen der 3- und 4-Position im Ring spaltet, ihre Enantioselektivität jedoch nach Austausch der 1-NH-Gruppe gegen ein Sauerstoffatom umkehrt (4.4.7, S. 101). Von Interesse war jetzt, ob diese Umkehrung der Chiralitätserkennung nur durch ein Sauerstoffatom oder auch durch andere Gruppen in der 2-Position verursacht wird. Deshalb wurde für eine weitere Untersuchung 5-Benzylsuccinimid (**BnSI**) eingesetzt. Im Vergleich zum **BnH** ist im **BnSI** die 1-NH-Gruppe durch eine Methylengruppe ersetzt.

4.4.8.1 Biotransformation

Eine Umsetzung von **BnSI** gelang nur mit einer sehr großen Enzymmenge. Dazu wurden in einem Eppendorfgefäß einige Kristalle **D,L-BnSI** in etwa 20 µl Tris-Puffer, pH 8.5 gegeben und der pH-Wert mit 10 %iger wäßriger Natronlauge und 0.1 pH-Einheiten genaue Indikatormeißstäbchen korrigiert. Anschließend wurden zu 10 µl der Mischung etwa 100 µl (3.1 U für **D,L-BnH**) unverdünnte Enzymlösung zugegeben und 28 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die verbliebenen 10 µl **BnSI**-Lösung wurden mit 100 µl Tris-Puffer pH 8.5 verdünnt und ebenfalls 28 Stunden bei 37 °C inkubiert. HPLC-Messungen beider Ansätze zeigten neben dem Peak von **BnSI** bei 36.7 Minuten zwei weitere Peaks bei 19.7 und 21.4 Minuten und einen Peak der Benzylbernsteinsäure bei 47.9 Minuten. Die beiden Chromatogramme der Umsetzungen mit und ohne Enzym waren identisch bis auf den Unterschied, daß bei der Umsetzung mit Enzym der Peak bei 21.4 Minuten deutlich größer war (Abbildung 4.4-24).

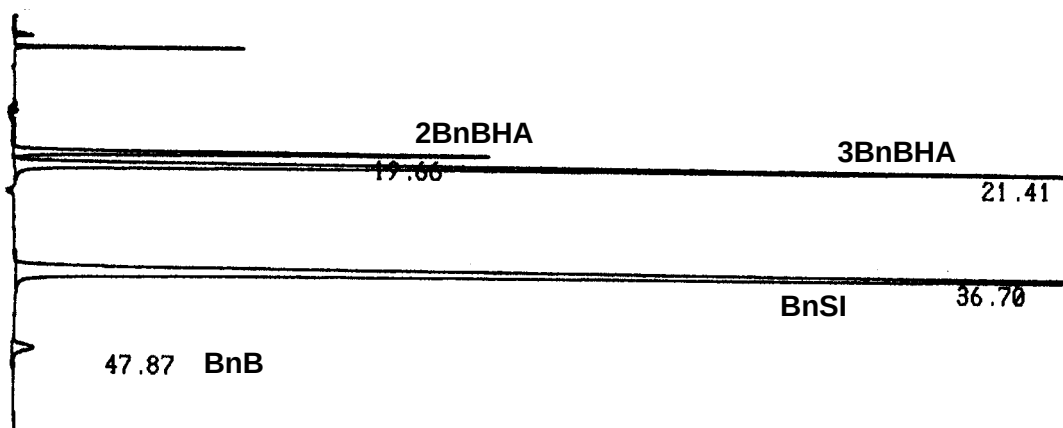


Abbildung 4.4-24: Umsetzung von **D,L-BnSI** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 in nahezu unverdünnter Enzymlösung bei 37 °C, pH 8.5

Im Vergleich zu **D,L-BOD**, das mit einer spezifischen Aktivität von 1 U/mg_{Enzym} umgesetzt wurde, zeigte die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 für die Umsetzung von **D,L-BnSI** eine viel geringere spezifische Aktivität von weniger als 0.1 U/mg_{Enzym}. Da über die lange Reaktionszeit parallel zur enzymatischen Hydrolyse auch eine nichtenzymatische Spaltung stattfand, wurde die genaue spezifische Aktivität der Hydantoinase für dieses Substrat nicht ermittelt. Spätere Untersuchungen zeigten, daß bei der Umsetzung 3-Benzylbernsteinsäurehalbamid (**3BnBHA**) gebildet wurde. Da das enzymatisch gebildete Produkt aufgrund der sehr geringen Konzentration nicht isoliert werden konnte, wurden zur Identifizierung der Substanz Vergleichsmessungen mit Standardverbindungen durchgeführt.

4.4.8.2 Identifizierung des Reaktionsprodukts

Wie bei der enzymatischen Hydrolyse von **D,L-BOD** (siehe 4.4.7.2, S. 102) wurden auch in diesem Fall Überlegungen angestellt, welche Substanzen durch Hydrolyse des **D,L-BnSI** entstehen können. Unter der Annahme, daß prinzipiell beide Carbamoylgruppen nucleophil angegriffen werden können (Abbildung 4.4-25), war die Bildung der beiden Enantiomere von 3- bzw. 2-Benzylbernsteinsäurehalbamid (**3BnBHA** bzw. **2BnBSHA**) denkbar.

Da die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 für die Umsetzung von **D,L-BnSI** nur eine sehr geringer Aktivität zeigte, war es nicht möglich, eine präparative Menge des entstandenen Halbamids ($R_t=21.4$ Minuten) zur weiteren Charakterisierung zu isolieren. Dafür gelangen aber Synthesen zweier unterschiedlich angereicherter Mischungen der beiden Benzylbernsteinsäurehalbamide (3.9.3.1b, S. 58), die in Zusammenarbeit mit PD Dr. Fischer aus dem Institut für organische Chemie der Universität Stuttgart NMR-spektroskopisch untersucht wurden (Fischer et al., in prep.) Aus diesen Untersuchungsergebnissen und Vergleichsmessungen mittels HPLC konnte

das enzymatisch gebildete Halbamide als **3BnBHA** identifiziert werden (Waniek et al., in prep.).

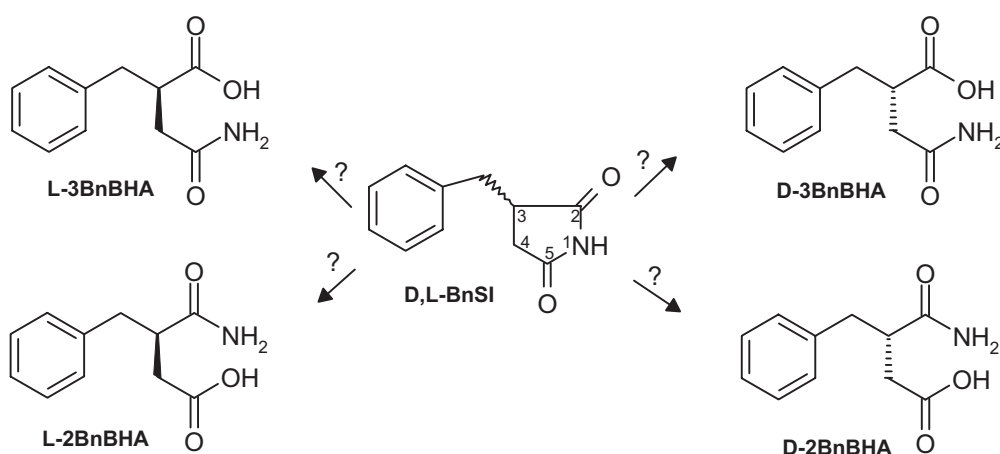


Abbildung 4.4-25: Mögliche Produkte der enzymatischen Umsetzung von **D,L-BnSI**

4.4.8.3 Bestimmung der Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse

Nachdem es gelungen war, die Regioselektivität der Umsetzung von **BnSI** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 aufzuklären, stellte sich die Frage nach der Enantioselektivität dieser Reaktion.

Mittels der chiralen HPLC-Säule gelang es, eine racemische Mischung der beiden Halbamide in ihre jeweiligen Enantiomeren zu trennen (siehe Abbildung 4.4-26). Um die absolute Konfiguration der Enantiomere bestimmen zu können, wurde eine Halbamidmischung von **2BnBHA** und **3BnBHA** synthetisiert (3.9.3.2, S. 59), die jeweils das D-Enantiomer im Überschuß enthielten (Abbildung 4.4-26). Die Bestimmung der Enantioselektivität der Umsetzung von **BnSI** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 erfolgte durch einen Vergleich der Retentionszeiten von den gebildeten Halbamide mit den synthetisierten, chiral angereicherten Halbamiden.

Abbildung 4.4-27 zeigt Chiral-HPLC-Messungen der Umsetzung von **BnSI** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Da **BnSI** unter den Reaktionsbedingungen auch nichtenzymatisch hydrolysiert, wurde parallel zur enzymatischen Umsetzung ein enzymfreier Ansatz inkubiert. In Abbildung 4.4-27 ist unter jeder Messung des Reaktionsansatzes eine Messung der enzymfreien Substratlösung dargestellt. Die Hydantoinase katalysiert die Hydrolyse von **BnSI** zu **D-3BnBHA**. Innerhalb der Meßgenauigkeit konnte weder die Bildung des L-Enantiomers noch die des **2BnBHA** nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Hydantoinase auch bei **BnSI** den Ring zwischen der 3- und 4-Position spaltet.

Bis auf den Unterschied, daß **BOD** etwa zehnfach so schnell wie **BnSI** umgesetzt wird, zeigt das Enzym auch für dieses Substrat dasselbe Verhalten der Umkehrung der Chi-

ralitätserkennung. Offensichtlich sind die Wechselwirkungen der 1-Position im Hydantoinring mit dem aktiven Zentrum des Enzyms für die Chiralitätserkennung von großer Bedeutung. Bei den Untersuchungen zur enzymatischen Umsetzung von **BOD** (4.4.7, S. 101) konnte eine Rückreaktion von **CPhM** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 nachgewiesen werden (4.4.7.3, S. 103). Dagegen konnte mit diesem Enzym unter identischen Reaktionsbedingungen keine Rückreaktion der Halbamide zum **BnSI** beobachtet werden.

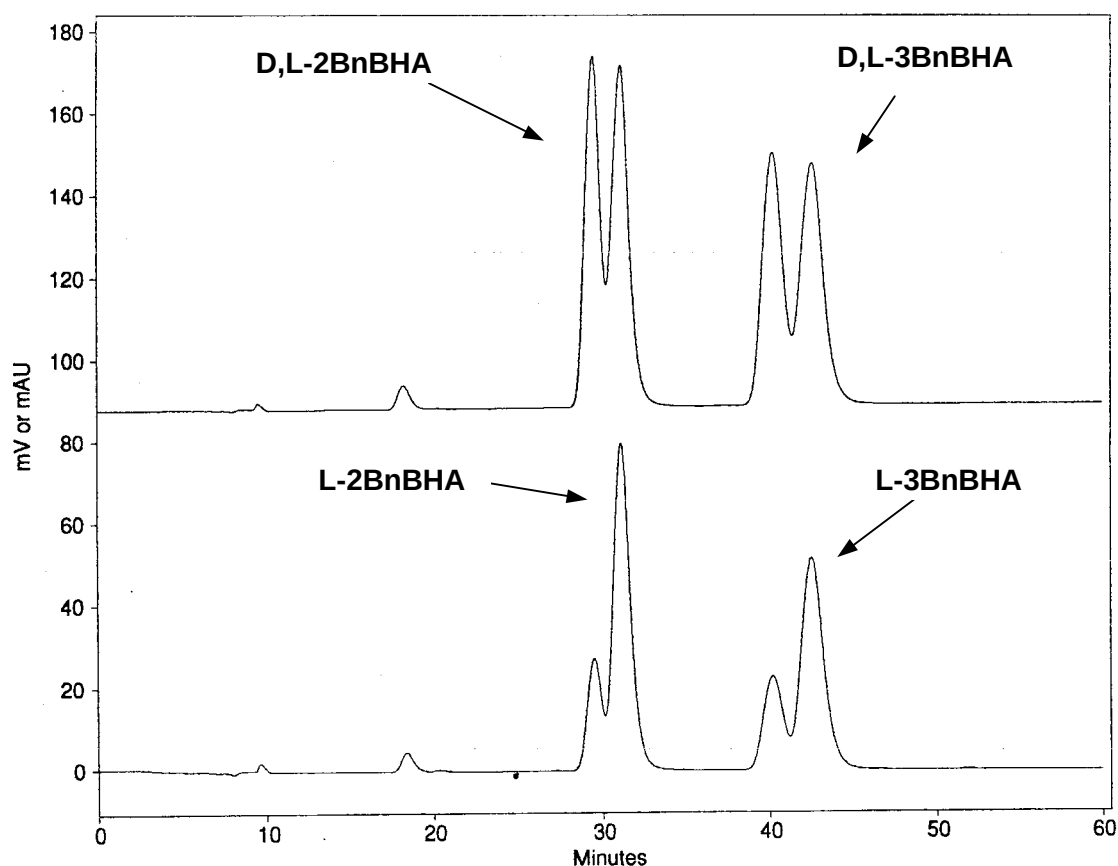


Abbildung 4.4-26: Chiral-HPLC-Chromatogramm einer Mischung von **2BnBHA** und **3BnBHA**, die jeweils das D-Enantiomer im Überschuß enthalten.

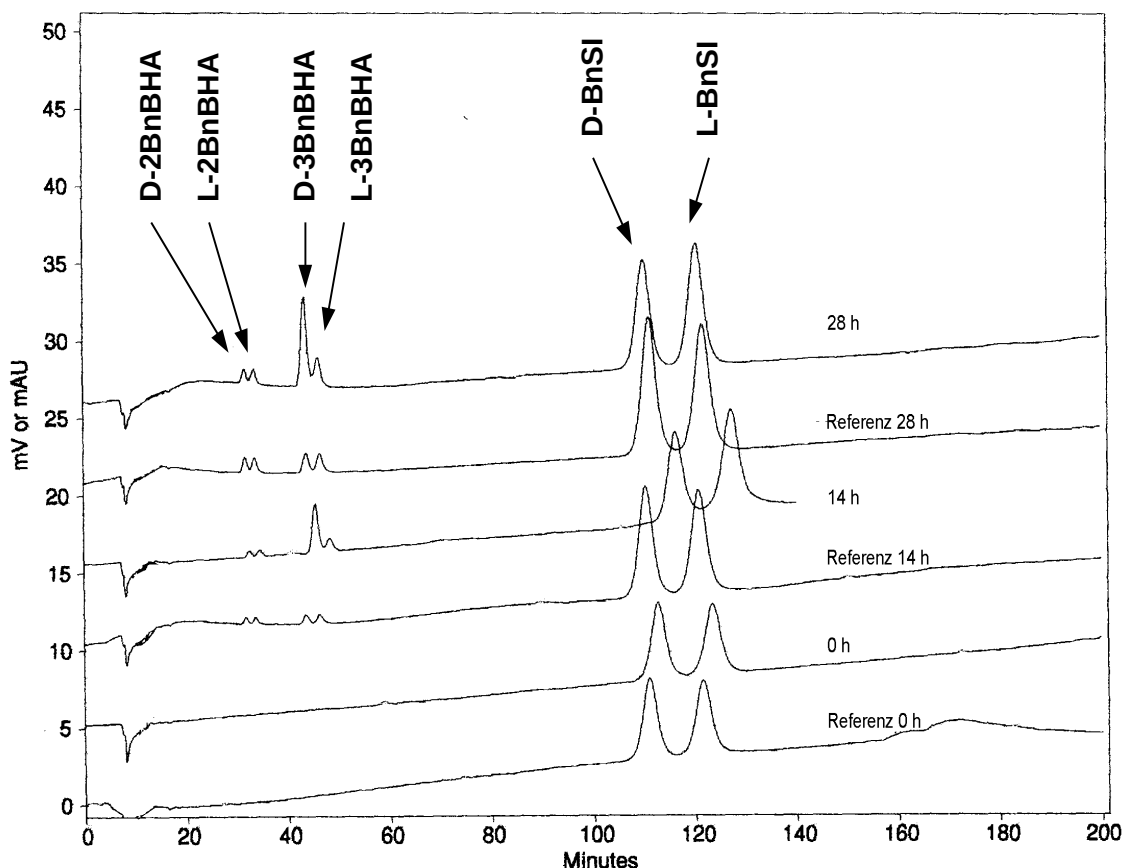


Abbildung 4.4-27: Chiral-HPLC-Chromatogramme der enzymatischen Umsetzung von **BnSI** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in nahezu unverdünnter Enzymlösung bei einem pH-Wert von 8.5. Es sind Proben des Reaktionsansatzes und eines enzymfreien Ansatzes jeweils zur selben Zeit genommen worden. Von oben beginnend: Probe nach 28, 14 und 0 Stunden, die Vergleichsprobe ohne Enzym ist jeweils darunterliegend.

4.4.9 Biotransformationen mit anderen Hydantoinasen

Die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchte Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 war als Enzymlösung in großer Menge verfügbar. Dagegen war von der D-Hydantoinase 2 aus *Bacillus thermoglucosidasius* nur eine geringe Menge vorrätig, zwei andere Hydantoinasen (aus *Thermus species* und *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117) lagen nur in immobilisierter Form vor. Für die etablierte, polarimetrische Methode (3.10.2.2, S. 63) wurde dagegen eine relativ große Menge an freiem Enzym benötigt. Deswegen wurden die Biotransformationen mit allen drei D-Hydantoinasen nur auf die Enantioselektivität hin untersucht. Zur qualitativen Bestimmung der Enantioselektivität dieser Hydantoinasen wurde die Umsetzungen im Eppendorfgefäß mit gesättigten Substratlösungen durchgeführt. Zum Ansetzen der Substratlösungen wurde einen Spatelspitze der jeweiligen Substanz zu 1000 µl Tris-

Puffer, pH 8.5 gegeben und einige Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktionen wurde mit dem Überstand der zentrifugierten Suspensionen durchgeführt. Dazu wurden zu 500 µl Substratlösung 10 µl Hydantoinase 2 bzw. eine Spatelspitze der immobilisierten Enzyme von Hydantoinase 1 oder von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 gegeben und einige Stunden bei 37 °C inkubiert. Proben der Umsetzungen wurden mit Fließmittel verdünnt und mittels chiraler HPLC bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm untersucht (3.10.2.1, S. 63). Zum Nachweis, ob eine Reaktion spezifisch oder selektiv ablief, wurde bei einer Umsetzung mit einer große Katalysatormenge über mehrere Tage die Bildung der Produktenantimere verfolgt. Bei einigen Reaktionen konnten nur die Substratenantimere getrennt werden. In diesen Fällen wurde die Enantioselektivität des Enzyms über die schnellere Abnahme eines Substratpeaks ermittelt. Tabelle 4.4-6 zeigt einen Vergleich der Enantioselektivitäten aller Umsetzungen der untersuchten Substanzen mit den Hydantoinasen aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745, Hydantoinase 1 bzw. 2 und der Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117. Der Begriff spezifisch wurde dann verwendet, wenn innerhalb der Meßgenauigkeit nur die Bildung eines Produktenantimers beobachtet wurde. Die Bezeichnung „geringe Aktivität“ wurde dann gewählt, wenn selbst in unverdünnter Enzymlösung nach tagelanger Inkubationszeit nur sehr wenig enzymatisch gebildetes Produkt nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4.4-6: Vergleich der Enantioselektivitäten unterschiedlicher Hydantoinasen

Substrat	„L“-Hydantoinase <i>Arthrobacter aureus</i> DSM 3745	D-Hydantoinase 2 <i>Thermus species</i> rekombinant in <i>Escherichia coli</i>	D-Hydantoinase 1 <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> , rekombinant in <i>Escherichia coli</i>	D-Hydantoinase <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117
1MeBnH	geringe Aktivität	sehr geringe Aktivität	sehr geringe Aktivität	geringe Aktivität
3MeBnH	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
BnH	L-selektiv	D-spezifisch	D-selektiv	D-spezifisch
BnSI	wird selektiv umgesetzt zu D-3BnBHA	keine Aktivität	wird spezifisch umgesetzt zu D-3BnBHA	unselektiv sehr geringe Aktivität
BnTD	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
BnTS	keine Aktivität	n. b.	n. b.	n. b.
BOD	D-selektiv*	D-spezifisch	D-spezifisch	keine Aktivität
MTEH	D-selektiv**	D-spezifisch**	n.b.	n.b.
NPH	unselektiv (sehr geringe Aktivität)	D-spezifisch	D-selektiv	n.b.
PhEH	D-selektiv	D-spezifisch ¹	D-spezifisch ¹	n. b.
PhH	? ²	D-spezifisch ¹	D-selektiv ¹	n. b.
POD	keine Aktivität	n. b.	n. b.	n. b.
TMSMH	D-spezifisch	D-spezifisch	D-spezifisch	D-spezifisch

* Umsetzung von **L-CPhe** konnte durch Rückreaktion mit einer großen Enzymmenge nach ca. 20 h nachgewiesen werden

** Die Bestimmung erfolgte polarimetrisch nach Methode 3.10.1.2 (S. 61)

¹ Untersuchungsergebnis wurde aus (Keil et al., 1995) entnommen

² Umsetzung wurde beschrieben (May et al., 1998a) ohne Angabe der Enantioselektivität

Aus apparativen Gründen konnten immobilisierte Enzyme nicht auf ihre Enantioselektivität getestet werden. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten beider Enantiomere von **D,L-MTEH** mit der D-Hydantoinase 2 aus *Thermus species* rekombinant in *Escherichia coli* wurden die getrennte Umsetzungen in der Polarimeterküvette nach der unter 3.10.1.2 beschriebenen Methode durchgeführt (Abbildung 4.4-28).

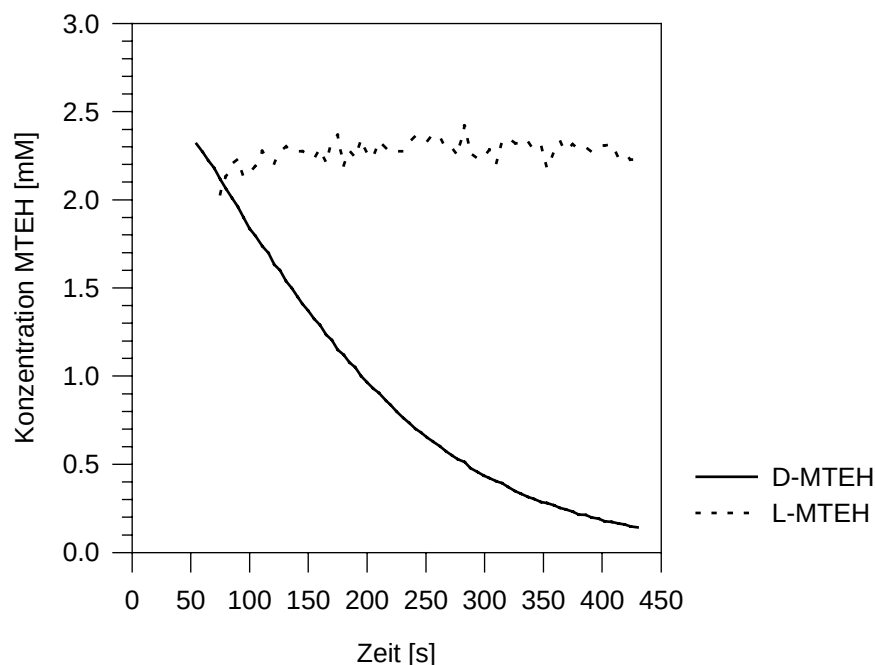


Abbildung 4.4-28: Vergleich der Umsetzungen von 3 mM **D-** und **L-MTEH** mit 0.031 U (für **D,L-BnH**) unverdünnter D-Hydantoinase aus *Thermus species*, rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt.

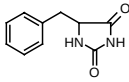
In der Abbildung ist die Umsetzung von **D-** und **L-MTEH** mit der D-Hydantoinase 2 dargestellt. Es wird praktisch nur **D-MTEH** umgesetzt.

4.4.10 Zusammenfassung der Untersuchungen

In den drei folgenden Tabellen sind alle untersuchten Umsetzungen mit den unterschiedlichen Hydantoinasen zusammengefaßt. Enantioselektivitäten konnten nur von Umsetzungen mit **D,L-BnH** und **D,L-PhEH** bestimmt werden. Für alle anderen Substrate werden daher qualitative Enantioselektivitäten genannt. Die Standard-Reaktionsbedingungen waren 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C. Abweichungen von diesen Standardbedingungen werden in den Klammern genannt. Wenn für die Aktivität null angegeben wurde, heißt das, daß bei einer Probe der Substanz in unverdünnter Enzymlösung (31 U/ml) bei einem pH zwischen 8 und 9 bei 37 °C über 24 h keine Umsetzung meßbar war.

