



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Isolierung und Charakterisierung einer PQQ-abhängigen  
Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp.  
zur enantioselektiven Oxidation von racemischen Diolen**

**Pedram Dehdari**





Isolierung und Charakterisierung einer PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase  
aus *Pseudomonas* sp. zur enantioselektiven Oxidation von racemischen Diolen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Pedram Dehdari  
aus Düsseldorf

Jülich 2013

*„Nie entmutigt sein. Geheimnis meines Erfolges.“*

(von Ernest Hemingway 1899-1961)

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel

Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 8.4.2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Hummel angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des SFB 380 (Asymmetrische Katalyse) von der DFG gefördert.

Der Forschungsaufenthalt bei Prof. J. E. Bäckvall im Arrhenius Laboratory wurde von dem Institut für Organische Chemie der Universität Stockholm finanziert.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit wurde bereits teilweise in Form eines Patents zusammengefasst:

**Hummel, W., Dehdari, P., Gröger, H.: Enzymatisches Reaktionssystem, DE 10353548, 2004; WO 2004048561, 2004; AU 2003279389, 2004.**

Meiner Familie und meinen Eltern gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	xii
Tabellenverzeichnis .....	xiv
Abkürzungsverzeichnis.....	xv
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Rolle der Enzyme in der Biotechnologie .....	1
1.2 Bedeutung der Enantiomerenreinheit in der Pharmaindustrie .....	2
1.3 Methoden der Racematspaltung .....	5
1.3.1 Enzymatische Racematspaltung.....	7
1.4 Redoxenzyme .....	9
1.4.1 Biochemische Unterteilung der Oxidoreduktasen .....	10
1.4.2 NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen .....	11
1.4.3 Biochemische Unterteilung und Vorkommen von Alkoholdehydrogenasen.....	12
1.4.4 Oxidasen .....	12
1.4.5 Chinoproteindehydrogenasen .....	13
1.5 Cofaktoren der Chinoproteine.....	14
1.6 Wirtschaftliche Bedeutung von enantiomerenreinen Hydroxysäuren und Alkoholen.....	15
1.7 Enzymatische Wege zur Darstellung von aromatischen $\alpha$ -Hydroxysäuren.....	17
1.8 Aufgabenstellung .....	19
<b>2 Material, Geräte und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Material und Geräte .....	22
2.2 Mikrobiologische Methoden .....	24
2.2.1 Verwendete Organismen.....	24
2.2.2 Anzucht von Mikroorganismen und Medien .....	25
2.3 Biochemische Methoden.....	26
2.3.1 Reinigung und Charakterisierung von Q-ADH aus <i>Pseudomonas</i> sp. ....	26
2.3.1.1 Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung von <i>Pseudomonas</i> sp.....	26
2.3.1.1.1 Aufschluss mit der Retsch-Schwingmühle.....	26
2.3.1.1.2 Chromatographische Methoden.....	27
2.3.1.2.1 Säulenchromatographie.....	27
2.3.1.2.2 Ultrafiltration .....	36
2.3.1.2.3 Ultrazentrifugation .....	36
2.3.1.2.4 Präparative Gelelektrophorese .....	38
2.3.1.3 Kombination mehrerer Reinigungsmethoden.....	38
2.3.1.3.1 Temperaturfällungen .....	38
2.3.1.3.2 pH-Fällung .....	38
2.3.1.3.3 Ultrafiltration mit 10-kDa- und 5-kDa-Filter .....	39
2.3.1.4 Ermittlung der Bezugsgrößen.....	39
2.3.1.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
2.3.1.4.2 Aktivitätstest für die PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase (Q-ADH).....	39
2.3.1.5 Reinigung mittels HPLC .....	41
2.4 Analytische Methoden .....	42
2.4.1 Aktivitäts- und Substanznachweis mittels Gaschromatographie .....	42
2.4.2 Sequenzierung.....	44
2.4.3 ATR-FTIR-Technologie .....	44
2.4.4 Aminosäureanalysator .....	45
2.5 Chemoenzymatische Methoden .....	45
2.5.1 Methode zum Nachweis des Aldehyds als Intermediat der Oxidation .....	45
2.5.2 Blasenfreie Begasung der oxidativen Reaktion .....	45
2.5.3 Vergleichende Verwendung von PQQ und anderen chinoiden Cofaktoren .....	46
2.5.4 Synthese von ( <i>R</i> )-Hydroxyphenylethylaldehyd über Oxidation mit TEMPO-Katalysator.....	47

2.5.5	Synthese von racemischem Hydroxyphenylethylaldehyd .....	47
2.5.6	Methode zur Synthese von chiralen Hydroxyketonen .....	48
2.5.7	Racemisierung des ( <i>S</i> )-Diols in einem Zweiphasensystem mit der Q-ADH .....	49
2.5.7.1	Racemisierung von ( <i>S</i> )-Phenylethandiol .....	49
2.5.7.2	Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1	Biochemische Charakterisierung einer Chinoproteinalkoholdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp.....	52
3.1.1	Reinigung.....	53
3.1.1.1	Chromatographische Reinigung .....	53
3.1.1.1.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose Cl 4B .....	53
3.1.1.1.2	Ionenaustauschchromatographie .....	54
3.1.1.1.3	Tentakel-Ionenaustauschchromatographie .....	54
3.1.1.1.4	Gelfiltration .....	55
3.1.1.1.5	Affinitätschromatographie.....	55
3.1.1.1.6	Screening von Chromatographie-Bedingungen .....	56
3.1.1.1.7	Zusammenfassung der Versuche zur chromatographischen Reinigung.....	56
3.1.1.2	Fraktionierung der Zellproteine durch Ultrazentrifugation .....	57
3.1.1.3	Partielle Reinigung des Rohextraktes.....	58
3.1.1.4	Reinigung über HPLC .....	58
3.1.1.5	Zusammenfassung der Reinigung mit nicht chromatographischen Methoden .....	60
3.2	Proteinchemische Analyse .....	60
3.2.1	Aktivitätsbestimmungen des Enzyms über chirale GC.....	60
3.2.2	Nachweis von chiralen ( <i>S</i> )-Alkoholen, ( <i>R</i> )-Hydroxysäuren und ( <i>R</i> )-1-Phenyl-2-hydroxyethanal mittels GC/MS .....	63
3.2.3	Nachweis der Peptidbindung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie .....	66
3.2.4	Aminosäurezusammensetzung des gereinigten PQQ-ADH-Proteins .....	67
3.2.5	Versuche zur Bestimmung der Aminosäuresequenz .....	69
3.3	Ergebnisse der enzymatischen Oxidationsreaktion.....	69
3.3.1	Chinoprotein-Enzyme.....	69
3.3.2	Substratspektrum der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase: Test verschiedener Alkohole.....	69
3.3.2.1	Substratspektrum mit unbehandeltem Rohextrakt.....	69
3.3.2.2	Substratspektrum mit partiell gereinigtem Enzym.....	71
3.3.3	Substratspektrum der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase: Test verschiedener orthochinoider Verbindungen als Coenzyme.....	72
3.4	Präparative Anwendungen der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase (Q-ADH).....	75
3.4.1	Untersuchung der Enzymaktivität der Q-ADH bei kontinuierlicher bzw. einmaliger blasenfreier Begasung des partiell gereinigten Rohextraktes .....	75
3.4.2	Cofaktoraustausch zur Beschleunigung der Reaktion und Anwendung kostengünstigerer chinoider Cofaktoren.....	77
3.4.2.1	Verwendung alternativer orthochinoider Cofaktoren bei der präparativen Anwendung.....	77
3.4.2.2	Cofaktoraustausch mit unbehandeltem Rohextrakt.....	77
3.4.2.3	Cofaktoraustausch mit partiell gereinigtem Rohextrakt .....	78
3.5	Chemoenzymatische Reaktionen .....	79
3.5.1	Enzymatische Herstellung und Isolierung des enantiomerenreinen Aldehyds als Zwischenprodukt der Oxidation .....	79
3.5.2	Enzymatische Herstellung und Isolierung des enantiomerenreinen ( <i>R</i> )-2-Hydroxyphenylethylaldehyds aus rac-1,2-Phenylethandiol .....	79
3.5.3	Ergebnisse zu Nachweis und Enantiomerenreinheit des ( <i>R</i> )-Aldehyds .....	83
3.5.5	Direkte <i>in situ</i> -C-C-Bindungsknüpfung: Direkte Weiterreaktion des Aldehyds mit einer Transketolase .....	84
3.5.5.1	Methode zur C-C-Bindungsknüpfung .....	84
3.5.6	Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem.....	86

3.5.6.1 Oxidations- und Racemisierungsreaktion mit einem Rutheniumkatalysator in einem Zweiphasensystem.....	86
3.5.6.2 Substratspektrum für die Racemisierungsreaktion .....	89
3.5.6.2.1 Analytik            89	
3.5.6.2.2 Racemisierungsreaktion .....	91
5.6.3 Oxidation und Racemisierungsreaktion in dem Zweiphasensystem gestartet mit ( <i>S</i> )-PED .....	93
3.5.6.4 Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem gestartet mit rac. PED.....	95
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1 Biochemische Reinigung .....	97
4.2 Das präparative Potenzial der PQQ-abhängigen Dehydrogenase .....	103
4.3 Chemoenzymatische Synthesen .....	105
4.3.1 Synthese von chiralen Hydroxyketonen .....	105
4.3.2 Oxidations- und Racemisierungsreaktion mit einem Rutheniumkatalysator in einem Zweiphasensystem.....	106
4.3.3 Oxidation und Racemisierungsreaktion im Zweiphasensystem gestartet mit ( <i>S</i> )-Diol.....	108
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>6 Literatur.....</b>	<b>115</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Weltmarktvolumen der industriellen Enzyme (BCC Research Inc., 2012).....	2
Abb. 2:	Weltmarktanteil der chiralen Synthese (BCC Research Inc., 2012).....	3
Abb. 3:	Beispiel für unterschiedliche physiologische Wirkung von Enantiomeren.....	4
Abb. 4:	Methoden der Racematspaltung.....	6
Abb. 5:	Oxidasekatalysierte Racemattrennung von Aminosäuren zur Gewinnung enantiomerenreiner D-Aminosäuren.....	10
Abb. 6:	Strukturen orthochinoider Cofaktoren, isoliert aus bakteriellen Chinoproteinen.....	14
Abb. 7:	Industrielle Anwendung der enantiomerenreinen Hydroxysäuren.....	16
Abb. 8:	Biokatalyse zur asymmetrischen und enantioselektiven Gewinnung von Hydroxysäuren.....	17
Abb. 9:	Die Oxidations- und Cofaktor-Regenerationsreaktion zur Racematspaltung von Diolen zu Hydroxysäuren mit Hilfe einer PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase..	20
Abb. 10:	Fraktionen der Ultrazentrifuge.....	38
Abb. 11:	Reinigungsmethode zur Isolierung der Q-ADH.....	38
Abb. 12:	Reaktionsgefäß.....	46
Abb. 13:	Reaktionsgefäß für die Racemisierungsreaktion.....	49
Abb. 14:	Der Reaktor für die Oxidations- und Racemisierungsreaktion im Zweiphasensystem	50
Abb. 15:	Stereospezifische enzymatische Oxidation von ( <i>R</i> )-PED zu ( <i>R</i> )-Mandelsäure mit Alkoholdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. ....	52
Abb. 16:	HPLC-Peaks aus dem gereinigten Rohextrakt.....	59
Abb. 17:	Aktivitätsnachweis der einzelnen HPLC-Fraktionen.....	59
Abb. 18:	Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse zu Beginn bei 0 h (Fläche ( <i>S</i> )-PED: 50515, <i>ee</i> -Wert ( <i>S</i> )-PED = 0%, Fläche ( <i>R</i> )-PED: 55926) ...	62
Abb. 19:	Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 24 h (Fläche ( <i>S</i> )-PED: 50213, <i>ee</i> -Wert ( <i>S</i> )-PED = 33%, Fläche ( <i>R</i> )-PED: 25074).....	62
Abb. 20:	Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 48 h (Fläche ( <i>S</i> )-PED: 60433, <i>ee</i> -Wert ( <i>S</i> )-PED = 68%, Fläche ( <i>R</i> )-PED: 11422).....	62
Abb. 21:	Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 72 h (Fläche ( <i>S</i> )-PED: 64910, <i>ee</i> -Wert ( <i>S</i> )-PED = 100%, Fläche ( <i>R</i> )-PED: 0).....	63
Abb. 22:	Reaktionsverfolgung der Hydroxysäuresynthese über GC (Fläche ( <i>R</i> )- Mandelsäureester: 21591; <i>ee</i> -Wert (( <i>R</i> )-Mandelsäureester = 91%, Fläche ( <i>S</i> )- Mandelsäureester: 970; <i>ee</i> -Wert (( <i>S</i> )-Mandelsäureester = 9%).....	63
Abb. 23:	Massenspektrum von 1-Phenyl-1,2-ethandiol aus dem NIST Chemistry WebBook....	65
Abb. 24:	Massenspektrum von Mandelsäuremethylester aus dem NIST Chemistry WebBook .	65
Abb. 25:	Das IR-Spektrum der gereinigten Alkoholdehydrogenas.....	66
Abb. 26:	Umsatzgrad in Abhängigkeit von der Sauerstoffbegasung.....	76
Abb. 27:	Umsatzgrad in Abhängigkeit vom Cofaktor mit nicht gereinigtem Rohextrakt.....	77
Abb. 28:	Umsatzgrad in Abhängigkeit vom Cofaktor für partiell gereinigtes Rohextrakt.....	78
Abb. 29:	Oxidation eines Alkohols bis zur Säure über die Aldehydzwischenstufe.....	79
Abb. 30:	Enzymatische Oxidation vom Diol zum enantiomerenreinen Aldehyd.....	80
Abb. 31:	GC-Spektrum zum Nachweis des Aldehyds als Zwischenprodukt.....	81
Abb. 32:	Zeitabhängiger Umsatz von rac. PED zum ( <i>R</i> )-Aldehyd und zur ( <i>R</i> )-Mandelsäure....	82
Abb. 33:	GC/MS-Spektrum zur Nachweis des Aldehyd-Zwischenprodukts.....	83
Abb. 34:	GC-Spektren des enzymatisch hergestellten, reinen und des racemischen Aldehyds ..	84
Abb. 35:	Reaktionsschema zur Herstellung chiraler Hydroxyketone.....	85
Abb. 36:	Umsetzung von rac. PED über die Aldehydzwischenstufe zum Hydroxyketon mittels chiraler GC-Analytik aus den Reaktionsproben.....	85
Abb. 37:	GC/MS des chiralen Hydroxyketons.....	86
Abb. 38:	Ru <sup>II</sup> - Katalysator (Shvo-Katalysator).....	87
Abb. 39:	Racemisierungsreaktion mit Hilfe des Ru <sup>II</sup> -Katalysators.....	87
Abb. 40:	Racemisierungsmechanismus des Rutheniumkatalysators.....	88

---

Abb. 41:	Enzymatische Oxidationsreaktion kombiniert mit dem Ru <sup>II</sup> -Katalysator zur Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem.....	89
Abb. 42:	Racemisierungsreaktion bei 45°C gestartet mit ( <i>S</i> )-Alkohol für 48 h mit 0,5 mM Substrat, 2 mol-% (20 mg) Ru-Katalysator und 2-4 mL Toluol.....	91
Abb. 43:	Oxidation des ( <i>S</i> )-Diols zum ( <i>R</i> )-Aldehyd über die Racemisierungsreaktion bei 45°C gestartet mit ( <i>S</i> )-Diol mit Nachweis über chirale GC und GC/MS.....	94
Abb. 44:	Oxidation des ( <i>S</i> )-Diols zum ( <i>R</i> )-Aldehyd über Racemisierungsreaktion bei 60°C gestartet mit ( <i>S</i> )-Diol mit Nachweis über chirale GC und GC/MS.....	94
Abb. 45:	Oxidation und Racemisierung von rac-PED bei 60°C im Zweiphasensystem mit Ru <sup>II</sup> -Katalysator .....	96
Abb. 46:	Zellbiotransformation von Essigsäure-Bakterien (Yakushi und Matsushita, 2010) .....	100
Abb. 47:	Redoxreaktionskaskade des Essigsäure-Bakteriums .....	101
Abb. 48:	Reaktionsmechanismus der Oxidation der PQQ-abhängigen Methanoldehydrogenase aus <i>Methylobacterium extorquens</i> (Anthony, 1998 und Anthony, 2001) .....	102
Abb. 49:	Dreidimensionales Bild mit Bindung der PQQH <sub>2</sub> und Glucose an ( <i>S</i> )-GDH mit der Programm GRASP (Nicholls <i>et al.</i> , 1991).....	102
Abb. 50:	Die effiziente Kombination der metallorganischen Katalyse mit Enzymen.....	106
Abb. 51:	Detaillierter Mechanismus der Racemisierung von Alkoholen .....	108
Abb. 52:	Mechanismus des Hydrogentransfers mit dem Shvo-Katalysator .....	109
Abb. 53:	Enantioselektive Biokatalyse mit axialen chiralen Allenen.....	110
Abb. 54:	Moderne chirale Synthese von Hydroxysäure mit LDA.....	111
Abb. 55:	Moderne Synthese chiraler Hydroxysäuren mit DCC/CAN.....	111
Abb. 56:	Biotransformation zur Herstellung von chiralen Hydroxysäuren .....	111
Abb. 57:	ADH- und ALDH-Reaktion zur Oxidation von Alkoholen zu chiralen Hydroxysäuren.....	112

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Die ersten sechs Subklassen der 1. Hauptgruppe (Oxidoreduktasen).....	11
Tab. 2:	Übersicht zu literaturbeschriebenen enzymatischen Wegen zu aromatischen $\alpha$ -Hydroxysäuren (A = Reaktionsprinzip; B = Konkrete Beispiele) .....	18
Tab. 3:	Aktivitätsdaten nach jedem Reinigungsschritt.....	58
Tab. 4:	Nachweis der Hydroxy- und organischen Säureester mittels GC/MS .....	64
Tab. 5:	Aminosäure-Zusammensetzung des Q-ADH-Proteins .....	68
Tab. 6:	Substratspektrum mit Enantiomerenreinheit und Überschuss des verbleibenden ( <i>S</i> )-Alkohols bei Umsatz von racemischem Alkohol nach 72 h mit Rohextrakt .....	70
Tab. 7:	Umsatz und Enantiomerenreinheit verschiedener Oxidationsprodukte aus Alkoholen. Umsetzungen mit Rohextrakt, gemessen nach 72 h Inkubation .....	70
Tab. 8:	Substratspektrum und Reinheits- sowie Umsatzgrad mit partiell gereinigtem Rohextrakt.....	71
Tab. 9:	Produktspektrum und Reinheits- und Umsatzgrad mit partiell gereinigtem Rohextrakt.....	72
Tab. 10:	Relative Aktivität des Enzyms bei verschiedenen Cofaktoren .....	73
Tab. 11:	Referenzpeaks der enantiomerenreinen Substrate mittels HPLC .....	90
Tab. 12:	Racemisierungsgrad des getesteten Substrats mit Shvo-Ru-Katalysator .....	91
Tab. 13:	Racemisierungsgrad des getesteten Substrats mit kommerziellem Ru-Katalysator .....	92
Tab. 14:	Zugabe von Metall-Ionen zu einer Alkohol/MeCN-Lösung mit PQQ-Derivat .....	103

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
Akt.	Aktivität
ATR	Attenuated Total Reflectance
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DMS	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture
E.C.	European Commission
<i>ee</i>	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuss
ESR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinucleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
GC	Gaschromatographie
HAc	Essigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
IEC	Anionenaustauschchromatographie
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphat
LTQ	Lysyl-Tyrosyl-Chinon
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert/reduziert)

NADP/NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (oxidiert/reduziert)
NC	Naphthoquinone
nm	Nanometer
NPC	2-Nitrophenanthrachinon
OD600	optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMe	1-Methyl-1,2-Phenanthrolin-5,6-diomium-tetrafluoroborat
PED	1-Phenyl-1,2-ethandiol
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
PQQ-ADH	PQQ-Alkoholdehydrogenase
Pseudomonas sp.	Pseudomonas species
Q-ADH	Chinoproteinalkoholdehydrogenase
rac.	racemisch
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Ru	Ruthenium
spez.	spezifisch
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl
TFAA	Triflouressigsäure
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TPQ	Topachinon
TTQ	Tryptophantryptophylchinon
U	Unit (Enzymeinheit)
UF	Ultrafiltration
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

# 1 Einleitung

## 1.1 Rolle der Enzyme in der Biotechnologie

Enzymtechnologie ist zwar ein Ausdruck der modernen Technologie des 21. Jahrhunderts, dieser Begriff hat aber eine sehr alte Nutzungstradition. Die erste Nutzung von Enzymen aus Kälbermägen zur Käseherstellung liegt mehr als 6000 Jahre zurück. Die Beobachtungen zur Spaltung von Saccharose durch Invertase (1846), die Kristallisation von Urease (1926) und vor allem die industrielle Nutzung von Proteasen in Waschmitteln – entwickelt Anfang des 20. Jahrhunderts von der Firma Roehm – waren wesentliche Meilensteine der Entwicklung der modernen Enzymtechnologie. Enzymkatalysierte Methoden und Prozesse verbrauchen dabei weniger Energie als Prozesse, die mit Chemokatalysatoren durchgeführt werden, sie sind umweltfreundlicher und im Allgemeinen deutlich selektiver. Die Umweltaspekte, Abfallvermeidung und Energiespareffekte der Enzyme in der chemischen und pharmazeutischen Industrie haben dieses Feld erst so interessant gemacht, dass viele Prozesse wie die Herstellung von Acrylamid oder Antibiotika auch unter ökonomischen Aspekten von chemischen Verfahren auf enzymatische umgestellt wurden.

Für die chemisch-pharmazeutische Industrie sind Enzyme besonders interessant, da diese in der Lage sind, asymmetrische und regioselektive Reaktionen zu katalysieren. In der Natur kommen optisch aktive Verbindungen sehr häufig vor, beispielsweise Aminosäuren, Zucker, Terpene, Antibiotika oder auch Wirkstoffe wie Hormone oder Pheromone. Heutzutage haben enzymkatalysierte Reaktionsschritte ihren festen Platz in der Entwicklung von Pharma- und Agrowirkstoffen. Im Bereich der Pharmaentwicklung müssen Hersteller mittlerweile den Nachweis liefern, welches Enantiomer die gewünschte Wirkung zeigt. Da es nach dem Stand der Technik möglich ist, enantiomerenreine Verbindungen herzustellen, wird bei der Zulassung neuer Pharmaka gefordert, dass der Wirkstoff enantiomerenrein ist, konkret wird eine optische Reinheit von  $> 99\%$  Enantiomerenüberschuss (ee) gefordert. Somit kommen verstärkt chemoenzymatische Verfahren zum Einsatz. Durch gentechnisch manipulierte Mikroorganismen und daraus resultierende rekombinante Enzyme können die Reaktionsprozesse und die Ausbeuten deutlich verbessert werden. Moderne Verfahren der Molekularbiologie ermöglichen es mittlerweile sogar, in Einzelfällen maßgeschneiderte Enzyme für industrielle Prozesse zu entwickeln.

Der globale Markt für industrielle Enzyme wurde für 2009 mit 3,1 Mrd. USD beziffert und bis 2016 wird er auf 6 Mrd. USD wachsen mit einem Durchschnittswachstum von 9,1 % pro Jahr (Abb. 1). Dabei haben die Lebensmittelenzyme den größten Anteil auf dem Enzymweltmarkt. Der zweitgrößte Markt sind dann die technischen Enzyme, worin unter anderem auch die Enzyme für die Produktion chiraler Produkte umfasst sind (BCC Research Inc., 2012).

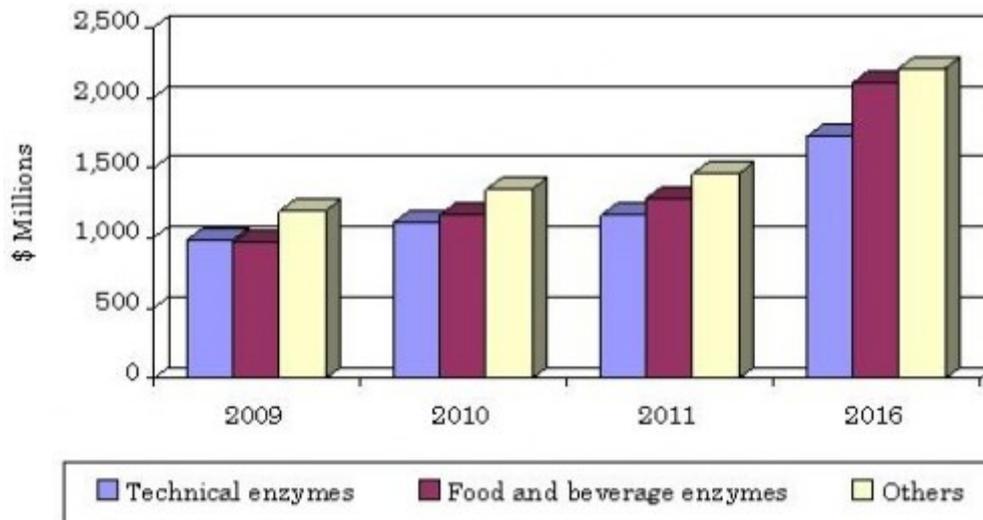


Abb. 1: Weltmarktvolumen der industriellen Enzyme (BCC Research Inc., 2012)

In den frühen 1990er Jahren lagen noch etwa 90 % der synthetischen chiralen Pharmazeutika als racemische Gemische vor. Allerdings zeigen Enantiomere oft sehr unterschiedliche oder auch gegensätzliche pharmakologische Effekte. Um gezielt eine gewünschte Wirkung zu erzielen, sollten chirale Wirkstoffe enantiomerenrein vorliegen.

1992 gab die US Food and Drug Administration einen Leitfaden bezüglich der Einführung von enantiomerenreinen Wirkstoffen heraus. Bei der Zulassung neuer Medikamente werden von den Behörden enantiomerenreine Wirkstoffe gefordert. Heutzutage liegen mehr als 50 % der 500 weltweit meistverkauften Medikamente in enantiomerenreiner Form vor (O'Brien und Vanasse, 2000), neun der zehn sog. „Blockbuster“ sind chirale Verbindungen (Rouhi, 2004).

Optisch aktive Substanzen wie Alkohole, Amine und Aminosäuren sind wichtige Zwischenprodukte für die Synthese vieler Pharma- und Agrowirkstoffe. Unter den vielen Techniken, die zur Synthese optisch aktiver Substanzen zur Verfügung stehen, hat die asymmetrische Reduktion beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Vor allem die asymmetrische Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen ist eine der nützlichsten Reaktionen in der organischen Chemie (Wills und Hannedouche, 2002).

## 1.2 Bedeutung der Enantiomerenreinheit in der Pharmaindustrie

Louis Pasteurs Experimente aus dem Jahr 1848 mit Weinsäure-Kristallen und die Beobachtung ihrer Struktur mit Hilfe der Einzelkristalle unter dem Mikroskop waren das Fundament der Theorie der asymmetrischen Anordnung der Atome im Molekül. Solche als chiral bezeichneten Moleküle verhalten sich wie Objekte und deren Spiegelbild und können nicht durch Drehung miteinander zur Deckung gebracht werden. Der globale Markt für chirale Technologien betrug 5,3 Mrd. USD im Jahr 2011 und wird bis 2016 auf etwa 7,2 Mrd. USD

wachsen mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von 6,5 % pro Jahr (Abb. 2). Die chirale Synthese macht mit 80 % den größten Anteil des chiralen Technologiemarktes aus mit rd. 4,2 USD in 2011 mit einem Wachstum von 6,4 % pro Jahr bis 2016 (5,7 Mrd. USD). Der Markt chiraler Analysen beträgt 839,4 Mio. USD in 2011 mit einer Wachstumsrate von 5,8 % bis 2016 (1,1 Mrd. USD). Es ist deutlich, dass die chirale Synthese hier den dominanten Anteil am globalen Markt chiraler Technologien hält (BCC Research Inc., 2012).

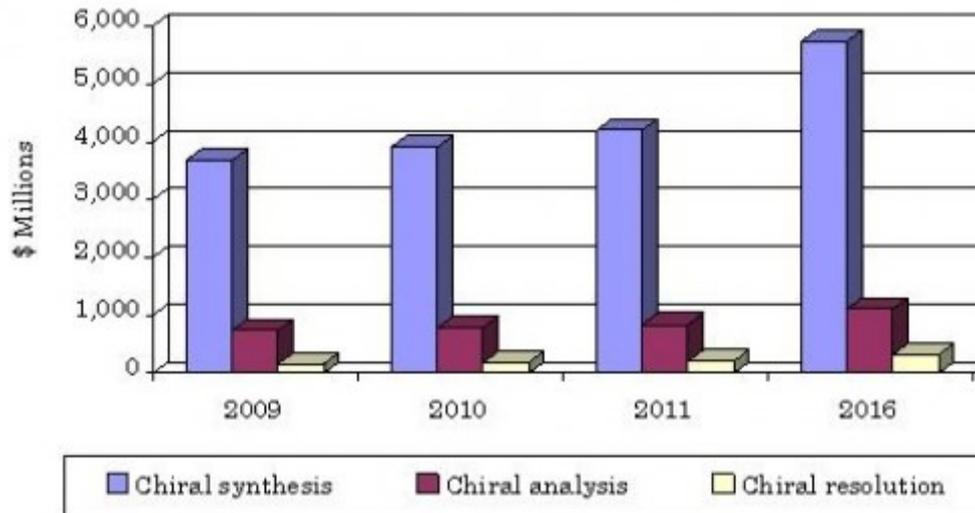
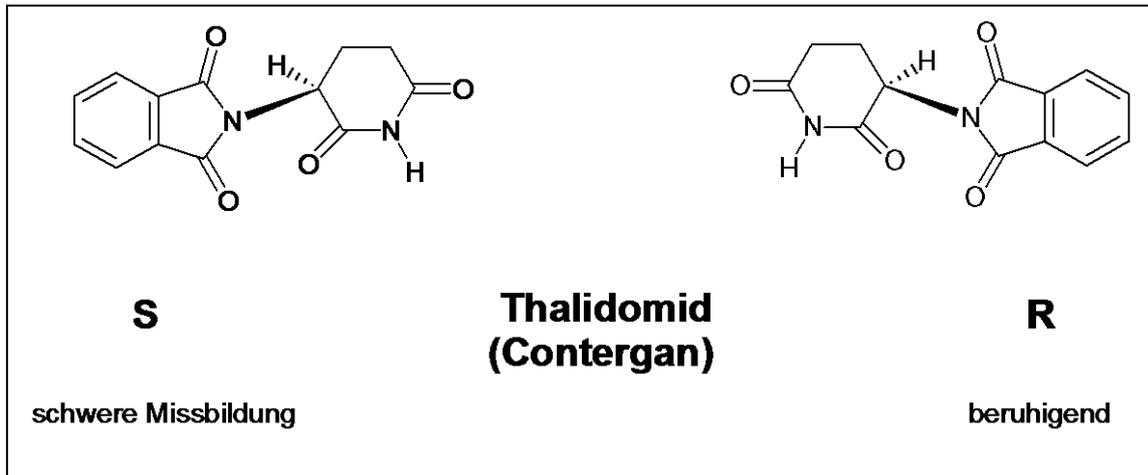


Abb. 2: Weltmarktanteil der chiralen Synthese (BCC Research Inc., 2012)

Enantiomere einer Substanz haben – vom Drehwert abgesehen – dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften, können aber aufgrund ihrer anderen Raumstruktur eine unterschiedliche biologische bzw. pharmakologische Wirkung aufweisen. Oft hat bei Pharmaka nur ein Enantiomer die gewünschte Wirkung, während das andere Enantiomer eine entweder neutrale Wirkung oder sogar schädliche Nebenwirkungen haben kann. Das Schlafmittel Contergan® (Abb. 3) ist ein warnendes Beispiel: Das (*R*)-Isomer des Schlafmittels hat die beruhigende Wirkung, während das (*S*)-Isomer bei Einnahme des Racemats während der Schwangerschaft zur Missbildung von Embryonen geführt hat (Römpp, 1990, S. 286).