Die in Tabelle 4.4-7 dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen, daß weder der pH-Wert zwischen 7.5 und 9.5 noch die Reaktionstemperatur im Bereich von 25 – 45 °C einen nennenswerten Einfluß auf die Enantioselektivität der Umsetzung von **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 zeigen.

Tabelle 4.4-7: Zusammenfassung der Umsetzungen von 3 mM **D,L-BnH**

Substanz		<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3745		Hyd. 2	Hyd 1	DSM 20117
Strukturformel	Abk.	Enantioselektivität E ⁴ , Enantiomer, T, pH	spez. Aktivität ⁴ A _{spez.} [U/mg _{Enzym}]		E ³	E ³
			L	D		
	BnH	4.1 (L, 25 °C, pH 8.5) 3.3 (L, 37 °C, pH 8.5) 3.4 (L, 45 °C, pH 8.5) 4.1 (L, 37 °C, pH 7.5) 3.8 (L, 37 °C, pH 9.5)	28.5 58.3 35.3 39.5 54.8	7.8 19.3 15.8 14.0 14.8	>100 (D)	85 % ee(P) bei 55 % U (D)
						>100 (D)

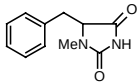
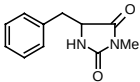
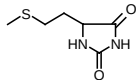
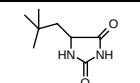
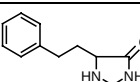
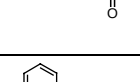
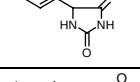
¹ Methode 3.10.1.1 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels RP-18-HPLC

² Methode 3.10.1.2 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels Polarimetrie

³ Methode 3.10.2.1 (S. 63): Bestimmung von E mittels Chiral-HPLC

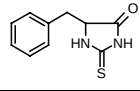
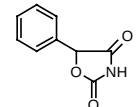
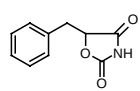
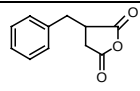
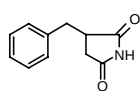
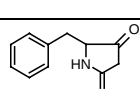
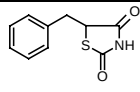
⁴ Methode 3.10.2.2 (S. 63): Bestimmung von E mittels Photometrie und Polarimetrie

Tabelle 4.4-8: Zusammenfassung der Umsetzungen von D,L-Hydantoinen

Substanz		Arthrob. aureescens DSM 3745				Hyd. 2	Hyd. 1	DSM 20117
Strukturformel	Abk.	E	spez. Aktivität der Enantiomere [U/mg _{Enzym}]		Inhibitor auf die D,L-BnH-Umsetzung ²	E ³	E ³	E ³
			L	D				
	1MeBnH	n. b.	< 0.1 ¹	< 0.1 ¹	kein Inhibitor	sehr geringe Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
	3MeBnH	-	keine Aktivität		sehr schwach	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
	MTEH	D	0.14 ^{4,5}	30.4 ^{4,5}	n. b.	>100 (D)	n. b.	n. b.
			0.88 ^{2,6}	7.43 ^{2,6}				
	NPH	D,L	< 1 ³	< 1 ³	n. b.	>100 (D)	D-selektiv 50 % ee(L-S) bei 40 % U	keine Aktivität
	PhEH	4.9 (D) ⁴	1.5 ⁴	0.5 ⁴	n. b.	>100 (D) ⁷	>100 (D) ⁷	n. b.
	PhH	-	sehr geringe Aktivität ⁸		K _i = 9.2 mM ⁹	>100 (D) ⁷	D-selektiv ⁷	keine Aktivität
	TMSMH	D	0 ³	≈ 0.2	n. b.	>100	>100	>100

¹ Methode 3.10.1.1 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels RP-18-HPLC² Methode 3.10.1.2 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels Polarimetrie³ Methode 3.10.2.1 (S. 63): Bestimmung von E mittels Chiral-HPLC⁴ Methode 3.10.2.2 (S. 63): Best. von E mittels Photometrie und Polarimetrie⁵ Umsetzung von **D,L-MTEH**⁶ getrennte Umsetzung der einzelnen Enantiomere⁷ Untersuchungsergebnis wurde aus (Keil et al., 1995) entnommen⁸ Umsetzung wurde beschrieben (May et al., 1998a) ohne Angabe der Enantioselektivität⁹ Bestimmung nach Methode 3.10.3 (S. 69)

Tabelle 4.4-9: Zusammenfassung Umsetzungen hydantoinanaloger Verbindungen

Substanz		Arthrob. aureus DSM 3745			Hyd. 2	Hyd. 1	DSM 20117
Strukturformel	Abkürzung	E	Aktivität	Inhibitor ² auf die D,L-BnH- Umsetzg.	E ³	E ³	E ³
	BnTH	-	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
	POD	keine Aktivität	keine Aktivität	kein Inhibitor	n. b.	n. b.	n. b.
	BOD	D-selektiv ee(P)=20 % ee(S)=79 % U=68 %	1 ³	K _i = 46 mM*	D-selektiv ee(P)=13 % ee(S)=9 % U=19 %	>100 (D)	keine Aktivität
	BnBA	-	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung	Zersetzung
	BnSI	D-selektiv ee(P)=50 % bei U=10 % gleichzeit. Hydrolyse!	< 1 ³	noch nicht bestimmt	keine Aktivität	>100 (D)	keine Aktivität
	BnTS	-	keine Aktivität	n. b., schwach für IMH ⁹	n. b.	n. b.	n. b.
	BnTD	-	keine Aktivität	schwach	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität

¹ Methode 3.10.1.1 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels RP-18-HPLC² Methode 3.10.1.2 (S. 61): Bestimmung der A_{spez.} mittels Polarimetrie³ Methode 3.10.2.1 (S. 63): Bestimmung von E mittels Chiral-HPLC⁴ Methode 3.10.2.2 (S. 63): Best. von E mittels Photometrie und Polarimetrie⁵ Umsetzung von D,L-MTEH⁶ getrennte Umsetzung der einzelnen Enantiomere⁷ Untersuchungsergebnis wurde aus (Keil et al., 1995) entnommen⁸ Umsetzung wurde beschrieben (May et al., 1998a) ohne Angabe der Enantioselektivität⁹ (May, persönliche Mitteilung)

* Bestimmung nach Methode 3.10.3 (S. 69)

4.5 Inhibitionsuntersuchungen mit *Arthrobacter aureescens* DSM 3745

Wird ein Substanz nicht umgesetzt, ist es interessant zu wissen, ob sie stattdessen einen inhibitorischen Einfluß auf die jeweilige Enzymreaktion zeigt. Wenn eine Substanz weder umgesetzt wird noch eine Reaktion dieses Enzyms inhibiert, kann daraus gefolgert werden, daß diese Substanz nicht mit dem aktiven Zentrum des Enzyms wechselwirken kann, also nicht in das aktive Zentrum „paßt“. Zeigt dagegen eine Verbindung eine hohe Inhibition, wird aber nicht umgesetzt, kann gefolgert werden, daß die Verbindung sehr gut in das aktive Zentrum paßt.

Durch den systematischen Austausch einzelner Positionen im Hydantoinring könnten durch Inhibitionsuntersuchungen Informationen erhalten werden, welche Positionen für die Bindung im aktiven Zentrum von besonderer Bedeutung sind. Aus Röntgenstrukturanalysen eines Enzyms, das mit einem Inhibitor kokristallisiert wurde, könnte in Zukunft evtl. die Struktur des aktiven Zentrums bestimmt werden, die vorläge, wenn sich ein Substratmolekül im aktiven Zentrum befände.

Inhibitionsexperimente wurden nur mit Substanzen durchgeführt, die von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 nicht umgesetzt wurden (siehe 4.4.9, S. 109). Dazu wurde nach der unter 3.10.3 (S. 69) beschriebenen Methode untersucht, ob diese Substanzen die Umsetzung von **L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 inhibierten. Keines der untersuchten Hydantoine und keine der hydantoinanalogen Substanzen zeigten einen nennenswerten inhibitorischen Einfluß. Da bei schwachen Inhibitoren der K_i -Wert nicht zuverlässig bestimmt werden konnte, wurden nur qualitative Aussagen über diese Substanzen gemacht. Eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen befindet sich im Anhang (8.5, S. 168).

Im Gegensatz dazu zeigte **BnBHA**, welches als äquimolare, racemische Mischung beider Benzylbernsteinsäurehalbamide nach der unter 3.9.3.1 (S. 58) beschriebenen Methode aus **BnBA** (3.8.3.2, S. 49) hergestellt worden war, eine starke Inhibition mit einem K_i -Wert von 0.34 mM. Die in Abbildung 4.5-1 dargestellten Symbole zeigen eine Auswahl der kontinuierlich bestimmten Konzentrationen von **L-BnH** von 5 Umsetzungen bei Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors **BnBHA**. Die durchgezeichneten Kurven zeigen die Simulationen der Gleichung 3-11 (S. 70) zur Schätzung von k und K_i . Gleichung 3-11 beschreibt eine reversible Reaktion mit der Annahme, daß die Hin- und Rückreaktion jeweils vom Typ einer Michaelis-Menten-Gleichung mit kompetitiver Inhibition durch einen Inhibitor sind. Aus der guten Übereinstimmung der Simulationen mit den Meßwerten kann diese Annahme bestätigt werden.

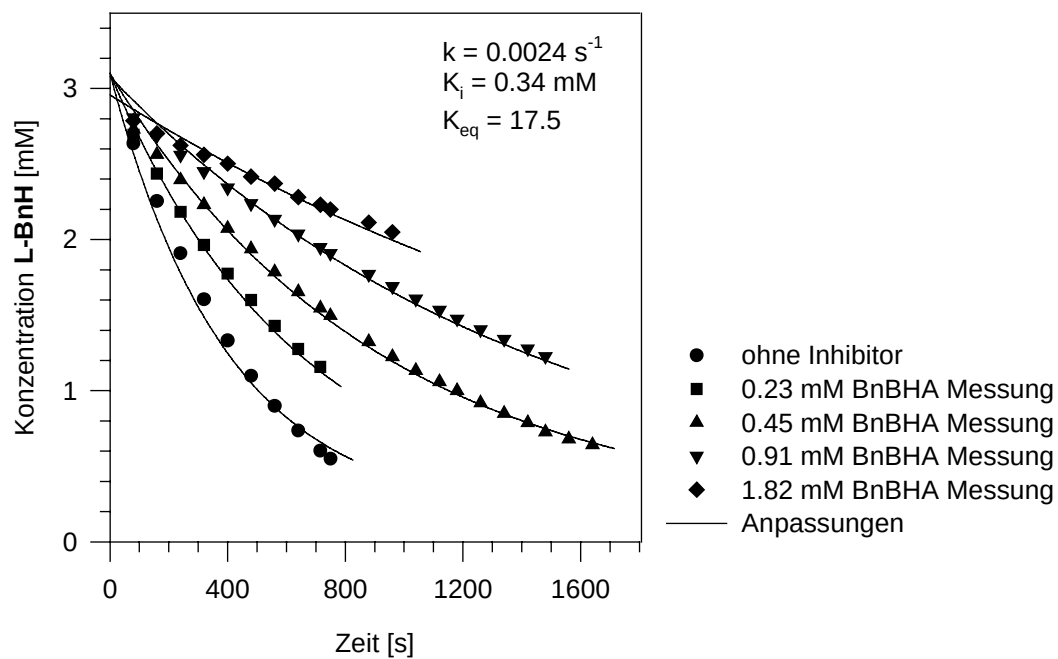


Abbildung 4.5-1: Untersuchung des inhibitorischen Einfluß von **BnBHA** auf die Umsetzung von **L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Substrat- und Enantioselektivität von Hydantoinasen systematisch zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 gerichtet werden, da für dieses Enzym bereits umfangreiche Vorarbeiten durchgeführt wurden und zur Zeit parallele Untersuchungen zur Röntgenstrukturanalyse stattfinden (May, 1996; Abendroth, in prep.). Vergleichend sollten dann Untersuchungen mit weiteren, u. a. kommerziell erhältlichen Hydantoinasen (Keil, et al., 1995; Roche-Diagnostics, Pensberg, Deutschland) durchgeführt werden.

5.1 Wahl von 5-Benzylhydantoin als Standardsubstrat

Die Entscheidung, **BnH** als Standardsubstrat zu verwenden, hatte mehrere Gründe. In Vorversuchen hatte sich zum einen gezeigt, daß diese Verbindung von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 umgesetzt wurde. Zum anderen war das Hydantoin vom günstig erhältlichen Phenylalanin problemlos auch als Racemat oder als D-Enantiomer zugänglich. Im Gegensatz zu aliphatischen Resten in der 5-Position zeigt der aromatische Benzylrest einen viel höheren Extinktionskoeffizienten. Da die Synthesen der hydantoinanalogen Verbindungen oft mehrstufig waren, hatte der aromatische Rest den Vorteil, daß sich der Umsatz der meisten chemischen Synthesen unkompliziert mittels DC verfolgen ließ. Genauso war die leichte Nachweisbarkeit dieser Substanzen bei der Produktisolierung von großem Vorteil. Außerdem zeigten die aromatischen Verbindungen eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln als die mit aliphatischen Resten. Dies vereinfachte die Aufarbeitung der Reaktionsmischungen durch z. B. Extraktion der Produkte mit organischen Lösungsmitteln erheblich.

Da in allen bisher publizierten Untersuchungen der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 nur Umsetzungen von Substraten mit mindestens einer Methylengruppe im 5-monosubstituierten Hydantoin genannt werden, wurde Benzylhydantoin als einfachstes aromatisches Hydantoin gewählt.

Viele aliphatische, 5-substituierte Hydantoine sind schlecht löslich. Z. B. zeigt **NPH** eine maximale Löslichkeit von 0.5 mM in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C. Dagegen ist **L-BnH** mit 5 - 7 mM relativ gut löslich, das Racemat von **BnH** löst sich etwa doppelt so gut. **BnH**-Lösungen neigen zur Übersättigung, so kam es vor, daß in Lösungen über 7 mM das **BnH** unvorhersehbar auskristallisierte. Als problematisch stellte sich das racemisierungsfreie Ansetzen enantiomerenreiner **BnH**-Lösungen dar, die für Aktivitätsbestimmungen (3.10.1.2, S. 61) oder Inhibitionsuntersuchungen (3.10.3, S. 69)

benötigt wurden. Selbst das Lösen einer 3 mM **L-BnH**-Suspension dauerte bei 40 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 im Ultraschallbad etwa 30 Minuten. Da aber während dieser Zeit unter diesen Bedingungen mehr als 5 % des **L-BnH** racemisiert wären (siehe 4.3, S. 79), mußte eine andere Methode gefunden werden. Die Racemisierungsgeschwindigkeit hängt stark von der Temperatur und dem pH-Wert ab (Abendschein, 1998). Daher wurde versucht, eine praktikable Methode durch Variation dieser Parameter zu entwickeln. Es gelang nicht, Lösungen racemisierungsfrei bei niedrigeren Temperaturen anzusetzen, außerdem nahm mit abnehmender Temperatur die Zeit zum Auflösen des Hydantoins zu. In einem Vorversuch konnte mittels chiraler HPLC gezeigt werden, daß eine bei 60 °C angesetzte 3 mM **L-BnH**-Lösung in einem Tris-Puffer mit pH 3 über Tage keine Racemisierung zeigte (3.4.2, S. 23). Der Nachteil dieser Methode ist zum einen die bei pH 3 begrenzte Löslichkeit von etwa 3 mM **L-BnH**, zum anderen wird durch die Neutralisierung der Salzsäure auf den Reaktions-pH-Wert Natriumchlorid eingebracht. Es konnte aber gezeigt werden, daß eine Natriumchloridkonzentration in dieser Konzentration weder die Enantioselektivität noch die Aktivität der Hydantoinase bei der Umsetzung von **D,L-BnH** beeinflusste (Schwickart, 1999).

5.2 Etablierung einer Standardumsetzung

Zur Bestimmung der **Substratspezifität** der verschiedenen Hydantoinasen war es erforderlich, eine auf möglichst viele Reaktionen übertragbare analytische Methode zu entwickeln. Bei den meisten Verbindungen konnten Substrat und Produkt mittels HPLC auf einer RP-18-Säule getrennt werden. Dabei zeigte sich, daß nahezu alle Substanzen mit dem unter 3.3 (S. 23) beschriebenen Fließmittel bei Retentionszeiten unter einer Stunde getrennt werden konnten. Ein Nachteil beim Einsatz von HPLC war die hohe Anzahl an Proben. Vor allem die Bestimmung von Inhibitionskonstanten hätte eine kaum zu bewältigende Anzahl von Proben erfordert. Diese Konstante wird in der Regel durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Für jede Reaktionsgeschwindigkeitsmessung sind aber mindestens 4 Proben der Umsetzung nötig. Bei mindestens 8 Meßpunkten pro Inhibitorkonzentration wäre eine Messung von mindestens 128 Proben erforderlich gewesen, was einer Woche Meßzeit entsprochen hätte. Deshalb war ein primäres Ziel der Arbeit, Methoden zu entwickeln, mit denen möglichst schnell Reaktionsgeschwindigkeiten von Umsetzungen verschiedener Substanzen gemessen werden konnten.

Es wurde untersucht, ob eine beschriebene photometrische Methode, die sich für die Untersuchung der Umsetzung von 5-Methylthioethylhydantoin eignete, auch auf andere Substrate übertragen werden konnte (May et al., 1998). Es zeigte sich jedoch, daß sich die Absorptionsspektren vieler Hydantoine von denen der entsprechenden Carbamoylaminosäuren im kurzwelligen Bereich um 240 nm nur geringfügig unterschieden. In einer später beschriebenen kombinierten Methode mit einem Polarimeter wurde die-

ser geringfügige Unterschied beider Absorptionsspektren genutzt, um kontinuierlich die Konzentrationen der Hydantoine und Carbamoylaminosäuren zu bestimmen (Schwickart, 1999). Mit Erfolg konnte eine polarimetrische Methode entwickelt werden, mit der Umsetzungen im 1-ml-Maßstab direkt in der Polarimeterküvette gemessen wurden. Voraussetzung war bei dieser Methode, daß enantiomerenreines Substrat und Produkt zur Verfügung steht. Bei dieser Methode mußte zur Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentration die Molsumme als konstant angenommen werden. Das hat den Nachteil, daß Fehler beim Pipettieren des Enzyms oder bei der Einwaage des Substrats nicht erkannt werden können. Außerdem konnten nur Substrate getestet werden, deren Absorption bei der verwendeten Wellenlänge niedrig war. Z. B. war es nicht möglich, 5-Indolymethylhydantoin polarimetrisch zu bestimmen. Diese Substanz zeigte nur eine geringe Löslichkeit, dafür aber über den gesamten kurzwelligen Meßbereich eine so hohe Absorption, daß die polarimetrischen Methoden nicht angewendet werden konnten.

Bei der Entwicklung analytischer Methoden zur Bestimmung der **Enantioselektivität** wurden Methoden untersucht, die eine gleichzeitige Bestimmung der Substrat- und Produktenantiomere ermöglichte. Für viele Substanzen gelang es, eine HPLC-Methode mit einer Cyclodextrintrennsäule zu entwickeln. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings eine hohe Meßzeit von bis zu zwei Stunden. Da für die meisten Substanzen bereits eine analytische Methode mittels RP-18-HPLC entwickelt war, wurde untersucht, ob sich ein Polarimeter als zusätzlicher HPLC-Detektor eignet, den Enantiomerenüberschuß der getrennten Substanzen zu bestimmen (Teves et al., 1999). Selbst bei der Verwendung einer sehr kurzen Meßwellenlänge im Polarimeter konnten hinsichtlich der Empfindlichkeit allenfalls zufriedenstellende Resultate erzielt werden, wenn die Proben unverdünnt in die HPLC injiziert wurden. Da es aber nicht gelang, das Enzym durch TFA-Zugabe auszufällen, bedeutete diese Methode eine große Belastung der Trennsäule. Außerdem traten Doppelpeaks auf, wenn die Menge an zugesetzter TFA zu gering war. Vermutlich reichte in diesen Fällen die Pufferkapazität der Phosphorsäure im Laufmittel nicht aus, und es wurden unterschiedliche Dissoziationsstufen der Substanzen detektiert. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine große Menge TFA zugesetzt, was zur Folge hatte, daß die enzymatisch gebildete Carbamoylaminosäure nichtenzymatisch zum Hydantoin zurückreagierte (siehe 4.2.1, S. 74). Vor allem bei einer großen Probenzahl machte sich dieser Effekt durch die Lagerung im Autosampler der HPLC-Anlage bemerkbar. Die am erfolgreichsten eingesetzte Methode zur kontinuierlichen Bestimmung der vier Enantiomere der Hydantoinasereaktion war eine kombinierte Anordnung von Photometer und Polarimeter. Da die Molsumme der L- und D-Enantiomere als konstant betrachtet werden mußte, war es im Vergleich zur Chiral-HPLC-Messungen nicht möglich, Wäge- oder Pipettierfehler zu erkennen. Außerdem mußte die Racemisierung während der Reaktionszeit vernachlässigt werden. Dazu wurde in getrennten Experimenten die Halbwertszeit der Racemisierung von den untersuchten Substraten bestimmt und die maximale Reaktionsdauer berechnet (siehe 3.10.2.1, S. 63). Die erhaltene maximale Reaktionsdauer war die Zeit, in der eine enantiomerenreine **BnH**-Lösung bei 37 °C und pH 8.5 in 0.1 M Tris-Puffer zu höchstens

5 % racemisiert wäre. Da aber bei einer Umsetzung die Konzentration des Hydantoins ständig geringer wird, ist der tatsächliche Fehler immer geringer als dieser berechnete Wert. Die Güte aller neuentwickelten Verfahren wurde durch vergleichende Messungen mittels HPLC und Chiral-HPLC überprüft, siehe dazu Abbildung 5.2-1 (S. 122), Abbildung 5.2-2 (S.123) und Teves et al. (1999).

5.2.1 Analytik mittels HPLC

Als chromatographische Methode wurde sowohl für qualitative als auch für quantitative Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich die HPLC eingesetzt. Da die untersuchten Substanzen aufgrund ihres salzartigen Charakters hohe Schmelz- und Siedepunkte besitzen, kam die Gaschromatographie für underivatisierte Hydantoine nicht in Frage. Die hierfür notwendige Derivatisierung der Proben konnte durch Einsatz von HPLC-Methoden umgangen werden. Ein Vorteil der HPLC gegenüber den eingesetzten Online-Methoden ist die Möglichkeit, die Konzentration aller Enantiomere der Reaktionspartner unabhängig voneinander messen zu können. Dadurch konnte für jede Messung die Molsumme, also die Summe der Substrat- und Produktenantiomerenkonzentrationen bestimmt werden und damit der Meßfehler der Proben besser bewertet werden. Offensichtlich wird diese Schwäche der Online-Methoden in den kontinuierlich erhaltenen Konzentrationsverläufen über die Reaktionszeit. Z. B zeigt Abbildung 4.4-6 (S. 86), daß sich Gasblasen in einer Küvette als Fehler in allen vier errechneten Enantiomerkonzentrationen bemerkbar machen. Deshalb wurden gelegentlich Start- und Endkonzentrationen der Online-Messungen mittels HPLC kontrolliert.

5.2.1.1 Meßfehler und Reproduzierbarkeit

Bei RP-18- und Chiral-HPLC-Messungen schwankten die Molsummenkurven um maximal 0.1 mM. Geringere Konzentrationen als 0.1 mM konnten mittels HPLC nicht mehr quantitativ bestimmt werden. Die Eichgeraden konnten monatelang verwendet werden, wurden aber durch Messungen bekannter Konzentrationen ständig kontrolliert. Beim Einsatz der chiralen HPLC zur Bestimmung der Enantiomerenkonzentrationen von **D-** und **L-BnH** konnte nur in Konzentrationsbereichen über 1 mM gemessen werden. Die Ursache hierfür lag in der schlechten Peaktrennung der Enantiomere von **BnH** (siehe Abbildung 3.6-1, S. 29).

5.2.1.2 Abstoppen der Reaktionen

Das Abstoppen der Umsetzungen von **BnH** in Gegenwart von freiem Enzym bereitete Probleme (siehe 4.2.1, S. 74). Da sowohl die Zugabe von zuviel als auch von zuwenig TFA die Meßergebnisse verfälschte, wurde als optimale Menge die Zugabe von 2 % (V/V) TFA zur Reaktionsprobe ermittelt. Diese abgestoppten Proben wurden möglichst bald mit HPLC-Laufmittel auf 1/10 verdünnt und waren so mindestens 12 Stunden im Autosampler bei Raumtemperatur stabil. Um bei neuen Substraten nicht jedesmal wie-

der die Lagerstabilität der HPLC-Proben untersuchen zu müssen, wurden die Eichproben alternierend vermessen. Dazu wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe abwechselnd die erste, dann die letzte, die zweite, dann die vorletzte Probe usw. gemessen.

5.2.2 Analytik mittels kontinuierlicher Meßmethoden

In dieser Arbeit wird der Begriff Online-Methode nur für Methoden verwendet, bei denen die Auswertung während der Messung möglich war. Dagegen wird umgangssprachlich dieser Begriff häufig für die automatisierte Probenahme bei nachfolgender HPLC-Messung verwendet. Bei dieser Vorgehensweise ist ein Eingreifen in die Reaktion, z. B. der Abbruch einer Racematspaltung erst nach Verstreichen der Meßzeit möglich. Im Vergleich zu der sonst üblichen Probenahme bieten Online-Methoden den Vorteil, daß Meßdaten in sehr kurzen Abständen erhalten werden, in dieser Arbeit war dies in 2 – 5-Sekundenschritten der Fall. Bei der Messung von Konzentrations-Zeit-Verläufen mittels HPLC müssen zur Ermittlung von optimalen Probenahmeintervallen normalerweise Vorversuche durchgeführt werden. Demgegenüber bieten Online-Methoden den Vorteil, daß eine Fülle von Meßdaten über die Reaktion aufgezeichnet wird und die Auswahl der benötigten Meßdaten erst nach Reaktionsende erfolgt. Soll z. B. aus gemessenen Daten die Enantioselektivität eines Enzyms bestimmt werden, müssen bei reversiblen, enantioselektiven Reaktion besonders im Bereich zwischen 30 - 70 % Umsatz (Theil, 1997) besonders viele Meßpunkte gemessen werden, was üblicherweise zeitaufwendige Vorversuche erfordert. Bei komplexeren Reaktionssystem eignet sich der Einsatz von Online-Methoden besonders gut. Z. B. mußten zur chromatographischen Bestimmung der vier Enantiomere der Hydantoinasereaktion zwei Enantiomerenpaare getrennt werden. Für die Untersuchung von mehreren Substraten hätte dies eine zeitaufwendige chiralanalytische Methodenentwicklung bedeutet.

5.2.2.1 Meßfehler und Reproduzierbarkeit

Da die Molsumme der Substrat- und Produktenantiomere durch die Messung nicht bestimmt werden konnte, war bei allen Online-Methoden ein sorgfältiges Einwiegen und genaues Pipettieren erforderlich, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Außerdem wirkte sich die Behandlung, wie z. B. erneutes Auftauen des Enzyms dramatisch auf die Aktivität aus. Um diese Einflüsse zu verringern, wurde die Enzymfraktion in 100 µl Portionen aliquotiert. Bei vergleichenden Messungen wurden eine gepoolte Enzymlösung aus mehreren Aliquots verwendet und die Versuchsreihen in möglichst kurzer Zeit durchgeführt. Bei Inhibitionsuntersuchungen wurde immer die Umsetzung ohne Inhibitor wiederholt und mit den kurz darauf gemessenen Reaktionen mit Inhibitor verglichen. Da sowohl das Polarimeter als auch das Photometer einen Drift in ihren Grundlinien zeigten, wurden die Geräte bereits einige Stunden vor der Messung eingeschaltet und thermostatisiert. Zur Kontrolle des Grundliniendriffs wurde nach einigen Messungen mit Standards der Drift der Grundlinie ermittelt und das Experiment bei einem resultierenden Konzentrationsfehler von über 5 % wiederholt. Die Lichtquelle im Polarimeter strahlt

ein Linienspektrum aus, aus welchem mittels optischer Filter eine Linie ausgewählt wird. Dagegen wird im Photometer aus einem kontinuierlichen Spektrum mit Hilfe eines optischen Gitters ein spektraler Bereich ausgewählt. Durch Fehler in der Mechanik zur Einstellung der Spektralloptik werden Schwankungen der Detektionswellenlänge verursacht. Deshalb wurde für die photometrische Messungen eine Methode zur Ermittlung des spezifischen Extinktionskoeffizienten des Produkts ausgehend von einer Messung der Substratlösung etabliert (siehe 3.10.2.2, S. 63).

Der Meßfehler der etablierten Online-Methoden wurde nicht ermittelt, da vor allem bei der kombinierten Methode aus Photometer und Polarimeter Grundliniendrifts die Hauptursache waren. Die Genauigkeit wurde durch einen Vergleich der mittels Online- und HPLC bestimmten Meßdaten abgeschätzt (siehe Abbildung 5.2-1 und Abbildung 5.2-2). Die beiden Methoden zeigten eine zufriedenstellende Übereinstimmung.

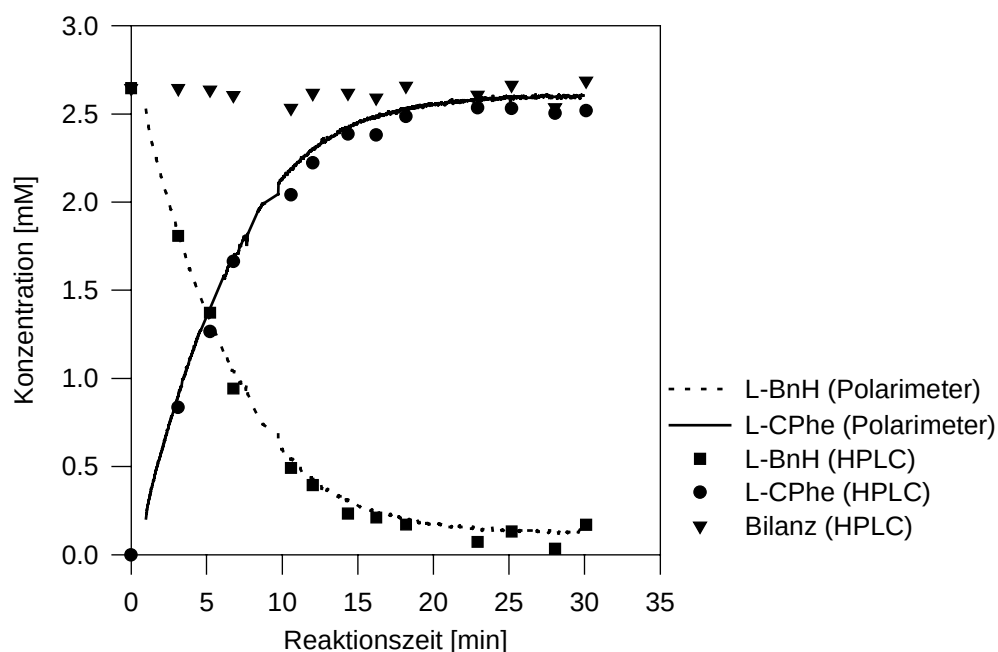


Abbildung 5.2-1: Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit 0.031 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Vergleich der kontinuierlich, nach Methode 3.10.1.2 (S. 61) erhaltenen Konzentrationen (Kurven) mit HPLC-Messungen (Symbole) nach Methode 3.10.1.1 (S.61).

Abbildung 5.2-1 zeigt den Vergleich von mittels Polarimetrie (3.10.1.2, S. 61) und mittels HPLC (3.10.1.1, S. 61) gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufen einer Umsetzung von 3 mM **L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C. Die mittels HPLC bestimmten Konzentrationen zeigten Abweichungen von weniger als 5 % gegenüber den polarimetrisch bestimmten. Die mit der HPLC bestimmten Konzentrationen zeigten Schwankungen von etwa 0.1 mM, was an der Bilanzkurve erkennbar ist.

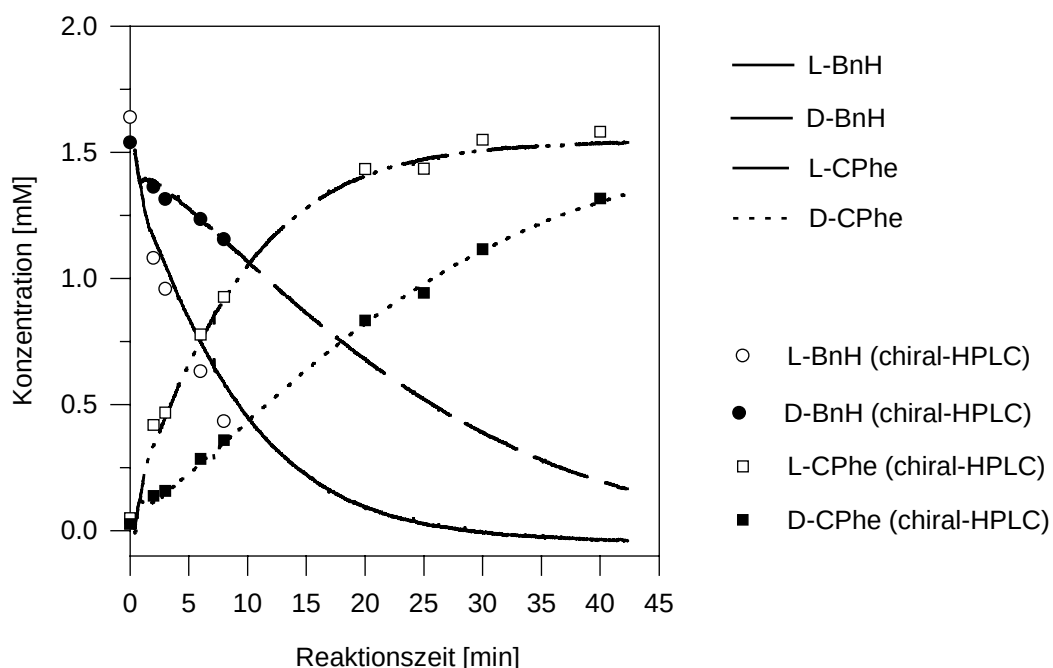


Abbildung 5.2-2: Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** mit 0.31 U Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C. Die durchgezogenen Kurven zeigen den nach Methode (3.10.2.2, S. 63) ermittelten kontinuierlichen Konzentrationsverlauf aller Enantiomere, die Symbole zeigen zum Vergleich die mittels chiraler HPLC ermittelten Konzentrationen nach Methode 3.10.2.1 (S. 63).

Abbildung 5.2-2 zeigt den Vergleich von Konzentrations-Zeit-Verläufen einer Umsetzung von 3 mM **D,L-BnH** mit Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C, die mittels Methode (3.10.2.2, S. 63) und mittels chiraler HPLC (3.10.2.1, S. 63) gemessen wurden. Die Abweichung der polarimetrisch bestimmten Konzentrationen gegenüber den mittels HPLC bestimmten betrug weniger als 5 %. Die mittels HPLC bestimmten Konzentrationen zeigten Schwankungen von etwa 0.05 mM. Für die Enantiomere von **BnH** konnte für Reaktionszeiten über 10 Minuten keine Konzentration bestimmt werden. Der Grund dafür lag in der schlechten Trennung der Enantiomere von **D,L-BnH** (Abbildung 3.6-1). Vor allem bei einer kleinen Konzentration eines Enantiomers gegenüber einer großen Konzentration des anderen war der Fehler besonders groß. Deshalb konnten für die Enantiomere von **BnH** nur Eichgeraden für Konzentrationen über 1 mM erstellt werden.

Für den unter 3.10.1.2 (S. 61) beschriebenen polarimetrischen Aktivitätstest wurde die Empfindlichkeit der Methode für die Umsetzung von **L-BnH** zu **L-CPhe** bei 296 nm in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 bei 37 °C ermittelt (Tabelle 5.2-1). Die Empfindlichkeit der Umsetzung berechnet sich aus der Differenz der spezifischen molaren Drehwerte von 1 mM Lösungen von Produkt und Substrat. Die Nachweisgrenze wird aus dem konstanten Meßwertfehler des Polarimeters, der 0.004 ° betrug und der Empfindlichkeit

berechnet. Für die Umsetzung von **L-BnH** zu **L-CPhe** ist die Nachweisgrenze einer Konzentrationsänderung niedriger, als wenn die getrennten Substanzkonzentrationen bestimmt würden. Dies liegt an dem entgegengesetzten Vorzeichen der spezifischen molaren Drehwerte der beiden Substanzen. Daher sind Nachweisgrenze und Empfindlichkeit umso geringer, je höher die Differenz der spezifischen molaren Drehwerte von Substrat und Produkt ist. Z. B. beträgt die Differenz bei der Umsetzung von **L-NPH** selbst bei 280 nm nur 0.014 °/mM, da die spezifischen molaren Drehwerte von Substrat und Produkt in diesem Fall das gleiche Vorzeichen haben.

Tabelle 5.2-1: Empfindlichkeit und Nachweisgrenze des polarimetrischen Aktivitätstest (Methode 3.10.1.2, S. 61)

Substanz	spezifischer, molarer Drehwert [°/mM]	Empfindlichkeit [°/mM]	Nachweisgrenze [mM]
L-BnH ¹	-0.184	0.184	0.022
L-CPhe ¹	+0.069	0.069	0.058
Umsetzung L-BnH , L-CPhe ¹		0.253	0.016
L-NPH ²	-0.334	0.334	0.012
L-CNPG ²	-0.196	0.196	0.020
Umsetzung L-NPH , L-CNPG ²		0.138	0.029

¹ Messung bei 296 nm

² Messung bei 253 nm

5.2.2.2 Substratspezifitäts- und Enantioselektivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der **Substratspezifität** der verschiedenen Hydantoinasen wurden in den meisten Fällen die Umsetzungen mittels HPLC untersucht. Darüber hinaus konnte als Vorversuch eine Umsetzung der racemischen Verbindung in der Polarimeterküvette bereits einen qualitativen Hinweis über die Aktivität und Enantioselektivität einer Umsetzung geben. Dazu wurde zu einem Racemat, dessen spezifische molare Drehwerte der Enantiomere unbekannt waren, Enzym zugegeben und der Drehwert der Reaktionslösung kontinuierlich verfolgt. Wurde das Substrat vom Enzym umgesetzt, konnte eine Drehwertänderung beobachtet werden, Voraussetzung dafür war lediglich, daß sich die spezifischen molaren Drehwerte von Substrat und Produkt unterschieden. Außerdem konnte mit dieser Methode die notwendige Enzymmenge für eine Reaktion innerhalb einer gewünschten Reaktionszeit abgeschätzt werden. Wird bei dieser Methode keine Drehwertänderung beobachtet, heißt das allerdings nicht, daß keine Reaktion stattfindet. Bei unspezifischen Umsetzungen von Racematen oder bei einer rasch ablaufenden Racemisierung bleibt der Drehwert über die gesamte Reaktion konstant. Diese Methode wurde z. B. als Vorversuch zur Untersuchung der Umsetzung von **D,L-BOD** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 durchgeführt (siehe 4.4.7, S. 101).

Bei **Enantioselektivitätsbestimmungen** zeigte sich, daß die beschriebene Online-Methode (3.10.2.2, S. 63) sehr empfindlich auf Fehler der spezifischen Extinktionen

reagierte. Da im Falle des Photometers die verwendete Wellenlänge Teil eines kontinuierlichen Spektrum ist, machen sich mechanische Ungenauigkeiten in der Monochromatoreinheit des Photometers bei den Messungen stark bemerkbar. Es fiel auf, daß bei wiederholtem Einschalten des Photometers die Extinktion einer Standardlösung bis zu 10 % variierte. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß der mittels Seilzug gesteuerte Monochromator nach der Geräteequilibrierung nicht exakt dieselbe Wellenlänge traf. Da Extinktionsunterschiede normalerweise auf den Plateaus von Absorptionsbanden gemessen werden, zeigt dieser Wellenlängendrift keine nennenswerte Auswirkung auf die Extinktion. Im Fall der Umsetzung von **BnH** wurde aber aufgrund der geringen Unterschiede der Absorptionsspektren der Hydantoine und der Carbamoylaminosäuren an der Kante von Absorptionsbanden gemessen. Geringe Wellenlängendifferenzen verursachten hierbei große Extinktionsänderungen. Deshalb wurden die Absorptionsspektren von Substrat und Produkt im Bereich um die gewählten Wellenlänge gemessen. Da bei den Messungen die genaue Wellenlänge unbekannt war, wurde durch eine Auftragung der Extinktionen des Substrats über der des Produkts mittels Regression ein Zusammenhang der spezifischen Extinktionskoeffizienten ermittelt. Von Vorteil war nun, daß zu Beginn einer Umsetzung die Extinktion der Substratlösung vor der Enzymzugabe genügte, um die beiden spezifischen Extinktionskoeffizienten zu berechnen.

5.2.3 Bestimmung der Enantioselektivität durch Parameteroptimierung

Die klassische Methode zur Bestimmung kinetischer Parameter ist die Linearisierung einer kinetischen Gleichung. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die durch linearisierte Auftragung resultierende Gerade ein Beweis für die Richtigkeit des angenommen Modells sein kann. Außerdem kann die Linearisierung im Gegensatz zur Parameteroptimierung ohne weitere Hilfsmittel durchgeführt werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die mathematische Veränderung der Meßdaten durch die Linearisierung. Mit den Meßdaten wird auch der Meßfehler verändert, dieser ist dann in vielen Fällen abhängig vom absoluten Meßwert (Abbildung 5.2-3). Daraus resultiert, daß der Beitrag der einzelnen Meßwerte zur Ausgleichsgerade eigentlich gewichtet werden müßte. Das bedeutet wiederum, daß bereits vor der Messung bekannt sein muß, welche Meßwerte für die nachfolgende Linearisierung von besonderer Bedeutung sind.

In dieser Arbeit wurden die kinetischen Parameter mittels nichtlinearer Regression der kinetische Gleichungen an die Meßdaten ermittelt. Diese Methode bietet den Vorteil, daß die Daten unverändert, mit ihrer ursprünglichen Fehlerbehaftung zur Parameteridentifizierung eingesetzt werden. Dadurch treten die oben beschriebenen Nachteile nicht mehr auf. Außerdem bieten diese Programme die Möglichkeit, auch andere unsichere Größen, wie z. B. die Anfangskonzentration, in die Optimierung aufzunehmen.

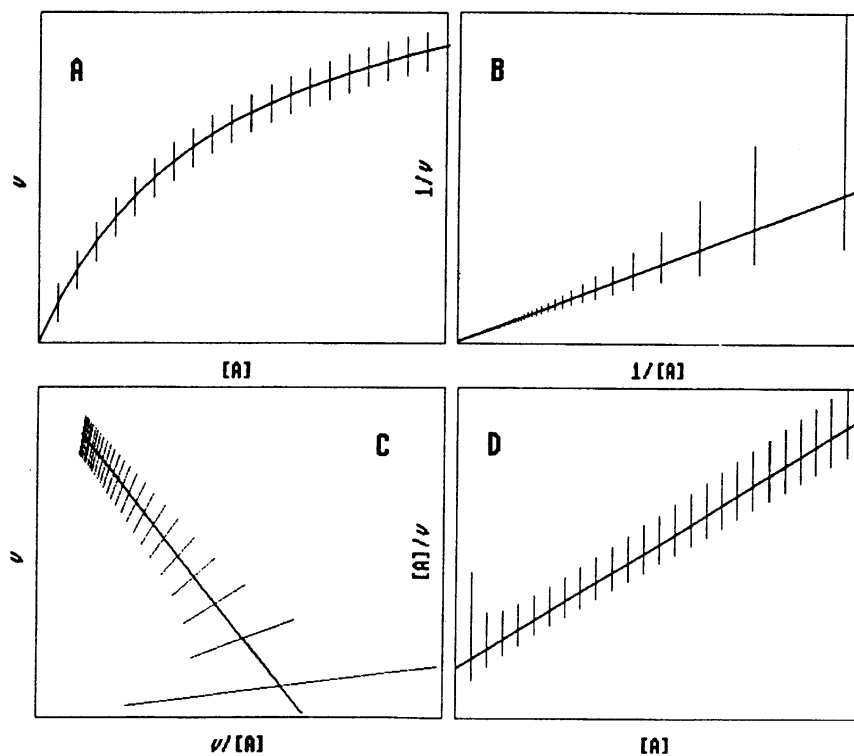


Abbildung 5.2-3: Fehlergrenzen in verschiedenen Darstellungsarten der Michaelis-Menten-Beziehung unter Annahme eines konstanten absoluten Fehlers; A: direkte Auftragung (siehe auch Abbildung 4.4-5 (S. 85); B: doppelt-reziprokes-Diagramm (Lineweaver-Burk-Diagramm); C: Eadie-Hofstee-Diagramm; D: Hanes-Diagramm; v : Reaktionsgeschwindigkeit, $[A]$: Substratkonzentration; (Bisswanger, 1994; mit freundlicher Genehmigung).

5.3 Umsetzung von D,L-BnH

Bei Umsetzung mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 konnte nachgewiesen werden, daß das Enzym für dieses Substrat eine geringe Enantioselektivität von $E=3.3$ bezüglich des L-Substrats besitzt. Die Messungen zeigten, daß das Gleichgewicht der Reaktion bei 37 °C und pH 8.5 in 0.1 M Tris-Puffer bei ca. 97 % **CPhe** liegt.

Der Hydantoinaseprozeß unterscheidet sich von der klassischen kinetischen Racematspaltung durch die in situ Racemisierung des Hydantoin. Dadurch kann theoretisch das ganze Substrat zu enantiomerenreinem Produkt umgesetzt werden. Reaktionen eines solchen Typs werden als dynamische, kinetische Racematspaltung bezeichnet (Theil, 1997).

Unter den oben geschilderten Reaktionsbedingungen ist die Umsetzung von **BnH** reversibel. Während bei einer dynamischen kinetischen irreversiblen Racematspaltung enantiomerenreines Produkt gewonnen werden kann, kann im Fall einer reversiblen Reaktion keine enantiomerenreine Verbindung erhalten werden. Diese Tatsache kann durch das Vorhandensein eines Maximum der Kurve im ee(S) von U-Diagramm leicht nachvollzogen werden. Zu dieser Zeit der Reaktion liegt die größtmögliche Anreicherung an **L-BnH** vor.

5.3.1 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit

Eine Veränderung der Temperatur zeigte lediglich den erwarteten Einfluß auf die Gleichgewichtskonstante der Reaktion. Die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten wird mit Gleichung 4-6 beschrieben:

$$\Delta_R G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

Unter der Annahme, daß $\Delta_R G^0$ in dem untersuchten Temperaturbereich konstant ist, kann eine Abnahme der Gleichgewichtskonstanten mit zunehmender Temperatur mit dieser Formel erklärt werden. Die Gleichgewichtskonstanten wurden durch Parameteroptimierung an ee(U)-Verläufe ermittelt (siehe 3.10.2.4, S. 68). Die unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebene Methode zur kontinuierlichen Bestimmung der 4 Enantiomerenkonzentrationen ist bei Umsätzen über 70 % mit einem großen Fehler behaftet. Dies wird an den ee(U)-Verläufen besonders deutlich, wie in Abbildung 3.10-5 (S. 68) zu sehen ist. Genau dieser Bereich sagt aber am meisten über die Gleichgewichtskonstante aus. Da der Fehler bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten nicht genauer untersucht wurde, können keine quantitativen Aussagen über die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante getroffen werden.

Obwohl erwartet wird, daß eine Temperaturerhöhung zu einer Erniedrigung der Enantioselektivität führt, wurden seither nur wenig systematische Untersuchungen dieser Art durchgeführt (Philips, 1996). Holmberg und Hult (1991) untersuchten die Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität für eine Umesterung und Hydrolyse von 1-Phenylethylbutyrat mit einer Lipase aus *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*). Sie leiteten einen Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Enantioselektivität her (Gleichung 4-5):

$$E_1^{T_1} = E_2^{T_2} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Bei der Herleitung dieser Beziehung wurde angenommen, daß die Differenz der Aktivierungsenergien beider Substratenantiomere temperaturunabhängig ist.

Um den Temperatureinfluß der Enantioselektivität bei der Umsetzung von **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 nach dieser Beziehung abzuschätzen, wurde aus dem bei 37 °C ermittelten E-Wert die E-Werte für 25 und 45 °C berechnet (Tabelle 5.3-1).

Tabelle 5.3-1: Vergleich der nach Methode 3.10.2.4 (S. 68) ermittelten Enantioselektivitäten und der Berechnung über die Temperaturabhängigkeit (Holmberg, Hult, 1991)

Temperatur [°C]	pH-Wert	Gleichgewichts- konstante [1]	Enantioselektivität [1] aus den Meßdaten berechnet	Enantioselektivität [1] berechnet mit Gleichung 4-5
25	8.5	19.2	4.1	3.4
37	8.5	17.5	3.3	3.3
45	8.5	6.7	3.4	3.2

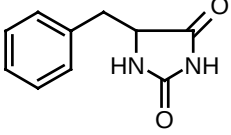
Aus den mittels Gleichung 4-5 berechneten Enantioselektivitäten (Tabelle 5.3-1) kann gezeigt werden, daß sich E innerhalb des untersuchten Temperaturintervalls nur um 0.2 ändern sollte. Solche geringen Änderungen waren aber mit der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Methode nicht nachweisbar. Bei eigenen Messungen wurde selbst die größte meßbare Differenz von E = 0.7 als nicht signifikant eingeschätzt.