**Abb. 3: Beispiel für unterschiedliche physiologische Wirkung von Enantiomeren**

Erst seit diesem Vorfall ist die Aufmerksamkeit der Synthese-Chemiker in vollem Umfang auf das Problem der Chiralität gelenkt worden bis hin zu Zulassungsvorschriften bezüglich der Enantiomerenreinheit.

Pharmakologisch beinhaltet der Contergan-Fall allerdings noch eine weitere Komplikation: Man war lange Zeit der Meinung, dass die unerwünschten Nebenwirkungen des racemisch hergestellten Contergans hätten vermieden werden können, wenn das Medikament als reines Enantiomer vertrieben worden wäre, da man die beiden so unterschiedlichen Wirkungen (Schlafmittel und teratogene Wirkung) eindeutig den beiden Enantiomeren zuordnen konnte. Mittlerweile weiß man aber, dass enantiomerenreines Thalidomid im Organismus langsam racemisiert und damit das teratogene Enantiomer wieder entsteht. Immerhin zeigt dieser Befund, wie weit man bei den Untersuchungen der Wirkungen eines Pharmawirkstoffs und seiner Abbauprodukte gehen muss, um eine Schädigung von Personen zu verhindern.

Bei der Synthese enantiomerenreiner Verbindungen können Enzyme im Rahmen der folgenden drei Wege eingesetzt werden:

- Durch asymmetrische Synthesen werden prochirale Verbindungen durch stereoselektive Enzyme zu chiralen Verbindungen umgesetzt.
- Durch Aufbau aus enantiomerenreinen Bausteinen aus dem chiralen Pool der optisch aktiven Naturstoffe: Diese optisch aktiven Substanzen werden aus einfachen Quellen mit einer natürlichen Enantiomerenreinheit gewonnen. Als Beispiel für Verbindungen aus dem chiralen Pool kann man hier die Aminosäuren nennen.
- Durch Racematspaltung, also ausgehend vom Racemat und nachträgliche selektive Derivatisierung, so dass eine enantiomerenreine Verbindung übrig bleibt. Es gibt eine chemische und eine biokatalytische Racematspaltung:

- In der chemischen Racematspaltung wird das unerwünschte Enantiomer durch Kristallisationsverfahren oder chromatographische Trennmethode entfernt.
- In der biokatalytischen Racematspaltung wird aus einem Racemat ein Enantiomer selektiv abgetrennt, während das andere Enantiomer nicht umgesetzt wird. Die beiden Verbindungen werden dann anhand vorliegender unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften getrennt.

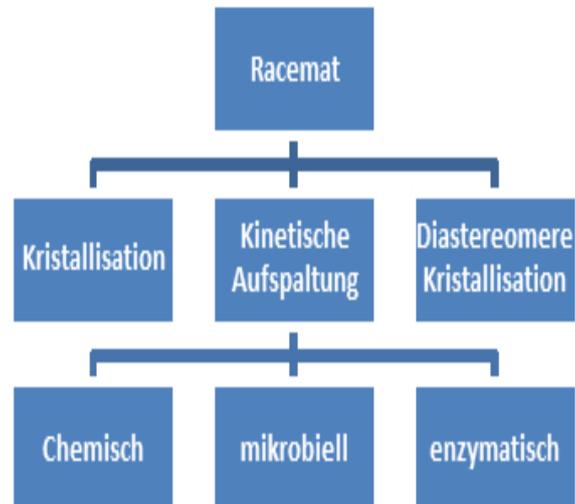
Bei der biokatalytischen asymmetrischen Synthese werden prochirale Ausgangssubstanzen zu enantiomerenreinen Produkten umgesetzt, häufig mit hohen Ausbeuten und einer hervorragenden Enantiomerenreinheit, während bei der asymmetrischen Synthese mit chemischen Verfahren die Ausbeuten und Enantiomerenreinheiten oft unzureichend sind. Dazu kommt ein notwendiger Einsatz an organischen Lösungsmitteln und Schwermetallkatalysatoren und häufig ein hoher Energiebedarf solcher Prozesse, so dass man sehr daran interessiert war, alternative Verfahren für die Synthese enantiomerenreiner Produkte zu entwickeln.

Aufgrund der hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität von Enzymen haben biokatalytische Prozesse in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Fortschritte im Bereich des Hochdurchsatz-Screenings und der rekombinanten DNA-Technologie haben zur Entwicklung neuer Enzyme mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Aktivität und Stabilität geführt. Der Einsatz von Biokatalysatoren ist nicht auf deren natürliche Substrate beschränkt und einige enzymatische Reaktionen mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen in organischen Lösungsmitteln sind bereits industriell etabliert (Holland, 1998; Huisman und Gray, 2002; Liese und Filho, 1999; Ogawa und Shimizu, 1999; Rasor und Voss, 2001; Zaks, 2001).

In dieser Dissertation wird ein neuer Syntheseweg zu chiralen Hydroxysäuren durch die Oxidation von Alkoholen nach dem Prinzip der enzymatischen Racematspaltung beschrieben.

### **1.3 Methoden der Racematspaltung**

Die Methoden zur Trennung eines Racemats (Abb. 4) lassen sich in drei Gruppen einteilen (nach Sheldon, 1993, S. 275):



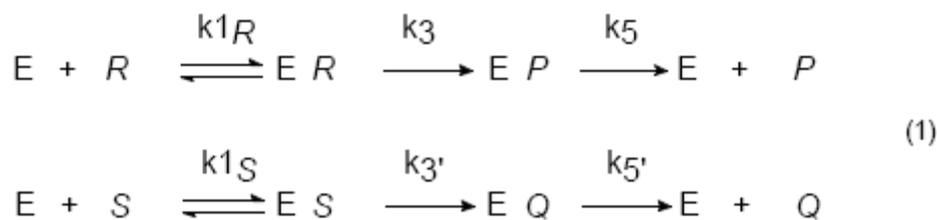
**Abb. 4: Methoden der Racematspaltung**

Die beiden Kristallisationsmethoden sind die klassischen Methoden der Racemattrennung. Bei der Kristallisation von Enantiomeren nutzt man aus, dass für einige racemische Verbindungen unter bestimmten Bedingungen die beiden Enantiomere getrennt und enantiomerenreine Kristalle gebildet werden. Diese können dann getrennt gesammelt werden. Leichter geht dies, wenn die Enantiomere vor der Kristallisation zu Diastereomeren umgesetzt werden, diese haben dann auch unterschiedliche physikalische und damit auch andere Kristallbildungseigenschaften. Bei der kinetischen Spaltung wird die unterschiedliche Reaktivität der Enantiomere ausgenutzt: Hierbei benötigt man für die Trennung eine chirale Komponente, wobei die Methoden dann entsprechend unterteilt werden – je nachdem, ob es sich um einen chemischen, mikrobiellen oder enzymatischen Katalysator handelt. Auf chemisch katalysierte Methoden wird hier nicht näher eingegangen, dafür stehen zahlreiche chirale Katalysatoren zur Verfügung. Die mikrobielle Spaltung nutzt aus, dass Mikroorganismen, sofern sie eine chirale Verbindung katalytisch umsetzen können, sehr häufig nur ein Enantiomer metabolisieren, das andere bleibt ungenutzt zurück. Nachteil dieser Methode ist, dass nur Verbindungen getrennt werden können, die ein Organismus verwerten kann. Die Verbindung muss also relativ ähnlich den eigenen Verbindungen des eingesetzten Organismus sein. Zudem verliert man bei dieser Methode auf jeden Fall 50 % der metabolisierten Verbindung durch Verwertung. Das ist bei den beiden anderen Schritten der chemischen oder enzymatischen Trennung nicht der Fall: Nach der Trennung kann man versuchen, das unerwünschte Enantiomer z. B. durch Re-Racemisierung wieder verwertbar zu machen.

Im Folgenden soll nur die Methode der enzymkatalysierten Racemattrennung näher erläutert werden.

### 1.3.1 Enzymatische Racematspaltung

Zur quantitativen Beschreibung kinetischer Racematspaltungen, die durch Enzyme katalysiert werden, formulierten Chen und Mitarbeiter mathematische Gesetzmäßigkeiten (Chen *et al.*, 1982). Damit ein Enzym ein racemisches Gemisch trennen kann, muss es in der Lage sein, die beiden enantiomeren Formen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten umzusetzen. Das Ausmaß der Geschwindigkeitsdifferenz ist dabei von entscheidender Bedeutung. Gleichung 1 gilt für den einfachen Fall einer irreversiblen Dreistufen-Kinetik und unter der Voraussetzung, dass keine Produktinhibierung stattfindet (sogenannten stationären Zustands) und die miteinander konkurrierenden Enantiomere *R* und *S* am gleichen aktiven Zentrum des Enzyms angreifen.



**Gleichung 1:** Kinetik der Racematspaltung nach Chen und Sih, wobei *E* die Enzymkonzentration und *R* und *S* die Konzentrationen der Enantiomere darstellen. *P* und *Q* symbolisieren die Enantiomerenkonzentrationen des Produktes. Der Enzym-Substrat- bzw. Enzym-Produkt-Komplex ergibt sich aus der Kombination von *E* mit den entsprechenden Enantiomeren.

Das Verhältnis zwischen zwei partiellen Reaktionen kann im stationären Zustand durch Gleichung 2 beschrieben werden, wobei *K* die Michaelis-Menten-Konstante und *V* die jeweilige Maximalgeschwindigkeit des schneller bzw. langsamer reagierenden Enantiomers darstellt. Wenn das gesamte Enzym im Enzym-Substrat-Komplex gebunden ist, dann ist die Maximalgeschwindigkeit *V* einer Enzymreaktion erreicht.

$$\frac{v_R}{v_S} = \frac{V_R K_S [R]}{V_S K_R [S]} \quad (2)$$

**Gleichung 2:** Darstellung des Verhältnisses der beiden Geschwindigkeiten für die Umsetzung der Enantiomeren *R* und *S*

Das Verhältnis nach der Integration von Gleichung 2 wird als Enantioselektivität *E* einer kinetischen enzymatischen Racematspaltung definiert.

$$E = \frac{\ln([R] / [R_0])}{\ln([S] / [S_0])} = \frac{V_R / K_R}{V_S / K_S} \quad (3)$$

**Gleichung 3: Enantioselektivität E dargestellt als Verhältnis der Integration der beiden Geschwindigkeiten im Verhältnis zur Michaelis-Menten-Konstante**

Die kinetischen Parameter  $V$  und  $K$  lassen sich jedoch nur schwer ermitteln. Chen und Sih haben durch Umformung der Gleichung 3 einen Ausdruck geschaffen, der die Enantiomerenüberschüsse des Eduktes (Gleichung 4) sowie des Produktes (Gleichung 5) mit Hilfe des Umsatzes  $x$  ins Verhältnis setzt. Ein solcher Ausdruck bietet sich für praktische Anwendungen an, da Umsatz und  $ee$ -Werte einer Reaktion bedeutend leichter zu bestimmen sind als die entsprechenden kinetischen Parameter.  $R$  und  $R_0$  sowie  $S$  und  $S_0$  stellen die Konzentrationen der Enantiomere dar.

$$E = \frac{V_R/K_R}{V_S/K_S} = \frac{\ln[(1-x)(1-ee(S))]}{\ln[(1-x)(1+ee(S))]} \quad (4) \quad E = \frac{V_P/K_P}{V_Q/K_Q} = \frac{\ln[(1-x)(1-ee(P))]}{\ln[(1-x)(1+ee(P))]} \quad (5)$$

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

$$ee(R) = \frac{[P] + [Q]}{[P] - [Q]}$$

$$x = 1 - \frac{[S] + [R]}{[S]_0 + [R]_0}$$

**Gleichung 4: Gleichung zur Bestimmung der Enantioselektivität E durch Verbindung des  $ee$ -Werts mit dem Umsatz**

Für die Enantioselektivität  $E$  ist ein Wert  $> 100$  notwendig, wenn beide Enantiomere eines Racemates durch eine kinetische Racematspaltung mit hohen Enantiomerenreinheiten anfallen sollen.

Das Maß für die bevorzugte Bildung eines Enantiomers bei enantioselektiver Synthese ist der Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess,  $ee$ ):

$$ee [\%] = \frac{E_+ - E_-}{E_+ + E_-}$$

**$E_+$  = Masse des im Überschuss gebildeten Enantiomeren**

**$E_-$  = Masse des im Unterschuss gebildeten Enantiomeren**

#### Gleichung 5: Definition des *ee*-Werts

Die Gleichung 5 zeigt die Definition der Bestimmung des *ee*-Wertes. Für die Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen sind zwei Aspekte wichtig:

- die Enantioselektivität des Enzyms und
- die Frage, ob das Rest-Edukt oder das derivatisierte Produkt die gewünschte Verbindung darstellt.

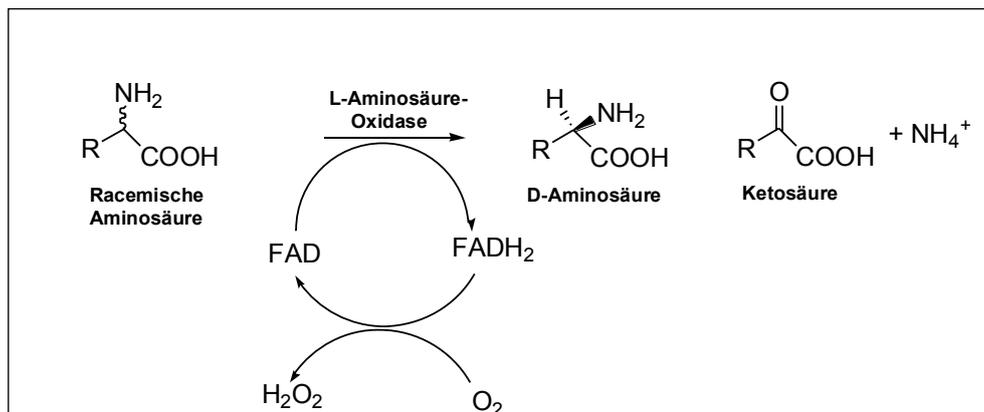
Die Enantioselektivität des verwendeten Enzyms ist nicht immer optimal, insbesondere die häufig verwendeten Lipasen zeigen für viele Verbindungen eine niedrige Selektivität, die man im Einzelfall durch Mutagenese verbessern kann. Gerade bei der Verwendung von Enzymen mit geringer Selektivität ist der zweite Aspekt wichtig, ob das Rest-Edukt oder das derivatisierte Produkt die gewünschte Verbindung darstellt. Im letzteren Fall erhält man im gesamten Verlauf der Reaktion immer ein Produkt mit niedrigem *ee*-Wert, während man im ersteren Fall, wenn also das Rest-Edukt die gewünschte Verbindung ist, einen Zeitpunkt festlegen kann, an dem die unerwünschte Verbindung vollständig abreagiert hat. Bei einer Nichtselektivität des Enzyms ist dann zwar auch etwas von der gewünschten Verbindung umgesetzt worden, so dass die Ausbeute erniedrigt ist, aber das gewünschte Produkt kann in einer guten optischen Reinheit erhalten werden.

## 1.4 Redoxenzyme

Redoxenzyme (auch Oxidoreduktasen genannt) können für asymmetrische Reaktionen und Racemattrennverfahren eingesetzt werden. Beispiele für asymmetrische Reaktionen stellen die Reduktionen mit NADH- oder NADPH-abhängigen Dehydrogenasen dar, während Racemattrennungen eher durch die oxidativen Reaktionen dargestellt werden, bei denen das Asymmetriezentrum einer Verbindung durch Oxidation entfernt wird, hier also das verbleibende Restsubstrat eines Racemats die gewünschte Verbindung darstellt. Der Vorteil von Redoxenzymen für die Racemattrennung ist, dass in aller Regel die verwendeten Enzyme hoch enantioselektiv sind.

Ein Beispiel für eine Racemattrennung mittels Redoxenzymen wird nun im Folgenden dargestellt:

Aminosäureoxidasen sind Flavoproteine, die für Oxidationen prädestiniert sind; bekannt sind D- und L-spezifische Enzyme. Die Reduktionsäquivalente, die bei der Oxidation frei werden, werden auf das enzymgebundene FAD übertragen. In einer gekoppelten Reaktion wird das FADH<sub>2</sub> dann durch O<sub>2</sub> re-oxidiert, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet wird. Die Oxidationsreaktion verläuft nahezu quantitativ, und da Aminosäure-Oxidasen hoch enantioselektiv sind, kann man bei praktisch 50 % Ausbeute *ee*-Werte von > 99 % erreichen. Abb. 5 zeigt das am Beispiel der Racemattrennung von Aminosäuren durch L-Aminosäure-Oxidase zur Gewinnung enantiomerenreiner D-Aminosäuren. Beschrieben wurde dies beispielsweise für die Gewinnung der D-Aminosäuren D-Methionin (Takahashi *et al.*, 1997), von D-Phenylalanin (Geueke und Hummel, 2002) und für die Ketosäure CBZ-L-Oxylysin (Hanson *et al.*, 1992).



**Abb. 5:** Oxidasekatalysierte Racemattrennung von Aminosäuren zur Gewinnung enantiomerenreiner D-Aminosäuren

#### 1.4.1 Biochemische Unterteilung der Oxidoreduktasen

Der Einsatz von Enzymen in der Industrie hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen, da sie gegenüber chemischen Katalysatoren immer mehr Vorteile zeigen. Enzymatische Katalysen verlaufen unter milden Bedingungen (Temperatur, pH und Druck) mit hoher Stereospezifität. Je nach Art der katalysierten Reaktion werden alle Enzyme durch die „International Union of Biochemistry“ in sechs Klassen unterteilt. Die Oxidoreduktasen (Klasse 1) katalysieren die Übertragung von Reduktionsäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen.

Die Dehydrogenasen bilden eine Unterklasse der Oxidoreduktasen. Innerhalb der Dehydrogenasen kommt den Alkoholdehydrogenasen aufgrund ihres biotechnologischen Potenzials eine besondere Bedeutung zu.

Diese Hauptgruppe wird nach der E.C.-Nomenklatur wiederum in 19 verschiedene Subklassen unterteilt. Diese Enzyme katalysieren Redoxreaktionen, wobei das reduzierte Substrat als Wasserstoffdonator und Namensgeber für das Enzym festgelegt wurde. Der Trivialname

setzt sich hierbei zumeist aus der Bezeichnung für den Donator und der Endung Dehydrogenase zusammen, z. B. Alkoholdehydrogenase. Beispiele für Subklassen der 1. Hauptgruppe sind in Tab. 1 zusammengestellt.

**Tab. 1: Die ersten sechs Subklassen der 1. Hauptgruppe (Oxidoreduktasen)**

<b>Subklasse</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Beispiele</b>
E.C. 1.1	NAD <sup>+</sup> /NADP <sup>+</sup> als Akzeptor	Alkohol-, Lactat-, Malat-, Glucose-6-Phosphat- und Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
E.C. 1.2	O <sub>2</sub> als Akzeptor	Glucose-, Aminosäure-, Xanthin-, Cytochrom- und Monoamin-Oxidase
E.C. 1.3	Cytochrom als Akzeptor	Pyruvatdehydrogenase, Cytochrom-b <sub>5</sub> -Reduktase
E.C. 1.4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Akzeptor	Peroxidase, Katalase
E.C. 1.5	andere Akzeptoren	Succinatdehydrogenase, Hydrogenase
E.C. 1.6	unter Einbau von O <sub>2</sub>	Dopaminhydrolyase, Lipoxxygenase

Die größte Untergruppe stellen die Enzyme dar, bei denen NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> als Coenzyme wirken, da sie in der Lage sind, Wasserstoff reversibel aufzunehmen. Das Fehlen von NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> oder geringfügige Modifikationen dieser Coenzyme führen zum Aktivitätsverlust des Enzyms. Neben diesen von NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> abhängigen Dehydrogenasen existieren aber auch Dehydrogenasen, die andere Coenzyme benötigen, beispielsweise Flavine oder chinoide Verbindungen. Hierunter fallen auch die Chinoproteine, die z. B. Pyrrolochinolinchinon (PQQ) als Coenzym benutzen. Andere chinoide Cofaktoren sind Topachinon (TPQ) und Tryptophantryptophylchinon (TTQ), die fest am Protein gebunden sind (Duine, 1991; van Ophem, 1992).

Im Folgenden sollen aus der großen Gruppe der Redoxenzyme die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen (E.C. 1.1), die Oxidasen (E.C. 1.2) und die Chinoproteindehydrogenasen (E.C. 1.1.99.8) kurz dargestellt werden.

### 1.4.2 NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen

Nicotinamiddehydrogenasen übertragen ein Wasserstoff-Atom aus dem Nicotinsäureamid des NADH bzw. NADPH als Hydrid-Ion auf eine Carbonylverbindung. Bekannte Enzymuntergruppen, die auch technische Bedeutung haben, sind die Hydroxysäure-, die Aminosäure- und die Alkoholdehydrogenasen. Insbesondere letztere Gruppe hat in den letzten Jahren größere Bedeutung zur Herstellung enantiomerenreiner Bausteine gewonnen (Hummel *et al.*, 2010).

Dehydrogenasen sind in der Natur weit verbreitet, da sie an den energiegewinnenden Prozessen (z. B. Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung) sämtlicher Organismen beteiligt sind. Je nach Substrat unterscheidet man verschiedene Dehydrogenasen. Ein Enzym, das in der Leber beim Alkoholabbau Ethanol in Acetaldehyd (Ethanal) umwandelt, ist die

Alkoholdehydrogenase. Die Oxidation des Lactats zu Pyruvat wird durch die Lactatdehydrogenase katalysiert.

### 1.4.3 Biochemische Unterteilung und Vorkommen von Alkoholdehydrogenasen

Alkoholdehydrogenasen (ADH) katalysieren die Oxidation von primären Alkoholen zu Aldehyden und von sekundären Alkoholen zu Ketonen. Auch die Reduktion von Aldehyden oder Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen wird von ADH katalysiert. Für diese enzymatischen Reaktionen werden Cofaktoren als Elektronenakzeptoren benötigt. In Abhängigkeit vom Cofaktor der ADH werden drei Gruppen unterschieden (Reid und Fewson, 1994). Zur ersten Gruppe gehören die ADH mit den Cofaktoren Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH). ADH können auch andere Cofaktoren benutzen, wie z. B. Pyrrolochinolinchinon (PQQ), wie die zu untersuchende ADH hier in dieser Dissertation. Diese ADH werden zur zweiten Gruppe zusammengefasst. ADH der dritten Gruppe nutzen die prosthetische Gruppe FAD als Cofaktor.

Neben den NAD(P)H-abhängigen ADH sind die PQQ-abhängigen ADH in der Natur weit verbreitet (Reid und Fewson, 1994; Zarnt *et al.*, 2001). Diese Chinoproteine sind entweder löslich oder an einer Membran gebunden und katalysieren die Oxidation verschiedener Alkohole in den Gram-negativen Bakterien. Zu diesen Chinoproteinen gehören z. B. die Methanoldehydrogenasen methylotropher Bakterien (Day und Anthony, 1990). PQQ-abhängige ADH nicht methylotropher Bakterien werden beispielsweise von Bakterien wie *Pseudomonas* (Rupp und Görisch, 1988) und *Gluconobacter* (Matsushita *et al.*, 1994) produziert.

NAD(P)H-abhängige ADH kommen in großer Anzahl bei Tieren, Pflanzen und Bakterien vor. Dieser Gattung Enzyme bilden eine Superfamilie (Jörnvall *et al.*, 1987). Zu der Superfamilie gehören drei Klassen. Die erste Klasse bilden die „long-chain ADHs“, also die langkettigen zinkabhängigen ADH. Diese Enzyme bestehen aus ca. 350 Aminosäuren und bilden Dimere oder Tetramere (Sun und Plapp, 1992) aus. Die „short-chain ADHs“, also die kurzkettigen metallionenunabhängigen ADH mit ca. 250 Aminosäuren bilden die zweite Klasse. Die ADH der dritten Klasse, die eisenabhängigen Alkoholdehydrogenasen (Fe-ADH), bestehen aus über 385 Aminosäuren. Die ADH-E von *E. coli* nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Fe-ADH ein. Das Enzym kann Alkohole und Acetaldehyd oxidieren (Sridhara *et al.*, 1969).

### 1.4.4 Oxidasen

Als Oxidasen bezeichnet man Enzyme, welche die bei der Oxidation eines Substrates freierwerdenden Elektronen mittels FAD oder FMN auf Sauerstoff (O<sub>2</sub>) übertragen. Dabei dient der

Sauerstoff als Elektronenakzeptor und wird zu Wasser (H<sub>2</sub>O) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reduziert. Bekannte Enzyme sind:

- D- und L-Aminosäureoxidasen
- Monoaminoxidasen (MAO)
- Alkoholoxidasen

### 1.4.5 Chinoproteindehydrogenasen

Bereits im Jahr 1960 entdeckte Hauge eine Glucosedehydrogenase von *Bacterium anitratum*, die ohne Zusatz von Pyridinnukleotiden, Flavinnukleotiden oder Hämgruppen die Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) und Phenazinmethosulfat (PMS) bewirkte (Hauge, 1960a; Hauge, 1960b). Diese ungewöhnliche Glucosedehydrogenase wurde in der Folge bezüglich des beteiligten Cofaktors eingehend charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass dieses Enzym eine neue prosthetische Gruppe enthalten musste, deren chemische Natur von Hauge aber nicht aufgeklärt werden konnte (Hauge, 1964). Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erfolgten erst in den 70er Jahren, als der Produktion von Einzellerprotein, der Biogasproduktion und der mikrobiellen Enzymologie durch methylotrophe Bakterien größeres Interesse zugewendet wurde (Duine und Jongejan, 1989a; Duine und Jongejan, 1989b). Mittlerweile waren mehrere Enzyme bekannt, die mit dem künstlichen System PMS und DCPIP reagierten, deren biologische Cofaktoren man aber nicht kannte, beispielsweise Methanoldehydrogenase (Duine *et al.*, 1978), Glucosedehydrogenase (Duine *et al.*, 1979) oder Methylamindehydrogenase (Vellieux *et al.*, 1986).

Für lange Jahre wurde angenommen, dass der gesuchte Cofaktor ein Pterinderivat ist (Anthony und Zatman, 1967). Dies wurde durch die Entdeckung freier, organischer Radikale mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR), die andere Merkmale hatten als Flavin- oder Pterinradikale, widerlegt und es wurde daraufhin eine orthochinoide Struktur vermutet. Mittels NMR- und Massenspektroskopie wurde dann die Struktur des Cofaktors der Methylamindehydrogenase als Methoxatin aufgeklärt. Heute üblich ist der halbsystematische Name Pyrrolochinolinchinon (PQQ) (Duine *et al.*, 1980; Salisbury *et al.*, 1979; Westerling *et al.*, 1979).

In oxidativen Prozessen mit Essigsäurebakterien sind zwei membrangebundene Enzyme gefunden worden. Das erste ist ein Flavoprotein und das zweite ein Chinoprotein. Beide können identische Substrate oxidieren, wobei das Produkt unterschiedlich ausfällt. Beispielsweise produziert die Gluconatdehydrogenase aus *Gluconobacter* 2-Keto-Gluconat, während das Chinoprotein 5-Keto-Gluconat oxidativ bildet (Adachi *et al.*, 2003).

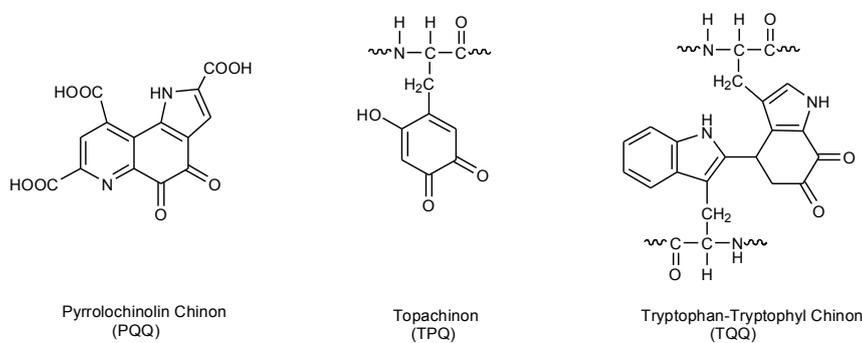
Chinoproteine gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen, die Pyrrolochinolinchinon- (PQQ) oder auch andere Chinon-Cofaktoren wie Topachinon (TPQ), Tryptophantryptophylchinon (TTQ) oder Lysintyrosylchinon (LTQ) enthalten können.