Die Gleichung von Holmberg und Hult besagt, daß vor allem Reaktionen mit einer hohen Enantioselektivität die höchste Temperaturabhängigkeit zeigen. Sie konnten sowohl rechnerisch als auch experimentell zeigen, daß in der von ihnen durchgeführten Umesterung eine Temperaturänderung von 37 °C auf 6 °C den E-Wert von 11.5 auf 14.6 steigerte. Eine Steigerung der Enantioselektivität mit abnehmender Temperatur konnte auch bei der Hydrolyse von substituierten Glutaminsäureestern mit Schweineleberesterase festgestellt werden (Lam et al., 1986). Dagegen berichtet eine andere Untersuchung (Boutelje et al., 1988) daß eine Umsetzung von Benzyl-bismethoxycarbonylpyrrolidin mit demselben Enzym eine mit der Temperatur zunehmende Enantioselektivität zeigte. Die mit steigender Temperatur zunehmende Flexibilität der Enzyme läßt eigentlich erwarten, daß durch die unschärfer definierten Positionen der Bindungsstellen des Substrats im aktiven Zentrum die Enantioselektivität abnimmt. Eine

Abhängigkeit der Enantioselektivität von der Enzymflexibilität wird in einer Untersuchung über die Umsetzung von D,L-N-Acetyl-phenylalanin mit Subtilisin Carlsberg berichtet. Durch zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropiestudien konnte die Enzymflexibilität in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln gemessen werden. Die Experimente ergaben, daß die Enantioselektivität für diese Reaktion mit zunehmender Flexibilität des Enzyms zunimmt. Erklärt wurde dieser unerwartete Effekt mit der durch die zunehmende Flexibilität steigende Wechselwirkung des Substrats mit dem Enzym. Barton et al. (1990) fanden bei einer Racematspaltung einer Hydroxypropionsäure zwischen 12 und 45 °C keinerlei Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität dieser Reaktion. Noritomi et al. (1996) stellten fest, daß die Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität von Subtilisin Carlsberg und einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* stark von der Art der Enzympräparation abhängt. Die untersuchte Reaktion war eine Umesterung von 2-Phenylethylalkohol mit Vinylbutyrat. Eine besonders starke Abhängigkeit E(T) konnte bei der Lyophilisierung des Enzyms aus Phosphatpuffer festgestellt werden. Dagegen zeigte eine Lyophilisierung ohne Puffer nahezu keinen Effekt.

Im Gegensatz zur Enantioselektivität zeigte die Aktivität des Enzyms bei der Umsetzung von **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 eine starke Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur. Interessant ist, ob die Aktivitätszunahme durch eine Veränderung des Enzyms verursacht wird oder ob eine normal temperaturabhängige Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit nach Arrhenius vorliegt. Die in Tabelle 4.4-7 (S. 112) zusammengefaßten spezifischen Aktivitäten der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bei pH 8.5 zeigen eine Verdopplung der Aktivität von 25 auf 37 °C. Das ist die Zunahme, die bei vielen chemischen Reaktionen bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C gefunden wird (Römpp, 1995). Allerdings nimmt die spezifische Aktivität bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 45 °C wieder ab. Diese Abnahme kann nicht mehr mit der Gleichung von Arrhenius erklärt werden und könnte durch eine Veränderung oder Inaktivierung des aktiven Zentrums verursacht werden. Ein Temperatur-Optimum von 39 – 40 °C wurde bereits in einer früheren Untersuchung für die Umsetzung von L-5-(3'-Indolylmethyl)-hydantoin beschrieben (Kölle, 1991)

Tabelle 5.3-2: Zusammenfassung der Umsetzungen von 3 mM **D,L-BnH**

Benzyhydantoin	Abkürzung	Enantioselektivität E	spez. Aktivität $A_{\text{spez.}}$ L, D
	BnH	4.1 (L, 25 °C, pH 8.5)* 3.3 (L, 37 °C, pH 8.5)* 3.4 (L, 45 °C, pH 8.5)* 4.1 (L, 37 °C, pH 7.5)* 3.8 (L, 37 °C, pH 9.5)*	28.5, 7.8* 58.3, 19.3* 35.3, 15.8* 39.5, 14.0* 54.8, 14.8*

* Untersuchungsmethode nach 3.10.2.2 (S. 63)

5.3.2 Abhängigkeit der Enantioselektivität vom pH-Wert

Die Enantioselektivität der Umsetzung von **D,L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* zeigte keine Abhängigkeit vom pH-Wert des 0.1 M Tris-Puffers bei 37 °C (4.4.1.5, S. 90). Dagegen führte eine pH-Erhöhung von 7.5 auf 8.5 zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität um etwa 45 %. Eine weitere Erhöhung auf pH 9.5 zeigte keinen nennenswerten Einfluß mehr. In einer früheren Untersuchung wurde ein pH-Optimum vom 7.5 für die Umsetzung von L-IMH in 0.1 M Glycylglycin-Piperazin-Puffer ermittelt (Kölle, 1991). Vermutlich beruht der Unterschied des pH-Optimums auf die unterschiedlichen Puffersysteme bzw. anderen Substrate. Der pK_s -Wert von **BnH** beträgt 8.7 (Sarfert, in prep.). Bei einem pH-Wert von 8.5 liegt etwa die Hälfte des **BnH** dissoziiert vor, bei pH 9.5 bereits die 10-fache Menge. Daraus kann gefolgert werden, daß mit steigendem pH-Wert weniger undissoziiertes **BnH** als Substrat zur Verfügung steht. Unter der Annahme, daß nur undissoziiertes Hydantoin umgesetzt wird, könnte damit evtl. die Abnahme der spezifischen Aktivität erklärt werden.

In der Literatur gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Enantioselektivität. Barton et al. (1990) beschreiben eine enantioselektive Racematspaltung von 2-(4-Hydroxyphenoxy)-propansäure mit einer Lipase aus *Candida rugosa*. Dabei stellten sie fest, daß eine Absenkung des pH-Werts von 9.0 auf 7.5 die Enantioselektivität von 3 auf 20 steigerte. Interessanterweise war die spezifische Aktivität bei pH 7.5 doppelt so hoch wie die bei pH 9.0. Granjean et al. (1991) untersuchten Racematspaltungen eines Diesters mit Schweineleberesterase. Sie entdeckten eine Abhängigkeit der Enantioselektivität vom pH-Wert für die Umsetzung des Dimethylesters in einem pH-Bereich zwischen 6 und 7.5. Bei dem niedrigeren pH-Wert nahm zwar die Aktivität des Enzyms stark ab, dafür war die Enantioselektivität der Umsetzung deutlich höher.

5.4 Wahl der untersuchten Substrate

Wie in Abschnitt 5.1 (S. 117) beschrieben ist, wurde in dieser Arbeit **BnH** als Standardsubstrat eingesetzt. Von dieser Verbindung war bekannt, daß sie von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 enantioselektiv zu **L-CPhe** umgesetzt wird (Dombach, 1989). Ziel dieser Arbeit war es, durch einen systematischen Vergleich der Umsetzungen verschiedener Substanzen mit dieser Hydantoinase Aussagen über die Substrat- und Enantioselektivität dieses Enzyms und einiger anderer Hydantoinasen machen zu können. Das Auswahlkriterium der Substanzen, die für die Untersuchungen bereitgestellt werden mußten, war, daß in den Versuchsreihen lediglich ein einziger Parameter variiert wurde. Sollte z. B. die Auswirkung der Raumerfüllung des Benzylrestes in der 5-Position des Hydantoinrings untersucht werden, stellte sich die Frage, welche Gruppen dem Benzylrest hinsichtlich induktiver und mesomerer Effekte ähnlich sind. Die gleiche Frage stellte sich bei der Untersuchung der Bedeutung einzelner Ringpositionen im Hydantoin. Beim Austausch einzelner Atome werden häufig

mehrere Parameter, wie z. B. Ringspannung, Elektronegativität, Auswirkung auf Tautomerien usw., gleichzeitig variiert. Beispielsweise würde der Austausch der 3-NH-Gruppe gegen ein Sauerstoffatom zu einem instabilen Carbaminsäurederivat (4-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,5-dion) führen, welches im Puffer unter Kohlendioxidabspaltung sofort zur Aminosäure hydrolysieren würde (siehe Abbildung 5.4-1).

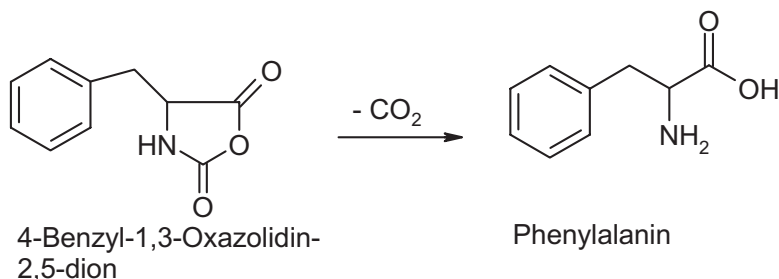


Abbildung 5.4-1: Zersetzung von 4-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,5-dion zu Phenylalanin

Daher wird im folgenden die Auswahl der zu untersuchenden Substanzen hinsichtlich der Vergleichbarkeit mit Benzylhydantoin begründet.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Benennung der chiralen Substanzen erfolgt nach der Fischer-Projektion als D- und L-Enantiomere. Obwohl diese Benennung eigentlich auf Aminosäuren und Kohlenhydrate beschränkt ist, bietet sie in dieser Arbeit den Vorteil, die unterschiedlichen Reaktionen hinsichtlich ihrer Enantioselektivität besser vergleichen zu können. Die üblicherweise eingesetzte Bezeichnung der absoluten Konfiguration asymmetrischer Kohlenstoffatome erfolgt nach Cahn-Ingold-Prelog (Cahn et al., 1966; Prelog, Helmchen, 1982). Diese Bezeichnung kann aber hinsichtlich der Enantioselektivität eines Enzyms beim Vergleich unterschiedlicher Substrate Verwirrung stiften. Als Beispiel sei hier die Umsetzung von **D,L-BnSI** (4.4.8, S. 105) im Vergleich zu **D,L-BnH** (4.4.1.3, S. 85) genannt. Während **BnH** von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 L-selektiv umgesetzt wird, wird **BnSI** D-selektiv gespalten. Werden jedoch die Produkte nach der Cahn-Ingold-Prelog-Regel gekennzeichnet, wird in beiden Fällen das S-Produkt erhalten, obwohl die Enantioselektivität der beiden Reaktionen entgegengesetzt ist. Der Grund hierfür ist die Änderung der Prioritäten der Substituenten.

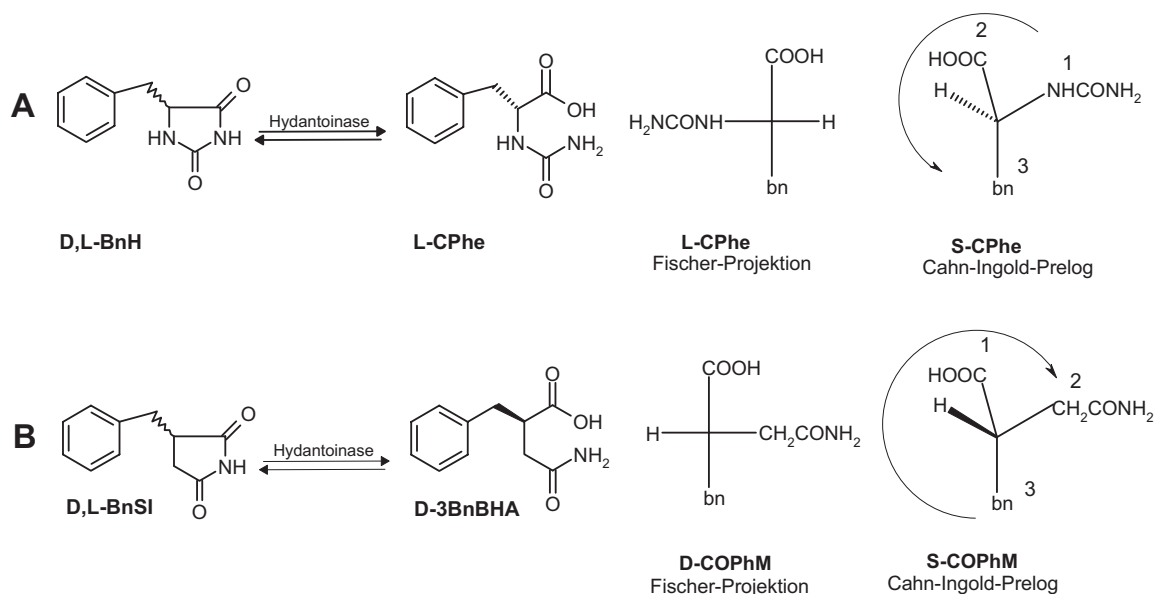


Abbildung 5.4-2: L-selektive Umsetzung von **D,L-BnH** (A) bzw. D-selektive Umsetzung von **D,L-BnSI** (B) mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Werden die absoluten Konfigurationen der Produkte nach Cahn-Ingold-Prelog bestimmt, wird in beiden Fällen das S-Produkt erhalten.

Um die ausgewählten Substrate mit Benzylhydantoin vergleichen zu können, werden die wichtigsten stoffspezifischen Werte zusammengefaßt:

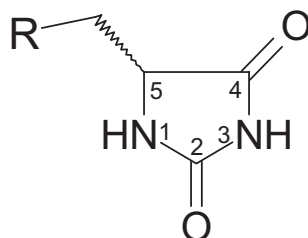


Abbildung 5.4-3: Numerierung der Positionen im Hydantoinring

Tabelle 5.4-1: Zusammenfassung stoffspezifischer Parameter von **BnH**

Eigenschaft	Beschreibung	Quelle
pK _s -Wert	8.7; 9.3	1, 2
acides C-Atom	Position 3	3
Racemisierung	durch Enolbildung C ⁴ C ⁵ Beweis: H/D-Austausch und Racemisierung erfolgen gleich schnell	3 5
Bindungswinkel	N ¹ C ⁵ C ⁴ =99-100 °; C ⁶ C ⁵ C ⁶ =111.5-112.5 °	4
Ringkonformation	nahezu planar	4
Hybridisierung von C ⁵	sp ³	4
Ø Ph-Gruppe	≈ 500 pm	6
Länge Bn-Rest	≈ 650 pm	6
Hydrolyse mit NaOH	Produkt: CPhe	7

1 (Sarfert, persönliche Mitteilung); 2 (Picket, McLean, 1939); 3 (Ware, 1950); 4 (Kleinpeter, 1997); 5 (Reist et al. 1996); 6 Molecular Structure Model (1990); 7 (Chromwell, Stark, 1969), (3.6.3, S. 30)

Tabelle 5.4-2: Zusammenfassung stoffspezifischer Parameter von Hydantoin

Eigenschaft	Beschreibung	Quelle
Tautomerien	C ⁴ C ⁵ ; C ² C ³ und C ⁴ C ⁵ ; C ¹ C ² und C ⁴ C ⁵	1
Standardbildungsenthalpien der Tautomere [kJ/mol] ⁸	C ¹ C ² : -17.7 (-49.1); C ² C ³ : -30.7 (-60.9)	2
Standardbildungsenthalpie von Hydantoin [kJ/mol] ⁸	-55.9 (-77.0)	2

1 (Ware, 1950); 2 (Kleinpeter, 1997)

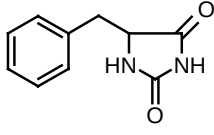
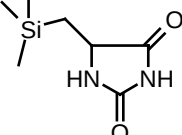
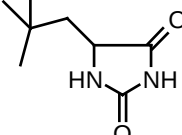
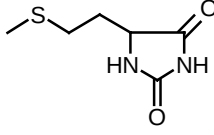
5.5 Variation der 5-Substituenten

Bei der Untersuchung der Substituenten in der 5-Position des Hydantoinrings wurden zum einen der Phenylrest durch Gruppen mit ähnlicher Größe ausgetauscht. Zum anderen wurde der Einfluß der Methylengruppe auf die Substrat- und Enantioselektivität der enzymatischen Umsetzung untersucht.

Aus den Daten der Tabelle 5.5-1 fällt auf, daß die TMS-Gruppe mit der *tert*-Butylgruppe gut vergleichbar ist. Die Raumerfüllung der Substituenten beider Hydantoine ist sehr ähnlich. Da die Löslichkeiten sowohl von **TMSMH** als auch von **NPH** sehr gering sind, kann geschlossen werden, daß die Hydrophobizität von der TMS- und der *tert*-Butylgruppe vergleichbar ist. Die TMS-Gruppe wurde bei biologischen Untersuchungen als unpolar und hydrophob beschrieben (Walkup et al., 1995; Tacke, Linoh, 1989; Tacke, 1985). Die Elektronegativitäten von Kohlenstoff und Silizium unterscheiden sich sehr

wenig, daher liegen in beiden Fällen ausschließlich kovalente Bindungen vor, so daß sich die induktiven Effekte beider Reste nicht wesentlich unterscheiden können.

Tabelle 5.5-1: Einfluß der Phenylgruppe im 5-Substituenten auf die Substrat- und Enantioselektivität verschiedener Hydantoinasen bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5

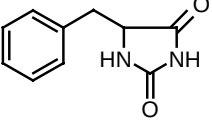
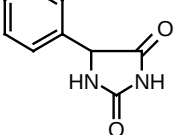
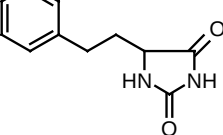
				
Abkürzung	BnH	TSMH	NPH	MTEH
Substituentenlänge [pm] ¹	≈ 650	≈ 450 (Atomradius Si = 118)	≈ 450 (Atomradius C = 77)	≈ 600
Raumerfüllung Ø [pm] ¹	Phenylgruppe: ≈ 500	TMS-Gruppe ≈ 450	tert-Butyl-Gruppe: ≈ 450	Methylthiomethyl-Gruppe: ≈ 350
maximale Löslichkeit in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 als Racemat [mM]	10 – 12	1.5	0.5	120
Halbwertszeit der Racemisierung [h]	5.2	10.4	6.4	4.8
Enantioselektivität (D oder L, Enzym)	E=3.3 (L ³⁷⁴⁵) E>100 (D ²⁰¹¹⁷) D-selektiv ^{H1} E>100 (D ^{H2})	E>100 (D ³⁷⁴⁵) E>100 (D ²⁰¹¹⁷) E>100 (D ^{H1}) E>100 (D ^{H2})	E=0 ³⁷⁴⁵ D-selektiv ^{H1} E>100 (D ^{H2})	E=3 (D ^{3745,2}) E>100 (D ^{H2}) 20117, H1: n. b.
spez. Aktivität [U/mg Enzym] für Racemat für 3745	31	≈ 0.2	≈ 0.3	0.91

1: Molecular Structure Model; 2: (May, 1998b); 3745: Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745; 20117: Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117; H1: Hydantoinase aus *Bacillus thermoglucosidasius*, rekombinant in *E. coli*; H2: Hydantoinase aus *Thermus species* rekombinant in *E. coli*

Erstaunlich ist die unterschiedliche Racemisierungszeit der beiden Hydantoinen. Während das **TSMH** mit einer ähnlichen Aktivität wie das **NPH** umgesetzt wird, bewirkt allein der Unterschied, daß sich im **NPH** ein Kohlenstoffatom anstelle eines Siliziumatoms befindet, eine starke Auswirkung auf die Enantioselektivität der Umsetzung. Beim **NPH** reichte das Spektrum der Enantioselektivitäten bei Umsetzungen mit unterschiedlichen Hydantoinasen von unselektiv bis D-spezifisch. Dagegen zeigte sich, daß alle eingesetzten Hydantoinasen **TSMH** ausschließlich D-spezifisch umsetzten. Im Gegensatz zu den etwas hydrophoberen Hydantoinen **TSMH** und **NPH** wurde das **BnH** L-selektiv umgesetzt. Da aber das relativ hydrophile **MTEH** D-selektiv umgesetzt

wird, läßt sich kein Zusammenhang der Enantioselektivität mit der Hydrophobizität des Hydantoin nachweisen. Die 5-Substituenten von **MTEH** und **BnH** sind ungefähr gleich lang, daher scheint auch dieses Merkmal, wie ebenfalls bei **TMSMH** und **NPH** keinen Zusammenhang mit der Enantioselektivität zu haben. Die Hydantoinase 2 aus *Thermus species* setzte alle vier Substrate spezifisch zum D-Enantiomer um. Dagegen zeigte die Umsetzungen mit Hydantoinase 1 aus *Bacillus thermoglucosidasius* nur bei **TMSMH** eine Spezifität zum D-Produkt, während **BnH** und **NPH** lediglich D-selektiv umgesetzt wurden.

Tabelle 5.5-2: Einfluß der Anzahl an Methylengruppen im 5-Substituenten auf die Substrat- und Enantioselektivität verschiedener Hydantoinasen bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5

			
Abkürzung	BnH	PhH	PhEH
Substituentenlänge [pm] ¹	≈ 650	≈ 550	≈ 750
Halbwertszeit der Racemisierung [h]	5.2	n. b.	4.8
Enantioselektivität (D oder L, Enzym)	E=3.3 (L ³⁷⁴⁵) E>100 (D ²⁰¹¹⁷) D-selektiv ^{H1} E>100 (D ^{H2})	20117, H1, H2: n. b.	E=4.9 (D ³⁷⁴⁵) 20117, H1, H2: n. b.
spez. Aktivität [U/mg Enzym] für Racemat für 3745	31	0.3 ²	5.1

1: Molecular Structure Model; 2 (May, 1998b); 3745: Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745; 20117: Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117; H1: Hydantoinase aus *Bacillus thermoglucosidasius*, rekombinant in *E. coli*; H2: Hydantoinase aus *Thermus species* rekombinant in *E. coli*

In Tabelle 5.5-2 sind die Untersuchungsergebnisse zum Einfluß der Methylengruppe auf die Substrat- und Enantioselektivität zusammengefaßt. Wie bereits in früheren Untersuchungen berichtet wurde (Dombach, 1989) werden Substanzen, die keine Methylengruppe des 5-Substituenten in Nachbarstellung zum C-5-Atom besitzen gar nicht oder nur sehr schwach von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 umgesetzt. Obwohl der Rest des **PhEH** deutlich länger als ein Benzylrest ist, wird dieses Substrat immer noch von der Hydantoinase umgesetzt. Interessanterweise wird **PhEH** aber mit der umgekehrten Enantioselektivität umgesetzt. Da sowohl im Fall des

NPH und **TMSMH** als auch beim **BnH** und **PhEH** bereits eine sehr kleine Veränderung des Substrats zu einer starken Enantioselektivitätsänderung bzw. –umkehr führt, soll an dieser Stelle keine Hypothese für die Ursache dieses Phänomens aufgestellt werden.

Sowohl **MTEH** als auch **PhEH** wurden von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 D-selektiv umgesetzt, **TMSMH** sogar D-spezifisch. Solch eine substratabhängige Umkehr der Enantioselektivität wurde für die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 für das MTEH beschrieben (May, 1998a; Sylø et al., 1999). Als Erklärung für die Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 wird eine Wechselwirkung des 5-Substituenten mit einer hydrophoben Region im aktiven Zentrum postuliert. Zum einen wird durch den Abstand dieser Region zu den Bindungsstellen des Hydantoinrings die Notwendigkeit der Methylengruppe als Linker erklärt. Diese Theorie konnte mit allen Experimenten in der vorliegenden Arbeit untermauert werden. Zum andern wird aber auch beschrieben, daß die asymmetrische Lage dieser Region zu den Bindungsstellen des Hydantoinrings für die Enantioselektivität verantwortlich ist. Mit dem Modell kann eine hohe Enantioselektivität für **L-BnH** vorausgesagt werden. Eigene Untersuchungsergebnisse widersprechen dieser Theorie, da das Substrat **D,L-BnH** entgegen den Erwartungen mit einer geringen Enantioselektivität zum **L-CPhe** umgesetzt wird. In der Literatur werden ebenfalls Untersuchungen beschrieben, in denen schon sehr geringfügige Modifikationen des Substrats einen großen Einfluß auf die Enantioselektivität zeigten. Kerridge et al. (1999) untersuchten eine stereoselektive Oxidation von Sulfiden mit einer Naphthalin-Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp.. Sie konnten zeigen, daß Methyl- und Ethyl-phenylsulfid (S)-selektiv umgesetzt wurden, dagegen aber die Umsetzungen von n-Propyl-, Isopropyl- und n-Butyl-phenylsulfid (R)-selektiv waren. Lediglich eine Verlängerung eines Alkylrestes um eine Methylengruppe verursachte diese Enantioselektivitätsumkehr. Tuomi und Kazlauskas (1999) untersuchten die Hydrolyse der Essigsäureester von 2-Methyl-3-phenyl-1-propanol (**1**) und 2-Phenoxy-1-propanol (**2**) mit einer Lipase von *Pseudomonas cepica* (Abbildung 5.5-1). Dabei zeigte sich, daß das Enzym beide Ester enantioselektiv zum (S)-Alkohol hydrolysierte. Da sich dabei aber die Priorität der Substituenten änderte (siehe auch Abbildung 5.4-2, S. 132), hydrolysiert das Enzym beide Ester tatsächlich mit entgegengesetzter Enantioselektivität. In diesem Beispiel genügte der Austausch einer Methylengruppe gegen ein Sauerstoffatom, um eine Umkehr der Enantioselektivität zu bewirken. Ilding et al. (1998) gelang eine Umkehr der Enantioselektivität einer Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* durch rationales Protein Design. Bei der Untersuchung des Einflusses von Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums auf die Enantioselektivität wurden zwei Aminosäuren gegen Isoleucin ausgetauscht. Die Folge war eine Umkehr der Stereoselektivität der von ihnen untersuchten Reaktion.