Oxidoreduktasen mit PQQ als Cofaktor sind in der Regel Membranenzyme, während Enzyme mit TPQ, TTQ und LTQ als Cofaktor cytoplasmatische Proteine sind. Chino- und Chinohämoproteine, also Enzyme, die ein Häm c enthalten, wurden als dritte Klasse der Redoxenzyme eingestuft (Matsushita *et al.*, 2002).

## 1.5 Cofaktoren der Chinoproteine

PQQ wird hauptsächlich in Gram-negativen Bakterien gefunden, das Auftreten in Gram-positiven Bakterien ist eher selten. In eukaryotischen Organismen ist es bislang nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Es wurden jedoch andere orthochinoide Cofaktoren entdeckt, die offensichtlich durch Modifikationen von Aminosäuren im Protein gebildet werden (Abb. 6): Topachinon (TPQ) wurde zuerst in Aminooxidasen des Rindes nachgewiesen, wo es an einen Aminosäurerest des Proteinrückgrats gebunden ist. Viele weitere TPQ-haltige Aminooxidasen, die zumeist Kupferatome enthalten, wurden in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Hefen, Pilzen und Pflanzen gefunden. Allen gemeinsam ist die kovalente Bindung des Cofaktors an das Protein.

Des Weiteren wurde in vielen methylo-trophen Bakterien, zuerst in *Methylobacterium extorquens*, der Cofaktor Tryptophantryptophylchinon (TTQ) nachgewiesen. Dieser ebenfalls kovalent an das Proteinrückgrat gebundene Cofaktor hat im Gegensatz zu TPQ jedoch zwei kovalente Bindungen zum Protein (Duine, 1992; McIntire, 1994).



**Abb. 6: Strukturen orthochinoider Cofaktoren, isoliert aus bakteriellen Chinoproteinen**

Mittlerweile gibt es auch präparative Anwendungen von Chinoproteindehydrogenasen. In einer Veröffentlichung von Matsushita wird ausführlich über die Entdeckung neuer Chinoprotein-Enzyme für oxidative Biotransformationen berichtet. Chinoprotein-Enzyme aus Essigsäure-Bakterien (*Acetobacter* sp., *Gluconobacter* sp.) werden seit langem dazu genutzt, durch Fermentationen oder enzymatische Reaktionen verschiedene Alkohole zu Säuren zu oxidieren. Am Beispiel der gereinigten D-Arabitoldehydrogenase aus der Membranfraktion

von *Gluconobacter suboxydans* konnte gezeigt werden, dass mit diesem zellfreien System zahlreiche Oxidationen mit verschiedenen Substraten durchgeführt werden konnten (Matsushita *et al.*, 2002).

Die zellfreie Oxidation von Ethanol zu Essigsäure konnte als enzymatische Zweistufen-Reaktion, katalysiert von einer membrangebundenen Aldehyddehydrogenase (ALDH) und einer Alkoholdehydrogenase (Q-ADH) aus *Gluconobacter* nachgewiesen werden, beide Enzyme sind Chinoprotein-Enzyme (Adachi *et al.*, 2003).

### **Chinoproteine in *Pseudomonas* und *Comamonas***

Die Gattung *Pseudomonas* ist den Gram-negativen Stäbchen zuzuordnen, die Energiegewinnung bei Stämmen dieser Gattung erfolgt aerob durch Atmung und anaerob – im Gegensatz zu *Escherichia coli* – durch Denitrifikation. Die Bakterien können eine große Zahl von Substraten verwerten und sind daher fast überall zu finden. Einige *Pseudomonas*-Arten oxidieren Zucker unvollständig und bilden Zuckersäuren.

Stämme von *Pseudomonas*-Arten produzieren eine Vielzahl von Chinoproteinen. Darunter fallen z. B. Alkoholdehydrogenasen (im Speziellen Ethanoldehydrogenasen) und Glucosedehydrogenasen. So wurden z. B. in *Pseudomonas putida* drei verschiedene Alkoholdehydrogenasen gefunden, wovon zwei eine Häm-Gruppe enthalten (Toyama *et al.*, 1995). Bei allen drei Enzymen ist das PQQ durch Dialyse abtrennbar, so dass das Apoenzym erhalten werden kann. Weitere Alkoholdehydrogenasen wurden in *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas* sp. BB1, *P. aeruginosa* und *Comamonas testosteroni* gefunden. Zumeist handelt es sich hierbei um Monomere zwischen 60 und 100 kDa, die als Holoenzym vorliegen, aber es wurden auch Dimere und Apoenzyme (de Jong *et al.*, 1995; Groen *et al.*, 1986; Mutzel und Goerisch, 1991) entdeckt. Oftmals besitzen die Alkoholdehydrogenasen eine breite Substratspezifität und können somit verschiedene Alkohole gut umsetzen (Shimao *et al.*, 1984; Görisch und Rupp, 1989; Groen *et al.*, 1984; Rupp und Görisch, 1988; Schrover *et al.*, 1993; van den Tweel und de Bont, 1985). Die in *Pseudomonas* enthaltenen Glucosedehydrogenasen besitzen ein breites Substratspektrum und sind daher auch als Aldosedehydrogenase zu bezeichnen. Das monomere Enzym hat ein Molekulargewicht von 90 kDa (Hardy *et al.*, 1993; Ameyama *et al.*, 1978; Matsushita und Ameyama, 1982; Matsushita *et al.*, 1980; van Schie *et al.*, 1984).

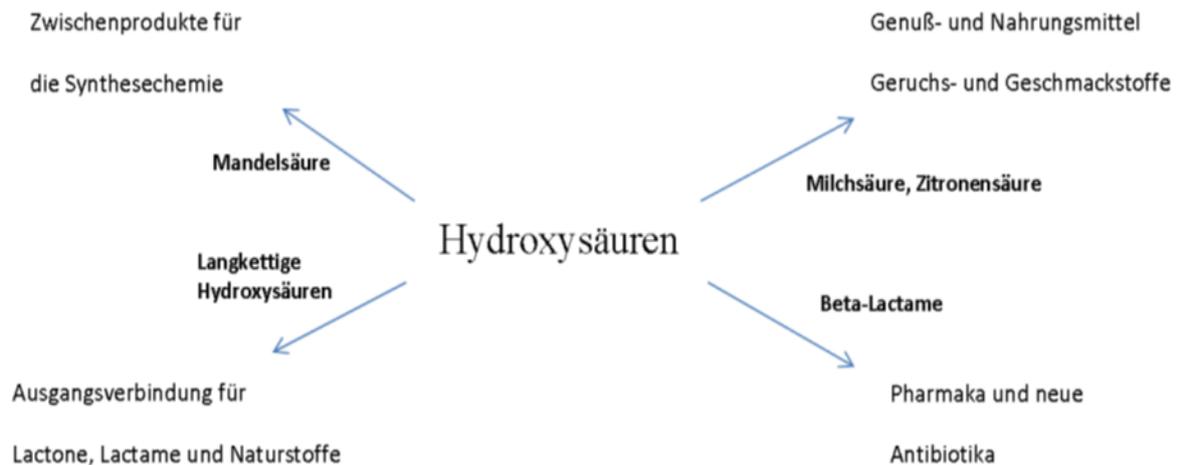
## **1.6 Wirtschaftliche Bedeutung von enantiomerenreinen Hydroxysäuren und Alkoholen**

Wie bereits erläutert, gewinnen Enzyme auch in der organischen Synthese zunehmend an Bedeutung (Zaks, 2001). Innerhalb der industriell genutzten Biokatalysatoren kommt den Dehydrogenasen dabei in den letzten Jahren eine stärkere Bedeutung zu (Carrera *et al.*, 1996).

So stellen Dehydrogenasen ideale Biokatalysatoren für asymmetrische Synthesen chiraler, enantiomerenreiner Substanzen aus prochiralen Vorstufen dar (Hummel und Kula, 1989; Hummel *et al.*, 2009).

Einsatzgebiete sind derzeit vor allem die Produktion von Pharmazeutika, Feinchemikalien und Lebensmittelzusatzstoffen, wie in der Abb. 7 dargestellt (Bommarius *et al.*, 1994). Kommerzielle und aus der Forschung gewonnene Enzyme wie zum Beispiel Alkoholdehydrogenasen, Phenylalanindehydrogenase (Hummel, 1997), D- oder L-Lactatdehydrogenasen oder D-Hydroxyisocaproinsäuredehydrogenasen (Lerch *et al.*, 1989) wurden für die Präparation von optisch aktiven Substanzen mit Erfolg eingesetzt (Hanson *et al.*, 2000).

Enantiomerenreine Hydroxysäuren und Alkohole werden als chirale Bausteine in der organischen Synthese eingesetzt. Gezielt werden Hydroxysäuren als chirale Bausteine für Pharmaka wie Homatropin, Antibiotika, Lactame, Lactone, Geruchs- und Geschmackstoffe eingesetzt. Chirale Alkohole, Hydroxysäureester oder auch Diole, die alle mit Alkoholdehydrogenasen herstellbar sind, finden ebenfalls einen breiten Einsatz als Bausteine: Diole beispielsweise für die Kettenverlängerung von chiralen Zuckermolekülen im Bereich der pharmazeutischen Zuckerchemie und als chirale OH-Träger für Synthesebausteine der chiralen Zuckerchemie in der pharmazeutischen und der Lebensmittelchemie. Allgemein haben enantiomerenreine Hydroxysäuren vielfältige Anwendungen in der chemischen Industrie.



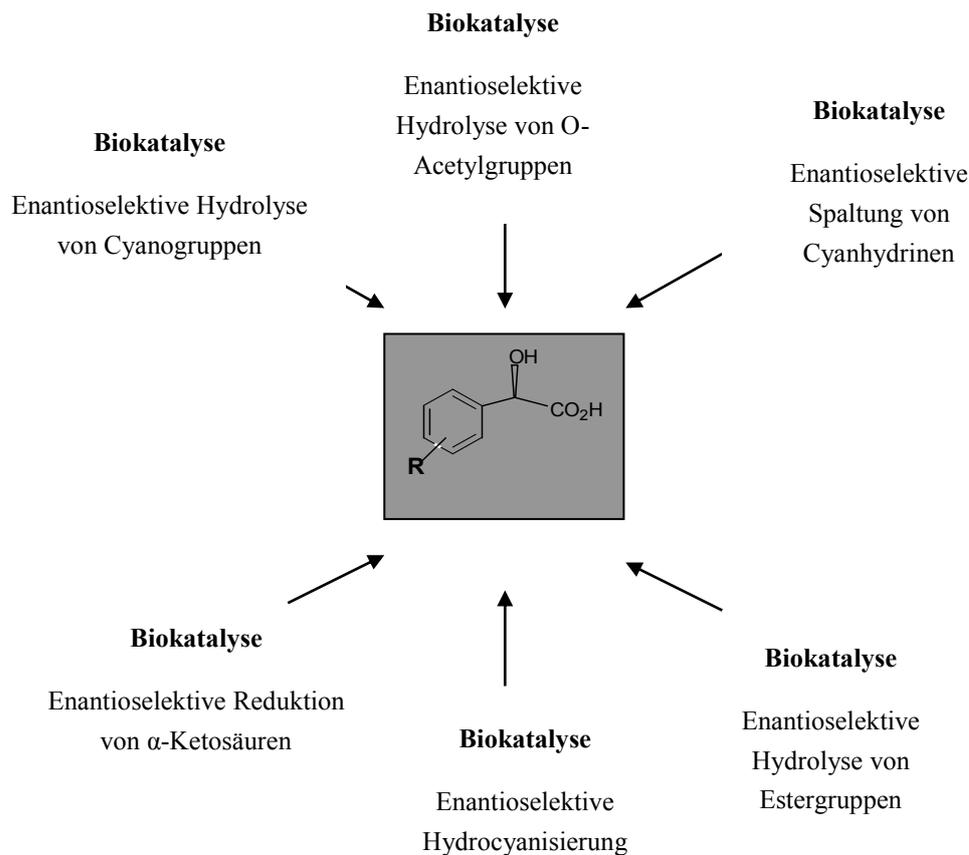
**Abb. 7: Industrielle Anwendung der enantiomerenreinen Hydroxysäuren**

In der pharmazeutischen Industrie besteht ein großes Interesse an enantiomerenreinen Hydroxysäuren zur Herstellung von semisynthetischem Penicillin, Cephalosporin etc. Zur Synthese von chiralen Alkoholen werden sowohl Racemattrennverfahren, häufig mit Lipasen katalysiert, als auch asymmetrische Reduktionen von Ketonen mit Dehydrogenasen eingesetzt.

Einsatzgebiete für chirale Alkohole sind vor allem die Produktion von Pharmazeutika, Feinchemikalien und Lebensmittelzusatzstoffen (Drauz *et al.*, 1994; Gröger *et al.*, 2012).

## 1.7 Enzymatische Wege zur Darstellung von aromatischen $\alpha$ -Hydroxysäuren

Einige enzymatische Syntheseprozesse sind bereits in den vorigen Unterkapiteln vorgestellt worden. Grundsätzlich kann man die enzymatischen Routen zur Gewinnung von enantiomerenreinen aromatischen  $\alpha$ -Hydroxysäuren wie folgt darstellen

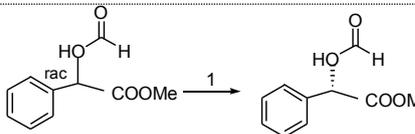
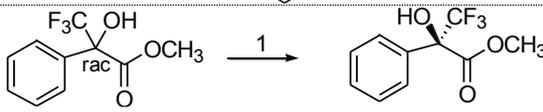
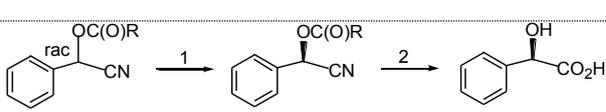
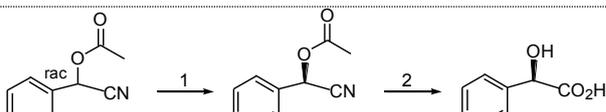
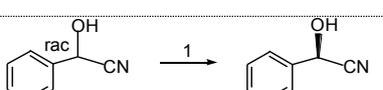
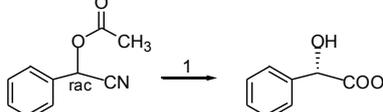
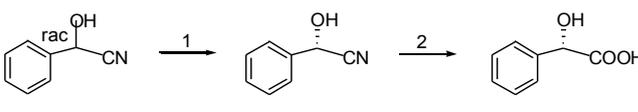


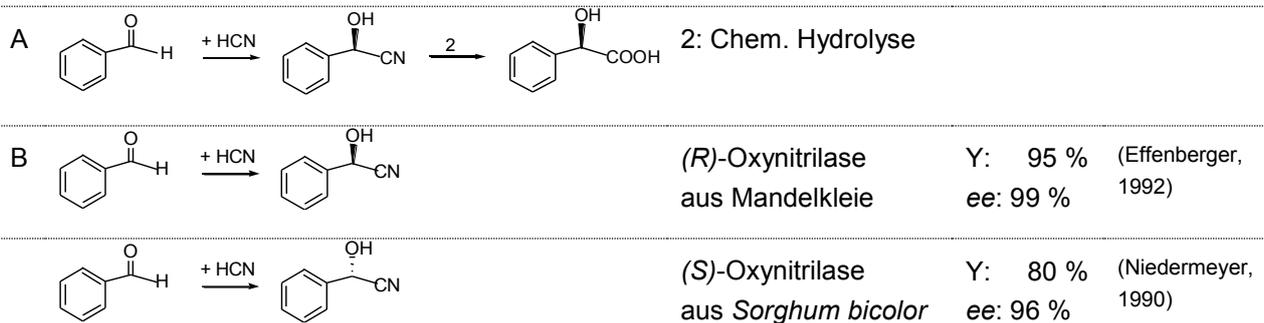
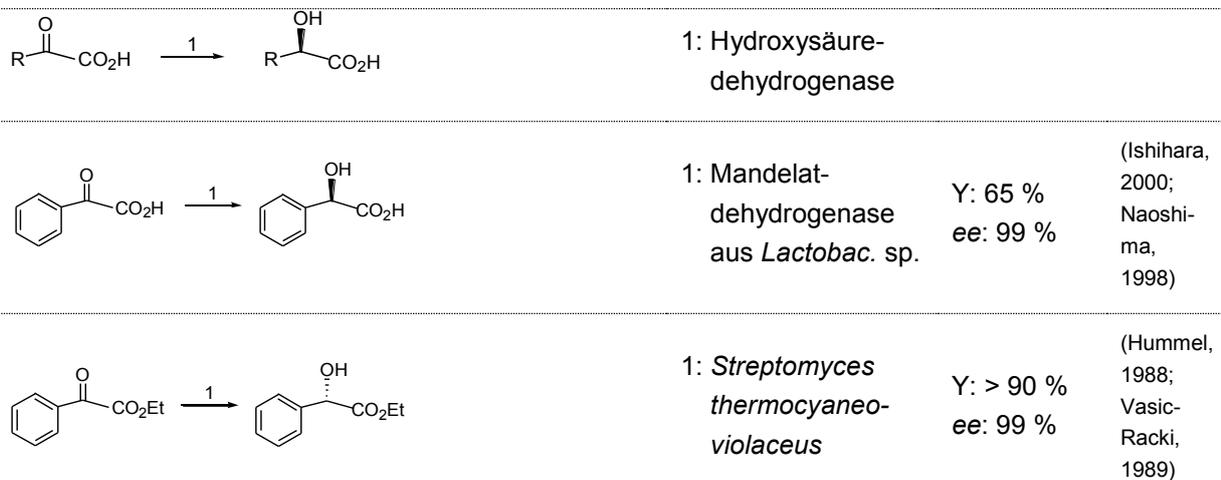
**Abb. 8: Biokatalyse zur asymmetrischen und enantioselektiven Gewinnung von Hydroxysäuren**

Eine wichtige Klasse der enantiomerenreinen chemischen Verbindungen, die eine breite Anwendung in der chemischen und der Pharmaindustrie haben, sind optisch reine  $\alpha$ -Hydroxysäuren, speziell Mandelsäure und deren Derivate. In Abb. 8 sind verschiedene enzymatische Synthesewege dargestellt, die auch industriell ihre Anwendung finden (Gröger, 2001). Da optisch reine (*R*)-Mandelsäure ein wichtiger Baustein der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und ein wichtiges Zwischenprodukt in der chemischen und pharmazeutischen Industrie ist, ist die industrielle Produktion von großer Bedeutung. Traditionelle chemische Synthesen von (*R*)-Mandelsäure verlaufen über die Nutzung von metallorganischen Katalysatoren. Dazu sind

umfangreiche Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen publiziert, beispielsweise von Shibasaki *et al.*, Inoue *et al.*, Carpentier *et al.*, Agbossou *et al.* (aus Gröger, 2001). Die verschiedenen enzymatischen Synthesewege für die enantioselektive Herstellung von Mandelsäure werden in nachfolgendem Schema (Tab. 2) dargestellt:

**Tab. 2: Übersicht zu literaturbeschriebenen enzymatischen Wegen zu aromatischen  $\alpha$ -Hydroxysäuren (A = Reaktionsprinzip; B = Konkrete Beispiele)**

Reaktionsroute	Enzyme	Ausbeute/ ee-Wert	Lit.
<b>Enzymatische Hydrolyse</b>			
A 	1: Esterase / Lipase / Amidase		
B 	1: Penicillin-Amidase	Y: 50 % ee > 98 %	(Fuganti, 1992; Wong, 1990,)
	1: <i>Aspergillus oryzae</i> Protease	Y: 40 % ee > 88 %	(Moorlag, 1991)
<b>Biokatalytische Transesterifizierung</b>			
A 	1: O-Deacetylase 2: Chem. Hydrolyse		
B 	1: <i>Pseudomonas</i> - Esterase	Y: 42 % ee > 98 %	(van Almsick, 1989)
<b>Enzymatische Hydrolyse der Cyano-Gruppe</b>			
A 	1: Nitrilhydratase		
B 	1: <i>Rhodococcus</i> sp.	Y: 57 % ee > 98 %	(Wang, 2000)
	1: ( <i>R</i> )-Oxynitrilase aus Mandelkleie	Y: 44 % ee: 96 %	(Matcham, 1994; Ress- Loeschke, 2000)
Reaktionsroute	Enzyme	Ausbeute /ee-Wert	Lit

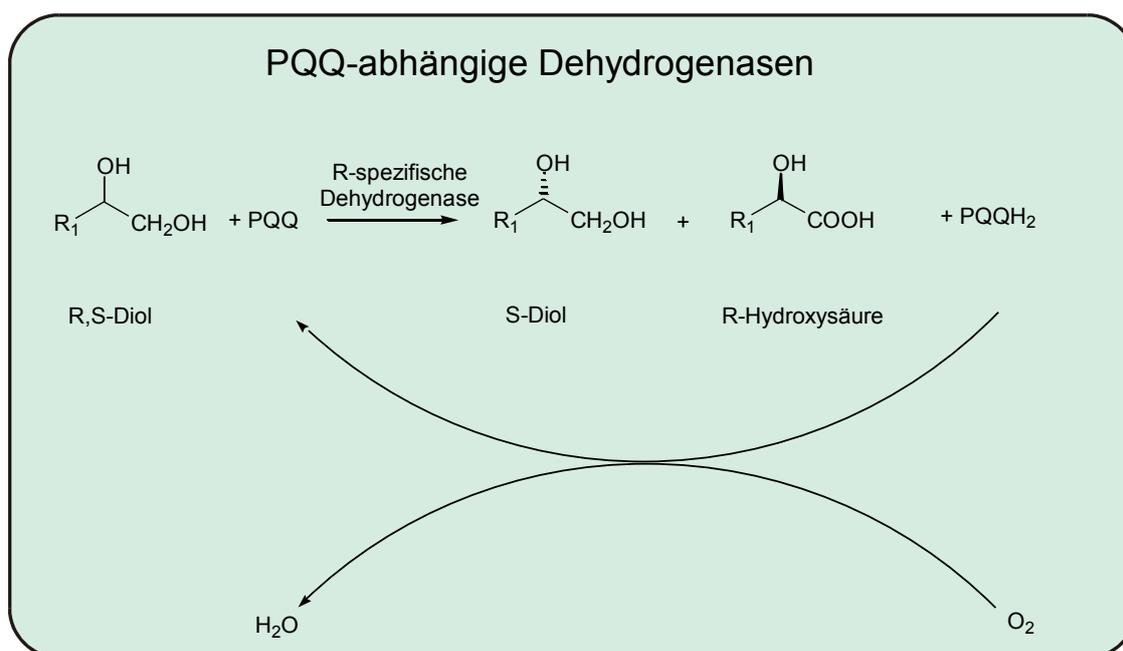
**Biokatalytische Hydrocyanierung****Enantioselektive Reduktion der Ketosäure****1.8 Aufgabenstellung**

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung und biochemische Charakterisierung einer PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase aus einem Stamm *Pseudomonas* sp. Um das biotechnologische Potential dieses Enzyms bewerten zu können, soll vorrangig das Substratspektrum dieses Enzyms erstellt werden. Neben der Anwendung für die selektive Oxidation von Alkoholen sollen komplexere chemoenzymatische Reaktionen untersucht werden, wie z. B. die Herstellung von chiralen Zuckerbausteinen oder die Kopplung mit einer Organometallkatalyse. Bei der Umsetzung von schlecht wasserlöslichen Verbindungen können zur Reaktionsoptimierung und Erzielung höherer Ausbeuten eines Enantiomers auch Zweiphasenreaktionen in Betracht gezogen werden. Diese haben den Vorteil, dass auf komplizierte technische Varianten wie die Verwendung von Zweikammersystemen oder die Trennung durch Filtersysteme verzichtet werden kann.

In Vorversuchen konnte ein *Pseudomonas*-Stamm isoliert werden, der in der Lage ist, aus dem Racemat von Diolen enantioselektiv ein Enantiomer zur Säure zu oxidieren.

In dieser Dissertation soll die Oxidation von Alkoholen zu chiralen Hydroxysäuren als Racematspaltung beschrieben und es sollen die Vor- und Nachteile der Verwendung von PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenasen für diesen Zweck aufgezeigt werden (Abb. 9). Ein wichtiger Aspekt ist die Cofaktor-Regenerierung, die aufgrund des Redoxpotenzials von PQQ mit Hilfe von Sauerstoff möglich sein sollte. Damit ist, anders als beim NAD(P)H, keine zusätzliche externe Coenzym-Regenerierung erforderlich.

Das allgemeine Reaktionsschema für die Gesamtreaktion wird in folgender Abbildung gezeigt:



**Abb. 9: Die Oxidations- und Cofaktor-Regenerationsreaktion zur Racematspaltung von Diolen zu Hydroxysäuren mit Hilfe einer PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase**

Bei der Ruthenium-katalysierten Transferhydrierung setzt eine schnelle Racemisierung von sekundären Alkoholen am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom ein. Des Weiteren soll im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, eine Kopplung dieser Reaktion mit einem Rutheniumkatalysator für die Oxidation von sekundären Alkoholen zu Ketonen zu erreichen. Ein solcher Katalysator ist von der Arbeitsgruppe von Bäckvall beschrieben. Durch diese Ruthenium-katalysierte Transferhydrierung wird eine schnelle Racemisierung von sekundären Alkoholen am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom ermöglicht.

Die Schwerpunkte dieser Dissertation umfassen:

1. Isolierung und Charakterisierung der PQQ-abhängigen ADH aus *Pseudomonas* sp.
2. Aufnahme eines Substratspektrums mit dem unbehandelten und partiell gereinigten Enzym
3. Nachweis und Einsatz des intermediär gebildeten Aldehyds; dieser Aldehyd soll in einer gekoppelten Reaktion zur Herstellung chiraler Zuckerbausteine verwendet werden.

4. Cofaktoraustausch zur Optimierung der Cofactorregeneration und Einsatz unterschiedlicher Cofaktoren alternativ zu PQQ
5. Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidationsreaktion durch ein Begasungssystem
6. Nachweis der (*R*)-Mandelsäure und weiterer möglicher Hydroxysäuren resultierend aus der Analyse der Substratspektren
7. Erhöhung der Ausbeute von (*R*)-Mandelsäure durch Racemisierung des (*S*)-Diols mit einem Ru-Katalysator in einem Eintopf-Zweiphasensystem

## 2 Material, Geräte und Methoden

### 2.1 Material und Geräte

#### Geräte

##### **Analytik**

Spektrophotometer UV-VIS 160A & UV-1602	Shimadzu
Spektrophotometer UV-VIS	Pharmacia Biotech
Gaschromatograph GC-17A & GC-9A	Shimadzu
GC/MS HP 5973	Hewlett-Packard
FTIR-Spektrometer	Hewlet Packard
Aminosäure Analysator	Shimadzu
HPLC (Gina 50, M 480, UVD 170S, DG 1310)	Gynkotek
NMR	Bruker

##### **Chromatographie**

FPLC	Pharmacia Biotech
Biocad-Sprint Perfusion Chromatography System	Applied Biosystems
Viva Spins	Sartorius
Ultrafiltrationszelle Modell 8050, 8010	Amicon
Microcon 10 kDa	Millipore

##### **Elektrophorese**

DNA Elektrophoresekammer GT System	Bio-Rad
NuPAGE® XCell <i>SureLock</i> ini Cell mit	
NuPAGE® Bis-Tris Gelen	Invitrogen
NuPAGE® XCell II TM Blot Module	Invitrogen
Model 491 Prep Cell	Bio-Rad

##### **Disintegration**

Schwingkugelmühle MM2000	Retsch
Desintegrator S	IMA
Sonopuls HD 60	Bandelin Electronic

##### **Zentrifugen**

Du Pont Instruments Sorvall RC-5B	Kendro
Rotina 35R	Hettich
Speedvac Univapo 150H	Uniequip
Eppendorf-Zentrifuge 5415 C	Eppendorf

### **Geräte für chemische Synthesen**

Digitalthermometer	IKA
Reaktionskammer (Eng- und Breithals)	Schott
Dosierungsgerät	Dräger
Glasgeräte für organische Synthese	Schott
Rotationsverdampfer	IKA
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf
Sauerstoffsensor	WTW
Dosierungsgerät	B. Braun

### **Chemikalien**

Alle nicht aufgeführten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von analytischer Qualität (p. a.) und wurden in der Regel von Fluka, Sigma, Roth oder Merck bezogen.

Nährmedienbestandteile waren von Merck oder Difco, die Coenzyme wurden von Fluka, Sigma-Aldrich und Merck bezogen.

Racemische Dirole	Fluka/Sigma-Aldrich
Organische Alkohole	Fluka/Sigma-Aldrich
Enantiomerenreine Alkohole	Fluka/Sigma-Aldrich
Racemische Hydroxysäuren	Fluka/Sigma-Aldrich
Enantiomerenreine Hydroxysäuren	Fluka/Sigma-Aldrich
Racemische Aminoalkohole	Fluka/Sigma-Aldrich
Enantiomerenreine Aminoalkohole	Fluka/Sigma-Aldrich
Enantiomerenreine organische Säuren	Fluka/Sigma-Aldrich
Racemische Ketale	RWTH Aachen
Ruthenium-Shvo-Katalysator	Universität Stockholm
Cofaktoren	Degussa/Sigma-Aldrich
Org. Lösemittel	Roth/Fluka/Sigma-Aldrich

**Racemische Alkohole, Ketale und Hydroxysäuren**

1-Phenyl-1,2-ethandiol (PED)	Fluka/Sigma-Aldrich
1-Phenyl-1,3-propandiol	Fluka/Sigma-Aldrich
3-Buten-1,2-diol	Fluka/Sigma-Aldrich
Propylenglycol	Fluka/Sigma-Aldrich
2-Methoxy-2-phenylethanol	Fluka/Sigma-Aldrich
2-Phenylpropanol	Fluka/Sigma-Aldrich
Solketal	RWTH Aachen
2,2-Diethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	RWTH Aachen
2-Cyclopentan-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	RWTH Aachen
Mandelsäure	Fluka/Sigma-Aldrich

**Enantiomerenreine Alkohole und Hydroxysäuren (R) oder/und (S)**

1-Phenyl-1,2-ethandiol	Fluka/Sigma-Aldrich
1-Phenyl-1,3-propandiol	Fluka/Sigma-Aldrich
3-Buten-1,2-diol	Fluka/Sigma-Aldrich
2-Methoxy-2-phenylethanol	Fluka/Sigma-Aldrich
2-Phenylpropanol	Fluka/Sigma-Aldrich
Mandelsäure	Fluka/Sigma-Aldrich

**Mikroorganismen**

Stämme wurden von der „Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen“ bezogen, bei *Pseudomonas* sp. handelt es sich um ein Bodenisolat.