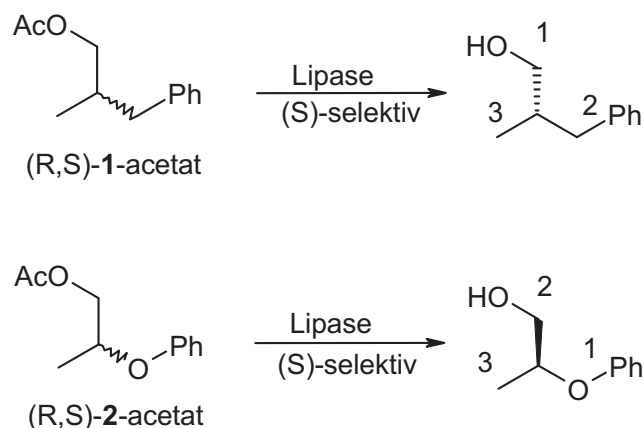


Abbildung 5.5-1: Umsetzung von 2-Methyl-3-phenyl-1-propylacetat (**1**) und 2-Phenoxy-1-propylacetat (**2**) mit Lipase von *Pseudomonas cepica*. Es werden in beiden Fällen bevorzugt die (S)-Alkohole gebildet. Da jedoch die Priorität der Substituenten wechselt, bewirkt der Austausch des Kohlenstoff- gegen ein Sauerstoffatom eine Umkehr der Enantioselektivität der Lipase (Tuomi und Kazlauskas, 1999).

Weitere Faktoren, die eine Änderung der Enantioselektivität bewirken können werden in Abschnitt 5.7 diskutiert.

Zur Diskussion der Substratspezifität in Abhängigkeit des 5-Substituenten sollen Untersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden (Kölle, 1991), herangezogen werden. Um die Aktivitäten mit eigenen Daten besser vergleichen zu können, werden relative Aktivitäten, bezogen auf **BnH** (=100), angegeben (Tabelle 5.5-3, S. 138). Bei der Betrachtung von relativen Aktivitäten der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745, fällt auf, daß die Untersuchungen von Kölle zu dem gleichen Aktivitätsverhältnisse von **BnH** und **PhEH** führt, wie dem in der vorliegenden Arbeit. Vor allem bei den para-substituierten Benzylhydantoinen fällt auf, daß die Aktivität nur von der Nitrogruppe signifikant reduziert wird. Im Unterschied zu allen anderen para-Substituenten zeigt die Nitrogruppe einen –M-Effekt, kann also Elektronen delokalisieren, wodurch die Elektronendichte im Benzolring erniedrigt wird. Diese Effekte verstärken die Polarität des Restes, die evtl. durch eine schlechtere Wechselwirkung des Substituenten mit Gruppen im aktiven Zentrum die Aktivitätsabnahme verursacht. Das Substrat 5-Benzoyloxybenzylhydantoin wurde nicht umgesetzt, dieser Substituent ist doppelt so lang wie die Benzyl-Gruppe. Vermutlich wird dieses Substrat aus sterischen Gründen nicht akzeptiert. Ebenso wurde auch das 5-(2-Naphthylmethyl)-hydantoin als Substrat nicht akzeptiert. Kölle konnte für 5-p-Hydroxybenzylhydantoin und 5-p-Carboxylbenzyl-hydantoin keine Aktivität nachweisen. Vermutlich war die Ursache die Deprotonierung der beiden Gruppen bei dem Reaktions-pH-Wert von 8.5. Interessanterweise wird 5-Cyclohexylmethylhydantoin ebenfalls nicht umgesetzt. Von der Raumerfüllung her ist dieser Rest dem Benzyl-, Trimethylsilyl- und Neopentylrest ähnlich. Da auch das **NPH** nur ein sehr schlechtes Substrat für die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 ist, werden offensichtlich aliphatisch substituierte Hydantoine nicht oder nur mit geringer Aktivität umgesetzt. Substrate, deren 5-Substitu-

enten Gruppen besitzen, die zur Ausbildung von π -Bindungen fähig sind, wie z. B. Aromaten, werden deutlich besser von diesem Enzym umgesetzt.

Guanti et al. (1990) führten Untersuchungen zur Enantioselektivität einer Umsetzung von 2-Aryl substituierten 1,3-Propandiol-diacetaten mit verschiedenen Esterasen durch. Dazu wurde die Stereoselektivität der Enzyme in Abhängigkeit von strukturell unterschiedlichen aromatischen Resten verglichen. Bei Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Kölle (1991) und Guanti (1990) fällt auf, daß sich die Substratabhängigkeit der Aktivität von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 und der Lipase aus Schweinepankreas (PPL) ähnlich verhalten (Tabelle 5.5-3). So werden Substrate, die sich sauer, wie z. B. beim p-Hydroxy-Rest, bzw. alkalisch verhalten, wie z. B. der Pyridylrest, deutlich schlechter umgesetzt. Während Kölle bei pH 8.5 beim Pyridinrest im Vergleich die halbe Aktivität zum **BnH** feststellte, fanden Guanti et al. bei pH 7 nur noch einen Bruchteil der Aktivität verglichen mit dem Phenylrest. Eine Erklärung hierfür wäre die mit abnehmendem pH-Wert zunehmende Menge an protonierten Pyridinresten, die dem Enzym aufgrund der Ladung nun vermutlich nicht mehr als Substrat zur Verfügung stehen. Dieselbe Argumentation erklärt auch bei der Esterase die starke Aktivitätsabnahme beim Aminorest. Genau umgekehrt verhält sich dieser Effekt beim p-Hydroxy-Rest, der mit abnehmendem pH-Wert undissoziiert und damit dem Enzym besser verfügbar vorliegt. Für beide Enzyme konnte keine Aktivität für den langen Benzyloxybenzyl- bzw. Benzyloxyphenylrest gefunden werden. Ein Zusammenhang zwischen Enantioselektivität und Aktivität der PPL läßt sich in der Publikation nicht finden. Mit geringen Enantioselektivitäten wurden Substrate mit Pyridyl-, Amino- und Hydroxyphenylsubstituenten umgesetzt.

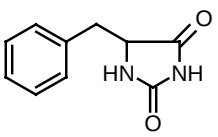
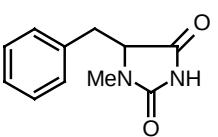
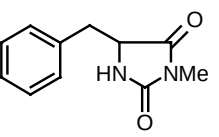
Tabelle 5.5-3: Vergleich relativer Aktivitäten Umsetzungen 5-substituierter Hydantoinen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C (Kölle, 1991) mit Umsetzungen verschiedener 2-Aryl-1,3-Propandiol-diacetaten mit PPL in 0.02 M Phosphatpuffer pH 7, bei RT (Guanti et al., 1990).

Kölle, 1991		Guanti et al., 1990		
5-Substituent des Hydantoin	relative Aktivität zu BnH (=100) pH 8.5	2-Substituent des 1,3-Propandiol-diacetat	relative Aktivität zu Ph (=100) pH 7	E _{irreversibel} (Chen et al., 1982)
Benzyl	100	Phenyl	100	58
p-Chlor-Benzyl	109	p-Chlor-Phenyl	112	141
p-Amino-Benzyl	94	p-Amino-Phenyl	15	4.0
p-Nitro-Benzyl	20	p-Nitro-Phenyl	41	34
p-Hydroxy-Benzyl	0	p-Hydroxy-Phenyl	21	2.6
1-Pyridylmethyl	53	1-Pyridyl	6	1.7
Benzyloxybenzyl	0	Benzyloxyphenyl	0.1	84

5.6 Substituenteneinfluß im Hydantoinring

Um die Bedeutung der Wasserstoffatome an den Positionen 1 und 3 im Hydantoinring zu untersuchen, wurde als Ersatz zunächst die Methylgruppe als sehr kleiner Substituent gewählt. Durch die Substitution änderte sich zum einen die Größe der Position, zum anderen können N-Substituierte Hydantoine an diesen Positionen keine Wasserstoffbrücken bilden. Außerdem sind durch diese Substitutionen die Ausbildung bestimmter tautomerer Formen des Hydantoins nicht mehr möglich.

Tabelle 5.6-1: Einfluß von Substituenten am Hydantoinring auf die Umsetzung mit verschiedenen Hydantoinasen bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5

			
	BnH	1MeBnH	3MeBnH
mögliche Tautomerien*	C ⁴ C ⁵ ; C ² C ³ und C ⁴ C ⁵ ; C ¹ C ² und C ⁴ C ⁵	C ⁴ C ⁵ ; C ² C ³ und C ⁴ C ⁵	C ⁴ C ⁵ ; C ¹ C ² und C ⁴ C ⁵
<i>Arthr. auresc.</i> DSM 3745	siehe Tabelle 4.4-7 (S. 112)	geringe Aktivität, Reaktionsprodukt: MeCPhe E nicht meßbar	keine Aktivität
<i>Arthr. crystall.</i> DSM 20117	E>100 (D)	keine Aktivität	n. b.
Hydantoinase 1	D-selektiv	keine Aktivität	n. b.
Hydantoinase 2	E>100 (D)	geringe Aktivität, Reaktionsprodukt: MeCPhe E nicht meßbar	n. b.

* siehe Tabelle 5.4-2 (S. 133)

Aus Tabelle 5.6-1 ist ersichtlich, daß die beiden Wasserstoffatome an den NH-Gruppen im Hydantoinring eine große Bedeutung auf die Aktivität der Hydantoinasen zeigen. **3MeBnH**, welches das benzylnaloge Hydantoin des als Induktor verwendeten 5-Indolylmethyl-N-3-methylhydantoin ist (Syldatk et al., 1992), wurde von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 nicht mehr umgesetzt. Dagegen zeigte das Enzym für **1MeBnH** eine sehr geringe Aktivität. Die Enantiomere von **1MeBnH** konnte zwar mittels chiraler HPLC getrennt werden, die Trennung der Enantiomere von dem Produkt **CMePhe** gelang aber nicht. Bei der geringen Aktivität des Enzyms für dieses Substrat war zudem die Racemisierung des Substrats schneller als die enzymatische Umsetzung. Daher konnte die Enantioselektivität des Enzyms für dieses Substrat nicht über die unterschiedlich schnelle Abnahme eines Substratpeaks bestimmt werden.

5.7 Austausch von Heteroatomen im Hydantoinring

Beim Austausch der Atome in der 1-Position des Hydantoinrings fiel auf, daß die Verbindungen, wenn überhaupt, nur noch einen Bruchteil der Aktivität im Vergleich zu **D,L-BnH** zeigten (Tabelle 5.7-1). **D,L-BOD** wurde von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745 mit einer Aktivität von etwa 0.3 U/mg_{Enzym} umgesetzt. Dagegen war **D,L-BnSI** ein viel schlechteres Substrat und **D,L-BnTD** wurde überhaupt nicht umgesetzt. Daraus kann geschlossen werden, daß die 1-Position sehr bedeutend bei der Bindung des Substrats im aktiven Zentrum ist. Im Gegensatz zu **BnH** konnte weder bei **BOD** noch bei **BnSI** eine Racemisierung bei pH 8.5 in 0.1 M Tris-Puffer und 37 °C nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, daß sich diese Verbindungen in ihren elektronischen Eigenschaften im Ring vom Hydantoin unterscheiden. Dagegen kann bei **1MeBnH** eine Racemisierung nachgewiesen werden (3.8.1.1, S. 36). Nach der Substitution des Wasserstoffatoms der 1-NH-Gruppe dieser Verbindung gegen eine Methylgruppe wurde das Substrat nur noch mit sehr geringer Aktivität umgesetzt (siehe Tabelle 5.6-1, S. 139). Beim Austausch der 1-NH-Gruppe gegen eine CH₂-Gruppe bzw. ein Sauerstoff- oder Schwefelatom kann die beim **BnH** mögliche C¹C²-Tautomerie nicht mehr stattfinden. Außerdem ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke ebenfalls nicht mehr möglich. Bei der Umsetzung mit allen untersuchten Hydantoinasen erfolgte die Hydrolyse sowohl beim **BnSI** als auch beim **BOD** durch nucleophilen Angriff des Wassers ausschließlich an die Carbonylgruppe der 4-Position. Dadurch wurden als Reaktionsprodukte **3BnBHA** bzw. **CPhM** gebildet. Im Unterschied zur nichtenzymatischen Hydrolyse von **BnSI** wurde bei der chemischen Hydrolyse, vor allem mit Hydantoinase 1, an der 4-Carbonylgruppe regiospezifisch hydrolysiert. Die alkalische Hydrolyse von **BnSI** fand dagegen nur regioselektiv an dieser Position statt.

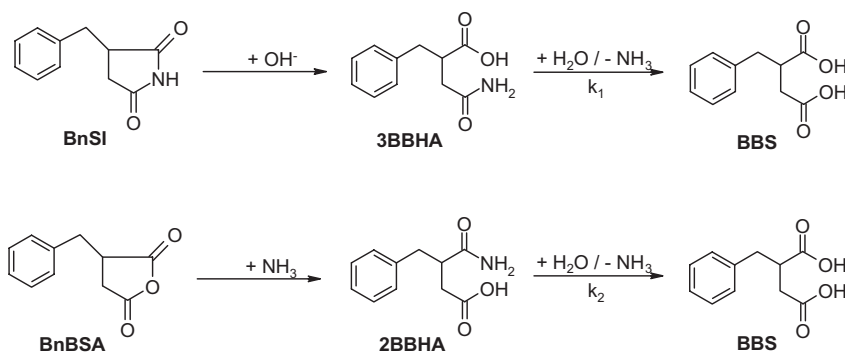
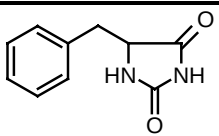
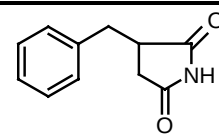
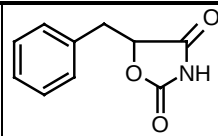
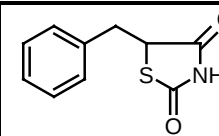


Abbildung 5.7-1: Bei der alkalischen Hydrolyse von **BnSI** wird überwiegend **3BnBHA** gebildet. Auch bei der Aminolyse findet der Angriff des Ammoniaks an der elektrophileren Carbonylgruppe in der 4-Position statt, dadurch wird bei dieser Reaktion überwiegend **2BnBHA** erhalten. Aufgrund der höheren Elektrophilie hydrolysiert **2BnBHA** etwa 5 mal so schnell wie **3BnBHA**.

Die 4-Carbonylgruppe ist elektrophiler als die in 2-Position. Das kann auch durch die Aminolyse von **BnBA** gezeigt werden. Hier wird bevorzugt das **2BnBHA** gebildet, also

erfolgte der nucleophile Angriff des Ammoniaks ebenfalls an der 2-Carbonylgruppe. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeit der mittels HPLC getrennten Halbamidpeaks (3.9.3.1, S. 58). Hier wurde festgestellt, daß **2BnBHA** etwa 5 mal schneller im HPLC-Fließmittel hydrolysierte als **3BnBHA**, bei dem die Amidgruppe an der weniger elektrophilen Carbonylgruppe hängt.

Tabelle 5.7-1: Einfluß der Atome in 1-Position des Hydantoinrings auf die Umsetzung mit unterschiedlichen Hydantoinasen bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5

				
Enzymquelle	BnH	BnSI	BOD	BnTD
<i>Arthr. auresc.</i> DSM 3745	siehe Tabelle 4.4-7 (S. 112) Racemisierung bei pH 8.5	D-selektiv ee(P)=50 % U=10 %, E=2.7 gleichzeitige Hydrolyse! Aktivität < 0.3 U/mg _{Enzym} Reaktionsprodukt: 3BnBHA keine Rückreaktion von 3BnBHA mit Salzsäure	D-selektiv ee(P)=20 % ee(S)=79 % U=68 % Aktivität ca. 0.3 U/mg _{Enzym} Reaktionsprodukt: CPhM keine Rück- reaktion mit Salzsäure schwacher Inhibitor für L-BnH , siehe 8.5 (S. 168) keine Racemi- sierung bei pH 8.5	keine Aktivität schwacher Inhibitor für L-BnH , siehe 8.5 (S. 168)
<i>Arthr. crystall.</i> DSM 20117	E>100 (D)	keine Aktivität	keine Aktivität	n. b.
Hydantoinase 1	D-selektiv	E>100 (D) Produkt: 3BnBHA	E>100 (D) Produkt: CPhM	n. b.
Hydantoinase 2	E>100 (D)	keine Aktivität	D-selektiv ee(P)=13 % ee(S)=9 % U=19 % Produkt: CPhM	n. b.

Für die Hydantoinasen aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 und DSM 3747 wurde bisher noch keine Umsetzung eines cyclischen Imids beschrieben. Die auf der Suche nach einem natürlichen Substrat der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 untersuchten cyclischen Imide (May, 1998b; Dombach, 1989; Kölle, 1991) zeigten allerdings auch keine strukturelle Ähnlichkeit mit **BnH**. In Abbildung 5.7-2 befindet sich eine Zusammenstellung seither untersuchter cyclischer Imide (May, 1998b).

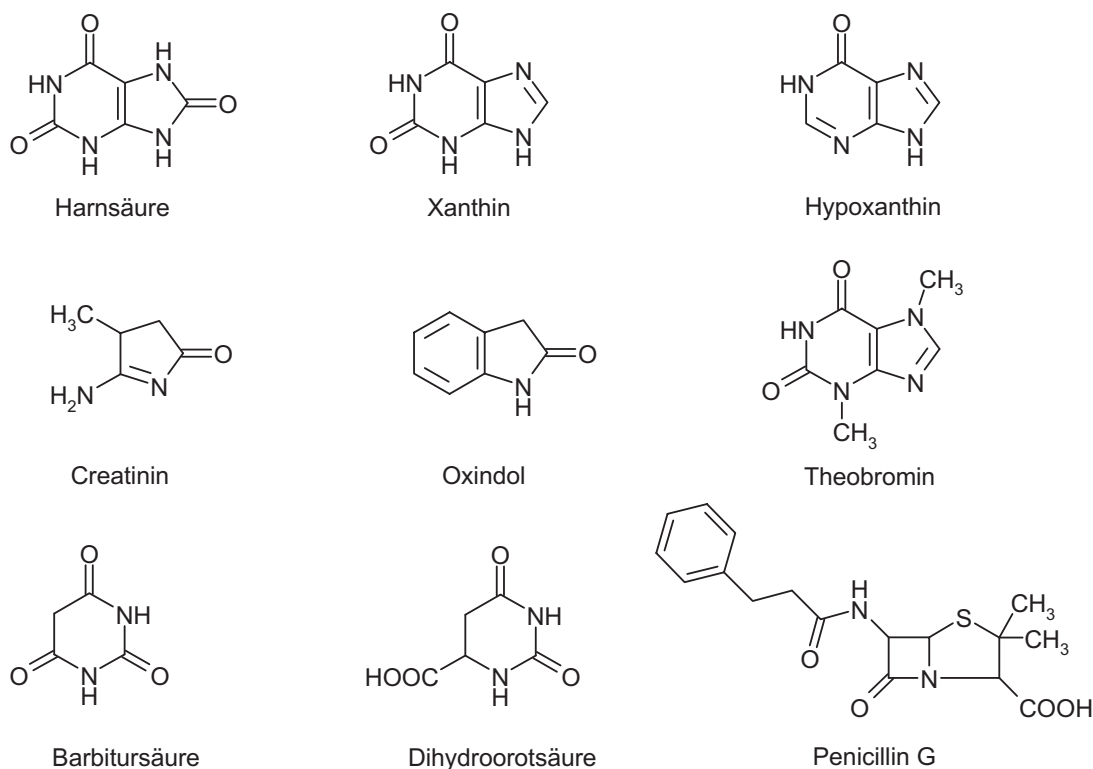


Abbildung 5.7-2: Übersicht seither untersuchter cyclischer Imide. Keine der gezeigten Substanzen wurde von den Hydantoinasen aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 und DSM 3747 umgesetzt (May, 1998b; Dombach, 1989; Kölle, 1991).

In der Literatur findet sich Imidaseaktivität bei einigen D-Hydantoinasen (Soong et al., in press; Soong, et al., 1999, Ogawa und Shimizu, 1997; Ogawa et al., 1996; Ogawa et al., 1995a; Ogawa et al., 1995b; Yang et al., 1993). Im Gegensatz zu der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 (May, 1998b) setzten D-Hydantoinasen überwiegend auch Dihydropyrimidine um.

1974 berichteten Kenneth et al. von einer Dihydropyrimidinase, die sie aus Niere und Leber verschiedener Nagetiere und Hunde isolieren konnten. Neben ihrem natürlichen Substrat Hydrouracil und Dihydrothymine setzte dieses Enzym auch **PhH** und 2-Phenylsuccinimid um.

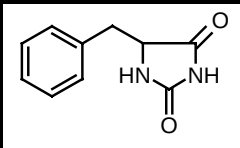
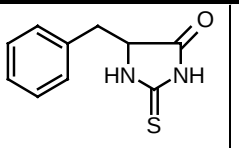
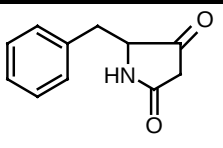
Yang et al. (1993) beschrieben eine Imidase aus Rattenleber, die eine sehr hohe Aktivität für Phthalimid zeigte. Für die Umsetzung von 6-Methylhydrouracil wird berichtet, daß β -N-Carbamoylalanin die Reaktion stark inhibiert. Es fiel auf, daß die Inhibition mit

zunehmendem pH-Wert abnahm. Während bei pH 6 eine 2 mM Substratlösung durch die Anwesenheit von 50 μ M Inhibitor um 90 % inhibiert wurde, konnte bei pH 8.5 keine Inhibition mehr beobachtet werden. Da das Carbamoylalanin mit steigendem pH-Wert zunehmend dissoziiert vorlag, war vermutlich die Ursache, daß es nicht mehr ins aktive Zentrum gelangen konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Feststellung von Kölle (1991) bestätigt werden, daß die Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* nur ungeladene Substrate akzeptiert. Soong et al. (1999) berichteten, daß in *Blastobacter species* A17p-4 zwei Enzyme für die Umsetzung von cyclischen Imiden verantwortlich sind. Neben einer von ihnen bereits früher beschriebenen Imidase, wird von einem Enzym mit dem Substratspektrum einer D-Hydantoinase berichtet. Die beiden Enzyme setzen sowohl unsubstituiertes Hydantoin als auch Methylsuccinimid um. Neben anderen cyclischen Imiden wurde bezüglich der Hydantoinase eine Aktivität für Phenylsuccinimid berichtet. 1,3-Thiazolidin-2,4-dion und schwefelhaltige Imide wurden nur von der Imidase umgesetzt, cyclische Anhydride, N-substituierte und disubstituierte Hydantoine dagegen von keinem der beiden Enzyme. Interessanterweise wird von der Rückreaktion von Phthal säurehalbamid zum Phthalimid mit der D-Hydantoinase bei einem pH-Wert unter 7.5 berichtet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für die Umsetzung von **BnSI** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 nicht beobachtet werden (siehe 4.4.8.3, S. 107). Bei Inhibitionsuntersuchungen der D-Hydantoinase konnten Soong et al. (1999) weder auf der Substrat- noch auf der Produktseite stark inhibierende Verbindungen finden.

Für **CPhM** konnte eine enzymatische Rückreaktion zu **BOD** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 nachgewiesen werden. Dagegen konnte bei der Umsetzung einer Mischung der Halbamide **3BnBHA** und **2BnBHA** mit diesem Enzym keine Bildung von **BnSI** beobachtet werden. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Halbamide konnte eine Untersuchung zur nichtenzymatischen Rückreaktion durch Behandlung mit Salzsäure nur bei **CPhM** durchgeführt werden. Interessanterweise wurde dabei aber kein **BOD** (4.4.7.3, S. 103) gebildet. Diese Reaktion verläuft bei **CPh** problemlos zu **BnH** (siehe 4.2.1, S. 74).

Tabelle 5.7-2: Einfluß der Atome in 2- und 3-Position des Hydantoinrings auf die Umsetzung mit unterschiedlichen Hydantoinasen bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5

			
Enzymquelle	BnH	BnTH	BnTS
<i>Arthr. auresc.</i> DSM 3745	siehe Tabelle 4.4-7 (S. 112) $pK_S=8.7^1$	Zersetzung	keine Aktivität, schwacher Inhibitor $pK_S=6.4^2$
<i>Arthr. crystall.</i> DSM 20117	E>100 (D)	Zersetzung	n. b.
Hydantoinase 1	D-selektiv	Zersetzung	n. b.
Hydantoinase 2	E>100 (D)	Zersetzung	n. b.

1: (Sarfert, persönliche Mitteilung)

2: (Mulholland et al., 1972)

Zur Untersuchung des Einflusses der 3-Position des Hydantoinrings auf Aktivität und Enantioselektivität der Enzyme, konnte gezeigt werden, daß **BnTS**, wie erwartet, nicht umgesetzt wurde. Aufgrund der starken Absorption dieser Verbindung konnten die unter 3.10.3 (S. 69) beschriebenen Inhibitionsexperimente bezüglich der Umsetzung von **L-BnH** nicht durchgeführt werden. Frühere Untersuchungen am selben Institut hatten eine schwache Inhibition von **BnTS** auf die Umsetzung von **D,L-IMH** gezeigt (May, persönliche Mitteilung). **BnTS** liegt auch in der Enolform vor (Mulholland et al., 1972). Nach Römpp (1995) dissoziieren ähnliche Substanzen sowohl in der Keto- als auch in der Enolform. In Abbildung 5.7-3 wurde in Analogie zur Barbitursäure die Dissoziation an der Methylengruppe gezeigt (Beyer, Walter, 1988). Im Gegensatz zu **BnH**, das einen pK_S -Wert von 8.7 besitzt, ist **BnTS** mit einem pK_S -Wert von 6.4 eine relativ starke Säure. Im alkalischen Tris-Puffer ist bei einem pH-Wert von 8.5 deutlich mehr **BnTS** dissoziiert als **BnH**. Da alle Hydantoinen mit geladenen Resten nicht umgesetzt wurden (Tabelle 5.5-3, S. 138), (Kölle, 1991), kann davon ausgegangen werden, daß nur ungeladene Substrate ins aktive Zentrum der Hydantoinase *aus Arthrobacter aurescens* DSM 3745 gelangen können. Vermutlich kann nur die undissoziierte Form der **BnTS** als Inhibitor wirken. Aufgrund von Tautomerie und Dissoziation reduziert sich die Menge an freier **BnTS** derart, daß der inhibitorische Einfluß dieser Substanz evtl. viel größer ist.

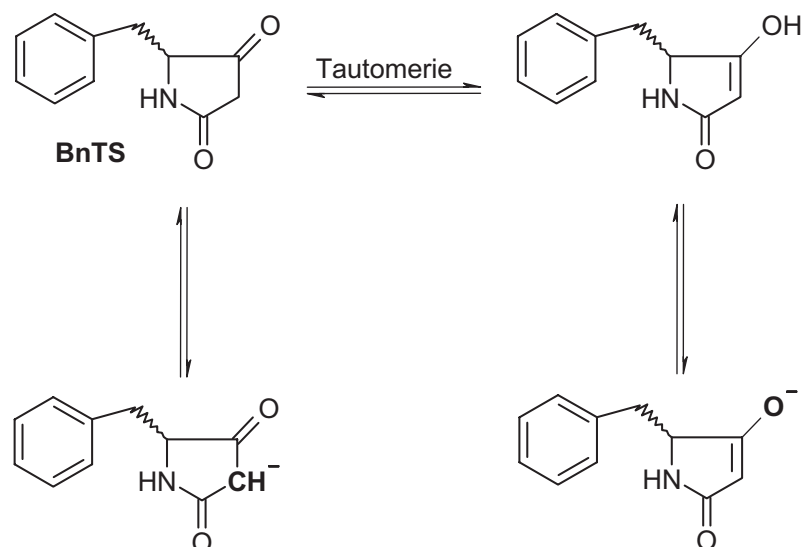
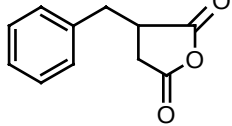
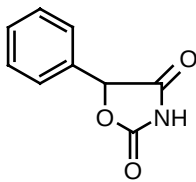


Abbildung 5.7-3: Tautomerie von **BnTS** (Mulholland, 1972) und Deprotonierung des Enols bzw. der Methylengruppe (Römpp, 1995; Beyer, Walter, 1988).

Untersuchungen mit **BnTH** ergaben, daß sich die Substanz unter den Reaktionsbedingungen bei einer Inkubationszeit über mehrere Stunden zersetzte. Diese oxidative Zersetzung wird unter anderem durch den im Puffer gelösten Sauerstoff verursacht (Edward und Nielsen, 1959; Ghoneim, et al., 1987). Das Chromatogramm einer Umsetzung mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C zeigte zwar die Bildung von mehreren Substanzen, unterschied sich aber nicht von einem enzymfreien Ansatz.

Als Beispiel eines cyclischen Anhydrids wurde **BnBA** eingesetzt (Tabelle 5.7-3), welches aber unter Reaktionsbedingungen hydrolysierte (Tabelle 4.4-9, S. 114). **POD** wurde als Substrat nicht akzeptiert und bestätigt damit die Untersuchungen mit **PhH**, das ebenfalls kein Substrat der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 ist. Im Gegensatz zu **PhH**, das ein schwacher Inhibitor für die Umsetzung von **PhH** ist (Tabelle 4.4-8, S. 113) zeigte **POD** keinen inhibitorische Wirkung.

Tabelle 5.7-3: Untersuchungen der Umsetzung weiterer hydantoinanaloger Substanzen mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 bei 37 °C in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5

		
Enzymquelle	BnBA	POD
<i>Arthr. auresc.</i> DSM 3745	Zersetzung	keine Aktivität
<i>Arthr. crystall.</i> DSM 20117	Zersetzung	n. b.
Hydantoinase 1	Zersetzung	n. b.
Hydantoinase 2	Zersetzung	n. b.

5.8 Schlußfolgerungen

5.8.1 Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745

Die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 setzt nur Hydantoin um, die ungeladene Substituenten in 5-Position mit einer 1'-Methylengruppe besitzen. Die Enantioselektivität dieser Hydantoinase ist abhängig von dem 5-Substituenten. Bereits geringste Änderungen können die Enantioselektivität des Enzyms ändern. Z. B. bewirkt der Austausch des Trimethylsilylrests durch einen Neopentylrest, daß die Stereoselektivität von D-spezifisch zu unselektiv wechselt. Beide Reste sind unpolar und nahezu gleich groß. Diese beiden Umsetzungen bilden einen Widerspruch zu dem Modell von May (1998b; Syldatk et al., 1999). Mit einem Atomradius von 118 pm ist das Siliziumatom um etwa 50 % größer als das Kohlenstoffatom, dessen Atomradius 77 pm beträgt. Dadurch ist die TMS-Gruppe lediglich etwa 10 % größer als die *tert*-Butylgruppe des **NPH**. Aufgrund der ähnlichen Löslichkeit müßten die beiden Substanzen in etwa die gleiche Hydrophobizität zeigen und daher mit der in dem Modell beschriebenen hydrophoben Region ähnlich gut wechselwirken. Es zeigte sich aber, daß neben dem großen Unterschied der Enantioselektivität dieses Enzym **NPH** im Gegensatz zu **TMSMH** fast nicht mehr umsetzt. Im Gegensatz zum Kohlenstoffatom besitzt das Siliziumatom leere d-Orbitale, die eine Erhöhung der Elektrophilie bewirken (Owen und Brooker, 1994). Eventuell wird durch diesen Unterschied die Aktivität und Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 derart beeinflusst. Nach Kölle (1991) wird Cyclohexylmethylhydantoin ebenfalls nicht als Substrat akzeptiert. Offensichtlich bewirken „weiche“ Atome, wie Silizium und Schwefel eine deutlich unterschiedliche Wechselwirkung mit dem Enzym als aliphatische Kohlenwasserstoffreste. Beim Vergleich der Raumerfüllung der *tert*-Butylgruppe von **NPH**, der TMS-Gruppe von **TMSMH** und der Ph-Gruppe vom **BnH** fällt auf, daß die Gruppen

nahezu dieselbe Größe besitzen, unter der Annahme, daß ein freies Elektronenpaar etwa die Ausdehnung einer C-C-Bindung zeigt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Hydantoinen ist **BnH** aromatisch. Offensichtlich werden Substrate mit aromatischen Substituenten von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 im allgemeinen mit einer hohen Aktivität umgesetzt. Dies erklärt auch die hohe spezifische Aktivität der Hydantoinase für 5-Indolylmethylhydantoin und weitere aromatische Hydantoine (Kölle, 1991).

Variationen von Atomen und Substituenten im Hydantoinring wirkten sich sowohl auf die Substratspezifität als auch auf die Enantioselektivität der Umsetzungen aus. So konnte im Vergleich zum **BnH** maximal 1 % der Aktivität dieser Hydantoinase gefunden werden, wenn in 1-Position durch Substitution des Wasserstoffs der NH-Gruppe gegen eine Methylgruppe durchgeführt wurde bzw. die Gruppe gegen eine Methylengruppe oder ein Sauerstoffatom ausgetauscht wurde. Im Falle des **BnSI** und des **BOD** drehte sich die Enantioselektivität dieser Hydantoinase um. **1MeBnH** wurde dagegen mit einer derart geringen Aktivität umgesetzt, daß keine Enantioselektivität nachgewiesen werden konnte (siehe 4.4.6. S. 100).

BnTD wurde dagegen nicht als Substrat akzeptiert. Bei allen Umsetzungen konnte nachgewiesen werden, daß die enzymatische Hydrolyse an der elektrophileren Carbonylgruppe in 4-Position erfolgte. Variationen in der 3-Position führten dazu, daß das Substrat nicht mehr umgesetzt wurde. Diese starke Abhängigkeit der Substratspezifität und Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte eine sterisch stabile Umgebung des Hydantoinrings im aktiven Zentrum bereits diese Verringerung der Aktivität für diese Substrate bewirken. Ein weiterer Grund könnte die Notwendigkeit der Protonen an den beiden NH-Gruppen im Hydantoinring, z. B. wegen der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Substratbindung sein. Dies würde auch den Aktivitätsverlust beim Austausch der 1-NH-Gruppe gegen ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bzw. eine Methylengruppe erklären. Eine weitere Erklärung wäre, daß bestimmte Tautomerien zur Substratbindung bzw. -umsetzung erforderlich sind, die in den untersuchten hydantoinanalogen Substanzen durch Veränderung der NH-Positionen verhindert werden. Außerdem kann es sein, daß die elektronischen Verhältnisse im Hydantoinring durch den Austausch von einzelnen Gruppen erheblich verändert wird. Der Hydantoinring im **BnH** ist nahezu planar (Kleinpeter, 1997). In der Literatur gibt es einen Strukturvorschlag für N-3-substituiertes Benzylhydantoin in Pyridin bzw. Chloroform (Abbildung 5.8-1). Bei einem bevorzugten Rotamer des **BnH** befindet sich der Benzylrest senkrecht über dem Hydantoinring, in anti-Position zum Wasserstoffatom am C-5. In einer weiteren bevorzugten rotameren Struktur befindet sich der Benzylrest schräg unter dem Hydantoinring zwischen dem Wasserstoffatom an C-5 und der 1-NH-Gruppe (Kleinpeter, 1997; Fujiwara et al., 1980) (Abbildung 5.8-2).

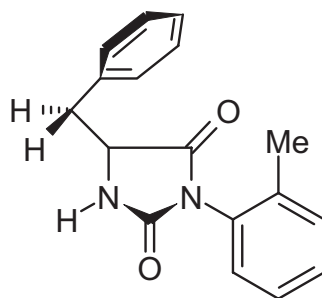


Abbildung 5.8-1: Struktur eines N-3-substituierten 5-Benzylhydantoin in Pyridin. Über dem nahezu planarem Hydantoinring befindet sich senkrecht dazu der Phenylring (Kleinpeter, 1997; Fujiwara et al., 1980).

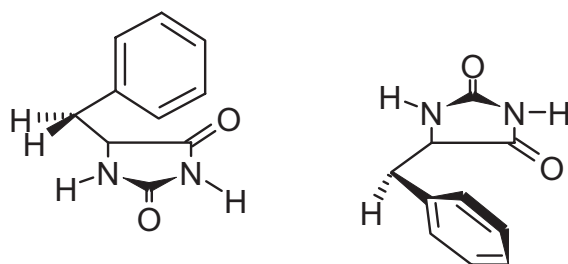


Abbildung 5.8-2: Strukturformeln der beiden bevorzugten Rotamere des **BnH** (Kleinpeter, 1997). In der links abgebildeten Struktur befindet sich der Phenylring in anti-Position zum Wasserstoffatom an C-5 über dem Hydantoinring. Dagegen befindet sich in der rechts abgebildeten Struktur der Phenylring unter dem Hydantoinring zwischen dem Wasserstoffatom an C-5 und der 1-NH-Gruppe.

Durch die Variationen im Hydantoinring ist es wahrscheinlich, daß die Planarität des Rings verloren geht. Für die Abhängigkeit der Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 von den 5-Substituenten konnte keine abschließende Erklärung gefunden werden. Genauso ist es auch schwierig, eine mechanistische Begründung für die starke Abhängigkeit der Stereoselektivität dieses Enzyms von den Variationen einzelner Positionen im Hydantoinring zu finden. Um eine Antwort auf diese Fragen zu erhalten, ist die Kenntnis der Kristallstruktur dieses Enzyms eine unerläßliche Voraussetzung.

5.8.2 Untersuchungen mit weiteren Hydantoinasen

Als weitere Hydantoinasen wurde eine kommerziell erhältliche, immobilisierte Hydantoinase aus *Bacillus thermoglucosidasius* (Handelsname: D-Hydantoinase 1, Roche, Penzberg) und eine freie Hydantoinase aus *Thermus species* (Handelsname: D-Hydantoinase 2, Roche, Penzberg), beide rekombinant in *Escherichia coli*, eingesetzt. Desweiteren wurden Untersuchungen mit einer immobilisierten D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 durchgeführt. Das Substratspektrum und die Enantioselektivität der kommerziell erhältlichen D-Hydantoinasen 1 und 2 waren bereits von Keil, et al., (1995) untersucht worden. Für die Hydantoinase aus *Arthrobacter*

crystallopoietes DSM 20117 waren bisher nur wenige Substrate mit isoliertem Enzym umgesetzt worden. Das Substratspektrum dieses Enzyms wurde größtenteils durch Umsetzung der Substrate mit ruhenden Zellen ermittelt (Alvarado-Marin, 1997; Möller et al., 1988; Siemann et al., 1998). Tabelle 5.8-1 zeigt eine Auflistung der literaturbekannten Substratspektren der drei genannten Hydantoinasen.

Alle untersuchten Substanzen werden mit zwei Ausnahmen von den drei Hydantoinasen D-spezifisch umgesetzt. Die Umsetzungen von Methyl- und n-Butylhydantoin mit der Hydantoinase 2 verlaufen jedoch nur mit einer geringen D-Selektivität.

Tabelle 5.8-1: Literaturbekanntes Substratspektrum weiterer, in dieser Arbeit eingesetzter Hydantoinasen.

5-Substituent des D,L-Hydantoins	D-Hydantoinase 1 <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> rekomb. <i>E. coli</i> ^{a)}	D-Hydantoinase 2 <i>Thermus species</i> rekomb. <i>E. coli</i> ^{a)}	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^{b)}
2-Butyl-	D	D	D
2-Hydroxyethyl-	D	D	
2-Thienyl-	D	D	D
2-Thienylmethyl-			D*
3,4-Dihydroxybenzyl-			D
4-Hydroxybenzyl-			D
4-Hydroxyphenyl-	D	D	D*
Benzyl-	D	D	D*
Benzyloxymethyl-			D
Benzylthiomethyl-			D
H-			D*
Hydroxymethyl-	D	D	D
Indolylmethyl-			D*
Isobutyl-	D	D	D
Isopropyl-	D	D	D
Methyl-	D	D-selektiv	D
Methylthioethyl-	D	D	D*
n-Butyl-	D	D-selektiv	
Phenyl-	D	D	D*
Phenylethyl-	D	D	

a) (Keil, et al., 1995)

b) (Möller et al., 1988, Siemann et al., 1998) Umsetzungen wurden mit ruhenden Zellen durchgeführt.

* Umsetzung wurde mit Isolierter Hydantoinase überprüft (Alvarado-Marin, 1997; Siemann et al., 1998)

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen nur durchgeführt, wenn die Verbindungen von der Hydantoinase *aus Arthrobacter aurescens* DSM 3745 umgesetzt wurden. Eine Zusammenfassung der Untersuchungen aller vier Enzyme befindet sich unter 4.4.9 (S. 109). Es zeigte sich, daß keine der anderen Hydantoinasen eines der untersuchten Substrate L-selektiv oder spezifisch umsetzten. **BnH**, **NPH** und **PhH** wurden von der Hydantoinase 1 lediglich D-selektiv umgesetzt, dafür D-spezifisch von der Hydantoinase 2.

Die Angabe der selektiven Umsetzung von **PhH** durch die D-Hydantoinase 1 wurde einer Untersuchung von Keil et al. (1995) entnommen. Allerdings wurden in diesen Untersuchungen die Enantioselektivität der Umsetzungen nur indirekt bestimmt, indem die entstandene N-Carbamoylaminosäure mit Natriumnitrit decarbamoyliert und anschließend mit BGIT zu einem Diastereomer derivatisiert wurde, von dem dann der Enantiomerenüberschuß mittels RP-HPLC bestimmt wurde. In dem Artikel wurde nicht beschrieben, ob eine Racemisierung durch die Probenbehandlung ausgeschlossen werden konnte.

Bei der Umsetzung von **BOD** zeigte die Hydantoinase 2 eine D-Selektivität, während mit der Hydantoinase 1 dieses Substrat D-spezifisch umgesetzt wurde. **1MeBnH** wurde von der Hydantoinase 1 mit sehr geringer Aktivität umgesetzt, die Hydantoinase 2 akzeptierte dieses Substrat gar nicht. Von beiden Hydantoinasen wurden **3MeBnH** und **BnTD** nicht umgesetzt. Die Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 setzte lediglich **TMSMH** D-spezifisch und **BnH** D-selektiv um. Für die anderen untersuchten Substrate konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war eine systematische Untersuchung der Substratspezifität und Enantioselektivität verschiedener Hydantoinasen, wobei sich der Schwerpunkt der Arbeiten auf die als L-selektiv beschriebene Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 konzentrieren sollte.

Zu Beginn wurde die Umsetzung von D,L-5-Benzylhydantoin mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 als Standardreaktion etabliert. Neben der Synthese von D- und L-5-Benzylhydantoin wurde eine chiralanalytische HPLC-Methode entwickelt. Zur Bestimmung der Enantioselektivität der L-selektiven Umsetzung von D,L-5-Benzylhydantoin wurde erstmals eine Analytik entwickelt, die aus einer Kombination von Polarimetrie und Photometrie bestand. Mit dieser online Methode wurden während der Umsetzungen kontinuierlich Meßdaten erhalten, aus denen der Enantiomerenüberschuß der Substratenantiomere berechnet und über dem Umsatz dargestellt wurde. Mittels nichtlinearer Regression wurde sowohl die Enantioselektivität als auch die Gleichgewichtskonstante der einzelnen Reaktionen ermittelt. Bei der Umsetzung einer 3 mM D,L-5-Benzylhydantoinlösung in 0.1 M Tris-Puffer, pH 8.5 bei 37 °C mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 wurde eine Enantioselektivität von 3.3, eine spezifische Aktivität von 78 U/mg_{Enzym} und eine Gleichgewichtskonstante von 17.5 bestimmt. Weder eine Variation der Temperatur zwischen 25 und 45 °C noch des pH-Werts zwischen 7.5 und 9.5 zeigte unter den genannten Reaktionsbedingungen einen signifikanten Einfluß auf die Enantioselektivität dieser Umsetzung.

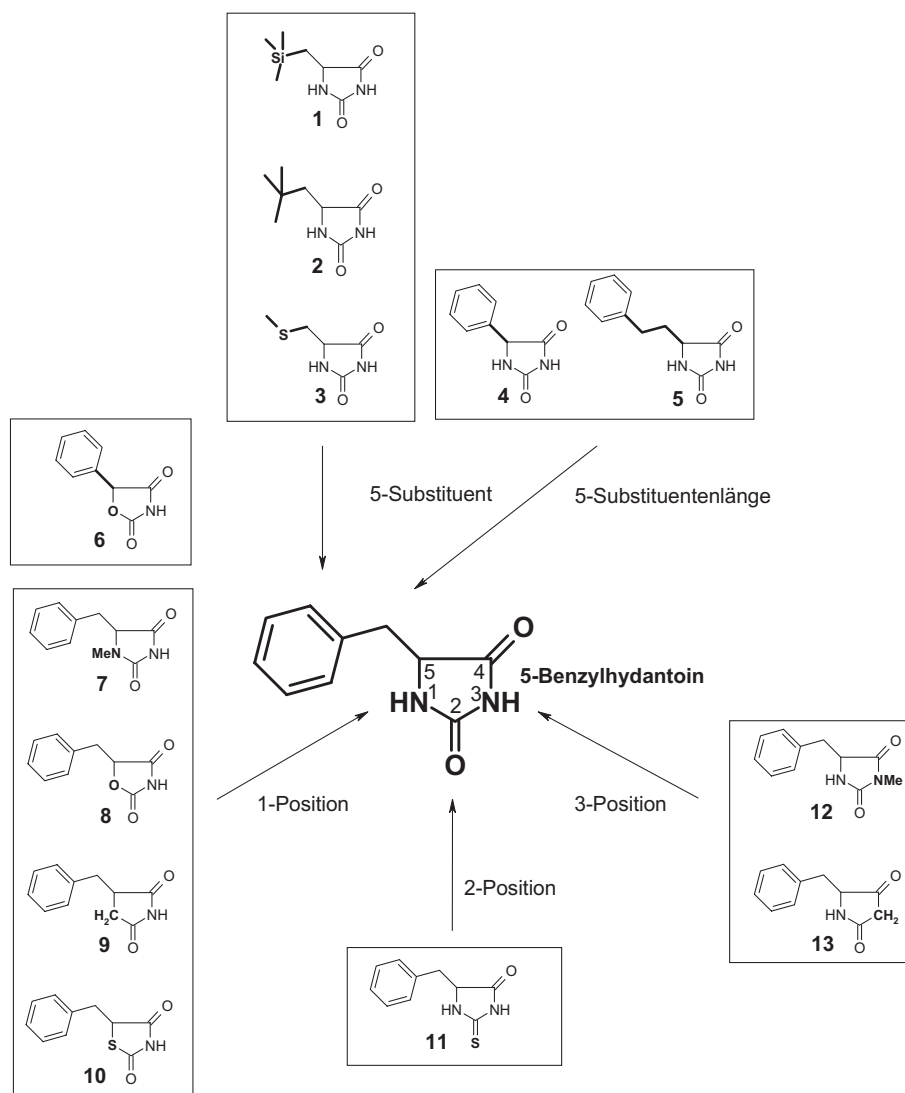
Zur systematischen Untersuchung der Substratspezifität von 5-monosubstituierten Hydantoinen wurde zunächst die Raumerfüllung des Substituenten variiert. Dazu wurden Substrate synthetisiert, die anstelle des Benzylrestes einen Neopentylrest, bzw. einen Trimethylsilylrest tragen (siehe auch Abbildung 6-1). Die Umsetzung des D,L-(Trimethylsilylmethyl)-hydantoin verlief D-spezifisch und war damit auch die erste stereospezifisch katalysierte Reaktion dieser Hydantoinase. Neopentylhydantoin wurde mit einer sehr geringen Aktivität unselektiv umgesetzt. Bei der Variation der Anzahl von Methylengruppen in Nachbarstellung vom C-5-Atom des Hydantoinrings, führte der Einbau einer weiteren Methylengruppe dazu, daß D,L-5-Phenylethylhydantoin mit einer umgekehrten Selektivität von $E = 4.9$ D-selektiv umgesetzt wurde. Phenylhydantoin konnte dagegen nicht umgesetzt werden.