**2.2 Mikrobiologische Methoden****2.2.1 Verwendete Organismen**

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Isolierung und Charakterisierung der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase (Q-ADH) das Bakterium *Pseudomonas* sp. (PE1) verwendet. Der Organismus wurde im Rahmen eines mikrobiellen Screenings aus Bodenisolat gefunden.

## 2.2.2 Anzucht von Mikroorganismen und Medien

### Medien

Für die Kultivierung von *Pseudomonas* sp. wurde ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

- Anzuchtmedium (g/L):
 

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,52
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,00
pH-Einstellung	7,0
- Calcium-Magnesiumlösung (g/L):
 

CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	50
- HVK-Spurenelementenlösung (Menge/L)
 

Titriplex I	10 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	14,45 g
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	3,33 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,01 g
Metallionenlösung	50 mL
pH-Einstellung auf 6,6	
- Flüssigmedium (mL/L)
 

Anzuchtmedium	960
Ca-Mg-Stammlösung	10
HVK-Spurenelementelösung	20
Ethanol abs.	10

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

Alle Medien wurden bei 121°C getrennt für 20 min autoklaviert. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten des Flüssigmediums unter sterilen Bedingungen vereinigt.

### Kultivierung von *Pseudomonas* sp. (PE1)

- Vorkultur:

400 mL Flüssigmedium (500-mL-Erlenmeyerkolben) wurden mit 2 mL einer Konserve von *Pseudomonas* sp. angeimpft und bei 22°C auf einem Schüttler (Infors) mit 110 rpm für 72 h angezogen.

- Hauptkultur:

2 L Flüssigmedium (5-L-Erlenmeyerkolben) wurden mit 200 mL Vorkultur beimpft und bei 22°C mit 120 rpm für 19 h angezogen. Danach wurden die bewachsenen Medien bei 9000 rpm für 20 min abzentrifugiert und die Zellmasse bei –20°C gelagert.

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Reinigung und Charakterisierung von Q-ADH aus *Pseudomonas* sp.**

#### **2.3.1.1 Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung von *Pseudomonas* sp.**

Als Ausgangsmaterial dienten Zellen, die bei –20°C gelagert waren. Es wurde eine 40%-ige Zellsuspension mit Aufschlusspuffer (KPi-Puffer pH 7,5) hergestellt. Zu dieser Suspension wurde die doppelte Menge an Glasperlen ( $\varnothing$  0,3 mm) hinzugegeben und 30 min in einer Retschmühle (mit vorgekühltem Behälter) aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 50 min bei 17 000 rpm (Sorvall Zentrifuge, GS-A Rotor, 4°C) abzentrifugiert. Der rotgefärbte, trübe und zähflüssige Rohextrakt wurde dann abdekantiert und es wurden wenige  $\mu$ L DNase-Enzym zur Verflüssigung des zähflüssigen Extrakts hinzugegeben. Nach etwa 30 min war eine klare rote Flüssigkeit für den Reinigungsprozess vorhanden.

##### *2.3.1.1.1 Aufschluss mit der Retsch-Schwingmühle*

Für Aufschlüsse im Bereich von 5 bis ca. 50 g Zell-Feuchtmasse kann vorteilhaft der Desintegrator-S verwendet werden. Für den kleineren Maßstab (1 bis ca. 10 g) bietet sich die Schwingmühle der Fa. Retsch an. Hier wurden regelmäßig 6 g Zellen in 30 Minuten mit diesem Gerät aufgeschlossen. Dazu wurde vorab die Aufschlusszeit für diesen Organismus optimiert.

#### **Aufschlussbedingungen**

Es wird ein 40%-iger Aufschluss von PE1-Zellen durchgeführt: Der Ansatz beinhaltet pro Gefäß 3 g Zellen, 5 mL KPi-Puffer 0,1 M pH 7,5 und 16 g Glasperlen (0,3 mm). Die Gefäße werden 15 Minuten vor dem Befüllen im Gefrierschrank gekühlt. Die Schwingleistung der Retschmühle beträgt 100 %. Nach 30 min Aufschlusszeit wird die Suspension für 50 Minuten bei 17 000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach der Trennung wird der Überstand mit 2 $\mu$ L DNase versetzt und nach einigen Minuten kann der Rohextrakt für Umsetzungen bzw. den Aktivitätstest verwendet werden.

### 2.3.1.2 Chromatographische Methoden

Zur Reinigung der Q-ADH wurden verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt.

#### 2.3.1.2.1 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie und die Flüssigkeitschromatographie werden als Niederdruckchromatographie betrieben. Als Säulenfüllmaterial können z. B. Cellulose, Agarose, Polystyrol etc. und ihre Derivate benutzt werden. Zum Eluieren können verschiedene Lösungsmittel, Lösungsmittelgemische und Pufferlösungen verwendet werden. Die Eluenzien können mit verschiedensten Zusätzen versetzt werden, die die Trennung günstig beeinflussen oder die zu trennenden Stoffe stabilisieren.

Das Kernstück in der Säulenchromatographie ist die Säule, ein Rohr aus Glas. Dieses enthält das Säulenfüllmaterial, das von zwei verstellbaren Stempeln gehalten wird. Die Stempel sind oben und unten am Rohr angebracht und so konstruiert, dass das Totvolumen minimiert wird. Zum Chromatographiesystem gehören weiterhin eine Pumpe, ein Durchflussmonitor, der mit einem Schreiber verbunden ist, ein Fraktionssammler und ein Gradientenmischer. Meistens werden selbstgepackte Säulen verwendet. Entscheidend für die chromatographische Trennung ist die Säulenpackung. Wichtig ist die Homogenität des Füllmaterials, d. h. eine luftblasenfreie Packung. Deshalb wird das voräquilibrierte Säulenmaterial gut verrührt, mittels Wasserstrahlvakuum unter leichtem Rühren entgast und in eine mit wenig Puffer gefüllte Säule gegossen. Nach einer längeren Absetzphase wird die Säule mit dem oberen Stempel verschlossen und mit dem Äquilibrierpuffer gespült. Nach dem Auftragen der Probe werden die zu trennenden Verbindungen durch das Spülen der Säule eluiert.

Die Flüssigkeitschromatographie verwendet unterschiedliche Trennprinzipien

- Trennung nach Hydrophobizität (Hydrophobe Interaktionschromatographie)
- Trennung nach Ladung (Ionenaustauschchromatographie)
- Trennung aufgrund der Molekülgröße (Gelfiltration)
- Trennung nach der Ligandenbindungspräferenz (Affinitätschromatographie)
- Trennung durch Verteilung (Adsorptionschromatographie)

#### **a. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**

Die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren lagern sich bei den Proteinen zusammen und bilden hydrophobe Bereiche auf der Moleküloberfläche. An diesen treten Interaktionen mit anderen Molekülen auf. Hydrophobe Chromatographie wird mit Hilfe einer Kopplung von unpolaren Alkylresten (Methyl-Octylrest) oder Arylresten (Phenylrest) an Agarose oder Sepharose durchgeführt. Durch den salzhaltigen Puffer werden die Hydrathüllen der Proteine zerstört und die hydrophoben Aminosäuren der Proteine treten in Interaktion mit den unpolaren Gruppen der Matrix.

Die Bindung an eine HIC-Matrix ist abhängig von der hydrophoben Natur des Proteins und dem Substitutionsgrad der Matrix. Je hydrophober das Protein und je länger die Alkylkette ist, umso stärker ist die Bindung. Stark abhängig ist der hydrophobe Effekt von der Art und der Konzentration des gelösten Salzes im Puffer. Je höher die Salzkonzentration ist, umso fester ist die Bindung. Die Bindung des Proteins erfolgt mit einem salzhaltigen Puffer, die Elution dagegen mit einem linear abfallenden Gradienten zum salzarmen Puffer.

- Matrix: Phenylsepharose Cl 4 B
- Bettvolumen: 28 mL
- Auftragspuffer: KPi, pH 7,5 + x M NaCl
- Elutionspuffer: 0,1 M KPi-Puffer
- Flussgeschwindigkeit: 1 mL/min
- Elution: Gradient 0→100 % Elutionspuffer

Die für die hydrophobe Chromatographie benötigten Lösungen wurden vorab entgast (Wasserstrahlvakuum). Da der Rohextrakt sehr zähflüssig war, wurde diesem DNase zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 0°C wurde 3 Minuten in der Tischzentrifuge bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und über einen Papierfilter (Macherey-Nagel) filtriert. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde der Rohextrakt 1:2 mit Auftragspuffer versetzt. Die Salzkonzentration des Auftragspuffers wurde variiert (1,5 M – 3,0 M NaCl). Die Säule wurde mit dem 10-fachen (mindestens 5-fachen) Säulenvolumen an Auftragspuffer äquilibriert. Die aufgetragene Probe wurde mit 100 mM KPi-Puffer eluiert. Nach beendetem Säulenlauf musste die Säule regeneriert werden. Dies erfolgte durch Spülen mit Elutionspuffer (5-faches Säulenvolumen), anschließendes Spülen mit 6 M Harnstoff und letztendliches Einlagern in 20%-igem Ethanol (entgast).

Die gesammelten Fraktionen (zu 3 mL) wurden für den Enzymtest weiterverwendet. Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch.

### **Enzymtest**

Puffer: KPi 0,1 M pH 7,5		33,5 µL
PED-Stammlösung	20,00 mM	80,0 µL
PQQ-Stammlösung	3,24 mM	37,5 µL
Nickelchlorid-Stammlösung	12,50 mM	24,0 µL
Fraktion		125,0 µL
Gesamtvolumen		300,0 µL

### **b. Ionenaustauschchromatographie**

Ionenaustauschmaterialien enthalten positiv oder negativ geladene Gruppen, die an eine feste Matrix gebunden sind. Weit verbreitet ist der Einsatz von Materialien auf Dextran Polystyrol und Cellulosebasis. Die größte Bedeutung bei biochemischen Untersuchungen haben von den Anionenaustauschern die Diethylaminoethyl- (DEAE-) Cellulose und von den Kationenaustauschern die Carboxymethyl- (CM-) Cellulose gewonnen.

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung von gelösten positiv oder negativ geladenen Teilchen mit einer entgegengesetzt geladener fester Matrix. Bei der Anionenaustauschchromatographie liegen die positiv geladenen Gruppen der Matrix gepaart mit einem Gegenion vor. Unter Austausch des Gegenions kann ein negativ geladenes Molekül vom Ionenaustauscher gebunden werden. Analog funktioniert der Kationenaustauscher, der negativ geladene Gruppen enthält und als Gegenion ein Kation aufweist, welches gegen ein positiv geladenes Molekül ausgetauscht wird.

Nach dem Ionenaustausch sind die Moleküle an die Matrix gebunden, je nach Affinität und Konzentration unterschiedlich stark. Zum Ablösen der Proteine wird die elektrostatische Bindung an die Matrix geschwächt. Dies erfolgt durch Zugabe von Salz. Mit steigender Salzkonzentration werden zuerst die schwächer, dann die stärker gebundenen Moleküle von der Säule verdrängt. Anstelle von Ionenstärkegradienten können auch pH-Gradienten zur Elution verwendet werden. Die Empfindlichkeit der Proteine gegenüber großen pH-Schwankungen lässt diese Elutionsmöglichkeit jedoch nicht oft zu.

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit einem starken Anionenaustauscher (Q-Sepharose FF, Pharmacia) und einem starken Kationenaustauscher (S-Sepharose FF, Pharmacia) durchgeführt. Vorab wurden alle verwendeten Puffer, Lösungen und Chromatographiematerialien entgast. Der Rohextrakt wurde filtriert und anschließend mit DNase versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge für 3 Minuten, 13 000 rpm). Der abgenommene Überstand wurde auf die Säule aufgetragen (Auftragsvolumen 2 mL). Die Säulen wurden mit dem Auftragspuffer (5-faches Säulenvolumen) äquilibriert. Die Proteine wurden mit einem Salzgradienten (zunehmende Salzkonzentration) eluiert. Regeneriert wurde die Säule durch Spülen mit 1 M Natronlauge, Auftragspuffer und 50%-iger Essigsäure (jeweils 5-faches Säulenvolumen). Aufbewahrt wurde die Säule in 20 % Ethanol.

- Gelmaterial: Q-Sepharose FF / S-Sepharose FF
- Bettvolumen: 3 cm<sup>3</sup>
- Auftragspuffer: 50 mM KPi pH 7,5 + 0,5 mM Nickelchloridhexahydrat
- Elutionspuffer: Auftragspuffer + 1 M NaCl

Die Fraktionen wurden für die gaschromatographische Bestimmung der Enzymaktivität nach Vorschrift weiter behandelt.

### **Hydroxylapatit**

Hydroxylapatit ist eine spezielle Variante von Calciumphosphat und fungiert als bifunktionaler Ionenaustauscher. Es kann über  $\text{Ca}^{2+}$  mit negativ geladenen Molekülen und über Phosphationen mit positiv geladenen Molekülen interagieren. Die relative Bindungsaffinität für verschiedene Proteine scheint eine Funktion der Ladungsdichte an der Oberfläche der Proteine, des Masse-Ladungsverhältnisses sowie der dreidimensionalen Anordnung zu sein. Die Proteine werden im Allgemeinen bei neutralem pH in einem Phosphatpuffer niedriger Ionenstärke an Hydroxylapatit absorbiert. Die Elution erfolgt mit zunehmender Ionenstärke. Ein Nachteil dieses Austauschmaterials ist die mechanische Instabilität, so dass die Flussrate nicht zu hoch sein darf. Außerdem bildet sich durch  $\text{CO}_2$ -Reaktionen leicht Carbonat, welches die Säulenoberfläche verkrustet.

- Säulenmaterial: Hydroxylapatit (Bio-Rad); Bindungskapazität 15 mg/mL
- Äquilibrierpuffer: 10 mM KPi pH 7,5
- Elutionspuffer: 400 mM KPi pH 7,5
- Säulenvolumen: 5 mL
- Flussrate: 1 mL/min

Die Chromatographie mit Hydroxylapatit wurde an einer FPLC- (Fast Protein Liquid Chromatography-)Anlage (Pharmacia) durchgeführt. Die Säule wurde mit Äquilibrierpuffer 10 min gespült. Anschließend wurden 2 mL Rohextrakt auf die Säule aufgetragen und mit 400 mM KPi pH 7,5 eluiert. Regeneriert wurde die Säule durch Spülen mit 0,4 M Phosphatpuffer und 6 M Harnstoff. Eingelegt wurde die Säule in 20 % Ethanol. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Enzymaktivität überprüft.

### **Keramisches Hydroxylapatit**

Das keramische Hydroxylapatit „Makro-Prep“ von Bio-Rad ist eine andere Form des Hydroxylapatit. Es besteht aus sphärischen makroporösen Perlen und wird durch Sintern der Hydroxylapatitkristalle hergestellt. Es ist ein sehr widerstandsfähiges und langlebiges Material und erlaubt hohe Flussraten. In der Trennleistung ist es dem kristallinen Hydroxylapatit überlegen. Es wurde eine Säulenchromatographie mit dem keramischen Hydroxylapatit durchgeführt. Die Bedingungen der Versuchsführung waren mit denen des kristallinen Hydroxylapatit identisch. Die Fraktionen wurden für den Enzymtest verwendet.

### **Tentakel-Ionenaustauschchromatographie**

Bei Tentakel-Ionenaustauschern sind die funktionalen Gruppen über lineare Polymerketten auf der Säulenoberfläche verankert. Sie werden durch geringe Konzentration von Gegen-

ionen, die im Puffer vorliegen, kompensiert. Der Austausch findet mit den schwach gebundenen Gegenionen statt. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften der Tentakel treten keine Wechselwirkungen der Proteine mit der Trägermatrix auf. Die frei beweglichen Polymerketten der Tentakel passen sich der Proteinstruktur an. Durch die hohe Anzahl der Liganden, die sich an einem Tentakel befinden, ist die Bindungskapazität sehr groß. Die Proteine werden bei niedrigen Salzkonzentrationen an eine entsprechend geladene Gruppe gebunden. Mit ansteigendem Salzgradienten erfolgt die Desorption der Proteine von der Salzsäule.

Um eine Reinigung der Q-ADH zu erzielen, wurde die Säulenchromatographie mit einem starken Anionenaustauscher (Fraktogel EMD-TMAE 650 (M)) durchgeführt.

- Säulenmaterial: Fraktogel EMD-TMAE 650 (M) (von Merck)
- Säulenvolumen: 5 mL
- Äquilibrierpuffer: 20 mM KPi pH 7,0
- Elutionspuffer: 20 mM KPi pH 7,0 + 1 M NaCl
- Probevolumen: a) 7 mL      b) 2,5 mL
- Flussrate: 1 mL/min

Der filtrierte Rohextrakt (30%-iger Aufschluss) wurde erst mit DNase versetzt, bevor er auf die äquilibrierte Säule aufgetragen wurde. Eluiert wurde mit einem Salzgradienten. Die Regenerierung erfolgte durch Spülen mit Puffer und 6 M Harnstoff (jeweils 5-faches Säulenvolumen). Die Fraktionen, die zu 3 mL gesammelt wurden, konnten für den Enzymaktivitätsnachweis gaschromatographisch analysiert werden.

### **c. Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße voneinander getrennt. Als Trägermaterialien dienen kleine, poröse Perlen, die vorwiegend aus natürlichen Polysacchariden (Dextran, Agarose) hergestellt werden. Durch gezielte Quervernetzung erhält man Perlen mit definierten Porengrößen. Große Moleküle können in diese Poren nicht hineindiffundieren und werden durch den Flüssigkeitsstrom an den Partikeln der Säulenfüllung vorbeigeleitet. Kleine Moleküle dagegen dringen tiefer in die Poren hinein, so dass große Volumen an Lösungsmittel benötigt werden, um sie durch die Säule zu transportieren. Bei der Fraktionierung erscheint somit erst das Ausschlussvolumen ( $v_o$ ), das dem Volumen der mobilen Phase in der Säule (Flüssigkeit außerhalb des Netzwerks) entspricht. Die stationäre Phase stellt die Flüssigkeit innerhalb des Gelnetzes mit dem inneren Volumen ( $v_i$ ) dar. Die zu trennenden Moleküle erscheinen mit abnehmender Größe bei einem charakteristischen Elutionsvolumen ( $v_e$ ).

Mit Hilfe eines Verteilungskoeffizienten ( $K_{av}$ -Wert) lässt sich das Elutionsverhalten eines Stoffes beschreiben als

$$K_{av} = (v_e - v_o) / (v_t - v_o)$$

mit

$v_e$  = Elutionsvolumen

$v_t$  = Gesamtvolumen der Gelpackung

$v_o$  = Volumen der mobilen Phase

Für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule wird ein bekanntes Protein mit definierter Größe eingesetzt, so dass man das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins ermitteln kann. Als Säulenmaterial wurde Superdex G-200 von Pharmacia verwendet.

### ***Eichung der Gelfiltrationssäule***

Für die Eichung der Säule wurden die aufgeführten Proteine chromatographisch getrennt und ihre  $K_{av}$ -Werte ermittelt.

<b>Protein</b>	<b>Molekulargewicht</b>
Albumin	67 000 Da
Ovalbumin	43 000 Da
Chymotrysinogen A	25 000 Da
Ribonuklease A	13 700 Da

<b>Protein</b>	<b>Molekulargewicht</b>
Thyroglobin	667 000 Da
Ferritin	440 000 Da
Katalase	232 000 Da
Aldolase	156 000 Da

Es wurde je ein hochmolekulares Protein mit einem niedermolekularen Protein auf die Säule aufgetragen und mit 100 mM KPi-Puffer eluiert. Der Laufpuffer enthielt 150 mM NaCl und hatte einen pH von 7,5. Die Kalibrierung erfolgte im Doppelansatz. Die Eichgerade wurde erstellt, indem die ermittelten  $K_{av}$ -Werte der bekannten Proteine gegen das Molekulargewicht

aufgetragen wurden. Das Gesamtvolumen der Packung ( $v_t$ ) betrug 173,71 mL. Das Volumen der mobilen Phase zwischen den Gelpartikeln ( $v_o$ ) wurde durch einen Lauf mit Blue Dextran ( $M_r = 2 \cdot 10^6$  Da) bestimmt und betrug 60,55 mL.

### **Durchführung**

1000  $\mu$ L des 30%-ig aufgeschlossenen Rohextraktes wurden auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Detektiert wurden die Proteine bei 280 nm. Die Fraktionen wurden zu 5 mL gesammelt und für den Enzymtest eingesetzt.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes war folgende:

Fraktion:	500 $\mu$ L
PED (20 mM):	320 $\mu$ L
PQQ (3,24 mM):	150 $\mu$ L
NiCl <sub>2</sub> (12,5 mM):	96 $\mu$ L
KPi (50 mM):	134 $\mu$ L

Inkubiert wurden die Proben bei 30°C auf einem Schüttler mit der maximalen Schüttelgeschwindigkeit. Nach 9 h wurde die Reaktion abgestoppt, indem dem Ansatz die doppelte Menge Chloroform zugesetzt wurde. Nach der Extraktion wurde zentrifugiert (3 Minuten bei 13 000 rpm) und die entnommene Unterphase nach der Derivatisation gaschromatographisch analysiert.

### **PD-10-Säulen**

Die PD-10-Säulen von Pharmacia sind gepackte Fertigsäulen auf Dextranbasis. Das enthaltene Gelfiltrationsmaterial wird als Sephadex G-25 M bezeichnet. G-25 gibt die Ausschlussgrenze an. Die schnell laufenden Säulen werden zum Entsalzen und zum Umpuffern verwendet.

### **Anwendung**

Die Säulen werden mit dem 5-fachen Säulenvolumen an KPi-Puffer (10-20mM/pH 7,0-7,5) gespült. Anschließend werden 2,5 mL Probelösung aufgetragen. Eluiert wird, indem mit 3,5 mL Puffer nachgespült wird. Aufbewahrt wird die Säule in 20 % Ethanol oder Natriumazid.

### **Gelfiltration (Superdex-Säulen für 100–kDa- und 50-kDa-Peptide)**

Rohextrakt und partiell gereinigter Rohextrakt (Teilreinigung über pH- und Temperaturfällung) wurden mit den Säulen 100 kDa, 50 kDa und der Peptidsäule (Amersham-Pharmacia Biotech) nach dem Prinzip einer Gelfiltration zur Reinigung des Rohextrakts aufgetragen. Die Säulen wurden mit KPi-Puffer äquilibriert und die Probe wurde aufgetragen.

Daten zur Gelfiltration:

- Gerät: Biocad
- Säule: Superdex (100/50/Peptide) Amersham-Pharmacia Biotech
- Puffer: 0,1 M KPi / 0,15 M NaCl
- Flussrate: 0,5 mL/min
- Probevolumen: 0,5-1 mL

#### ***d. Affinitätschromatographie***

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen Interaktion zweier Reaktionspartner: Protein und Ligand (z. B. Enzym und Substrat/Substratanalogon, Enzym und Coenzym). Voraussetzung für die Anwendung ist jedoch, dass eine Säulenmatrix existiert, die kovalent gebunden einen Liganden enthält, an den der zu isolierende Stoff spezifisch gebunden werden kann. Ebenfalls muss gewährleistet werden, dass dieser spezifisch von der Matrix zu eluieren ist. Die Desorption von der Matrix kann durch Veränderungen der Ionenstärke, des pH-Wertes oder eine Änderung anderer Elutionsbedingungen erfolgen.

Die Affinitätschromatographie ist ein leistungsfähiges Chromatographieverfahren, da nur eine Isolierung der biologisch aktiven Anteile erfolgt. Jedoch gehört zur Anwendung bereits eine detaillierte Kenntnis der Struktur und der biologischen Spezifität der zu reinigenden Verbindung.

#### ***Farbstoffliganden-Affinitätschromatographie***

Bei dieser Affinitätschromatographie gehen Triazin-Farbstoffe mit anionischen Bindungsstellen und Coenzym-Bindungsstellen einiger Enzyme starke Interaktionen ein. Die Farbstoffe, die kovalent an die Agarose-Matrix gebunden sind, sind bewegliche Moleküle. Durch die Beweglichkeit können sie ihre polaren, aromatischen und anionischen Gruppen so ausrichten, dass sie sich an einer großen Anzahl anionischer Bindungsstellen an Enzymen passend anlagern. Die unterschiedlich starken Wechselwirkungen, die die Liganden mit den Enzymen eingehen, sind jedoch charakteristisch für die Bindungsspezifität.

Der Reinigungsversuch mittels Affinitätschromatographie erfolgte mit einem von Sigma angebotenen Test-Kit (Kit No. RDL-9). Dieses Kit besteht aus neun gepackten Säulen (Säulenvolumen 2,5 mL), an deren Agarose-Matrizen verschiedene Farbstoffliganden gekoppelt sind. Einzusetzen sind Test-Kits für Vorversuche, die klären sollen, welches Säulenmaterial am besten für die Reinigung geeignet ist. Die Wirkungsweise des Liganden ist vielseitig, denn er wirkt in dreifacher Weise:

- als Substratanaloges/Coenzym analoges
- durch hydrophobe Interaktion
- durch Ionenaustausch

Bettvolumen:	2,5 mL
Äquilibrierpuffer:	50 mM KPi pH 7,5
Elutionspuffer:	50 mM KPi pH 7,5 + 3 M NaCl
Auftragsvolumen der Probe:	500 $\mu$ L Rohextrakt + 0,5 mL Äquilibrierpuffer

Die Säulen wurden vorab mit dem 10-fachen Säulenvolumen Kaliumphosphatpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt aufgetragen und mit einem kleinen Volumen KPi-Puffer (0,5 mL) nachgespült. Um unspezifisches, an das Material gebundenes Protein aus der Säule zu entfernen, wurde 3 Mal mit 2,5 mL KPi-Puffer gespült. Im Anschluss wurde mit Elutionspuffer eluiert.

Zur Regenerierung der Säule wurde diese mit dem 10-fachen Säulenvolumen der aufgeführten Lösungsmittel gespült:

- 0,1 M Borat pH 9,8 + 1,0 M NaCl
- 0,1 M Borat pH 9,8
- destilliertes Wasser
- 2,0 M NaCl

Die Fraktionen wurden für den Enzymaktivitätstest verwendet. Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch.

### **Einfluss des Salzes und der Salzkonzentration**

Allgemein beeinflussen Salze die elektrostatischen und die unpolaren Wechselwirkungen. Bei hohen Salzkonzentrationen werden nicht nur elektrostatische Kräfte an der Proteinoberfläche neutralisiert, es können auch Stabilitätsveränderungen der Proteine eintreten.

Es wurde die Wirkung von drei verschiedenen Salzen auf die Enzymaktivität der Q-ADH überprüft. Verwendet wurden Ammoniumsulfat, Natriumchlorid und Kaliumchlorid. Der Testansatz wurde wie folgt angesetzt bei 30°C und auf dem Schüttler bei 120 rpm 140 Minuten inkubiert.

#### *Testansatz*

KPi 0,1 M pH 7,5 + Salz		230 $\mu$ L
PED-Stammlösung	20 mM	320 $\mu$ L
PQQ-Stammlösung	3,24 mM	150 $\mu$ L
Rohextrakt	0,1 mM	500 $\mu$ L
Gesamtvolumen		1200 $\mu$ L

*Variationen der Salze und ihrer Konzentrationen:*

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M; 2,0 M

NaCl: 1,0 M; 1,5 M; 2,0 M; 2,5 M; 3,0 M

KCl: 1,0 M; 2,0 M

Die Reaktionsansätze wurden nach 140-minütiger Inkubation mit Chloroform extrahiert und in der Biofuge 3 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Unterphase wurde entnommen und mittels 10%-igem TFAA-Zusatz 1 h im Wasserbad (Braun) bei 45°C derivatisiert. Die Proben wurden gaschromatographisch analysiert.

*2.3.1.2.2 Ultrafiltration***Ultrafiltration mit der Amicon-Zelle**

Bei der Ultrafiltration werden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Verwendet werden Membranen mit definierten Porengrößen, durch die die Moleküle unter Einwirkung von Überdruck hindurchgedrückt werden. Amicon bietet solch eine Ultrafiltrationszelle, mit der Lösungen auf kleine Volumina eingengt werden können. Die Trennung erfolgte an einer Diaflo-Membran mit bestimmten Ausschlussgrenzen. Eingesetzt wurde die Membran mit einer 10-kDa-Ausschlussgrenze. Der benötigte Druck wurde mit Stickstoff aufgebaut. Je nach Viskosität der Lösung wurde der Druck variiert; er betrug maximal 4 bar. Damit die Membran während des Vorgangs nicht verstopft, wurde die zu konzentrierende Proteinlösung mit einem Magnetrührer gerührt. Allgemein wird der Ultrafiltrationsprozess als schonend bezeichnet, bei empfindlichen Proteinen kann es jedoch zu einer partiellen Inaktivierung kommen. Um Denaturierung aufgrund zu hoher Temperatur (bedingt durch die Scherkräfte) auszuschließen, wurde während des Aufkonzentrierens die Proteinlösung mit Kühlakkus bei konstanter Temperatur gehalten.

**Ultrafiltration mit dem Mikrokonzentrator**

Die Ultrafiltration kann auch mit Hilfe eines künstlichen Schwerfeldes im Zentrifugenröhrchen durchgeführt werden. Eigens dafür wurden spezielle Einweggefäße (Centricon) mit einer integrierten Membran und verschiedenen Ausschlussgrenzen entwickelt. Diese Mikrokonzentratoren werden in die Zentrifuge eingesetzt und unter Kühlung (4°C) wird die Proteinlösung innerhalb einer bestimmten Zeit (mehrfache Zentrifugation à 30 Minuten) von mehreren mL auf wenige µL aufkonzentriert.