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Strukturelemente des Hydantoinrings auf die Umsetzung mit den Hydantoinasen wurden die NH-Gruppen der 1- und 3-Position im Hydantoinring modifiziert bzw. gegen andere Atome oder Atomgruppen ausgetauscht. Dabei zeigte sich, daß alle Modifikationen im Hydantoinring zu einer deutlichen Abnahme der spezifischen Aktivität führten. 5-Benzylloxazolidindion und Benzylsuccinimid wurden von der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 D-selektiv umgesetzt, wobei die Hydantoinase beide Substrate, wie auch im Fall der Hydantoine, zwischen der 3- und 4-Position spaltete. 5-Benzylthiazolidindion wurde von keiner der

Hydantoinasen umgesetzt. Eine Umsetzung von 1-N-Methylbenzylhydantoin zeigte nur eine sehr geringe Aktivität. Die an der 3-Position modifizierten Substanzen 5-Benzyl-N-3-Methylhydantoin und Benzyltetraamtsäure wurden nicht umgesetzt.

Bei Inhibitionsuntersuchungen bezüglich der Umsetzung von L-5-Benzylhydantoin, die mit den nicht als Substrat akzeptierten Hydantoinen und Derivaten durchgeführt wurden, konnte lediglich mit 5-Benzylthiazolidindion eine schwache Inhibition festgestellt werden. Dafür zeigte sich, daß das bei der enzymatischen Umsetzung von Benzylsuccinimid gebildete Benzylbernsteinsäurehalbamid einen starken Inhibitor mit einer Inhibitionskonstanten von $K_i = 0.35 \text{ mM}$ darstellt.

Umsetzungen mit D-Hydantoinasen aus *Bacillus thermoglucosidasius* (Hydantoinase 1) und *Thermus species* (Hydantoinase 2), beide rekombinant mit *Escherichia coli* hergestellt, sowie einer Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 verliefen alle D-spezifisch oder –selektiv. Alle hydantoinanalogen Verbindungen wurden von den Hydantoinasen an derselben Bindung gespalten, wie das entsprechend unmodifizierte Hydantoin. Abbildung 6-1 zeigt eine Übersicht der untersuchten Substanzen.



Substrat	„L“-Hydantoinase aus <i>Arthrobacter aureescens</i> DSM 3745	D-Hydantoinase 2 aus <i>Thermus species</i> , rekombinant in <i>Escherichia coli</i>	Immobilisierte D-Hydantoinase 1 aus <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> , rekombinant in <i>Escherichia coli</i>	D-Hydantoinase aus <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117
5-Benzylhydantoin	L-selektiv	D-spezifisch	D-selektiv	D-spezifisch
1	D-spezifisch	D-spezifisch	D-spezifisch	D-spezifisch
2	unselektiv	D-spezifisch	D-selektiv	n.b.
3	D-selektiv	D-spezifisch	n.b.	n.b.
4	n. b.	D-spezifisch	D-selektiv	n. b.
5	D-selektiv	D-spezifisch	D-spezifisch	n. b.
6	keine Aktivität	n. b.	n. b.	n. b.
7	geringe Aktivität	geringe Aktivität	geringe Aktivität	keine Aktivität
8	D-selektiv	D-spezifisch	D-spezifisch	keine Aktivität
9	D-selektiv	keine Aktivität	D-spezifisch	unselektiv
10	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
11	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
12	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität	keine Aktivität
13	keine Aktivität	n. b.	n. b.	n. b.

Abbildung 6-1: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Substratspezifität und Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 und einer Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117, sowie einer D-Hydantoinase 1, immobilisiert aus *Bacillus thermoglucosidasius* und einer D-Hydantoinase 2, aus *Thermus species*, beide rekombinant mit *Escherichia coli* hergestellt.

7 Literaturverzeichnis

Abendroth, J. *Dissertation in Vorbereitung*.

Abendschein, M. (1998). "Experimentelle Untersuchungen der chemischen Racemisierung von Hydantoinen", Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Alvarado-Marin, A. (1997). "Isolierung und Charakterisierung einer D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117", Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Anschütz, R., Hahn, C., Walter, P. (1907). "Über die isomeren Phenylbernsteinamid-, -anilid-, -p-toluidid- und -piperididsäuren;", *Annalen der Chemie*, **354**, 133.

Anschütz, R., Walter, P. (1908). "Über die Amidsäuren der Phenylbernsteinsäure", *Annalen der Chemie*, **355**, 117.

Aspelund, H. (1936). "Einwirkung von Natriumhydroxyd auf Benzyl- und Äthyl-dialursäure", *Acta Acad. Abo. Ser. B.*, **10**, 1-20.

Aspelund, H. (1938). "Entstehung von Dioxooxazolidinen aus substituierten Dialursäuren", *Acta Acad. Abo. Ser. B.*, **11**, 1-4.

Aspelund, H. (1939). "Einwirkung von Alkali auf 5-Äthyl-1-phenyl-, 1,5-Diphenyl- und 5-Phenyl-1-methyl-dialursäure", *Acta Acad. Abo. Ser. B.*, **12**, 1-32.

Astleford, B. A., Weigel, L. O. (1997). "Resolution Versus Stereoselective Synthesis in Drug Development: Some Case Histories", In: *Chirality in Industry II* (Collins, A. N., Sheldrake, G. N., Crosby, J., ed.), John Wiley & Sons, Weinheim, New York.

Baerns, M., Hofmann, H. Renken, A. (1987). *Chemische Reaktionstechnik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Barton, M., Hamman, J. P., Fichter, K. C., Calton, G. J. (1990). "Enzymatic Resolution of (R,S)-2-(4-Hydroxy)Propionic-Acid", *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 577-83.

Battistini, C., Scarafile, C., Vioglio, S., Perrone, E., Franceschi, G. (1986). "A new Reduktive Acylation of Azetidione Disulphide in the Route to Penems", *Tetrahedron Lett.*, **27**, 513-16.

Bergstrom, F. W., Fernelius, W. C. (1933). *The Chemistry of the Alkali Amides*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.

Beyer, H., Walter, W. (1988). *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Hirzel Verlag, Stuttgart.

Bisswanger, H. (1994). *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*, VCH, Weinheim.

Blumenstein, J. J. (1997). "Chiral Drugs: Regulatory Aspects", In: *Chirality in Industry II* (Collins, A. N., Sheldrake, G. N., Crosby, J., ed.), John Wiley & Sons, Weinheim, New York.

Bommarius, A. S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K. und Drauz, K. (1995). "Synthesis and use of enantiomerically pure *tert*-leucine", *Tetrahedron: Asymm.*, **6**, 2851-2888.

Boutelje, J., Hjalmarsson, M., Hult, K., Lindbäck, M., 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", *Bioorg. Chem.*, **16**, 364-75.

Breslow, D. S., Baumgarten, E., Hauser, C. R. (1944). "A New Synthesis of β - Keto Ester of the Type $\text{RCOCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ ", *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1286-8.

Broos, J., Viesser, A. J. W. G., Engbersen, J. F. J., Verboom, W., Hoek, A., Reinhoudt, D. N. (1995). "Flexibility of Enzymes Suspended in Organic Solvents Probed by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy. Evidence that Enzyme Activity and Enantioselectivity are Directly Related to Enzyme Flexibility.", *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12657-63.

Cahn, R. S., Ingold, C. K., Prelog, V. (1966). "Spezifikation der Molekularen Chiralität", *Angew. Chem.*, **78**, 413.

- Cecere, F., Galli, G. Della-Penna, G. Rappuoli, B. (1977). "Method for the preparation of D-carbamyl amino acids and the corresponding D-amino acids.", US pat. 4065353, Snamprogetti, S.p.A.
- Chen, C.-S., Yoshinori, F., Shih-Hsiung, W., Girdaukas, G., Sih, C. J. (1982). "Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers", *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-9.
- Chen, C.-S., Shih-Hsiung, W., Girdaukas, G., Sih, C. J. (1987). "Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers 2. Enzyme-Catalyzed Esterifications in Water-Organic Solvent Biphasic Systems", *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2812-17.
- Cohen, S. G., Milovanovic, A. (1968). "Absolute Steric Course of Hydrolysis by α -Chymotrypsin Esters of α -Benzylsuccinic, α -Methyl- β -Phenylpropionic and α -Methylsuccinic Acids", *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3495-502.
- Commission on agrochemicals and the environment. (1997). "Pesticides report 37: Chirality in synthetic agrochemicals: Bioactivity and safety consideration (Technical report)", *Pure Appl. Chem.*, **69**, 2007-2025.
- Cromwell, L.-D., Stark, G. R. (1969). "Determination of the Carboxyl Termini of Proteins with Ammonium Thiocyanate and Acetic Acid, with Direct Identification of the Thiohydantoins", *Biochemistry*, **8**, 4735-40.
- Dakin, H. D., Dudley, H. W. (1914). "The Resolution of Inactive Uramido-Acids and Hydantoins into Active Components and their Conversion to Amino-Acids I. Beta-Phenyl-Alpha-Uramidopropionic Acids, Benzylhydantoin and Phenylalanine", *J. Biol. Chem.*, **17**, 29-36.
- Dinelli, D., Marconi, W., Cecere, F., Galli, G., Morisi, F. (1978). "A new method for the production of optically active amino acids", In: *Enzyme engineering. III.* (Pye, E. K., Weetall, H. H., ed.), Plenum, New York.
- Dombach, G. (1989). "Isolierung und Charakterisierung einer Hydantoinase aus *Arthrobacter Sp.* DSM 3747", Dissertation, Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Dudley, K. H., Butler, T. C., Bius, D. L. (1973). "The role of dihydropyrimidinase in the metabolism of some hydantoin and succinimide drugs", *Drug Metabolism and Disposition*, **2**, 103-12.
- Dunnavant, W. R., Hauser, C. R. (1960). "Synthesis of Beta-Hydroxy-Esters from Ethyl Acetate and Ketones or Aldehydes by Means of Lithium Amide", *J. Org. Chem.*, **25**, 503.
- Edward, J. T., Nielsen, S. (1959). "Thiohydantoins. Part IV. Oxidation in Alkaline Solution by Molecular Oxygen", *J. Chem. Soc.*, 2327-31.
- Faber, K. (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Fieser, L. F., Martin, E. L. (1943). "Succinic Anhydride", In: *Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 560-2.
- Fischer, P. *in prep.*
- Fittig, R. (1890). "Lactonsäuren, Lactone, ungesättigte Säuren", *Annalen der Chemie*, **256**, 88-96.
- Fredga, A. (1948). "Resolution of Benzylsuccinic Acid in the Optica Antipodes", *Arkiv för kemi, mineralogi och geologi*, **26 B**, 1-4.
- Fujiwara, H., Bose, A. K., Manhas, M. S., Veen, J. M. (1980). "¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Conformation of Substituted Hydantoins", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1573-7.
- Gabriel. (1906). "Über die Einwirkung des Broms auf α -Lactylharnstoff und verwandte Verbindungen. II. Versuche mit α -Lactyl-n-methylharnstoff.", *Annalen der Chemie*, **348**, 75-6.
- Ghate, R. V., Bhide, B. V. (1957). "Distributed Succinic Acids and their Derivatives", *Journal of the university of Bombay Section A*, **25/5 A**, 18-24.

- Ghoneim, K. M., El-Telbany, F. A., Badran, M., Ismail, M. (1987). "Hydantoin and Thiohydantoin Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. II", *Egypt. J. Chem.*, **30**, 281-94.
- Goehring, R. R., Greenwood, T. D., Pisipati, J. S., Wolfe, J. F. (1991). "Synthesis and Anticonvulsant Evaluation of some new 2-Benzylsuccinimides", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **80**, 790-92.
- Grandjean, D., Pale, P., Chuche, J. (1991). "Synthesis of Optically Pure cis Epoxyalcohols via an Enzymatic Route; An Alternative to the Sharpless Asymmetric Epoxidation.", *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3043-3.
- Groutas, W. C., Brubaker, M. J., Stang, M. J., Castrisos, J. C., Crowley, J. P., Schatz, E. J. (1989). "Inhibition of human leukocyte elastase by derivatives of N-hydroxysuccinimide. A structure-activity-relationship study", *J. Med. Chem.*, **32**, 1607-11.
- Guanti, G., Narisano, E., Podogorski, T., Thea, S., Williams, A. (1990). "Enzyme Catalyzed Monohydrolysis of 2-Aryl-1,3-Propanediol Diacetates. A Study of Structural Effects of the Aryl Moiety on the Enantioselectivity", *Tetrahedron*, **46**, 7081-92.
- Hoffmann, C. (1950). "Sur quelques 5,5-diphénylhydantoines substituées en position 3", *Bull. Soc. chim. Fr.*, 45-7.
- Hofmann, H., Wagner, R., Uhl, J. (1971). "Synthese und Eigenschaften von δ -3-Oxazolonen", *Chem. Ber.*, **104**, 2134-42.
- Holmberg, E., Hult, K. (1991). "Temperature as an enantioselective parameter in enzymatic resolutions of racemic mixtures", *Biotechn. Lett.*, **13**, 323-6.
- Iding, H., Pohl, M., Kula, M.-R. "Umkehr der Stereoselektivität der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* durch rationales Protein Design", *Dechema Jahrestagung der Biotechnologen*, Wiesbaden.
- Ishikawa, T. (1994). "Microbial conversion of D,L-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *Bacillus stearothermophilus* NS1122A", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 265-70.
- Jones, J. B., 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.
- Jones, R. C. F., Sumaria, S. (1978). "A Synthesis of 3-Acyl-5-Alkyl Tetramic Acids", *Tetrahedron Lett.*, **34**, 3173-6.
- Jones, R. C. F., Begley, M. J., Peterson, G. E., Sumaria, S. (1990). "Acylation of Pyrrolidine-2,4-diones: A Synthesis of 3-Acyltetramic Acids. X-Ray Molecular Structure of 3-[1-(Difluoroboryloxy)ethylidene]-5-isopropyl-1-methyl-pyrrolidine-2,4-dione", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1959-68.
- Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T. und Cuccia, L. A. (1991). "A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*", *J. Org. Chem.*, **56**, 2656-2665.
- Ke, T., Klibanov, A. M. (1997). "On Enzymatic Activity in Organic Solvents as a Function of Enzyme History", *Biotechn. Bioeng.*, **57**, 746-50.
- Ke, T., Tidor, B., Klibanov, A. M. (1998). "Molecular-Modelling Calculations of Enzymatic Enantioselectivity taking Hydratation into Account", *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 741-5.
- Keil, O., Schneider, P., Rasor, J. P. (1995). "New Hydantoinases from Thermophilic Microorganisms - Synthesis of Enantiomerically Pure D-Amino acids", *Tetrahedron: Asymm.*, **6**, 1257-60.
- Kerridge, A. W., A. Holland, H. (1999). "Stereoselective oxidation of sulfides by cloned naphthalene dioxygenase", *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **6**, 59-65.

- Kikugawa, M., Kaneko, M., Fujimoto-Sakata, S., Maeda, M., Kawasaki, K., Takagi, T., Tamaki, N. (1994). "Purification, characterization and inhibition of dihydropyrimidinase from rat liver", *Eur. J. Biochem.*, **219**, 393-9.
- Kleinpeter, E. (1997). "The Structure of Hydantoins in Solution and in the Solid State", *Structural Chemistry*, **8**, 161-73.
- Kölle, R. (1991). "Aufreinigung und vergleichende Charakterisierung zweier L-Hydantoinasen aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 und DSM 3747", Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Koshland, D. E. (1973). "Protein Shape: an Biological Control", *Sci. Amer.*, **299**, 52-64.
- Koshland, D. E., Jr. (1994). "Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2375-8.
- Kwong, S. F., Fisher, M. H., Nickolson, W. H. (1965). "Behavioral Stimulants 4-Oxazolidinones", *J. Med. Chem.*, **8**, 95-100.
- Lam, L. K. P., Hui, R. A. H. F., 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**, 2047-50.
- Lazarus, R. A. (1990). "Chemical Racemization of 5-Benzylhydantoin", *J. Org. Chem.*, **55**, 4755-7.
- Lee, S. B. (1995). "Linear Free Energy Relationship of Nonaqueous Bicatalsis: Analysis of Solvent Effects on Enzyme Enantioselectivity", *J. Ferm. Bioeng.*, **80**, 141-7.
- Lowe, G., Yeung, H. W. (1973). "Synthesis of a β -Lactam Related to the Cephalosporins", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2907-10.
- Matsuda, M. (1960). "Studies on benzylsuccinic anhydride derivatives and their utilizations. VI. Synthesis of benzylsuccinimide and benzylsuccinimide derivatives and their anticonvulsant activities", *Chem. Abstr.*, 4379.
- May, O., Siemann, M., Sylatk, C., Niefind, K., Schomburg, D. (1996). "Crystallisation and Preliminary X-ray analysis of a hydantoinase from *Arthrobacter aureescens* DSM 3745", *Acta Cryst.*, **D52**, 1209-10.
- May, O., Siemann, M., Pietzsch, M., Kiess, M., Mattes, R., Sylatk, C. (1998a). "Substrate dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aureescens* DSM 3745: Purification and characterisation as new member of cyclic amidases", *J. Biotechnol.*, **61**, 1-13
- May, O. (1998b). "The Hydantoinase from *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 and its Relation to other Hydantoinases", Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Menschutkin, N. (1872). "Amide und Anilide der Bernsteinsäure, deren Eigenschaften und gegenseitige Beziehungen", *Annalen der Chemie*, 165-87.
- Meyers, A., Slade, J. (1980). "Asymmetric Addition of Organometallics to Chiral Ketooxazolines. Preparation of Enantiomerically Enriched α -Hydroxy Acids", *J. Org. Chem.*, **45**, 2785-91.
- Möller, A., Sylatk, C., Schulze, M. und Wagner, F. (1988). "Stereo- and substrate specificity of a D-hydantoinase and a D-N-carbamoylamino acid amidohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM 2", *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 618-625.
- Moreno-Manas, M., Pleixats, R., Roglans, A. (1993). "Diels-Alder Reactions of 1,1-Disubstituted 3,4-Dimethylene-Cyclopentanes. Preparation of Indanes and Diazaindanes", *Synth. Comm.*, **23**, 601-12.
- Mulholland, T. P. C., Foster, R., Haydock, D. B. (1972). "Synthesis of Pyrrolidine-2,4-diones (Tetramic acids) and Some Derivatives", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2121-8.
- Naps, M., Johns, I. B. (1940). "Optically Active Mono-substituted Succinic Acids and Derivatives", *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2450-7.

- Nicolet, B. H., Campbell, E. D. (1928). "Benzalcreatinine and Related Compounds", *J. Am. Chem. Soc.*, **50**, 1155-60.
- Noritomi, H., Almarsson, Ö., Gabriel, L. B., Klivanov, A. M. (1996). "The Influence of the Mode of Enzyme Preparation on Enzymatic Enantioselectivity in Organic Solvents and Its Temperature Dependence", *Biotechn. Bioeng.*, **51**, 95-9.
- Nöthe, C. (1993). "Entwicklung eines kontinuierlichen Prozesses zur Synthese von aromatischen L- α -Aminosäuren aus 5-monosubstituierten Arylmethylhydantoinen mit *Arthrobacter aurescens* DSM 3747", Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Ogawa, J., Min Kim, J., Nirdnoy, W., Amano, Y., Yamada, H., Shimizu, S. (1995a). "Purification and characterization of an ATP-dependent amidohydrolase, N-methylhydantoin amidohydrolase, from *Pseudomonas putida* 77", *Eur. J. Biochem.*, **229**, 284-90.
- Ogawa, J., Soong, C. L., Honda, M., Shimizu, S. (1995b). "Diversity of Cyclic Ureide Compound-, Dihydropyrimidine-, and Hydantoin-hydrolyzing Enzymes in *Blastobacter* sp. A17p-4", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1936-5.
- Ogawa, J., Soong, C. L., Honda, M., Shimizu, S. (1996). "Novel Metabolic Transformation Pathway for Cyclic Imides in *Blastobacter* sp. Strain A17p-4", *Appl. Env. Microb.*, **62**, 3814-7.
- Ogawa, J., Shimizu, S. (1997). "Diversity and versatility of microbial hydantoin-transforming enzymes", *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2**, 163-76.
- Orsat, B., Drtina, G. J., Williams, M. G., Klivanov, A. M. (1994). "Effect of Support Material and Enzyme Pretreatment on Enantioselectivity of Immobilized Subtilisin in Organic Solvents", *Biotechn. Bioeng.*, **44**, 1265-9.
- Owen, S. M., Brooker, A. T. (1994). *Konzepte der Anorganischen Chemie*, Vieweg & Sohn, Braunschweig, Wiesbaden.
- Pamperin, D., Schulz, C., Hopf, H., Syltsch, C., Pietzsch, M. (1998). "Chemoenzymatic Synthesis of Optically Pure Planar Chiral (S)-(-)-5-Formyl-4-hydroxy[2.2]paracyclophane", *Eur. J. Org. Chem.*, 1441-5.
- Philips, R. S. (1996). "Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation", *TIBTECH*, **14**, 13-16.
- Picket, L. W., McLean, M. (1939). "The Dissociation of Hydantoin", *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 423-5.
- Prelog, V., Helmchen, G. (1982). "Grundlagen des CIP-Systems und Vorschläge für eine Revision", *Angew. Chem.*, **94**, 614.
- Ragnitz, K., Syltsch, M., Pietzsch, M. "Immobilization of a recombinant L-N-carbamoylase using water soluble carbodiimide results in a high stability of the immobilized catalysts", *in prep.*
- Rakels, J. L. L., Caillat, P., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. (1994). "Modification of the Enzyme Enantioselectivity by Product Inhibition", *Biotechnol. Prog.*, **10**, 403-9.
- Rakels, J. L. L., Schneiders, A. G. M., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. (1996). "Improved Kinetic Resolution by Enzym-Catalyzed Parallel Reactions", *Biocat. Biotrans.*, **13**, 179-88.
- Ramart-Lucas, P., Z. (1962). "Structure Reactivite chimique et absorption dans l'ultraviolet", *Ann. chim. (Paris)*, **18**, 52-5.
- Reist, M., Carrupt, P.-A., Testa, B. (1996). "Kinetics and Mechanisms of Racemizations: 5-Substituted Hydantoins (=Imidazolidine-2,4-diones) as Models of Chiral Drugs", *Helv. Chim. Acta*, **79**, 767-78.
- Römpf. (1995). *Römpf Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- Rousset, A., Lasperas, M., Taillades, J., Commeyras, A. (1980). "Systemes de Strecker et Apparentes - XI", *Tetrahedron*, **36**, 2649-61.
- Ruggli, P., Hegedüs, B. (1942). "Synthesen in der 1,4-Diphenyl-butan-Reihe I", *Helv. Chim. Acta*, **25**, 1285-96.

- Runser, S. M., Meyer, P. C. (1993). "Purification and biochemical characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium species* - A hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity", *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1315-1324.
- Sarfert, F. *Dissertation in Vorbereitung*.
- Schwämmle, A., Sylatk, C., Pietzsch, M. "Immobilisierung einer D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117", *in prep.*
- Schwickart, M. (1999). "Bestimmung der Enantioselektivität der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 in Abhängigkeit von der Temperatur, dem pH-Wert, der Natriumchloridkonzentration und dem Substrat", Studienarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, New York London.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- Siemann, M., Alvarado-Marin, A., Pietzsch, M., Sylatk, C. (1998). "A D-specific hydantoin amidohydrolase: Properties of the metalloenzyme purified from *Arthrobacter crystallopoietes*", *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **6**, 387-397.
- Sih, C. J. (1990). "Improving the enantioselectivity of biocatalytic resolution of racemic compounds", , Eur. Pat. Appl. EP 387,068 CA 114:245954q.
- Sondheimer, E., Holley, R. W. (1954). "Imides from Asparagine and Glutamine", *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2467-70.
- Soong, C.-L., Ogawa, J., Shimizu, S. "Cyclic ureide and imide metabolism in microorganisms producing a D-hydantoinase useful for D-amino acid production", *in press*.
- Soong, C.-L., Ogawa, J., Honda, M., Shimizu, S. (1999). "Cyclic-Imide-Hydrolyzing Activity of D-Hydantoinase from *Blastobacter sp.* Strain A17p-4", *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1459-62.
- Stadlbauer, W., Kappe, T. (1985). "Oxidative Hydroxylierung von heterocyclischen β -Dicarbonylverbindungen", *Monatshefte für Chemie*, **116**, 1005-15.
- Sylatk, C., Mackowiak, V., Höke, H., Groß, C., Dombach, G., Wagner, F. (1990). "Cell growth and enzyme synthesis of a mutant of *Arthrobacter sp.* DSM 3747 used for the production of L-amino acids from D,L-5-monosubstituted hydantoins", *J. Biotechnol.*, **14**, 345-62.
- Sylatk, C., Müller, R., Pietzsch, M., Wagner, F. (1992). "Microbial and Enzymatic Production of L-Amino Acids from D,L-5-Monosubstituted Hydantoins", In: *Biocatalytic Production of Amino Acids & Derivatives* (Rozzell, D., Wagner, F., ed.), Hanser-Verlag, München.
- Sylatk, C., Pietzsch, M. (1995). "Hydrolysis and formation of hydantoins", In: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Drauz, K., Waldmann, H., ed.), VCH-Verlag, Weinheim.
- Sylatk, C., May, O., Altenbucher, J., Mattes, R., Siemann, M. (1999). "Microbial hydantoinases - industrial enzymes from the origin of life?", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 293-309.
- Tacke, R. (1985). *Structure, Bonding, Reactivity and Synthetic Application*, John Wiley & Sons, New York.
- Tacke, R. L., H. (1989). *The Chemistry of Organosilicon Compounds*, John Wiley & Sons, New York.
- Tawaki, S., Klibanov, A. M. (1992). "Inversion of Enzyme Enantioselectivity Mediated by the Solvent", *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1882-4.
- Taylor, J. D., Wolfe, J. F. (1971). "A New Method for the Preparation of 5-Alkyl- and 5,5-Dialkyl-1,3-thiazolidien-2,4-diones through Dianion Intermediates", *Synthesis*, 310-11.
- Teves, H., Waniek, T., Pietzsch, M., Sylatk, C., Reuss, M. (1999). "Application of different polarimetric methods for the analysis of enzyme-catalyzed enantioselective reactions", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 738-43.
- Theil, F. (1997). *Enzyme in der organischen Synthese*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.

- Tuomi, W. V., Kazlauskas, R. J. (1999). "Molecular Basis for Enantioselectivity of Lipase from *Pseudomonas cepacia* toward Primary Alcohols. Modelling, Kinetics, and Chemical Modification of Tyr29 to Increase or Decrease Enantioselectivity", *J. Org. Chem.*, **64**, 2638-47.
- Völkel, D. (1993). "Produktion von L-Methionin mit neuen Mikroorganismen nach dem Hydantoinase-Verfahren und Aufklärung des enzymatischen Mechanismus", Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Walkup, R. D., Cole, D. C., Whittlesey, B. R. (1995). "Silicon-containing Amino Acids and Peptides. Asymmetric Synthesis of (Trialkylsilyl)alanines", *J. Org. Chem.*, **60**, 2630-34.
- Wallingford, H. V., Melvin, A., Stoughton, T., Stoughton, R. W. (1945). "Alkyl Carbonates in Synthetic Chemistry. IV. Condensation with Alpha-Hydroxy Amides. A New Method for Preparing 2,4-Oxazolidinediones", *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 522-23.
- Waniek, T., Vielhauer, O., Pietzsch, M., Sylatk, C. "Influences of substitutions in the ring and the 5-positions of hydantoins on the specificity and enantioselectivity of hydantoinases of different microorganisms", *in prep.*
- Waniek, T. (1996). "Gewinnung von Trimethylsilyl-Alanin durch Biotransformationen", Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Ware, E. (1950). "The Chemistry of the Hydantoins", *Chem. Rev.*, **46**, 403-70.
- Weidmann, B. (1992). "(Trimethylsilyl)alanine: a Metabolically Stable 'Bio-Isostere' for Phenylalanine", *Chimia*, **46**, 312.
- Wescott, C. R., Noritomi, H., Klibanov, A. M. (1996). "Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics", *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10365-10370.
- Witiak, D. T., Hopper, A. T. (1991). "Chiral Pharmaceuticals", In: *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4. Auflage (Kirk, R. E., Othmer, D. F., Grayson, M., ed.), Wiley & Sons, New York, 511-51.
- Yang, Y.-S., Ramaswamy, S., Jakoby, W. B. (1993). "Rat Liver Imidase", *J. Biol. Chem.*, **268**, 10870-5.
- Yokozeki, K., Kubota, K. (1987a). "Mechanism of Asymmetric Production of D-Aromatic Amino Acids from the Corresponding Hydantoins by *Pseudomonas sp.*", *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 721-8.
- Yokozeki, K., Yoshiteru, H., Kubota, K. (1987b). "Mechanism of Asymmetric Production of L-Aromatic Amino Acids from the Corresponding Hydantoins by *Flavobacterium sp.*", *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 737-46.

8 Anhang

8.1 Abhängigkeit des spezifischen molaren Drehwerts von der Wellenlänge

Die spezifischen molaren Drehwerte von **BnH** und **CPhe** zeigen eine starke Abhängigkeit von der Wellenlänge. In den ORD-Spektren der Substanzen erkennt man den dramatischen Anstieg bei kleineren Wellenlängen.

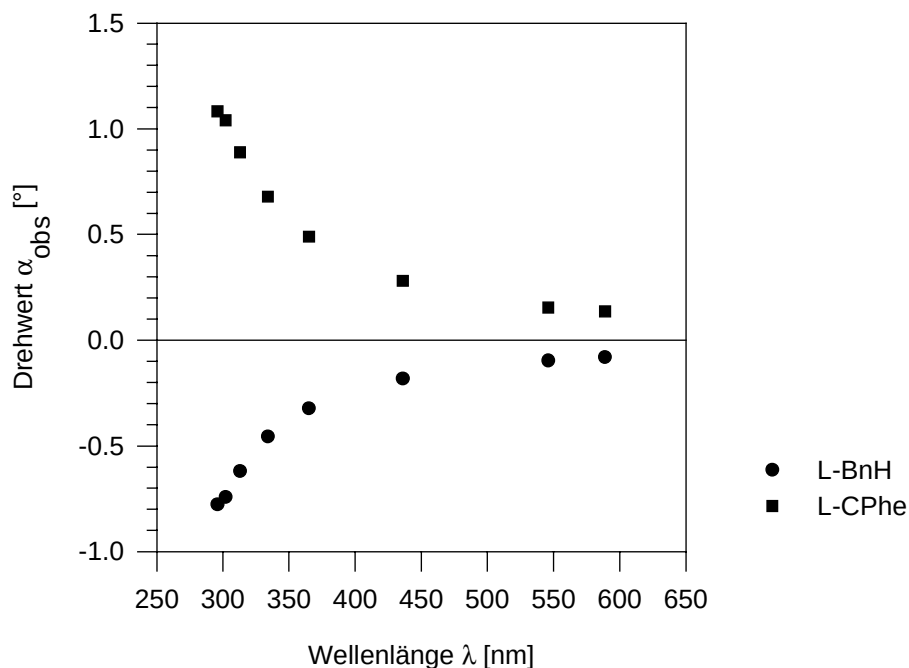


Abbildung 8.1-1: ORD-Spektren von 4 mM **L-BnH** und 16 mM **L-CPhe**

8.2 Zusammenfassung von spezifischen molaren Drehwerten

Tabelle 8.2-1: Zusammenfassung der spezifischen molaren Drehwerte [$^{\circ}$ /mM] (Bestimmungsmethode: 3.6.5.1, S. 31)

Substanz	T [$^{\circ}$ C]	pH	Wellenlänge λ [nm]							
			253	280	296	302	313	334	365	546
L-BnH	25	8.5	-	-0.285	-0.197	-0.197	-0.165	-0.124	-0.088	-0.027
	37	8.5	-	-0.262	-0.184	-0.185	-0.155	-0.177	-0.084	-0.027
	45	8.5	-	-0.262	-0.183	-0.184	-0.156	-0.177	-0.084	-0.026
	37	7.5	-	-0.256	-0.183	-0.183	-0.156	-0.118	-0.086	-0.026
	37	9.5	-	-0.330	-0.221	-0.221	-0.183	-0.134	-0.095	-0.028
L-CPhe	25	8.5	-	0.089	0.066	0.065	0.056	0.042	0.030	0.008
	37	8.5	-	0.087	0.061	0.062	0.052	0.039	0.028	0.009
	45	8.5	-	0.081	0.060	0.060	0.051	0.039	0.028	0.008
	37	7.5	-	0.085	0.061	0.061	0.052	0.039	0.029	0.009
	37	9.5	-	0.110	0.074	0.074	0.061	0.045	0.032	0.009
L-PhEH	37	8.5	-	-0.124	-	-0.082	-0.069	-	-0.036	-0.012
L-CHPhe	37	8.5	-	0.054	0.040	0.042	0.036	0.027	0.021	0.009
L-NPH	37	8.5	-0.334	-0.130	-0.092	-0.090	-0.080	-0.058	-0.042	-
L-CNPG	37	8.5	-0.196	-0.116	-	-0.092	-0.084	-0.070	-0.030	-

8.3 Zusammenfassung von spezifischen molaren Extinktionen

Tabelle 8.3-1: Zusammenfassung der spezifischen molaren Extinktionen [1/mM] (Bestimmungsmethode: 3.10.2.2, S. 63)

			spezifische, molare Extinktion [1/mM]			
T [$^{\circ}$ C]	pH	λ [nm]	BnH	CPhe	PhEH	CHPhe
37	7.5	240	0.528	0.063	-	-
37	8.5	240	0.788	0.075	0.547	0.071
37	9.5	245	0.870	0.099	-	-
25	8.5	240	0.823	0.099	-	-
45	8.5	238	0.811	0.075	-	-

8.4 Herleitungen

8.4.1 Ermittlung der Halbwertszeit der chemischen Racemisierung

Die Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit nach der unter 3.6.5.2 (S. 32) beschriebenen Methode soll am Beispiel der Racemisierung von **L-BnH** gezeigt werden. Dazu wurde während der Racemisierung kontinuierlich der Drehwert der racemisierenden Lösung gemessen. Dieser setzt sich zusammen aus den Drehwertanteilen der beiden Enantiomere:

$$\alpha_{obs} = \alpha_{L-BnH} + \alpha_{D-BnH} \quad \text{Gleichung 8-1}$$

α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
α_{L-BnH}	Drehwertanteil des L-BnH [°]
α_{D-BnH}	Drehwertanteil des D-BnH [°]

Die Drehwertanteile berechnen sich nach:

$$\alpha_i = c_i \cdot [\alpha]_i \quad \text{Gleichung 8-2}$$

$[\alpha]_i$	spezifischer, molarer Drehwert der Substanz i in einer 100 mm langen Küvette [°/mM]
c_i	Konzentration der Substanz i [mM]

Außerdem ist zu jeder Zeit die Summe der Enantiomerenkonzentrationen gleich der Anfangskonzentration von **L-BnH**:

$$c_{L-BnH}^0 = c_{L-BnH} + c_{D-BnH} \quad \text{Gleichung 8-3}$$

c_{L-BnH}^0	Anfangskonzentration von L-BnH [mM]
c_{D-BnH}, c_{L-BnH}	Konzentration von D-BnH bzw. L-BnH [mM]

außerdem gilt:

$$[\alpha]_{D-BnH} = -[\alpha]_{L-BnH} \quad \text{Gleichung 8-4}$$

Aus den Gleichungen wird folgende Beziehung erhalten:

$$c_{L-BnH} = \frac{\alpha_{obs} + c_{L-BnH}^0 <\alpha>_{L-BnH}}{2 <\alpha>_{L-BnH}} \quad \text{Gleichung 8-5}$$

Unter der Annahme, daß die Racemisierung reversibel ist, wobei Hin- und Rückreaktion erster Ordnung sind, gilt (Baerns et al., 1987):

$$v = -k (c_{L-BnH} - c_{L-BnH}^{eq}) \quad \text{Gleichung 8-6}$$

v Racemisierungsgeschwindigkeit von **L-BnH** [mM/s]
 k Geschwindigkeitskonstante der Racemisierung [s^{-1}]
 c_{L-BnH}^{eq} Gleichgewichtskonzentration von **L-BnH**

In integrierter Form:

$$\ln \left(\frac{c_{L-BnH} - c_{L-BnH}^{eq}}{c_{L-BnH}^0 - c_{L-BnH}^{eq}} \right) = -k t \quad \text{Gleichung 8-7}$$

Bei vollständiger Racemisierung ist aus der Hälfte des ursprünglich vorhandenen **L-BnH** **D-BnH** entstanden, damit ist $c_{L-BnH}^{eq} = 0.5 c_{L-BnH}^0$. Nach Verstreichen der Halbwertszeit ist aus der Hälfte der Differenz zwischen Anfangskonzentration c_{L-BnH}^0 und der Gleichgewichtskonzentration c_{L-BnH}^{eq} **D-BnH** entstanden. Damit gilt: $c_{L-BnH}(T_{1/2}) = 0.75 c_{L-BnH}^0$. In Gleichung 8-7 eingesetzt ergibt sich:

$$\ln 2 = -k T_{1/2} \quad \text{Gleichung 8-8}$$

Durch die Auftragung von $\ln \left(\frac{c_{L-BnH} - c_{L-BnH}^{eq}}{c_{L-BnH}^0 - c_{L-BnH}^{eq}} \right)$ über der Racemisierungszeit t läßt sich aus der Steigung k einer Regressionsgeraden mit Gleichung 8-8 die Halbwertszeit berechnen.

8.4.2 Berechnung der Produktkonzentrationen mittels Polarimetrie gemessener Umsetzungen enantiomerenreiner Substrate

Die Bestimmung der Produktkonzentration nach der unter 3.10.1.2 (S. 61) beschriebenen Methode soll am Beispiel der Umsetzung von **L-BnH** gezeigt werden. Dazu wurde während der Umsetzung kontinuierlich der Drehwert der Reaktionslösung gemessen. Dieser setzt sich zusammen aus den Drehwertanteilen von Substrat und Produkt. Als Beispiel sei hier die Umsetzung von **L-BnH** zu **L-CPhe** gezeigt.

$$\alpha_{obs} = \alpha_{L-BnH} + \alpha_{L-CPhe} \quad \text{Gleichung 8-9}$$

α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
α_{L-BnH}	Drehwertanteil des L-BnH [°]
α_{L-CPhe}	Drehwertanteil des L-CPhe [°]

Die Drehwertanteile berechnen sich nach Gleichung 8-2 (S. 163). Außerdem ist die Summe der Konzentrationen von **L-BnH** und **L-CPhe** gleich der Anfangskonzentration von **L-BnH**:

$$c_{L-BnH}^0 = c_{L-BnH} + c_{L-CPhe} \quad \text{Gleichung 8-10}$$

c_{L-BnH}^0	Anfangskonzentration von L-BnH [mM]
c_{L-CPhe}	Konzentration von D-BnH [mM]

Aus den Gleichungen folgt:

$$c_{L-CPhe} = \frac{\alpha_{obs} - \langle \alpha_{L-BnH} \rangle c_{ges}^0}{\langle \alpha_{L-CPhe} \rangle - \langle \alpha_{L-BnH} \rangle} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

8.4.3 Berechnung der Produktkonzentrationen mittels Polarimetrie und Photometrie gemessener Umsetzungen racemischer Substrate

Zur Bestimmung der Produktkonzentration aller vier Enantiomere nach der unter 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Methode wurden kontinuierlich die Extinktion und der Drehwert der Reaktionslösung gemessen. Als Beispiel sei hier eine enantioselektive Umsetzung von **D,L-BnH** zu **D-LCPhe** und **L-CPhe** gezeigt. Die Extinktion setzte sich zusammen aus den Extinktionsanteilen von Substrat und Produkt.

$$\epsilon_{obs} = \epsilon_{BnH} + \epsilon_{CPhe} \quad \text{Gleichung 8-11}$$

ϵ_{obs}	gemessene Extinktion [1]
ϵ_{BnH}	Extinktionsanteil des BnH [1]
ϵ_{CPhe}	Extinktionsanteil des CPhe [1]

Die Extinktionsanteile berechnen sich nach:

$$\epsilon_i = c_i \cdot \langle \epsilon \rangle_i \quad \text{Gleichung 8-12}$$

$\langle \epsilon \rangle_i$	spezifischer, molarer Extinktionskoeffizient der Substanz i in einer 10 mm langen Küvette [1/mM]
c_i	Konzentration der Substanz i [mM]

Außerdem ist zu jeder Zeit die Summe der Enantiomerenkonzentrationen gleich der Anfangskonzentration von **BnH**:

$$c_{BnH}^0 = c_{L-BnH} + c_{D-BnH} + c_{L-CPhe} + c_{D-CPhe} \quad \text{Gleichung 8-13}$$

Aus den Gleichungen wird folgende Beziehung erhalten:

$$c_{BnH} = \frac{\epsilon_{obs} - c_{BnH}^0 \cdot \langle \epsilon \rangle_{CPhe}}{\langle \epsilon \rangle_{BnH} - \langle \epsilon \rangle_{CPhe}} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Für den Drehwert gilt:

$$\alpha_{obs} = \alpha_{L-BnH} + \alpha_{D-BnH} + \alpha_{L-CPhE} + \alpha_{D-CPhE} \quad \text{Gleichung 8-14}$$

α_{obs}	gemessener Drehwert [°]
$\alpha_{L-BnH}, \alpha_{D-BnH}$	Drehwertanteil des L-BnH bzw. D-BnH [°]
$\alpha_{L-CPhE}, \alpha_{D-CPhE}$	Drehwertanteil des L-CPhE bzw. D-CPhE [°]

Wenn die Racemisierung von **BnH** während der Reaktion vernachlässigt werden kann, gilt:

$$\frac{c_{BnH}^0}{2} = c_{L-BnH} + c_{L-CPhE} = c_{D-BnH} + c_{D-CPhE} \quad \text{Gleichung 8-15}$$

mit Gleichung 8-2 und Gleichung 8-4 (S. 163) folgt:

$$c_{L-BnH} = \frac{\alpha_{obs} + c_{BnH}^0 (<\alpha>_{L-BnH} - <\alpha>_{L-CPhE})}{2 (<\alpha>_{L-BnH} - <\alpha>_{L-CPhE})} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

$<\alpha>_{L-BnH}, <\alpha>_{D-BnH}$	spezifische, molare Drehwerte von L-BnH , D-BnH , L-CPhE
$<\alpha>_{L-CPhE}, <\alpha>_{D-CPhE}$	und D-CPhE in einer 100 mm langen Küvette [°/mM]

8.4.4 Berechnung der maximalen Reaktionszeit bei einer Racemisierung enantiomerenreiner Hydantoine unter 5 %.

Neben der in Abbildung 4.1-2, (S. 73) gezeigten enantioselektiven Umsetzung eines Hydantoin gibt es noch die Racemisierung des Hydantoin als störende Nebenreaktion (Abbildung 4.1-1, S. 73). Da diese Racemisierung in den Herleitungen der unter 3.10.1.2 (S.61) und 3.10.2.2 (S. 63) beschriebenen Methoden nicht berücksichtigt wurde, mußte dieser Einfluß möglichst klein sein. Deshalb wurde für die Untersuchungen als maximale Reaktionszeit die Zeit ermittelt, in der unter Reaktionsbedingungen weniger als 5 % enantiomerenreines Hydantoin, also 2.5 % der Ausgangskonzentration von **D,L-BnH**, racemisieren kann. Dazu wurde in Gleichung 8-7 (S. 164) für $c_{L-BnH} = 0.975 c_{L-BnH}^0$ eingesetzt. Zusammen mit $c_{L-BnH}^{eq} = 0.5 c_{L-BnH}^0$ ergibt sich:

$$T_{5\%} = \frac{0.051}{k} \quad \text{Gleichung 8-16}$$

k Racemisierungskonstante (siehe Tabelle 4.3-1, S. 79)

8.5 Inhibitionsuntersuchungen

Die meisten der untersuchten Substanzen zeigten einen geringen inhibitorischen Einfluß auf die Umsetzung von **L-BnH** mit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 (3.10.3, S. 69). Da die Bestimmung der Inhibitionskonstanten in diesen Fällen mit einem großen Fehler behaftet ist, werden lediglich die Konzentrations-Zeit-Verläufe dieser Inhibitionsuntersuchungen zum qualitativen Vergleich dargestellt (Abbildung 8.5-1). Die dargestellten Zeit-Umsatz-Kurven der Inhibitionsuntersuchungen wurden wie unter 3.10.1.2 (S. 61) beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß in der oben dargestellten Untersuchung jeweils 100 µl 1/20 verdünnte Enzymlösung (0.16 U) zugegeben wurde, für die im unteren Diagramm dargestellten Umsetzung waren es 100 µl 1/30 verdünnte Enzymlösung (0.10 U) Hydantoinase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745. Sehr gut kann die starke Inhibition durch **BnBHA** gesehen werden, auch die mit **BnTD** nahezu gesättigte Lösung zeigte einen inhibitorischen Einfluß. Dagegen inhibierte **CPhe** nur sehr schwach. Innerhalb der Meßgenauigkeit zeigten **BnBDA**, **1MeBnH**, **3MeBnH** und **POD** in den eingesetzten Konzentrationen keine Inhibition der Umsetzung von **L-BnH**.

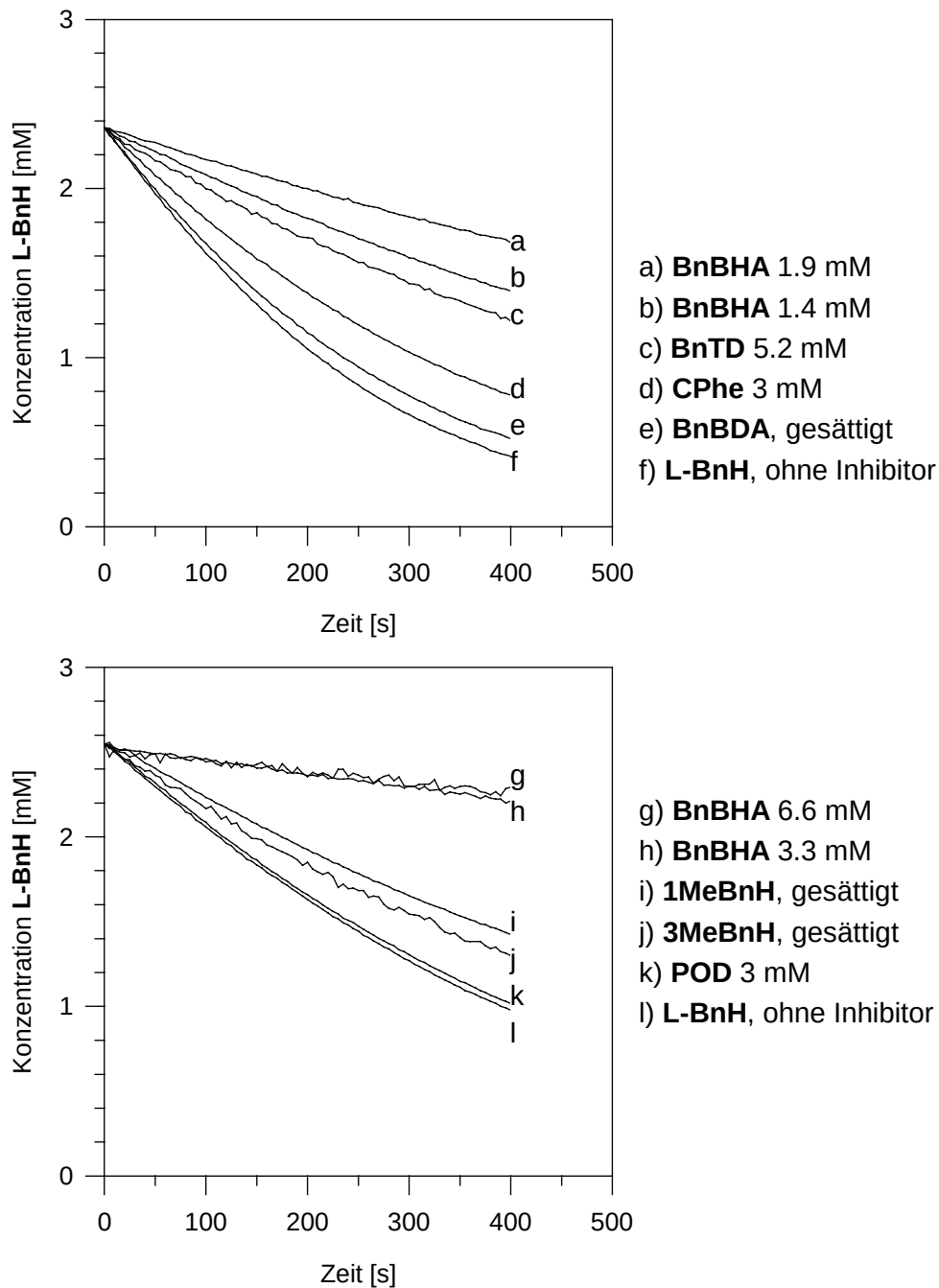


Abbildung 8.5-1: Inhibitionsuntersuchungen nach der unter 3.10.1.2 (S. 61) beschriebenen Methode mit 3 mM L-BnH-Lösungen mit Inhibitor (3.4.3, S. 24) und 0.16 U (oben) bzw. 0.10 U (unten) Hydantoinase aus *Arthrobacter aureus* DSM 3745.