*2.3.1.2.3 Ultrazentrifugation*

Bei der Zentrifugation sollen suspendierte Partikel voneinander oder vom Lösungsmittel getrennt werden. Ein Schwerfeld wird erzeugt und die Partikel sedimentieren entsprechend ihrem Sedimentationskoeffizienten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Bei der präpara-

tiven Ultrazentrifugation werden Geschwindigkeiten bis 75 000 rpm (Zentrifugationskräfte bis 500 000 g) erreicht. Die Trennung erfolgte durch Absetzen (Pelletierung) der schweren Partikel.

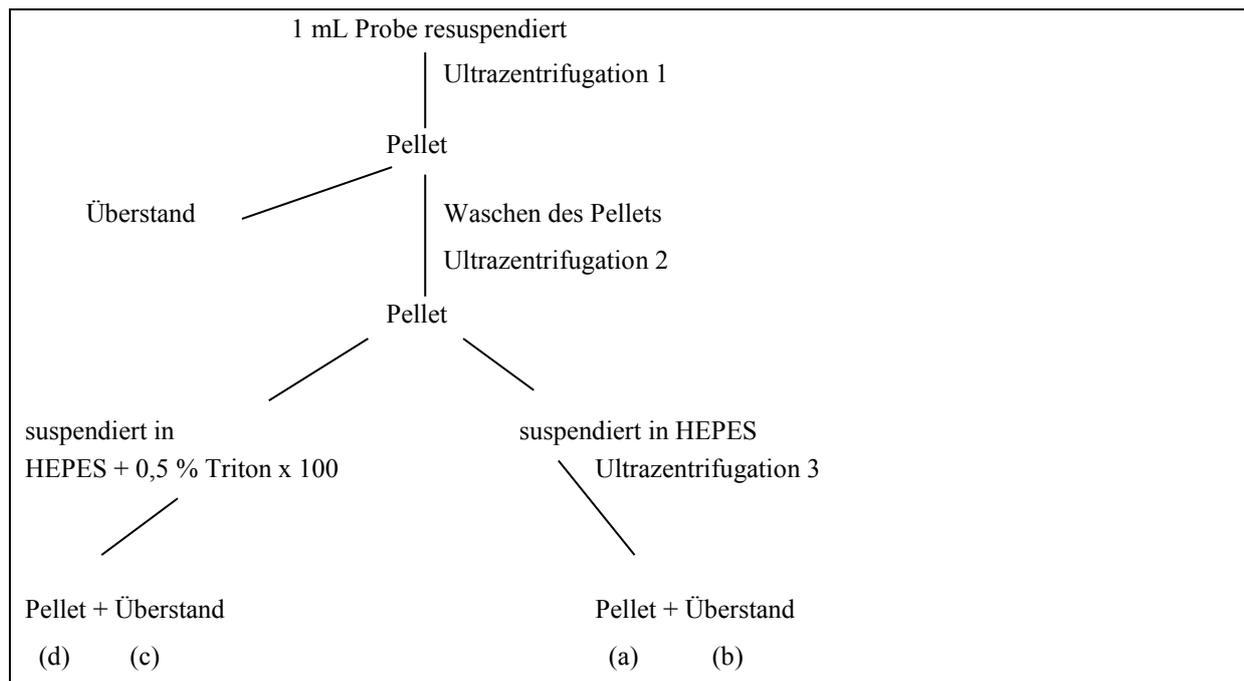
Zentrifuge:	Beckmann Ultrazentrifuge
Rotor:	Ti50
Drehzahl:	38 000 rpm (129 000 g)
Zentrifugationsdauer:	30 Minuten

### Durchführung

Der Rohextrakt wurde aus einem 30%-igen Zellaufschluss gewonnen und filtriert (Papierfilter). Es wurden zwei Proben vorbereitet. 1 mL Rohextrakt wurde resuspendiert und in der Ultrazentrifuge 30 Minuten bei 129 000 g zentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde erneut gewaschen und nochmals bei 129 000 g zentrifugiert. Im dritten Reinigungsschritt wurde eine Probe in HEPES (200 µL) suspendiert und die zweite in 200 µL HEPES mit einem Zusatz von 0,5 % Triton X100. Es wurde wieder zentrifugiert und der jeweilige Überstand und das Pellet wurden für die Enzymaktivitätsbestimmung verwendet. Es wurden vier Testansätze durchgeführt:

1. Membran: resuspendierte Membran
2. Membran-Überstand
3. Triton X 100-Überstand
4. Triton X 100-Membran

### Schematische Darstellung der Ultrazentrifugation

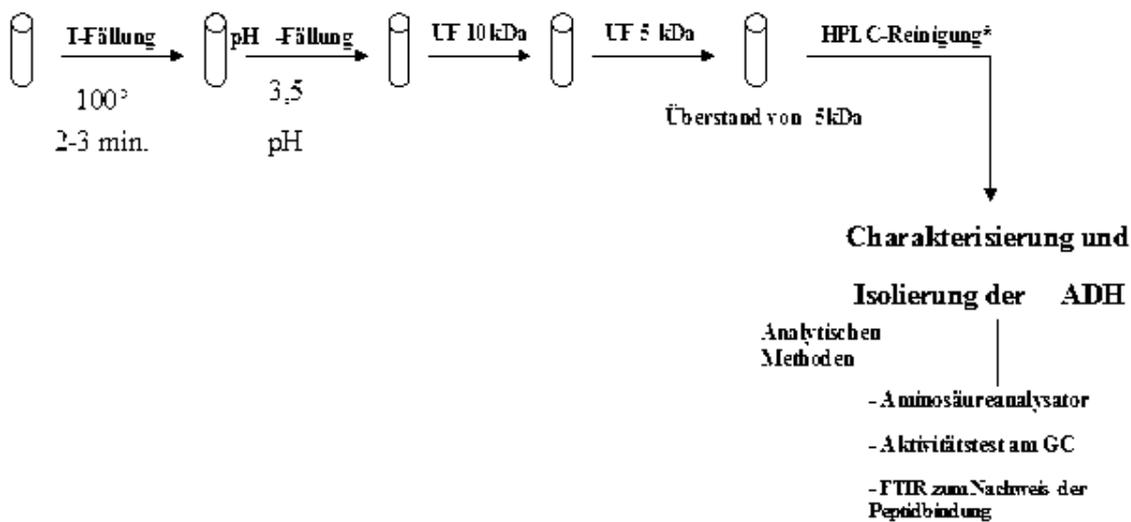


**Abb. 10: Fraktionen der Ultrazentrifuge****2.3.1.2.4 Präparative Gelelektrophorese**

Ein 10%-iges, natives Polyacrylamidgel wurde für die präparative Elektrophorese in der Prep Cell nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 mL/min, die Proteine wurden mit 0,1 M KPi/HCl-Puffer bei pH 7,0 eluiert und in 5-mL-Fractionen gesammelt.

**2.3.1.3 Kombination mehrerer Reinigungsmethoden**

Die eingesetzte Reinigungsmethode, mit der eine weitgehende Reinigung der Q-ADH erreicht wurde, ist in folgender Grafik zusammengefasst:

**Abb. 11: Reinigungsmethode zur Isolierung der Q-ADH****2.3.1.3.1 Temperaturfällungen**

Der mit DNase versetzte Rohextrakt wurde in ein Reagenzglas mit Schraubverschluss gegeben und unter Rühren 2-3 Minuten in ein Ölbad bei 100°C eingetaucht. Nach sichtbarem Proteinausfall wurde der rötlich klare Überstand abdekantiert und bei 11 000 rpm durch Zentrifugation geklärt. Der klare Überstand wurde dann für die pH-Fällung in ein Falcon-Tube abgefüllt.

**2.3.1.3.2 pH-Fällung**

Unter Rühren wurde dem Rohextrakt so lange 1 M HCl zugetropft, bis der pH-Wert den Wert 3,5 erreichte und gleichzeitig eine sichtbare Fällung erzielt wurde. Danach wurde die Lösung abzentrifugiert, der Rohextrakt für die Ultrafiltration (Viva-science) mit 1 M NaOH auf pH 7,0 gebracht und in zentrifugierbare Filtrationsbehälter abgefüllt.

### 2.3.1.3.3 *Ultrafiltration mit 10-kDa- und 5-kDa-Filter*

Der Rohextrakt (nach Hitze- und pH-Fällung) wurde so lange durch Zentrifugation bei 13 000 rpm filtriert, bis 90 % des Rohextrakts filtriert waren. Das Filtrat wurde zur Kontrolle mittels chiraler GC auf Aktivität getestet, dann wurde das Filtrat einer 10-kDa-Filtration gewonnen und dann anschließend durch eine Filtration bei einer 5-kDa-Ausschlussgrenze aufkonzentriert. Die 10-kDa-Filtration diente dazu, die höhermolekularen Proteine abzutrennen, um möglichst weitgehend eine Verstopfung des 5-kDa-Filters zu verhindern. Das Konzentrat der 5-kDa-Filtration zeigte weiterhin die gewünschte Aktivität und wurde mit der Vakuumzentrifuge (Speedvac) aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine HPLC-Säule aufgetragen.

### 2.3.1.4 **Ermittlung der Bezugsgrößen**

#### 2.3.1.4.1 *Proteinbestimmung nach Bradford*

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bindung des Triarylmethan-Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische, insbesondere Arginyl-, und aromatische Aminosäurereste beliebiger Proteine. Die rote Farbe von Coomassie Brilliant Blue G-250 schlägt beim Binden eines Proteins nach blau um. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nach 595 nm. Diese Absorptionsänderung bei 595 nm kann spektrophotometrisch gemessen werden und ermöglicht unter Erstellung einer Eichgeraden mittels definierter Mengen Rinderserumalbumin eine direkte Bestimmung des Proteingehalts. Aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten des Protein-Farbstoff-Komplexes besitzt die Methode eine große Empfindlichkeit. Da im Bereich bis 0,2 mg Protein/mL eine Proportionalität zwischen Extinktion und Protein gewährleistet ist, müssen Probenlösungen, die außerhalb dieses Konzentrationsbereiches liegen, entsprechend verdünnt werden.

#### **Herstellung der Bradford-Reagenzlösung**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 mL 95%-igem EtOH gelöst. Nach Zugabe von 100 mL 85%-iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> wurde mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Die lichtempfindliche Lösung wird im Dunkeln bei RT gelagert. Zur Bestimmung des Proteingehalts werden 900 µL Bradford-Reagenzlösung mit 100 µL Rohextrakt in einer Plastikkuvette vermischt. Nach fünf Minuten wird die Extinktion bei 595 nm in einem Spektralphotometer gemessen. In gleicher Weise wird eine Konzentrationsreihe mit 0,02-0,2 mg/mL Rinderserumalbumin für eine Eichgerade erstellt.

#### 2.3.1.4.2 *Aktivitätstest für die PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenase (Q-ADH)*

Die Aktivitätsbestimmung der Q-ADH wurde über enantiomerenreinen und reaktionszeitabhängigen Abbau der (*R*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol (PED) bzw. für das Substratspektrum über den Abbau des jeweiligen (*R*)-Alkohols gemessen. Alle

Aktivitätsmessungen wurden mit der Messung des jeweiligen enantiomerenreinen (*R*)-Alkohols gegen Reaktionszeit des unten aufgeführten Reaktionsansatzes mittels chiraler GC-Analytik bestimmt.

Der Standard-Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Rohextrakt	1000 $\mu\text{L}$
40 mM rac.Alkohol-Lsg.	1100 $\mu\text{L}$ (13 mM)
3 mM PQQ-Lsg.	430 $\mu\text{L}$
Katalase	20 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Gesamtansatz	2550 $\mu\text{L}$

Der Reaktionsansatz wurde in einem Reagenzglas unter leichtem Rühren bei 30°C inkubiert. Zur Untersuchung des Umsatzgrades wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Proben nach bestimmten Zeitabständen entnommen.

Dieser Standard-Reaktionsansatz wurde für alle Tests in dieser Arbeit angewendet mit folgende drei Ausnahmen:

- 1) Für die säulenchromatographische Reinigungen wurde ein spezieller Reaktionsansatz angewendet (Kapitel 2.3.1.2)
- 2) Für die Umsetzung unter Sauerstoffbegasung wurde aus meßtechnischen Gründen das dreifache Volumen des Standard-Reaktionsansatzes angewendet (Kapitel 2.5.2)
- 3) Für die Co-Faktoraustauschtests wurde aus meßtechnischen Gründen der halbe Standard-Reaktionsansatz angewendet (Kapitel 2.5.3)

### **Probenaufbereitung und Aktivitätsmessung**

Der Reaktionsansatz wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mittels GC analysiert. Hierbei wird nur das Diol (Substrat) analysiert, die entstandene Hydroxysäure befindet sich bei neutralem pH 7 in der wässrigen Phase. Zur Analyse der gebildeten Hydroxysäure wurde der Ansatz nach der Extraktion mit Ethylacetat bei pH 7 mit 1 Tropfen 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und bei einem pH von ca. 2,0 mit 100  $\mu\text{L}$  Ethylacetat ausgeschüttelt. Unter diesen sauren Bedingungen konnte auch die Hydroxysäure in die organische Phase extrahiert und GC analysiert werden. Die Hydroxysäure wurde mit TMSH (Tetramethylsilylhydroxid) derivatisiert. Auf 100  $\mu\text{L}$  Probe (Ethylacetat-Extrakt) wurden 10  $\mu\text{L}$  TMSH zugegeben und bei 70°C für 10 min inkubiert und danach mittels GC analysiert. Die GC-Messungen wurden zwischenzeitlich auf einer chiralen GC-Säule gemessen, die keine TMSH-Vorbehandlung für chirale Alkohole benötigt, wobei der Alkohol direkt underivatisiert einfach mit Ethylacetat extrahiert und dann auf die GC-Säule aufgetragen

wurde. Die Hydroxysäure ist wie oben beschrieben als Methylester auf die Säule aufgetragen. Die Beschreibung dieser Methode ist in Kapitel 2.4.1 für die Substanz- und Aktivitätsnachweise (beide Enantiomere Alkohole, chiraler Aldehyd und chirale Hydroxysäure) ausführlich dargestellt

Der Enantiomerenüberschuss, oder kurz *ee*-Wert (von Englisch: enantiomeric excess), gibt den Überschuss eines Enantiomers in einem Gemisch an. Er ist definiert als

$$ee = \frac{|m_1 - m_2|}{m_1 + m_2} \cdot 100\%$$

mit:  $m_1$ : Masse des Enantiomers 1,  $m_2$ : Masse des Enantiomers 2.

Bei einem Racemat (1:1-Gemisch der Enantiomere 1 und 2) ist demnach  $ee = 0\%$ , bei einer enantiomerenreinen Verbindung ist  $ee = 100\%$ .

Die integrierten Detektionssignale werden über die errechnete Flächengröße zur Berechnung des Enantiomerenüberschusses  $ee(R)$  verwendet. Der Enantiomerenüberschuss für (*R*)-Phenylethandiol berechnet sich nach

$$\% \text{ Enantiomerenüberschu\ss (ee-Wert)} = \frac{(R-S)}{(R+S)} \cdot 100$$

### **Bestimmung der Aktivität des Enzyms aus Rohextrakt und nach der Reinigung**

Die Aktivität und spezifische Aktivität der Q-ADH wurden sowohl im Rohextrakt als auch nach jedem Reinigungsschritt bestimmt, indem die Konzentration der Stammlösung (30 mM) auf den Reaktionsansatz (2,55 mL) umgerechnet wurde. Diese Konzentrationsangabe ist gleich der Fläche des racemischen Phenylethandiols (GC-Flächen); die Fläche eines Enantiomers entspricht demnach der halben Konzentration. Der Stoffumsatz (in mM angegeben) pro Zeiteinheit für dieses Enantiomer wird daher über die Veränderung der mittels GC gemessenen Fläche errechnet. Das (*S*)-Diol, das nicht abgebaut wird, kann im Einzelfall zudem als „interner Standard“ verwendet werden, um gfls. Extraktions- und Auftragedifferenzen einer Probe zu korrigieren.

Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die den Abbau von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro min katalysiert ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ).

#### **2.3.1.5 Reinigung mittels HPLC**

Der aufkonzentrierte Rohextrakt wird auf eine HPLC-Säule mit folgenden Daten aufgetragen:

Stationäre Phase:	Nucleosil 100-5 CIS Nautilus
Mobile Phase:	dest. Wasser 100 %

Flussrate: 0,5 mL/min  
Detektion: UV 213 nm (Absorptionsbereich der Peptidbindung)

Die Nautilussäule der Firma Macherey-Nagel ist eine Nucleosil-Säule mit ausreichend großen Partikeln, um relativ kleine Proteine zu trennen. Die Besonderheit der Säule liegt in der hydrophilen Oberfläche, die eine mobile Phase mit 100 % Wasser erlaubt. Die Probe wurde portionsweise aufgetragen und die Fraktionen separat in einem Fraktionssammler gesammelt. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert.

## 2.4 Analytische Methoden

### 2.4.1 Aktivitäts- und Substanznachweis mittels Gaschromatographie

Zum Aktivitätsnachweis wurde der Abbau des racemischen Alkohols mittels chiraler Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID) verwendet. Als Trägergas wurde Helium (1,3 mL/min) eingesetzt. Das Temperaturprogramm war folgendes: 60°C (für 5 min), 60-195°C (Temperaturanstieg 5°C/min).

Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 30°C. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat bzw. Chloroform gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und mittels Gaschromatographie untersucht. Der entstandene Aldehyd wurde auch in derselben organischen Phase extrahiert, die dann auch bei einer reaktionszeitabhängigen Detektion als wachsender Peak zu erkennen ist. Die Hydroxysäure, die sich noch in wässriger Phase befindet, wurde in saurem Medium verestert und dann extrahiert und auf das GC zur Detektion aufgetragen.

*CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID):*

Im Gegensatz zu den Lipodexssäulen der Firma Macherey-Nagel kann diese Säule ohne Derivatisierung des Alkohols direkt benutzt werden. Die Hydroxysäure wurde wie oben erwähnt derivatisiert aufgetragen. Der zeitabhängige Abbau des Alkohols kann gaschromatographisch verfolgt werden, wobei die Aktivität des Enzyms über den selektiven Abbau des (*R*)-Alkohols bestimmt wurde. Dieser Umsatz kann zusätzlich mit der gebildeten Hydroxysäure korreliert werden. Im Einzelfall wurde auch der intermediäre Aldehyd detektiert: Er wird gemeinsam mit dem Alkohol extrahiert. Mit Hilfe der Chrompack-Säule konnten sowohl das racemische Gemisch des Alkohols als auch der gebildete (*R*)-Aldehyd und die (*R*)-Hydroxysäure als Methylester detektiert werden. Für die Trennung wurden folgende Bedingungen eingestellt:

*Trennbedingungen:*

rac. PED

150°C isotherm

(*R*)-Aldehyd: 100°C isotherm

(*R*)-Hydroxysäureester: 110°C Isotherm

*Säulendaten:*

Säule: Chrompack CP-Chirasil-Dex CB

Injektionsvolumen: 1 µL

Injektionstemperatur: 200°C

Säulentemperatur: 150°C für Alkohol und Aldehyd (110°C bei Hydroxysäureesternachweis)

Trägergas: Helium

Detektor FID

Alkohole, Ketale und Hydroxysäuren, die mit TMSH methylverestert sind und in der Materialliste sowohl als racemisch als auch als enantiomerenrein aufgelistet sind, wurden kommerziell erworben und auf dieser chiralen GC-Säule detektiert und ihre Retentionszeit wurde bestimmt.

Das bedeutet, dass für den jeweiligen Alkohol das racemische Gemisch erst aufgetragen wurde und dann die jeweiligen Enantiomere detektiert und über die Retentionszeit bestimmt wurden. Um sicherzugehen, wurde auch ein Enantiomer im Überschuss mit racemischem Alkohol gemischt und detektiert, was zur Folge hat, dass das betroffene Enantiomer einen deutlich größeren Peak liefert.

Die mit TMSH in saurer Lösung methylveresterten Hydroxysäuren wurden auch über kommerziell erhältliche Hydroxysäuren als Ester bestimmt.

Einige Alkohole, Aldehydzwischenprodukte aus der Oxidation von 1-Phenyl-1,2-ethandiol (PED), Hydroxysäuren als Methylester und alle Ketale wurden auch mittels GC/MS über die Ermittlung der Molekülpeaks bestimmt. Hierbei wird die Hydroxysäure als Esterform (Methylester) detektiert und somit besitzt sie einen höheren Molekülpeak ( $m/z$  166).

### **Nachweis von Hydroxysäuren über Veresterung mittels GC/MS**

Der Nachweis von Alkoholen, Aldehydzwischenprodukten, Ketalen und veresterten Hydroxysäuren erfolgte mit einem Gaschromatographen HP 6890 (Hewlett-Packard), welcher mit einem Quadrupol-Massendetektor HP 5973 (Hewlett-Packard) gekoppelt war.

Die GC-Parameter waren die folgenden: Kapillarsäule HP-5MS (Hewlett-Packard, 30 m x 0,25 mm ID), Trägergas Helium (1,0 mL/min, konstanter Fluss), Temperaturprogramm 60°C (Minute 0-1), 60-280 °C (Minuten 1-14,7, Anstieg 15°C/min), 280°C (Minuten 14,7-20). Der Massendetektor wies folgende Parameter auf: EI (70 eV), Ionenquelle 230°C, Quadrupol 106°C, Transfer Line 300°C, detektierbarer Massenbereich 50-550 amu.

Die Ansätze wurden bei 30°C für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 40 µL Probe entnommen, mit 100 µL Ethylacetat nach gründlichem Mischen ausgeschüttelt, zur Phasentrennung bei 14 000 rpm 5 min zentrifugiert und anschließend die organische Phase abgenommen, welche GC/MS-analytisch untersucht wurde.

Die kommerziell erworbenen Alkohole, Ketale und Hydroxysäuren wurden als Methylester (behandelt in pH 2 und TMSH) auf das GC/MS aufgetragen und der Massenpeak bestimmt.

### **Analysebedingungen zum Nachweis des racemischen Aldehyds, hergestellt mit dem TEMPO-Katalysator**

Zum Nachweis des Aldehyds (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd, der als Zwischenprodukt der Oxidation von PED vermutet wurde, wurde eine Lipodex  $\gamma$ -Säule der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Die Detektion erfolgte über ein Temperaturprogramm von 50°C auf 170°C bei 100 kPa. Referenzmaterial des Aldehyds wurde durch Oxidation mit dem TEMPO-Katalysator hergestellt.

### **2.4.2 Sequenzierung**

Die Sequenzanalyse von Aminosäuren in Proteinen erfolgte N-terminal über den Edman-Abbau. Hierbei werden die Aminosäuren schrittweise abgebaut. Die freie Aminogruppe wird mit Phenylisothiocyanat zum Thioharnstoffderivat umgesetzt; dessen zyklisierende Spaltung führt zu der um die endständige Aminosäure verkürzten Peptidkette und schließlich zu einem 3-Phenyl-2-thiohydantoin-Derivat (PTH-Aminosäure), welches mittels HPLC identifiziert werden kann. Die Sequenzierung wurde nach der Edman-Abbau-Methode in der Analytikabteilung der Universität Münster durchgeführt.

### **2.4.3 ATR-FTIR-Technologie**

Die FTIR-Spektroskopie lässt sich auf Proteine anwenden, die unter den verschiedensten Bedingungen vorliegen können, z. B. in wässriger und nicht-wässriger Lösung und in Membranen. Es gibt eine große Zahl an Schwingungsbanden, die für Peptidgruppen und Seitenketten charakteristisch sind und aus denen Informationen über die Proteinstruktur gewonnen werden können. Von diesen kann die Amid-I-Bande besonders gut für die Sekundärstrukturcharakterisierung von Proteinen herangezogen werden (Byler und Susi, 1986).

Die ATR-FTIR -Spektroskopie (Attenuated Total Reflection = abgeschwächte Totalreflexion) wurde im Jahre 1960 von Harrick und Fahrenfort eingeführt, wobei mit diesem Verfahren die Untersuchung von Oberflächen mit relativ wenig Aufwand möglich wurde. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Techniken non-invasiv arbeitet, molekulare Informationen einfacher erhalten werden und dies eine geringere apparative Ausstattung gegenüber konkurrierenden Methoden erfordert.

Die aufkonzentrierte Probe aus der HPLC-Reinigung wird in flüssiger Form auf die Scan-Oberfläche (eine Diamantenplatte) aufgetragen und trockengeblasen. Hier muss man natürlich die geringe Proteinkonzentration in Betracht ziehen. Nachdem das Wasser weggeblasen ist, bildet sich eine feine kristalline Haut, da nur so eine FT-IR-Aufnahme – speziell bei diesen geringen Konzentrationen – möglich ist, ohne dass man ein KBr-Plättchen (was bei der Standard-IR-Spektroskopie üblich ist) mit der zu messenden Substanz pressen muss. Der dünne kristalline Film wurde bei  $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  Wellenzahl gescannt und als Spektrum aufgenommen.

#### **2.4.4 Aminosäureanalysator**

Die durch Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren wurden mit einem Aminosäureanalysator bestimmt, wobei die Aminosäuren an einem Kationen-Austauscher getrennt, mit Ninhydrin angefärbt und mit einem Durchflussphotometer quantitativ nachgewiesen werden. Dazu wurde die HPLC-gereinigte Probe 48 h mit konz. HCl behandelt, um die Peptidbindungen zu spalten und die einzelnen Aminosäuren freizusetzen. Die hydrolysierte Probe wurde zunächst mit Auftragspuffer (33,3 mM Natriumcitrat, 72,9 mM Zitronensäure, 10 mM HCl, 0,5 % 2,2-Thiodiethanol, pH 2,2) verdünnt und anschließend auf die Kationenaustauschersäule des Aminosäureanalysators aufgetragen. Nach der Auftrennung erfolgte die Reaktion der Aminoverbindungen mit automatisch zugeführtem Ninhydrin bei  $100^{\circ}\text{C}$ . Der entstandene Farbstoff (Ruhemanns Violett) wurde bei 570 nm detektiert. Die Art und Menge der vorhandenen Substanzen wurde durch Vergleich mit definierten Mengen von Aminosäure-Referenzen bestimmt. Hier wurde die partiell gereinigte Probe mit Hilfe der Speedvac (Vakuumentrifuge) getrocknet und vom Wollforschungsinstitut der RWTH Aachen analysiert. Aufgetragen wurde eine Probe, bei der 20  $\mu\text{g}$  Feststoff eingewogen wurden. Dieser wurde mit 4 mL Auftragspuffer verdünnt, dann wurden davon 50  $\mu\text{L}$  für die Analyse aufgetragen.

## **2.5 Chemoenzymatische Methoden**

### **2.5.1 Methode zum Nachweis des Aldehyds als Intermediat der Oxidation**

Das stabile Aldehydzwischenprodukt 1-Phenyl-2-hydroxyethanal lässt sich sehr einfach zusammen mit Detektion von 1-Phenyl-1,2-ethandiol bei neutralem pH-Wert mit Ethylacetat extrahieren und kann unter denselben GC-Bedingungen, wie sie zur Detektion des Alkohols verwendet werden, ebenfalls nachgewiesen werden. Dieser Aldehyd ist auch über GC/MS-Analytik nachweisbar.

### **2.5.2 Blasenfreie Begasung der oxidativen Reaktion**

Es ist zu erwarten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Alkoholoxidation mittels Q-ADH durch den verfügbaren Sauerstoff limitiert ist, so dass die Umsatzrate durch eine bessere  $\text{O}_2$ -

Versorgung gesteigert werden sollte. Die Untersuchung zur Verkürzung der Reaktionszeit durch kontinuierliche Sauerstoffbegasung wurde in einem Reaktionsgefäß durchgeführt, das blasenfrei begast werden konnte. Es handelt es sich um eine als Reaktionsgefäß umfunktionierte Spritze (Durchmesser 3 cm), bei der die untere Öffnung zugeschmolzen wurde (siehe Abb. 12). Durch zwei an den Seiten angebrachte Löcher wird ein Silikon-Diffusionschlauch durchgezogen, der spiralförmig in die Innenseite des Reaktionsgefäßes positioniert sind. Die Sauerstoffmessung erfolgt durch Einsatz eines Sauerstoffsensors der Firma WTW.

Abb. 12: Reaktionsgefäß



Ein durch den Schlauch durchgezogener Metalldraht sorgt für den Halt des Schlauches. Durch den Schlauch wird nun Sauerstoff geleitet, somit kann kontinuierlicher oder pulsweiser Sauerstoff in die Lösung diffundieren und die Reaktion mit Sauerstoff versorgen. Aufgrund der Dimension der Begasungsanlage musste der Ansatz in einem größeren Maßstab (8-10 mL) durchgeführt werden als der Standardansatz, der üblicherweise im (1-2)-mL-Maßstab ablief. Eingesetzt wurden:

Rohextrakt	3500 $\mu\text{L}$
40 mM rac. PED	3850 $\mu\text{L}$
3 mM PQQ-Lsg.	1575 $\mu\text{L}$
Gesamtansatz	8925 $\mu\text{L}$

### 2.5.3 Vergleichende Verwendung von PQQ und anderen chinoiden Cofaktoren

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der Cofaktor PQQ durch andere orthochinoide Verbindungen als Cofaktoren der Q-ADH ausgetauscht und deren Reaktion als möglicher Ersatz für PQQ untersucht.

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt dimensioniert:

Rohextrakt	500 $\mu$ L
40 mM rac. PED	550 $\mu$ L
3 mM Co-Faktor Lsg.	215 $\mu$ L
Gesamtansatz	1765 $\mu$ L

Die Cofaktoren wurden in einer Konzentration von 0,57 mM eingesetzt. Problematisch war, dass 1,2-Naphthochinon (NC), 9,10-Phenanthrenchinon (PC) und 2-Nitrophenanthrachinon (NPC) in Wasser schlecht löslich sind. Sie wurden als Suspensionen eingesetzt.

#### 2.5.4 Synthese von (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd über Oxidation mit TEMPO-Katalysator

Neben der GC/MS Nachweis wird hier auch chemisch versucht, dieses Aldehydintermediat als Racemat zu synthetisieren. Zum Nachweis des Reaktionsablaufs und der Enantiomerenreinheit des Aldehyds in der Oxidation des racemischen PED über den Aldehyd zur Säure wurde der racemische Hydroxyphenylethylaldehyd als Referenzsubstanz benötigt, damit mittels GC der Aldehyd selbst und die Enantiomerenreinheit des Aldehydzwischenprodukts nachgewiesen wird. Hier sind der chemisch hergestellte racemische Aldehyd und das aus der Oxidation der racemischen PED entstandene Aldehydzwischenprodukt auf eine chirale GC (Lipodex-G-Säule) aufgetragen und damit erfolgten der Nachweis der Substanz und die Bestimmung der Enantiomerenreinheit.

#### 2.5.5 Synthese von racemischem Hydroxyphenylethylaldehyd

In einem Dreihalskolben auf einem Magnetprüher und mit einem Thermometer wurden 1,4 g rac. Phenylethandiol, 0,02g 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl, 3,4 mL Dichlormethan und eine 0,05-molare KBr-Lösung in 25 ml Wasser zusammengegeben. Die Mischung wurde unter Rühren auf  $-10^{\circ}\text{C}$  in einem Salz-Eisbad gekühlt und es wurden 11 mL einer 1 M Natriumhypochloritlösung bei einem pH von 9,5 innerhalb von 15-20 min zugegeben. Die Temperatur wurde danach auf  $10-15^{\circ}\text{C}$  gehalten. Der Reaktionsansatz wurde 3 Minuten gerührt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit 1 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 2 mL einer 10%-igen Salzsäure, 0,03g Kaliumjodid und 1,2 mL Wasser gewaschen. Danach wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und zweimal über eine Celite-Säule gereinigt (Anelli *et al.*, 1987).

Die organische Lösung mit rac. Hydroxyphenylethylaldehyd kann direkt mittels chiraler GC und GC/MS analysiert werden.

### 2.5.6 Methode zur Synthese von chiralen Hydroxyketonen

Die Bildung des Aldehyds als Zwischenprodukt der Oxidation kann auch *in situ* durch eine geeignete Folgereaktion, durch die der Aldehyd direkt weiterreagieren kann, nachgewiesen werden. Dazu wurde die Q-ADH-katalysierte Oxidation mit einer Transketolase-Reaktion mit beta-Hydroxypyruvat gekoppelt. Durch diese C-C-bindungsknüpfende Reaktion sollte dann ein Zucker gebildet werden. In diesem Experiment wird der Versuch unternommen, die stabile Aldehyd-Zwischenstufe aus der enzymatischen Oxidationsreaktion unter Einsatz einer Transketolase aus Bäckerhefe mittels einer C-C-Verknüpfungsreaktion abzufangen und hiermit kleine chirale Zuckerbausteine zu synthetisieren.

Rohextrakt	1000 $\mu$ L
40 mM rac. PED	1100 $\mu$ L
3 mM PQQ-Lsg.	430 $\mu$ L
Katalase	20 $\mu$ L
Gesamtansatz	2550 $\mu$ L

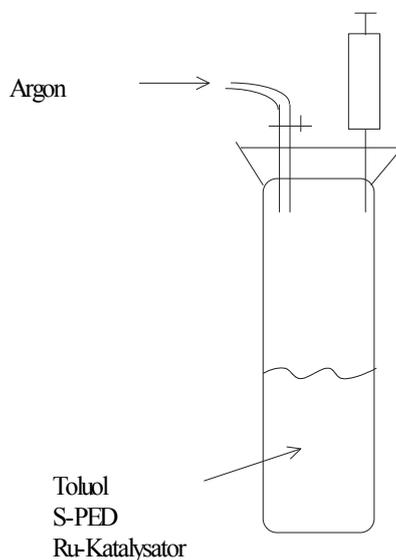
Hier handelt es sich um eine im selben Reaktionsgefäß nacheinander ablaufende Reaktion.

In einer Standardreaktion (wie oben aufgelistet) von Q-ADH mit rac. PED und PQQ wurden zusätzlich 11 mg Thiaminpyrophosphatchlorid (TPP), 128 mg beta-Hydroxypyruvat (Monohydrat), 3 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat und 5 mg Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl oder 1M NaOH auf pH-Wert 7 konstant beibehalten, die Reaktion unter Rühren bei 25°C gehalten. Diese Reaktionsmischung wurde am zweiten Reaktionstag zugegeben, da die Standardreaktion erst nach 24 h anfang, durch GC-Proben nachweisbaren (*R*)-Aldehyd zu bilden. Nach Zugabe der o. g. Komponenten wurde die zweite Reaktion im selben Reaktionsgefäß durch Zugabe von 150 Units Transketolase aus kommerziell erhältlichem *E. coli* gestartet. Der pH-Wert wird über die ganze Reaktionszeit, die etwa 5-6 Stunden beträgt, durch Zugabe von HCl konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktionszeit wird die Lösung mit Ethylacetat mehrmals extrahiert und es werden Proben zur analytischen Untersuchung mittels GC und GC/MS entnommen.

## 2.5.7 Racemisierung des (*S*)-Diols in einem Zweiphasensystem mit der Q-ADH

### 2.5.7.1 Racemisierung von (*S*)-Phenylethandiol

#### a) Apparativer Aufbau für den Racemisierungsprozess



**Abb. 13: Reaktionsgefäß für die Racemisierungsreaktion**

Die Racemisierung von enantiomerenreinem (*S*)-PED mit dem Ru<sup>II</sup>-Katalysator läuft bei 45°C in Toluol als Lösungsmittel ab.

#### b) Versuchsansatz und Durchführung

In einem Reagenzglas, das unter Argon-Atmosphäre gehalten wurde, wurden 1 mmol (*S*)-PED und 0,22 mg Ru<sup>II</sup>-Katalysator in 2,5 mL Toluol gelöst und bei 45°C unter Rühren für 48 h gehalten. Mit diesem Versuchsaufbau wurden fünf verschiedene aromatische Diole auf ihre Racemisierbarkeit untersucht. Nach Ablauf der jeweiligen Reaktion wurde der Ansatz mittels GC untersucht.

#### c) Bestimmung der Racemisierungsgrad der (*S*)-Alkohole mit HPLC

Die Racemisierungsgrad der Substanzen in der Tabellen 11/12/13, die mit Ruthenium Katalysator umgesetzt sind, wurden mittel HPLC ermittelt. Als Lösungsmittelgemisch wurde Isopropanol/Hexanol verwendet.

### 2.5.7.2 Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem

#### a) Oxidations- und Racemisierungsreaktion gestartet mit reinem (S)-PED

Der Aufbau der Apparatur für die Zweiphasenreaktion ist in folgender Abbildung wiedergegeben:

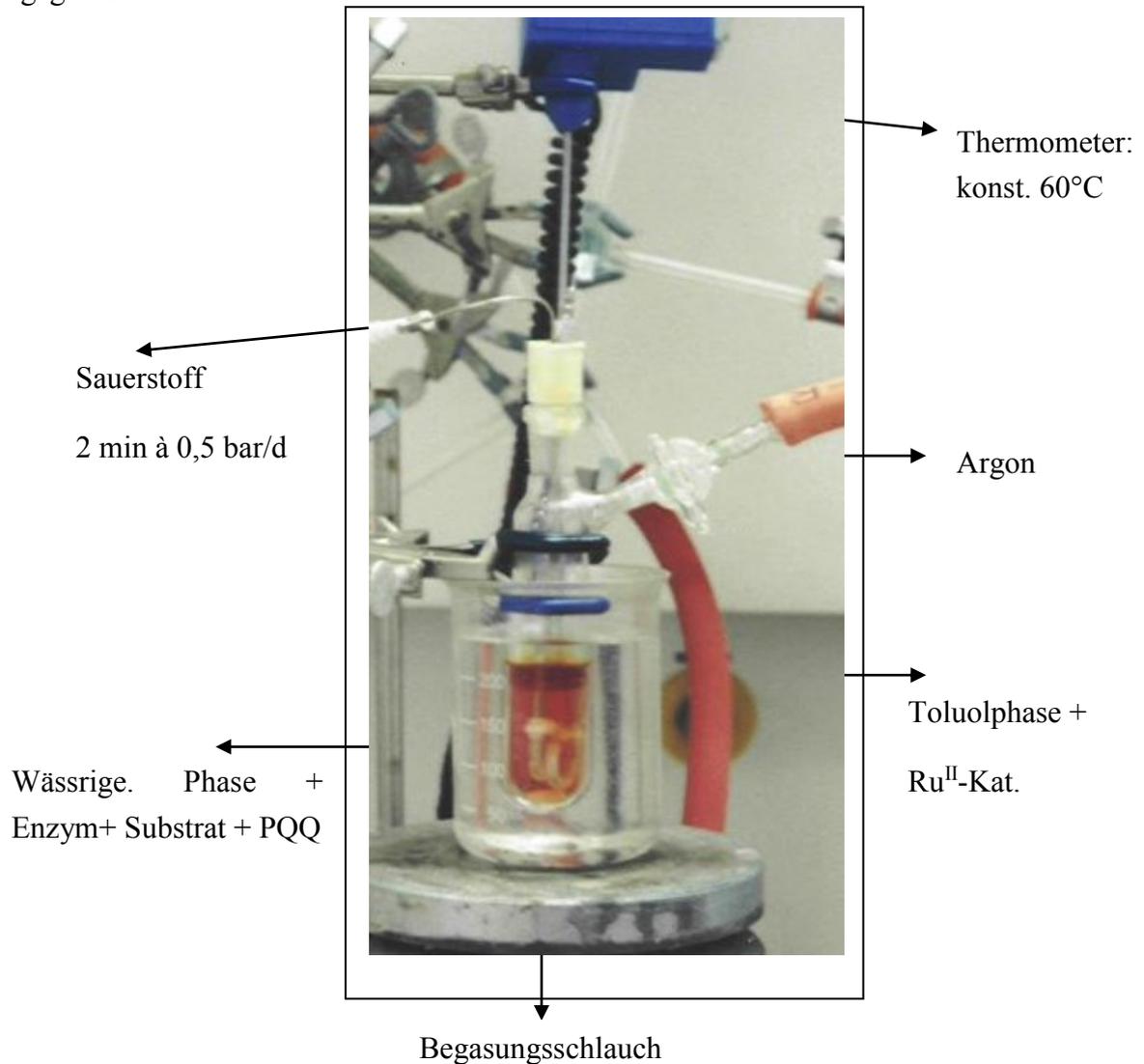


Abb. 14: Der Reaktor für die Oxidations- und Racemisierungsreaktion im Zweiphasensystem

Um die prinzipielle Durchführbarkeit dieser Reaktion nachzuweisen, wurde zuerst reines (S)-Diol eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren:

- Temperatur: 60°C
- Sauerstoff: 2 min mit 0,5 bar/d (Sättigung der Puffer) mit gleichzeitigem Argonstrom in der Toluolphase.

Der Argon-Gegenstrom war ausreichend, um eine Inaktivierung des Rutheniumkatalysators durch Sauerstoff zu verhindern. Gleichzeitig wurde aber auch die Sauerstoffversorgung zur PQQ-Regeneration gewährleistet (Einsatz des Sauerstoffsensors von WTW).

Der Reaktionsansatz ist wie folgt zusammengesetzt:

40 mM ( <i>S</i> )-PED	9 mL
3 mM PQQ-Lsg.	2 mL
Rohextrakt Q-ADH	3 mL
Toluol	4 mL
(Ru <sup>II</sup> -Katalysator	0,05 mg)
Gesamtansatz	18 mL

Während des Reaktionsablaufs über mehrere Tage wird jeden Tag eine Probe entnommen und für die GC-Analytik aufbereitet.

*b) Oxidations- und Racemisierungsreaktion gestartet mit rac. PED*

Nach den Vorversuchen mit (*S*)-Phenylethandiol wurde der gleiche Ansatz wie in 2.5.7.2 mit racemischem Phenylethandiol durchgeführt. Die Reaktion ist nahezu identisch zur zuvor beschriebenen Reaktion mit (*S*)-Phenylethandiol, es wurde lediglich racemisches Diol eingesetzt. Ein weiterer Unterschied betrifft den Reaktionsverlauf: Hierbei wird die zweite Phase erst nach vollständigem Abbau des (*R*)-PED (72 h) dazugegeben und somit die Racemisierung des (*S*)-PED gestartet. Damit kann man beide Reaktionsteile voneinander trennen und die durch den Ru-Katalysator katalysierte Re-Racemisierung nachweisen.

### 3 Ergebnisse

Zur Synthese enantiomerenreiner Verbindungen mittels Enzymkatalyse können asymmetrische Syntheseverfahren, aber auch Racemattrennungen verwendet werden. Die stereospezifische Oxidation racemischer Gemische von Hydroxyverbindungen ist ein bislang wenig genutzter Weg zu enantiomerenreinen Produkten. Um das präparative Potenzial dieser Route zu untersuchen, haben wir die racemische Verbindung 1-Phenyl-1,2-ethandiol (rac. PED) eingesetzt, um nach Enzymen zu suchen, die selektiv eine Komponente oxidieren, so dass als Produkte enantiomerenreine Mandelsäure und auch – als verbleibende Verbindung – enantiomerenreines Diol gebildet werden. Durch ein Screening wurde ein Mikroorganismus identifiziert, der in der Lage ist, ein Enantiomer aus racemischem PED über enzymatische Oxidation zu Mandelsäure zu oxidieren. Die Identifizierung hat gezeigt, dass es sich bei dem Organismus um einen Stamm der Gattung *Pseudomonas* handelt (*Pseudomonas* sp. PE1). Ebenso konnte in den Vorversuchen gezeigt werden, dass es sich bei dem für diese Oxidation verantwortlichen Enzym um eine Chinoproteindehydrogenase handelt. Das Produkt der Oxidation ist enantiomerenreine (*R*)-Mandelsäure, bei vollständiger Oxidation verbleibt enantiomerenreines (*S*)-Phenylethandiol (siehe Abb. 15).

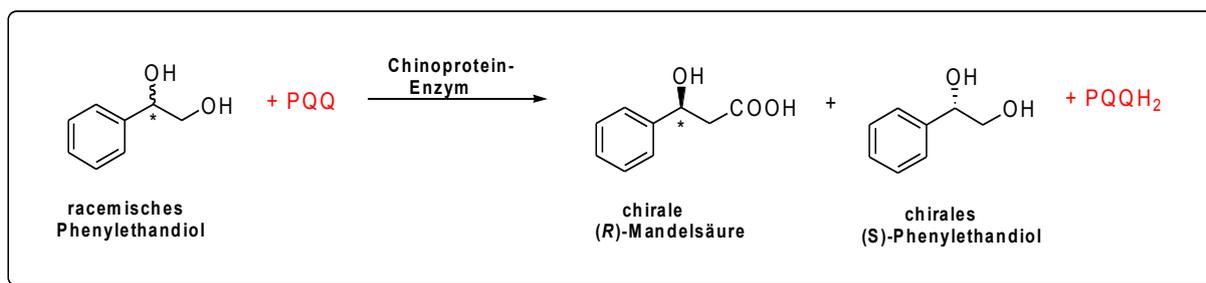


Abb. 15: Stereospezifische enzymatische Oxidation von (*R*)-PED zu (*R*)-Mandelsäure mit Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp.

Im Folgenden soll dieses Enzym gereinigt und biochemisch charakterisiert werden sowie für präparative Anwendungen zur Synthese enantiomerenreiner Alkohole und Hydroxysäuren geprüft werden.

#### 3.1 Biochemische Charakterisierung einer Chinoproteinalkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp.

Für die enzymatische Katalyse können Biokatalysatoren in verschiedenen Reinheitsgraden eingesetzt werden. Die Verwendung von isoliertem Enzym, Rohextraktpräparaten oder ganzen Mikroorganismen – jeweils in freier oder immobilisierter Form – hängt von folgenden Faktoren ab (Faber, 2000):

- Reaktionstyp, insbesondere Komplexität der Reaktion
- Notwendigkeit einer Cofaktorregenerierung
- Maßstab des biokatalytischen Prozesses

Eine Reihe von chiralen Produkten kann vorteilhaft mittels Dehydrogenasen aus den entsprechenden prochiralen Edukten hergestellt werden, beispielsweise Hydroxysäuren mittels Hydroxysäuredehydrogenasen, Aminosäuren durch Aminosäuredehydrogenasen oder Alkohole mit Alkoholdehydrogenasen. Vorteilhaft ist, dass das Gleichgewicht dieser Enzyme deutlich auf Seiten der chiralen Produkte liegt. In Einzelfällen wäre es allerdings auch vorteilhaft, die Oxidation der chiralen Verbindungen zu nutzen, beispielsweise zur Herstellung chiraler Aldehyde oder chiraler Säuren aus Alkoholen. Prinzipiell können auch hierfür NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen in der Oxidationsreaktion eingesetzt werden. Allerdings zeigen sich dabei einige beträchtliche Limitierungen, im Wesentlichen die für diese Richtung ungünstige Gleichgewichtslage und die fehlenden Möglichkeiten einer Regenerierung des oxidierten Coenzym  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$ . Daher ist der Einsatz isolierter Enzyme beispielsweise zur Oxidation von Alkoholen bislang nicht sehr weit verbreitet. Die Gründe sind folgende (Faber, 1992):

- Die Oxidation von Alkoholen ist thermodynamisch benachteiligt.
- Es tritt sehr oft eine starke Produktinhibierung durch das entstehende Keton oder den Aldehyd auf.
- Die enzymatische Oxidation arbeitet am besten in einem pH-Bereich von 8-9, bei dem die oxidierten Cofaktoren instabil sind.
- Bei der Oxidation von sekundären Alkoholen wird ein asymmetrisches Zentrum zerstört.
- Es fehlt eine etablierte Methode zur Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$ .

Diese Limitierungen treffen in wesentlichen Punkten für die in der Abb. 15 gezeigte Reaktion nicht zu, so dass dieses Enzym für die Herstellung sowohl von chiralen Hydroxysäuren als auch von enantiomerenreinen Diolen besonders vorteilhaft ist. Im Folgenden soll einerseits das für diese Reaktion verantwortliche Enzym charakterisiert werden als auch das präparative Potenzial aufgezeigt werden.

### **3.1.1 Reinigung**

Zur Reinigung der Q-ADH wurden verschiedene säulenchromatographische Verfahren eingesetzt, nach der Trennung wurden alle Fraktionen mittels GC-Analyse auf Aktivität geprüft.

#### **3.1.1.1 Chromatographische Reinigung**

##### *3.1.1.1.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose Cl 4B*

Als erster Schritt zur Reinigung wurde eine Chromatographie durch hydrophobe Interaktionschromatographie eingesetzt. Nach Auftragen des Rohextrakts wurden die Proteine durch einen linear abfallenden Gradienten eluiert.

Die Fraktionen wurden zunächst einmal einzeln mit dem GC-Test gemessen, danach wurden der Durchlauf (von 39 auf 7 mL) und die Fraktionen 34-64 (von 90 auf 12 mL) in einer Amicon-Zelle durch Ultrafiltration aufkonzentriert und diese ebenfalls getestet. Es zeigte sich, dass weder die Fraktionen noch die Konzentrate eine Aktivität aufwiesen.

#### *3.1.1.1.2 Ionenaustauschchromatographie*

##### **Ionenaustausch mit Q-Sepharose und (S)-Sepharose**

Die Chromatographie erfolgte mit dem Anionen-Austauscher Q-Sepharose und dem Kationenaustauschmaterial (S)-Sepharose. Das Säulenvolumen betrug je 3 mL und auf dieses wurden jeweils 2 mL Rohextrakt mit einer Q-ADH-Volumenaktivität von 28 mU/mL aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 50 mM KPi-Puffer pH 7,5 plus 1 M NaCl. Die Fraktionen wurden zu 3 mL gesammelt und gaschromatographisch untersucht. In den getesteten Fraktionen beider Matrizen konnte weder im Durchlauf noch in der Elution eine Q-ADH-Aktivität nachgewiesen werden.

##### **Ionenaustauschchromatographie mit Hydroxylapatit**

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit Hydroxylapatit (Bio-Rad) mittels FPLC durchgeführt. Der Rohextrakt (2 mL) wurde in den 5 ml Säulenvolumen verteilt und mit 400 mM KPi-Puffer pH 7,5 eluiert. Analysiert wurde die Q-ADH-Aktivität mittels Gaschromatographie. Getestet wurden die Fraktionen 3 und 4 vom Durchlauf und Fraktion 11-16 der Elution.

Das eingesetzte Rohextrakt hatte eine Volumenaktivität von 31 mU/mL. In den getesteten Fraktionen konnte jedoch keine Aktivität gefunden werden. Auch durch nachträgliche Aufkonzentrierung der Fraktionen des Durchlaufs und der eluierten Fraktionen mittels Amicon-Zelle konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

#### *3.1.1.1.3 Tentakel-Ionenaustauschchromatographie*

Die Chromatographie erfolgte mit Fraktogel TMAE 650(M). Der Rohextrakt (2,6 ml) wurde auf 5 ml Matrix aufgetragen und mit 500 mM KPi pH 8 plus 3M NaCl eluiert. Die Fraktionen à 3 mL wurden gesammelt und gaschromatographisch auf Q-ADH-Aktivität überprüft. Analysiert wurden die Fraktionen des Durchlaufs und jede zweite Fraktion der Gradientenelution. Der eingesetzte Rohextrakt wies eine Volumenaktivität von 34,3 mU/mL auf. In keiner Fraktion konnte eine Aktivität nachgewiesen werden.

### **Einfluss des Salzes und der Salzkonzentration**

Bei den verschiedenen chromatographischen Reinigungsversuchen wurde beobachtet, dass regelmäßig ein beträchtlicher Teil der Aktivität verlorengegangen ist. Solche Verluste können häufig durch Zusatz von Salz vermieden werden. Um die Aktivitätsverluste möglichst gering zu halten, wurde der Einfluss von Salz auf die Enzymaktivität der Q-ADH überprüft. Die bei Aufreinigungen am häufigsten verwendeten Salze Ammoniumsulfat, Natriumchlorid und Kaliumchlorid wurden auch hier für diesen Test ausgewählt. Ammoniumsulfat könnte als Fällungsmittel für einen ersten Aufreinigungsschritt eingesetzt werden, wogegen NaCl und KCl als Elutionsmittel bei der Ionenaustauschchromatographie ihren Einsatz finden. Es wurden Salzlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, 2,0 M und 3,0 M) hergestellt, die dem Reaktionsansatz zugesetzt wurden. Nach der Inkubation wurde die Enzymaktivität gaschromatographisch ermittelt. Als Vergleichswert diente die Aktivität eines Standardtestansatzes (ohne Salz).

Es wird deutlich, dass die Anwesenheit von Salz durchweg einen Aktivitätsverlust bewirkt; der Verlust ist umso höher, je höher die Salzkonzentrationen waren. Die geringste Auswirkung zeigt NaCl. Lösungen bis 2 M führen zu einem 20%-igen Verlust der Aktivität. Ammoniumsulfat beeinflusst die Wirkungsweise des Enzyms am stärksten. Es verringert die Aktivität bis zu 60 %, was die Möglichkeit einer Ammoniumsulfatfällung als ersten Reinigungsschritt für die Q-ADH ausschließt.

#### *3.1.1.1.4 Gelfiltration*

Die Gelfiltration sollte eine Bestimmung der Molmasse der nativen Q-ADH ermöglichen. Es wurde Superdex G-200 als Säulenmaterial verwendet. Der Rohextrakt mit einer Aktivität von 31 U/mL wurde mit 1 mL Volumen auf die Säule aufgetragen und schließlich mit einem Laufpuffer eluiert. Es wurden 5-mL-Fraktionen gesammelt und nach Aufkonzentrierung auf Q-ADH-Aktivität überprüft. Die Enzymtests wurden mit ausgewählten Fraktionen durchgeführt. Nach einer 9-stündigen Inkubation bei 30°C unter Rühren wurde die Aktivität gaschromatographisch analysiert. In keiner der getesteten Fraktionen konnte eine solche Aktivität nachgewiesen werden.

#### *3.1.1.1.5 Affinitätschromatographie*

Die Affinitätschromatographie ist eine Chromatographie, die auf spezifischen Wechselwirkungen eines Liganden mit dem Enzym beruht. Vorteilhaft ist es, wenn vor Benutzung dieser Chromatographiemöglichkeit bereits genauere Kenntnisse über das zu reinigende Enzym und seine Interaktionen mit Liganden vorhanden sind. Da für die zu untersuchende Q-ADH diese Informationen nicht zur Verfügung standen und die bereits durchgeführten Reinigungsversuche mit anderen Chromatographieverfahren keinen Erfolg brachten, wurde

für einen Reinigungsversuch auf das von Sigma angebotene Test-Kit zurückgegriffen. Wie in dem Methodenteil beschrieben, wurde die Farbstoff-Liganden-Chromatographie durchgeführt. In der Erwartung, dass in einer Fraktion die Q-ADH-Aktivität wiedergefunden wird, wurden Enzymtests mit den Fraktionen der unterschiedlichen Säulen angesetzt. Die Fraktionen und die dazugehörigen ermittelten Aktivitäten wurden aufgeführt. Getestet wurden jeweils der Durchlauf und die Elution jeder Säule.

Die eingesetzte Q-ADH, die im Rohextrakt eine Volumenaktivität von 30,8 mU/mL aufwies, konnte in keiner der Fraktionen wiedergefunden werden. Da es bei der Chromatographie zur Verdünnung kommt, wurde der Rohextrakt auch 1:10 verdünnt gemessen. Das Ergebnis zeigt, dass auch bei 1:10-Verdünnung noch problemlos eine Aktivität nachgewiesen werden kann und die Verdünnung somit nicht der Grund für die fehlende Aktivität sein kann.

#### *3.1.1.1.6 Screening von Chromatographie-Bedingungen*

##### Matrixeffekte

Um zu überprüfen, ob sich das Enzym bei der Chromatographie nicht an die Austauschgruppen, sondern an die Matrix anlagert, ohne wieder abgelöst zu werden, wurde das Enzym mit Phenylsepharose, Q-Sepharose, (S)-Sepharose und Hydroxylapatit (Makro-Prep) inkubiert, dann das Chromatographiematerial entnommen und im Enzymtest eingesetzt. Die gaschromatographisch analysierten Werte zeigen, dass keine an das Material gebundene Aktivität nachweisbar war.

##### Pufferzusätze

Um zu überprüfen, ob eventuell durch die Chromatographie Cofaktoren des Enzyms durch Bindung abgetrennt worden sind, wurden verschiedene Zusätze in Enzympräparaten nach der Chromatographie darauf geprüft, ob sie in der Lage sind, Enzymaktivität wieder herzustellen. Eingesetzt wurden Hefeextrakt als komplexe Spurenelemente-Lösung, eine synthetische Standard-Spurenelementelösung,  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$ . Mit diesen Ansätzen sollte ein breites Spektrum an Ionen abgedeckt werden. Um evtl. benötigte Cosubstrate zu ergänzen, die durch die Chromatographie abgetrennt werden könnten, wurden PQQ, NAD und FMN jeweils in 1 mM Konzentration als Pufferzusätze verwendet. Die Messungen zeigen, dass keiner dieser Zusätze einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

#### *3.1.1.1.7 Zusammenfassung der Versuche zur chromatographischen Reinigung*

Um das Enzym zu reinigen, wurden verschiedenste Chromatographiematerialien getestet. Verwendet wurden in der Ionenaustauschchromatographie Anionentauscher, Kationentauscher, Hydroxylapatit als bifunktionaler Ionenaustauscher und ein Tentakel-Ionenaustauscher. Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit Phenylsepharose

gearbeitet. Des Weiteren wurde mit einem Test-Kit, das verschiedene Säulen enthielt, eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Es konnte jedoch durch keine Methode eine Enzymreinigung erfolgen. Auch eine durchgeführte Gelfiltration ergab kein aktives Enzym, so dass keine Aussagen zur Molekülgröße möglich sind.

Um den Grund für das Scheitern der üblichen Reinigungsarten zu untersuchen, wurden Parallelansätze durchgeführt, in denen jeweils ein Faktor beim jeweils eingesetzten Chromatographiematerial verändert wurde. Unter Verwendung verschiedener Puffer (KPi, HEPES, Tris) mit pH-Werten von 5 bis 8 konnten keine Unterschiede verzeichnet werden, eine Aktivitätswiederfindung war nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, dass die Enzymaktivität weder im Durchlauf noch in den eluierten Fraktionen nachzuweisen war, stellte sich die Frage, ob das Enzym eine Bindung mit der Matrix eingegangen ist. Der Einsatz der verschiedenen Matrizen nach Enzymbeladung im Enzymtest zeigte ebenfalls keine Aktivität. Es wurde vermutet, dass von dem Enzym durch Interaktionen mit den Chromatographiematerialien essenzielle Ionen bzw. ein benötigtes Coenzym abgetrennt wurde, wodurch die Desaktivierung zu erklären wäre. In weiteren Parallelversuchen wurden dem Puffer Zusätze beigefügt. Vorversuche zeigten, dass Nickel einen aktivierenden Einfluss auf das Enzym hat. Der Zusatz im Puffer zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Wiederfindung des Enzyms. Durch den Einsatz eines Hefeextrakts, der verschiedene Spurenelemente enthält, konnte das Enzym ebenfalls nicht aktiviert werden.  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im Puffer zeigten auch keine Wirkung. Die Verwendung von PQQ, FMN oder NAD im Puffer konnte ebenso wenig zur Aktivitätsfindung führen.

In der Folge wurden daher andere Reinigungsmethoden eingesetzt, basierend auf der Beobachtung, dass eine schwache Enzymaktivität nach einer Temperaturbehandlung bei  $100^\circ\text{C}$  zu beobachten war. Diese Reinigung ist im Folgenden zusammengefasst.

### **3.1.1.2 Fraktionierung der Zellproteine durch Ultrazentrifugation**

Keiner der durchgeführten chromatographischen Reinigungsversuche hatte eine Wiederfindung der Q-ADH-Aktivität zur Folge. Um zu überprüfen, ob es sich bei der Q-ADH um ein Membranenzym handelt, wurde eine Fraktionierung mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Ultrazentrifugation wurde zwecks reproduzierbarer Werte zweimal vorgenommen. Beide Male erfolgte ein Parallelansatz, wobei der Rohextrakt des einen Ansatzes in Puffer ohne Detergens resuspendiert wurde und der zweite in Puffer mit 0,5 % Triton X 100-Zusatz. Bestimmt wurde gaschromatographisch der Enantiomerenüberschuss des (*S*)-Enantiomers als Maß für die Enzymaktivität bzw. bei einem Ansatz auch die spezifische Aktivität des Pellets und des Überstandes. Der Rohextrakt vor Fraktionierung zeigte eine spezifische Aktivität von 3,36 mU/mL. Addiert man die im Pellet gemessene Aktivität mit der im Überstand gemessenen, so ergibt sich die Gesamtaktivität der Q-ADH im

jeweiligen Ansatz. Für die Verwendung des detergenshaltigen Puffers in der Ultrazentrifugation erreicht man eine Gesamtaktivität der Q-ADH von 8,38 mU/mL. Bei dem Einsatz von Puffer ohne Zusatz ergab sich eine Gesamtaktivität von 7,14 mU/mL. In allen Ansätzen sind allerdings auch hier die Verluste beträchtlich. Die Wiederfindung an aktivem Enzym liegt in der Summe von Überstand und membranhaltigem Sediment unter 10 %.

### 3.1.1.3 Partielle Reinigung des Rohextraktes

Der Rohextrakt wurde nach folgendem Schema gereinigt:

- Temperaturfällung 2-3 Minuten bei 100°C
- pH-Fällung bei pH = 3,5 (1 M HCl; zugegebenes Volumen an HCl ist ca. 1:10 vom Gesamtvolumen des Rohextraktes)
- Ultrafiltration mit 10-kDa-Filter
- Ultrafiltration mit 5-kDa-Filter

Biochemische Daten der Reinigungsschritte:

**Tab. 3: Aktivitätsdaten nach jedem Reinigungsschritt**

Präparat	Aktivität (U) ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Protein (mg/mL)	Spez. Aktivität (U/mg)	Anreicherung
Rohextrakt	1,50	29	0,05	
Temperaturfällung	2,25	2,2	1,02	20
pH-Fällung	2,25	0,4	5,6	112
UF 10-kDa-Filtrat	2,25	0,035	64,3	1286
UF 5-kDa-Überstand	2,25	0,03	75	1500

### 3.1.1.4 Reinigung über HPLC

Der Überstand nach Filtration an einer Ultrafiltrationsmembran 5 kDa wurde aufkonzentriert und auf eine HPLC-Säule mit folgenden Daten aufgetragen:

- Säule Nucleosil C18 Nautilus;
- UV-Detektor; Messung bei 214 nm;
- 100 % Wasser als Laufmittel;
- 0,3 mL/min bei ca. 50 bar.

Die Wellenlänge 214 nm wurde ausgewählt, da Peptidbindungen hier absorbieren. Die Nucleosil-C18-Nautilussäule der Firma Macherey-Nagel ist sehr hydrophil und kann auch stabil mit 100 % Wasser oder Puffer als Laufmittel betrieben werden. Der Rohextrakt wurde

portionsweise aufgetragen, später wurden die einzelnen Fraktionen der sechs Peaks vereinigt und mit der Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) aufkonzentriert. Abb. 16 zeigt die sechs

detektierten Peaks. Alle sechs Fraktionen wurden in einem Standardreaktionsansatz mit rac. PED angesetzt und die Aktivität über (*R*)-PED Abbau über 72 h Reaktionszeit mit chiraler GC gemessen. Nur die Fraktion 1 zeigt als einziger Peak eine Aktivität. Leider konnte dieser Doppelpeak in einer Folgereinigung dieser Fraktion auf HPLC nicht optimal getrennt werden, da sich beide Peaks nicht besser getrennt haben. Eine 100%-ige Trennung des Doppelpeaks konnte nicht mehr über diese HPLC-Säule erzielt werden. Dieser Versuch zeigt, dass erstens hier eine weitere Reinigung dieser ungewöhnlich kleinen Enzyme möglich war, da weitere fünf Peaks, die auch im Bereich der Peptidbindung absorbieren, getrennt wurden, und es zeigt sich weiterhin, dass das Enzym trotz eines HPLC-Laufs in einer Fraktion wieder aktiv vorlag und die Oxidation mit dem Nachweis von Mandelsäure und damit ein (*R*)-PED-Abbau stattgefunden hat. Entsprechend wurde auch die Mandelsäurebildung als Ester über chirale GC nachgewiesen.

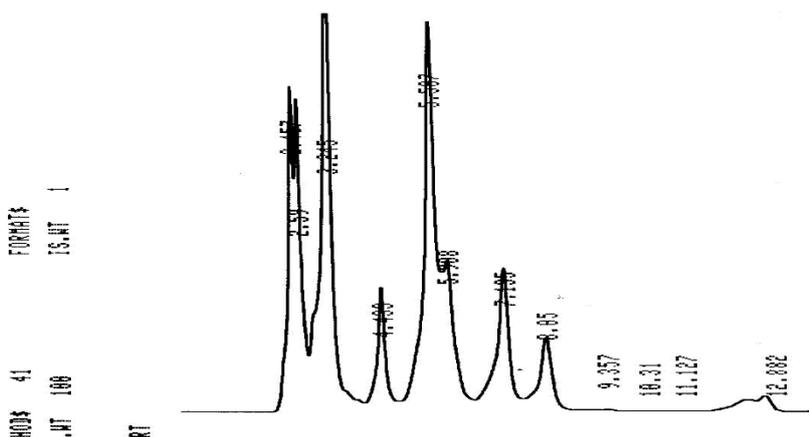


Abb. 16: HPLC-Peaks aus dem gereinigten Rohextrakt

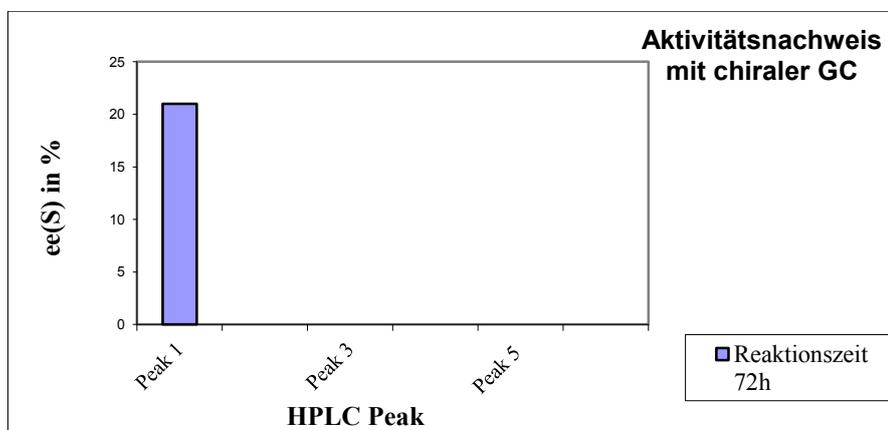


Abb. 17: Aktivitätsnachweis der einzelnen HPLC-Fraktionen



Es ist zu beachten, dass die Flächen der jeweiligen Messungen bei den vier verschiedenen Inkubationszeiten auch unterschiedlich sind, d. h. die Injektion von 1  $\mu\text{L}$  ist nicht immer exakt gleich in absoluten Werten, so dass damit bei allen Messungen gleiche Flächengrößen erzeugt werden könnten. Die Flächen sind aber relativ zueinander konstant. Das bedeutet, die Fläche von (*S*)-Diol z. B. kann über vier Messungen vier unterschiedliche Größen haben. Aber gegenüber der abgebauten Fläche von (*R*)-Diol ist sie gleich 100 % unveränderbar. Dies lässt sich deutlich erkennen, wenn man z. B. die Messung bei der Stunde 0 mit der nach 48 h vergleicht.

Das Ergebnis zeigt den Enantiomerenüberschuss des (*S*)-PED, das nicht selektiv abgebaut wird. Somit kann man prozentual den Abbau von (*R*)-PED ermitteln. Gleichzeitig zum Abbau des (*R*)-PED baut sich ein Peak nach 24 h Reaktionszeit mit einer Retentionszeit von 6,7 min auf, der sich dann bis nach 72 h Reaktionszeit wieder abbaut. Dies kann das Aldehydintermediat (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd sein.

Die chemische Synthese ist hier deutlich verfolgbar: (*R*)-PED baut sich ab, der intermediäre Aldehyd (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd baut sich auf (hier ist bei 48 h keine Mandelsäure nachweisbar) und bei 72 baut sich der Mandelsäurepeak auf und der Aldehyd und (*R*)-PED haben sich vollständig abgebaut. Nach 72 h ist das (*R*)-Diol vollständig abgebaut und das (*S*)-Diol liegt enantiomerenrein vor. Der Peak bei 6,7 min ist auch nach 72 h komplett abgebaut und nach Extraktion der Hydroxysäureester aus der Reaktionslösung und Auftragung auf chiraler GC ist jeweils ein Peak bei 16,5 min und bei 17,1 min zu detektieren, wobei diese nach Referenztests mit kommerziellen Mandelsäureestern als (*R*)-Mandelsäure im Überschuss über 90 % und (*S*)-Mandelsäure mit einem prozentualen Anteil von < 10 % nachgewiesen wurden. Dabei sind auch kleine Abweichungen wegen der sehr empfindlichen Messung und auch wegen der nicht zu 100 % exakten Flächenmessung des Gerätes zu erwarten, so dass z. B. beide Flächen nicht auf die letzte Ziffer gleich groß sind. Dies ist eine messtechnische Drift und keine chemische. Auch die Derivatisierung und der Extraktionsprozess spielen eine Rolle dabei.

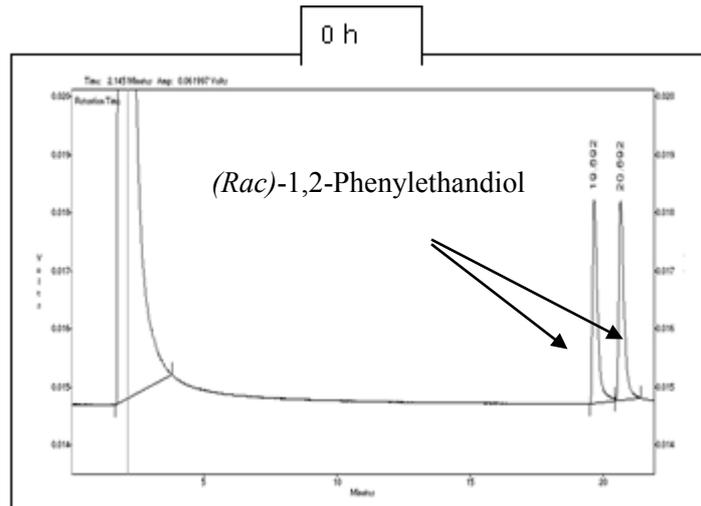


Abb. 18: Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse zu Beginn bei 0 h (Fläche (S)-PED: 50515,  $ee$ -Wert (S)-PED = 0%, Fläche (R)-PED: 55926)

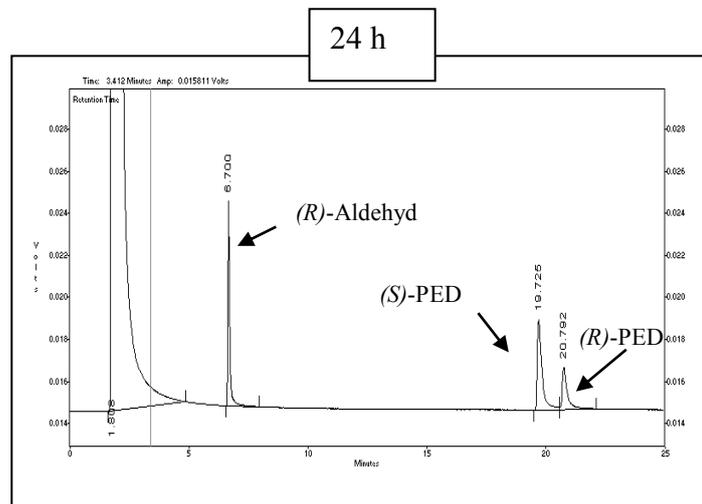


Abb. 19: Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 24 h (Fläche (S)-PED: 50213,  $ee$ -Wert (S)-PED = 33%, Fläche (R)-PED: 25074)

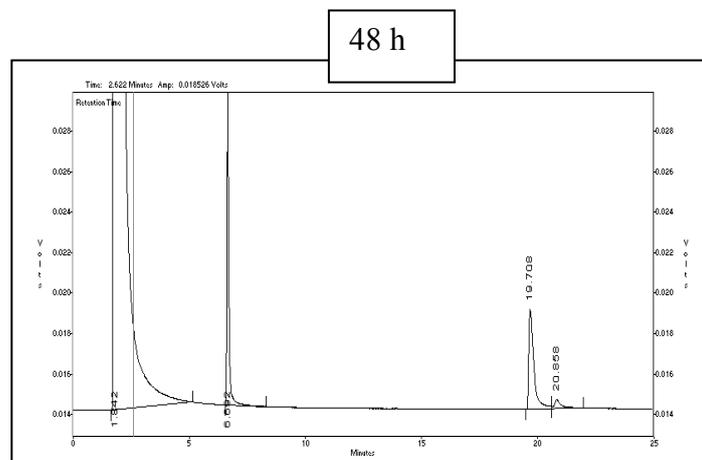


Abb. 20: Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 48 h (Fläche (S)-PED: 60433,  $ee$ -Wert (S)-PED = 68%, Fläche (R)-PED: 11422)

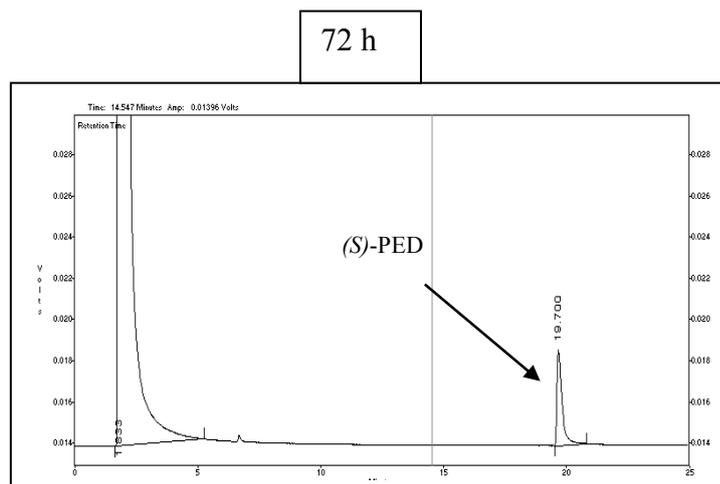


Abb. 21: Reaktionsverlauf für den enzymatischen Abbau von PED, GC-Analyse nach 72 h (Fläche (S)-PED: 64910, *ee*-Wert (S)-PED = 100% , Fläche (R)-PED: 0)

Nach dieser direkten GC-Analyse der Proben wurde das Produkt nach 72 h für den Nachweis einer möglicherweise gebildeten Mandelsäure durch Veresterung derivatisiert und ebenfalls mittels GC analysiert. Die Retentionszeiten, die mit Standards ermittelt wurden, waren:

(*R*)-Mandelsäure: 16,5 min

(*S*)-Mandelsäure: 17,1 min

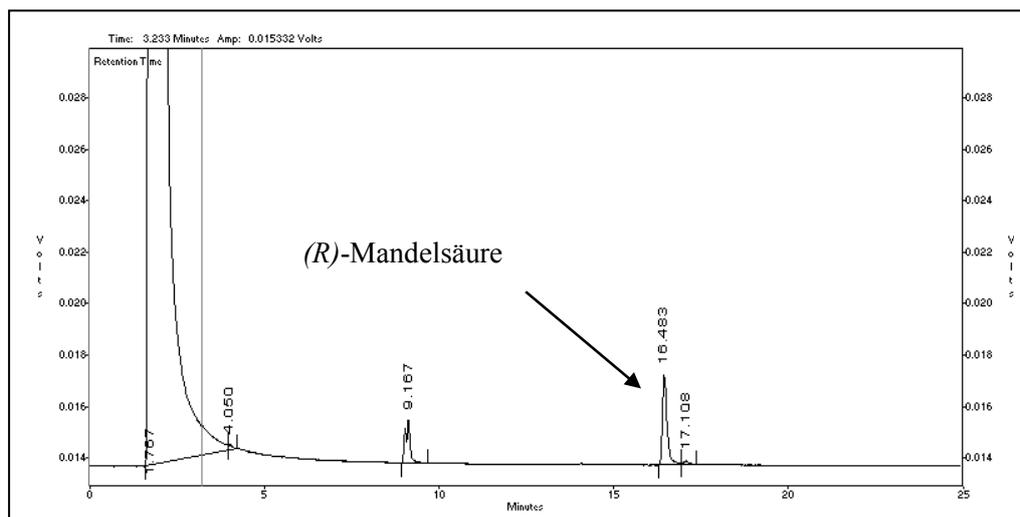


Abb. 22: Reaktionsverfolgung der Hydroxysäuresynthese über GC (Fläche (*R*)-Mandelsäureester: 21591; *ee*-Wert (*R*)-Mandelsäureester = 91%, Fläche (*S*)-Mandelsäureester: 970; *ee*-Wert (*S*)-Mandelsäureester = 9%)

### 3.2.2 Nachweis von chiralen (*S*)-Alkoholen, (*R*)-Hydroxysäuren und (*R*)-1-Phenyl-2-hydroxyethanal mittels GC/MS

Der Produktnachweis von diversen Hydroxysäuren und des (*R*)-Aldehydzwischenproduktes erfolgte zusätzlich mittels GC/MS. Alle Hydroxysäuren wurden als Erstes als kommerziell

erhältliches Produkt im Labor verestert und die hergestellten Methylester auf GC/MS aufgetragen und detektiert. Dieselben Proben aus dem Reaktionsansatz mit PQQ-ADH, die für die chirale GC vorbereitet worden sind und mittels GC nachgewiesen waren, konnten direkt für die GC/MS-Analyse verwendet werden. In der folgenden Tabelle sind die Molekülpeaks aufgelistet.

Die Molekülpeaks sind eindeutig der jeweiligen Massenzahl der Substanzen zuzuordnen.

**Tab. 4: Nachweis der Hydroxy- und organischen Säureester mittels GC/MS**

Substanzen	GC/MS (Molekülpeak)
( <i>S</i> )-1-Phenyl-1,2-ethandiol	138
( <i>S</i> )-1-Phenyl-1,3-propandiol	152
( <i>R</i> )-1-Phenyl-2-hydroxy-ethanal (Aldehydintermediat von PED)	136
( <i>R</i> )-Mandelsäuremethylester	166
( <i>R</i> )-3-Hydroxy-3-phenylpropansäuremethylester	180
( <i>R</i> )-2-Methoxy-2-phenylethansäuremethylester	180
( <i>R</i> )-2-Phenylpropansäuremethylester	164

Die beiden (*S*)-Diole aus der Tabelle 4 sind Proben, die nach 72 h aus dem Reaktionsansatz stammend gemessen sind und es zeigt sich, dass der verbleibende Peak in der Lösung (siehe GC-Spektrum in Abb. 21) von dem nicht oxidierten (*S*)-Diol kommt.

Auch aus dem Reaktionsansatz nach 48 h (Abb. 20) wurde eine GC/MS-Probe gefahren, die ebenfalls einen deutlichen Molekülpeak bei 136 m/z zeigt. Dieser entspricht der Masse des Aldehydzwischenproduktes.

Ebenso sind die angesäuerten und mit TMSH methylveresterten Hydroxysäuren mittels GC/MS untersucht worden und vier der Säuren konnten auch aus der extrahierten Reaktionslösung detektiert und nachgewiesen werden.

Alle Alkohole und Säuren in Tab. 4 sind auch als kommerzielle Substanzen für die Referenzmessung parallel aufgetragen, soweit erhältlich (siehe Chemikalienliste in Kapitel 2).

Die Fragmente sind entsprechend den GC/MS-Diagrammen charakteristisch verteilt und wurden als  $M^+M^-$  bestimmt. Zur Vereinfachung der Auswertung wurde nur der Molekülpeak aufgelistet, der die tatsächliche Masse wiedergibt.

Auch 1-Phenyl-2-Hydroxyethanal mit dem Molekülpeak 136 und von 5-Phenyl-5-deoxy-D-xylulose sind mit dem Molekülpeak 198 entsprechend in den jeweiligen MS-Spektren zu finden.

Als exemplarisches Beispiel sind nun im Folgenden aus dem NIST Chemistry WebBook MS-Spektren von 1-Phenyl-1,2-ethandiol mit dem Molekülpeak 138 und von Mandelsäuremethylester mit dem Molekülpeak 166 beigefügt.

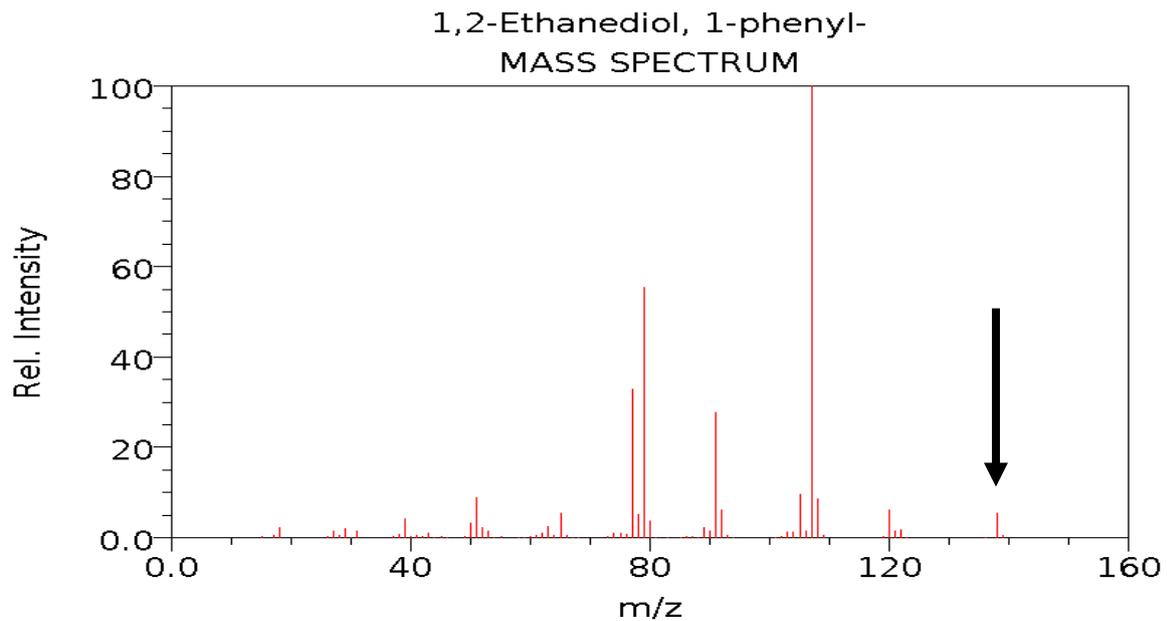


Abb. 23: Massenspektrum von 1-Phenyl-1,2-ethandiol aus dem NIST Chemistry WebBook

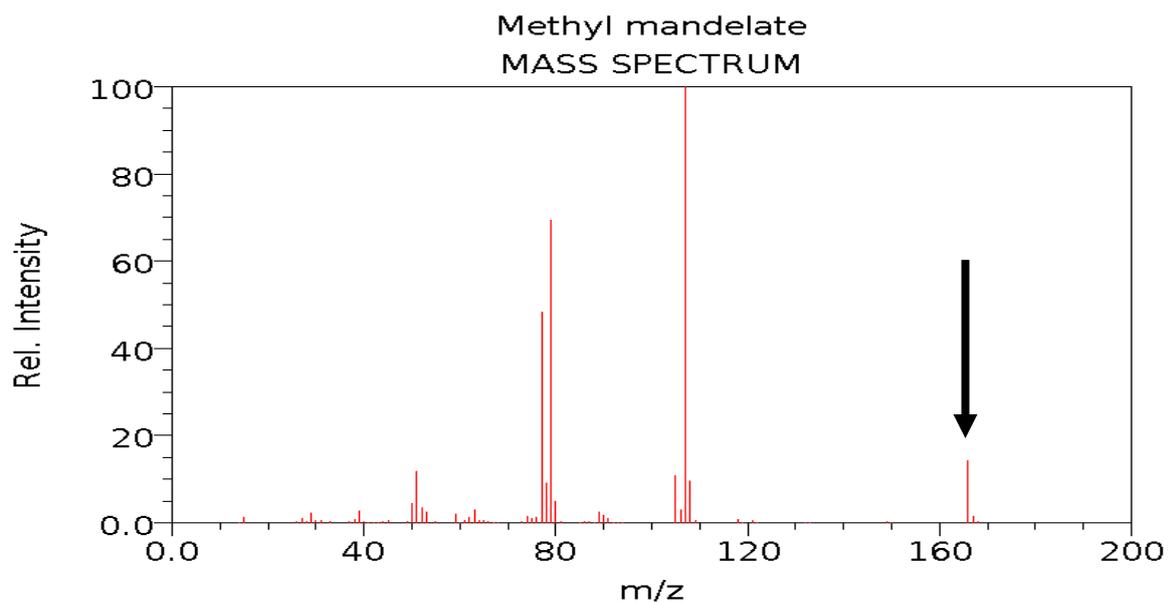


Abb. 24: Massenspektrum von Mandelsäuremethylester aus dem NIST Chemistry WebBook

### 3.2.3 Nachweis der Peptidbindung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Amid-I- und die Amid-II-Banden werden in der Literatur am häufigsten für die Strukturaufklärung an Proteinen benutzt, dabei ist die Amid-I-Bande zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen in wässrigem Medium die am häufigsten genutzte Bande (Stuart, 1997).

Im Protein lassen sich Schwingungen der Sekundärstruktur von den Schwingungen bestimmter Aminosäuren unterscheiden. Charakteristische Schwingungsmoden des Proteinrückgrats sind die Schwingungen der Peptidbindung. Die Amid-II-Bande absorbiert bei ca.  $1550\text{ cm}^{-1}$  und setzt sich aus den kombinierten N-H-Biege- und C-N-Streckschwingungen des Peptidgerüsts zusammen. Im Wellenzahlbereich zwischen  $1700$  und  $1620\text{ cm}^{-1}$  absorbieren die C=O-Streckschwingungen der Peptidbindung, die sogenannte Amid-I-Bande (Nüsken, 2002).

Gegenüber der IR-Spektroskopie in Transmission hat die ATR den Vorteil, dass aufgrund von Adsorption die lokale Konzentration im Bereich der evaneszenten Welle erhöht wird. Das führt dazu, dass wesentlich kleinere Probenkonzentrationen möglich sind als bei der Transmission. Die Methode ist außerdem gegenüber Staubpartikeln und Luftblasen recht unempfindlich, die im Falle der Transmission zu einer Streuung führen können. Auch nichtlösliche Substanzen sind messbar, ebenso auch Polymere, und des Weiteren entfällt das Herstellen der KBr-Presslinge, wobei dieses gerade bei Proteinen nicht anwendbar wäre.

Der dünne kristalline Proteinfilm wurde bei  $2000$ - $1000\text{ cm}^{-1}$  Wellenzahl gescannt und das in Abb. 25 wiedergegebenen Spektrum aufgenommen.

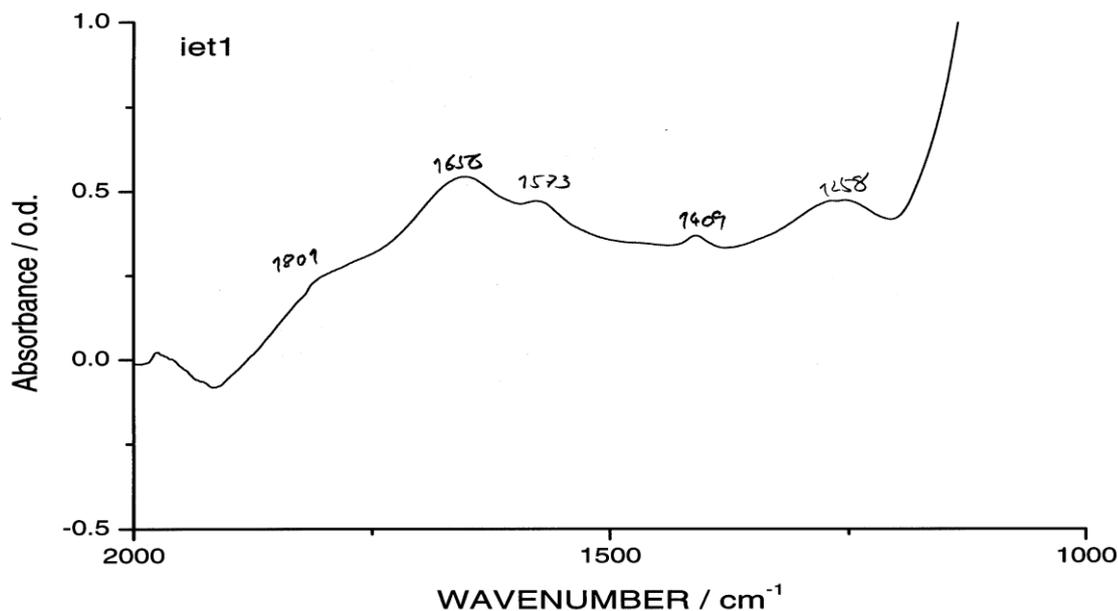


Abb. 25: Das IR-Spektrum der gereinigten Alkoholdehydrogenas

Die Wellenzahlen, die aufgenommen wurden, können folgenden funktionellen Gruppen mit IR-Absorption zugeordnet werden:

1809	C=O/COOH-Gruppe
1658	Amid-I-Gruppe
1573	Amid-II-Gruppe C=C/CHO-Gruppe
1258	OH-Gruppe

Der Proteingehalt in diesem Versuch hat nach mehreren Reinigungsschritten von Temperatur- und pH-Fällung über Ultrafiltration bis HPLC-Reinigung stark abgenommen, aber durch die Empfindlichkeit der ATR- FTIR Technologie für Messungen mit geringen Konzentrationen und die Unempfindlichkeit der Methode gegen Störungen, die FTIR- oder IR-Spektroskopie normalerweise zeigen und eine Messung deutlich stören, wurden aussagekräftige Ergebnisse erhalten.

Deutliche Zeichen einer Proteinstruktur gibt es bei den Wellenzahlen 1658/1573, da diese typisch und charakteristisch für Peptidbindungen sind. Also muss die Probe eine Peptidbindung besitzen und auch proteinischer Natur sein (keine bioorganischen Verbindungen oder einzelne Aminosäuren). Alle anderen Wellenzahlen deuten ebenfalls auf für Aminosäuren typische funktionelle Gruppen (OH-, COOH-Gruppen) hin.

### 3.2.4 Aminosäurezusammensetzung des gereinigten PQQ-ADH-Proteins

In diesem Versuch hat sich nach mehreren Reinigungsschritten von Temperatur- und pH-Fällung über Ultrafiltration bis HPLC-Reinigung der Proteingehalt stark verringert, aber die Bande, die auch hier wie in dem HPLC-Aktivitätsversuch als einzige Proteinfraction über HPLC-Reinigung Aktivität zeigte und rac. PED zur (*R*)-Mandelsäure oxidierte, wurde hier getrennt und zur festen Probe getrocknet. Eine feste Probe, die aus der aktiven Fraktion der HPLC-Reinigung entnommen wurde, wurde chemisch hydrolysiert und die einzelnen Aminosäuren mittels Aminosäureanalysator bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung konnte qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Sie ist in folgender Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5: Aminosäure-Zusammensetzung des Q-ADH-Proteins

Aminosäure	Aminosäure mol / (100 mol)	Anzahl der Aminosäure
Asparaginsäure	11,0624	11
Threonin	3,9043	4
Serin	7,2546	7
Glutaminsäure	20,1763	20
Prolin	2,6720	3
Glycin	13,3911	13
Alanin	12,6712	13
Valin	3,8571	4
Isoleucin	4,0725	4
Leucin	6,4225	7
Tyrosin	1,8004	2
Phenylalanin	3,3457	3
Ornithin	1,1582	1
Lysin	3,4658	3
Histidin	0,9887	1
Arginin	3,7570	4
<b>Gesamt</b>	<b>99,7681</b>	<b>100</b>
<b>Molekulargewicht</b>	99,7681 kDa	<b>~10 kDa</b>

Laut Literatur zur Aufklärung des Oxidationsmechanismus von Chinoproteindehydrogenasen spielt Asparaginsäure eine zentrale Rolle. Die Aminosäureanalyse zeigt, dass das Enzym aus *Pseudomonas* sp. elf Asparaginsäure-Moleküle enthält.

### **3.2.5 Versuche zur Bestimmung der Aminosäuresequenz**

Die Sequenzierung wurde mit derselben Probe durchgeführt, die auch für die AT-IR und den Aminosäureanalysator eingesetzt wurde. Die Sequenzierung hat leider kein Ergebnis geliefert, da der Sequenzvorgang sofort bei dem ersten Zyklus abbrach. Dies ist ein eindeutiges Zeichen für eine N-terminale Blockierung oder eine zyklische Proteinkette, die somit nicht nach der üblichen Reaktion des Edman-Abbaus zugänglich ist. Viele Mikroenzyme, die ausführlich in dem Diskussteil besprochen werden, sind N-terminal blockiert. Im Diskussteil sind mehrere vergleichbare Proteine aufgeführt.

## **3.3 Ergebnisse der enzymatischen Oxidationsreaktion**

### **3.3.1 Chinoprotein-Enzyme**

Die Aufklärung der Struktur des Cofaktors Pyrrolochinolinchinon (PQQ) wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen (Salisbury *et al.*, 1979; Duine *et al.*, 1980) nahezu zeitgleich erfolgreich abgeschlossen. Mehr als 20 verschiedene Enzyme sind mittlerweile als PQQ-abhängig entdeckt und klassifiziert worden. Die orthochinoide Struktur des PQQ ist direkt für den Ablauf der Oxidations- und Reduktionsreaktion verantwortlich. Diese prosthetische Gruppe besitzt ein relativ hohes mittleres Redoxpotenzial von +90 mV (Duine *et al.*, 1980). Dieses Redoxpotenzial ist dafür verantwortlich, dass, anders als beim Coenzym NADH/NAD, die Oxidationsreaktion bevorzugt abläuft.

### **3.3.2 Substratspektrum der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase: Test verschiedener Alkohole**

Zur Aufnahme eines Substratspektrums wurden verschiedene Alkohole im Standardansatz mit unbehandeltem Rohextrakt getestet und die jeweiligen Produkte mittels GC und GC/MS analysiert.

#### **3.3.2.1 Substratspektrum mit unbehandeltem Rohextrakt**

Der Reaktionsansatz wurde unter Rühren bei 30°C angesetzt. Aufgeführt in Tabelle 6 sind die jeweiligen Umsatzgrade nach 72 h. Hierin werden die Werte der verbleibenden (*S*)-Alkohole und Ketale in der Lösung aufgelistet und die Ergebnisse zusammengestellt.

**Tab. 6: Substratspektrum mit Enantiomerenreinheit und Überschuss des verbleibenden (*S*)-Alkohols bei Umsatz von racemischem Alkohol nach 72 h mit Rohextrakt**

Alkohole und Diole als Substrat	<i>ee</i> ( <i>S</i> ) in %
1-Phenyl-1,2-ethandiol	>99
1-Phenyl-1,3-propandiol	>99
3-Buten-1,2-diol	>99
Propylenglycol	0*
2-Methoxy-2-phenyl-ethanol	58
2-Phenyl-propanol	50
2,2-Diethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	48
2-Cyclopentan-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	30

\* Racemisches Gemisch ist abgebaut.

Die drei ersten Diole liegen nach 72 h Reaktion zu >99 % enantiomerelektiv (der Peak wurde mit kommerziell erworbenen (*S*)-Diolen geprüft) in der Lösung vor. Propylenglycol ist racemisch komplett oxidiert, so dass hier keine Selektivität zwischen (*R*)/(*S*)-Enantiomeren durch das Enzym vorliegt. Alle anderen Alkohole und Ketale zeigen geringe Enantiomerelektivität der (*S*)-Komponente an. Bei diesen 5 weiteren Alkoholen in der Tab. 6 wurde die jeweilige (*R*) und (*S*)-Zugehörigkeit durch Beobachtung des Abbaus des jeweiligen Peaks über die Reaktionszeit als (*S*)-Alkohol festgelegt.

In Tabelle 7 sind dann die nach 72 h Reaktionsansatz entstandenen Hydroxy- und organischen Säuren zusammengestellt und bewertet. Die Säuren der Messung wurden, wie im Methodenteil erwähnt, in die Esterform überführt und mittels chiraler GC detektiert.

**Tab. 7: Umsatz und Enantiomerenreinheit verschiedener Oxidationsprodukte aus Alkoholen. Umsetzungen mit Rohextrakt, gemessen nach 72 h Inkubation**

Hydroxysäuren und org. Säuren als Produkte	<i>ee</i> ( <i>R</i> ) in %	Umsatz in %
( <i>R</i> )-Mandelsäure	>90	50
( <i>R</i> )-3-Hydroxy-3-phenylpropansäure	>99	50
( <i>R</i> )-2-Hydroxybuttersäure-3-en	>99	50
3-Hydroxybuttersäure	0*	100

( <i>R</i> )-2-Methoxy-2-phenyl-ethansäure	>99	29
( <i>R</i> )-2-Phenylpropansäure	>99	25
( <i>R</i> )-2,2-diethyl-1,3-dioxolan-4-methansäure	>99	24
( <i>R</i> )-2-Cyclopentan-1,3-dioxolan-4-methansäure	>99	15

\* 100 % racemisches Produkt

Hier erreicht die (*R*)-Mandelsäure (die Peaks der ersten drei Säuren wurden mit kommerziell erworbener (*R*)-Säure geprüft) nur eine Enantiomerenreinheit von über 90 %, da anscheinend ein geringer Anteil an (*S*)-Diol auch oxidiert wurde. Der Peak ist deutlich in dem GC-Chromatogramm zu sehen. 3-Hydroxybuttersäure wurde racemisch >99 % aus dem rac. Alkohol hergestellt. Alle anderen Säuren sind >99 % enantioselectiv aus dem rac. Alkohol hergestellt worden, denn keinerlei (*S*)-Säure wurde detektiert. Bei diesen Säuren in der Tab. 7 wurde die jeweilige (*R*)- und (*S*)-Zugehörigkeit durch Beobachtung der Zunahme des jeweiligen Peaks über die Reaktionszeit als (*R*)-Säuremethylester festgelegt. Entsprechend ist aber bei den letzten vier Säuren der Gesamtumsatz geringer, da die Oxidation nach 72 h nicht vollständig abgelaufen ist.

### 3.3.2.2 Substratspektrum mit partiell gereinigtem Enzym

Im Folgenden sind die Substanzen, die auch unter anderem mit dem unbehandelten, nicht gereinigten Rohextrakt der PQQ-ADH eingesetzt wurden, hier mit dem partiell gereinigten Enzym unter denselben Bedingungen des Reaktionsansatzes wie bei der unbehandelten Enzymreaktion durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tab. 8: Substratspektrum und Reinheits- sowie Umsatzgrad mit partiell gereinigtem Rohextrakt**

Alkohole und Diole als Substrat	<i>ee</i> ( <i>S</i> ) in % (chirale GC)
1-Phenyl-1,2-ethandiol	>99
1-Phenyl-1,3-propandiol	>99
3-Buten-1,2-diol	>99
Trimethyl-4-ethoxybutandiol	>99
2,2-Diethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	50
2-Cyclopentan-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan	30

Die ersten vier Diole liegen erwartungsgemäß >99 % als (*S*)-Diol vor, somit ist das (*R*)-Diol vollständig hier oxidiert. Die beiden Ketale sind teilweise oxidiert und somit ist der (*S*)-Alkoholüberschuss entsprechend geringer.

In der nächsten Tabelle sind die entsprechend entstandenen enantiomerenrein oxidierten organischen und Hydroxysäuren aufgeführt, die mit derselben Methode wie beide Reaktionsansätze mit dem unbehandelten Enzym analysiert und ausgewertet wurden.

**Tab. 9: Produktspektrum und Reinheits- und Umsatzgrad mit partiell gereinigtem Rohextrakt**

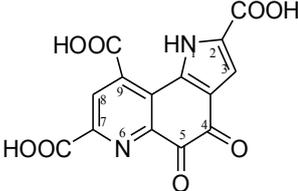
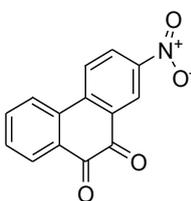
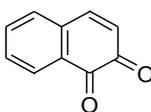
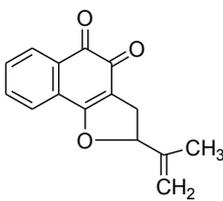
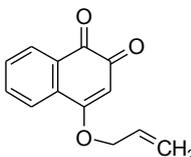
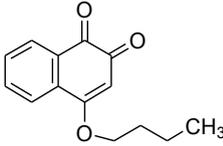
Hydroxysäuren und org. Säuren als Produkte	<i>ee</i> ( <i>R</i> ) in % (chirale GC)	Umsatz in %
( <i>R</i> )-Mandelsäure	>90	50
( <i>R</i> )-3-Hydroxy-3-phenylpropansäure	>99	50
( <i>R</i> )-2-Hydroxybuttersäure-3-en	>99	50
Trimethyl-4-ethoxy-2-hydroxybuttersäure	>99	50
( <i>R</i> )-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-methansäure	>99	25
( <i>R</i> )-2-Cyclopentan-1,3-dioxolan-4-methansäure	>99	20

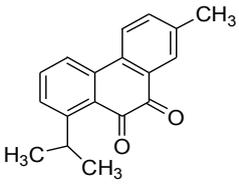
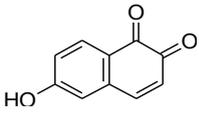
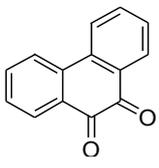
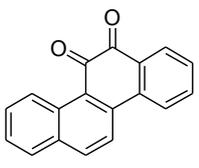
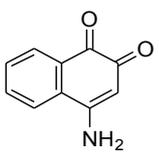
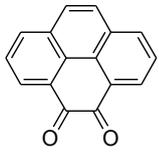
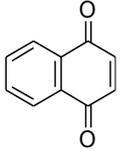
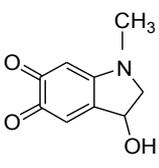
Außer Mandelsäure haben alle anderen Säuren einen *ee*-Wert von >99 % für die (*R*)-Komponente erreicht. Die Oxidationen sind für die ersten vier Säuren auch zu 50 % erfolgt. Nur für die zwei letzte Substanzen sind geringere Umsätze zu beobachten.

### 3.3.3 Substratspektrum der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase: Test verschiedener orthochinoider Verbindungen als Coenzyme

Im Folgenden wurde geprüft, inwiefern das teure PQQ durch einfachere, kostengünstigere Verbindungen ersetzt werden kann. Dazu wurde eine Vielzahl von Verbindungen mit dem gemeinsamen Strukturmerkmal einer o-chinoiden Teilstruktur als Alternative zu PQQ eingesetzt. Von anderen Coenzymen wie NAD oder NADP ist bekannt, dass die entsprechenden Enzyme kaum Variationen an der Coenzymstruktur zulassen. Dies gilt auch für FAD- oder FMN-abhängige Enzyme.

Tab. 10: Relative Aktivität des Enzyms bei verschiedenen Cofaktoren

Substanz	MW	Abk.	Strukturformel	Aktivität (U/mL)	Rel. Akt. (bezogen auf PQQ)
Pyrrolochinolinchinon	330,21	PQQ		83,5	100 %
2-Nitrophenanthra- chinon (gesättigt)	253,21	NPC		81,9	98 %
1,2-Naphthochinon	158,1	NC		68,5	82 %
2,3-Dihydro-2- (i-Methylethenyl)- naphtho(1,2-β)- furan-4,5-dion (gesättigt)	240,26	NFD		28,2	34 %
4-Allyloxy-1,2- naphthochinon	200,19	AINC		16,9	20 %
4-Butoxy-1,2- naphthochinon (EtOH, Triton, gesättigt)	230,26	BNC		16,3	20 %

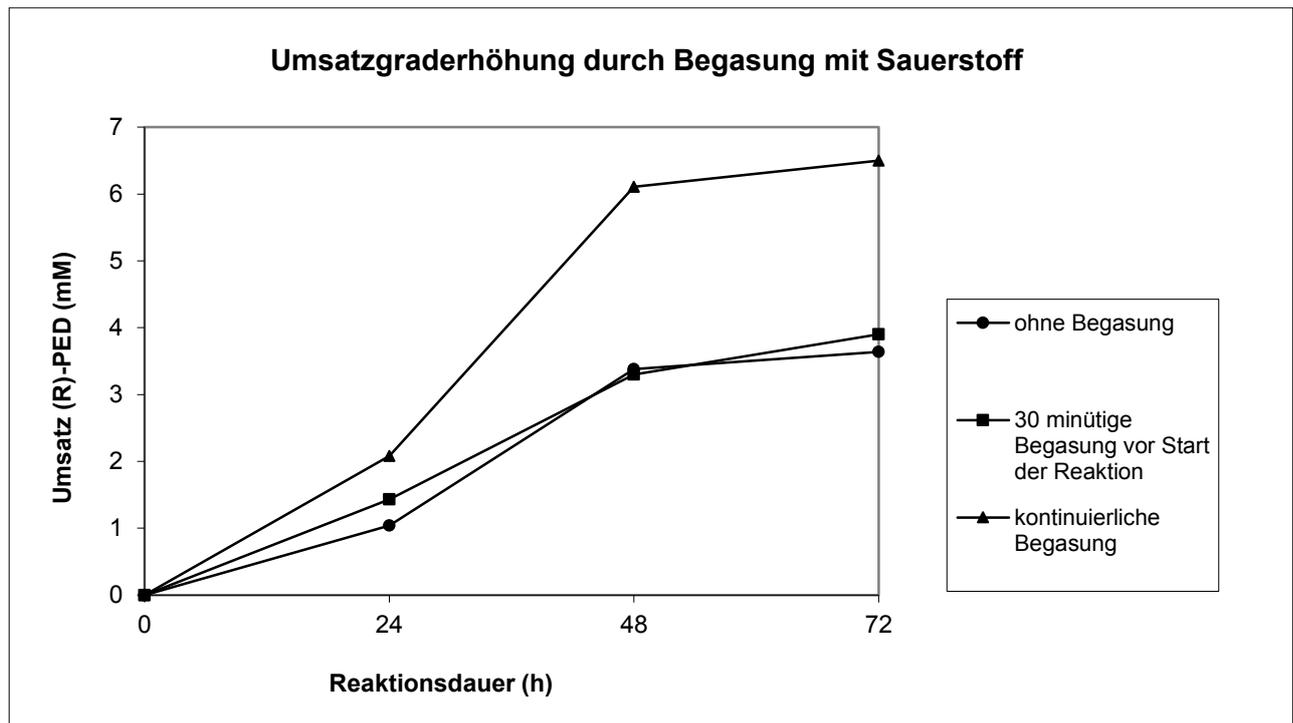
Isopropyl-7-methyl-9,10-phenanthrenchinon (EtOH, Triton, gesättigt)	264,32	IPC		13,2	16 %
6-Hydroxy-1,2-naphthochinon (EtOH, Triton, gesättigt)	174,15	HNC		9,4	11 %
9,10-Phenanthrenchinon (EtOH, Triton, gesättigt)	208,22	PC		9,4	11 %
11,12-Dihydrochrysen-11,12-dion (EtOH, Triton, gesättigt)	258,2	DC		9	10 %
4-Amino-1,2-naphthochinon (EtOH, Triton, gesättigt)	182,18	ANC		5	6 %
Pyren-4,5-dion (gesättigt)	256,26	PD		24,3	29 %
p-Benzochinon	152,1	pBC		14,1	17 %
Adrenochrom	179,2	AC		0	0 %

Die in Tab. 10 aufgeführten Werte zeigen, dass es tatsächlich möglich ist, dass der komplexe Cofaktor PQQ für einige Chinoprotein-Enzyme durch sehr einfache und kostengünstige Verbindungen mit o-chinoider Struktur ersetzt werden kann, teilweise ohne jeglichen Verlust an enzymatischer Aktivität.

### **3.4 Präparative Anwendungen der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase (Q-ADH)**

#### **3.4.1 Untersuchung der Enzymaktivität der Q-ADH bei kontinuierlicher bzw. einmaliger blasenfreier Begasung des partiell gereinigten Rohextrakts**

Aus der Abbildung 26 wird ersichtlich, dass der durch die enzymatische Oxidation reduzierte Cofaktor PQQH<sub>2</sub> durch den im Puffer gelösten Sauerstoff re-oxidiert, also regeneriert wird. Im folgenden Experiment soll die Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung durch blasenfreie Begasung kontinuierlich konstant gehalten werden, damit eine optimale Sauerstoffversorgung für die Regenerationsreaktion zur Verfügung steht. Die blasenfreie Begasung ist erforderlich, da ganz allgemein die Einleitung von Gasen in Blasenform die native Proteinstruktur schädigt und somit zur Inaktivierung des Enzyms führen kann. Um den Einfluss von Sauerstoff bei kontinuierlicher und einmaliger Begasung auf die Enzymaktivität der Q-ADH zu untersuchen, wurde eine Reaktion mit drei verschiedenen Reaktionsansätzen durchgeführt. Alle drei Ansätze wurden im selben Reaktionsgefäß durchgeführt mit dem Unterschied, dass einmal gar nicht begast wurde, einmal nur einmalig und einmal kontinuierlich begast wurde. Der Sauerstoffgehalt wurde mit einem Sauerstoffsensor gemessen. Der erste Ansatz wurde dabei nicht begast und die Reaktion läuft wie die beschriebenen Standardreaktionen. Der zweite Ansatz wurde einmalig 30 Minuten begast. Danach lag der Sauerstoffgehalt gesättigt bei etwa 25 mg/L. Der dritte Ansatz wurde kontinuierlich begast und der Sauerstoffgehalt wurde konstant bei 25-26 mg/L gehalten.



**Abb. 26: Umsatzgrad in Abhängigkeit von der Sauerstoffbegasung**

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich ist, läuft die Reaktion mit kontinuierlicher Begasung deutlich schneller ab als die in dem nicht bzw. nur einmalig begasten Ansatz. Eine kontinuierliche Begasung mit Sauerstoff zeigt nach drei Tagen einen Umsatz von 100 %, während der Umsatz bei dem nicht begasten bzw. einmalig begasten Ansatz nur etwa 50 % erreichte. Die Umsätze sind anhand des Abbaus des (*R*)-PED über chirale GC gemessen worden. Die einmalige Vorab-Begasung des Ansatzes – ohne Enzym bis zur Sättigung – hat keinen großen Einfluss auf die Aktivität der Q-ADH. Der Umsatz ist vergleichbar mit dem der Standardreaktion. Für die Untersuchung der Cofaktorregenerierung und dem Cofaktoraustausch wurde die kontinuierliche Begasung weiter verwendet. Somit wurde nachgewiesen, dass kontinuierliche Sauerstoffzufuhr eine Beschleunigung der Reaktion und somit eine effektive Cofaktorregenerierung bewirkt.

Diese Methode wurde ebenfalls eingesetzt bei der Verwendung des Ru<sup>II</sup>-Katalysators im Zweiphasensystem, da die wässrige Phase mit dem Rohextrakt die Oberphase bildet, während die Toluolphase mit dem Ru<sup>II</sup>-Katalysator die Unterphase darstellt. Dabei ist es besonders wichtig, dass während der Oxidation für eine zusätzliche Versorgung der Reaktion mit Sauerstoff gesorgt wird.

### 3.4.2 Cofaktoraustausch zur Beschleunigung der Reaktion und Anwendung kostengünstigerer chinoider Cofaktoren

#### 3.4.2.1 Verwendung alternativer orthochinoider Cofaktoren bei der präparativen Anwendung

Wie vorab gezeigt werden konnte, ist es möglich, bei der Q-ADH aus *Pseudomonas* sp. den natürlichen Cofaktor PQQ durch eine Reihe anderer orthochinoider Cofaktoren zu ersetzen. Im Folgenden wurden vergleichende Umsetzungen mit PQQ (Referenz) und Naphthochinon, Phenanthrenchinon und Nitrophenanthrachinon durchgeführt und dann die Umsatzrate mittels GC bestimmt.

#### 3.4.2.2 Cofaktoraustausch mit unbehandeltem Rohextrakt

Die Cofaktoren wurden mit der Konzentration von 0,57 mM (225 $\mu$ L) eingesetzt. Problematisch war, dass 1,2,-Naphthochinon (NC), 9,10-Phenanthrenchinon (PC) und 2-Nitrophenanthrachinon (NPC) in Wasser schlecht löslich sind. Sie wurden daher alle als Suspensionen eingesetzt.

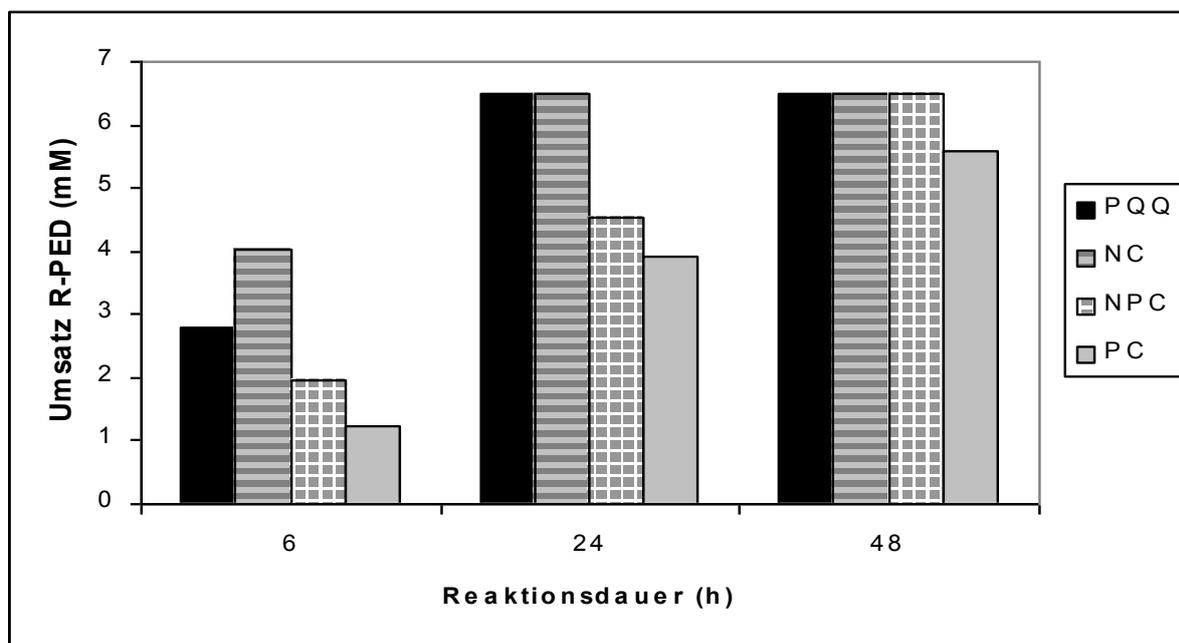


Abb. 27: Umsatzgrad in Abhängigkeit vom Cofaktor mit nicht gereinigtem Rohextrakt

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass sowohl 1,2-Naphthochinon als auch 9,10-Phenanthrenchinon und 2-Nitrophenanthrachinon neben PQQ als Elektronenakzeptoren für die Oxidation von (*R*)-PED geeignet sind. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit, neben der Reaktion mit PQQ, zeigt sich mit Naphthochinon.

### 3.4.2.3 Cofaktoraustausch mit partiell gereinigtem Rohextrakt

Die Untersuchungen mit Tausch der Cofaktoren wurden ebenfalls mit partiell gereinigtem Rohextrakt (Temperaturfällung, 100°C) bei Einsatz verschiedener Cofaktoren durchgeführt. Als Cofaktoren dienen PQQ, PDMe, 9,10-Phenanthrenchinon, 1,2-Naphthochinon und 2-Nitrophenanthrachinon in ihren Sättigungskonzentrationen wie folgt:

- NC: 2,5 mM
- PC: 0,18 mM
- NPC: 0,09 mM
- PDMe 0,023 mM

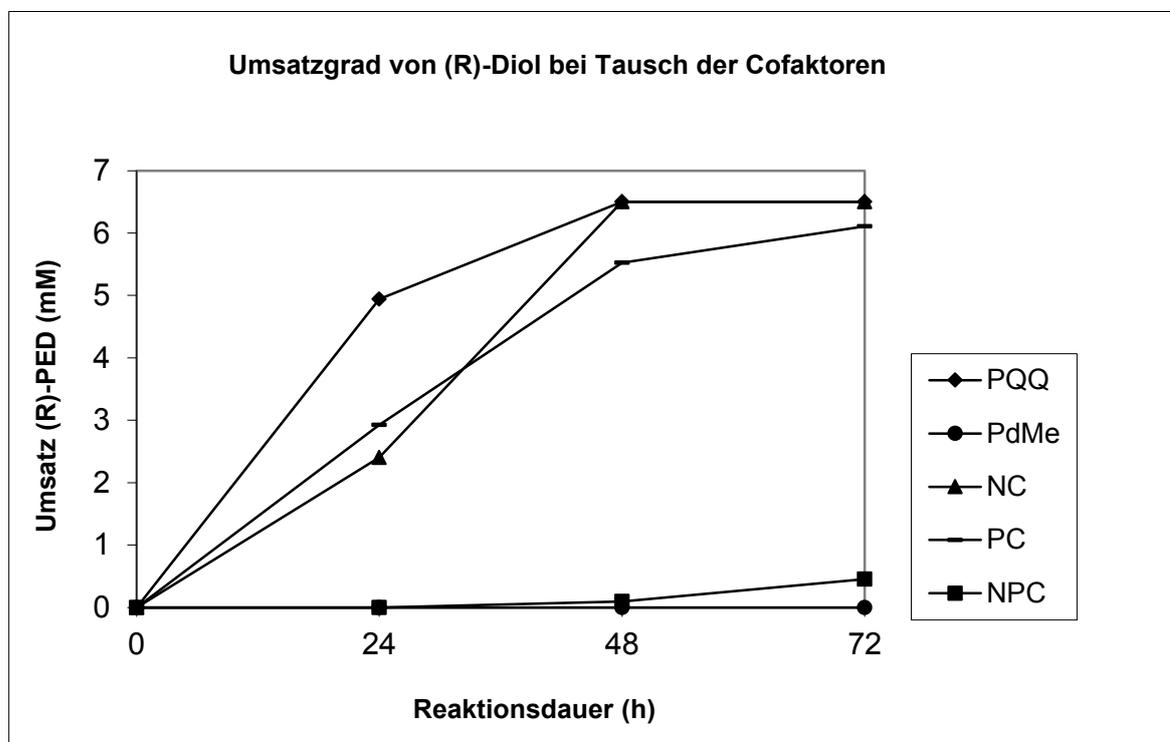


Abb. 28: Umsatzgrad in Abhängigkeit vom Cofaktor für partiell gereinigtes Rohextrakt

Erstaunlicherweise zeigt der Ansatz mit PDMe mit partiell gereinigtem Enzympräparat keinerlei Umsatz. Auch der Ansatz mit NPC als Cofaktor zeigt nur einen geringfügigen Abbau des Edukts. Bei PDMe haben Analysen mit chiralem GC gezeigt, dass überraschenderweise beide Enantiomere abgebaut werden.

## 3.5 Chemoenzymatische Reaktionen

### 3.5.1 Enzymatische Herstellung und Isolierung des enantiomerenreinen Aldehyds als Zwischenprodukt der Oxidation

Die Oxidation eines Alkohols über den Aldehyd zur Säure kann man sich als zweistufigen Prozess vorstellen, wobei zweimal 2 Elektronen oder Reduktionsäquivalente übertragen werden: Im ersten Schritt vom Alkohol zur Aldehyd-Stufe, im zweiten Schritt dann von der Aldehyd-Stufe zur Säure (Abb. 29). Da PQQ nur zwei Reduktionsäquivalente übertragen kann, müssen bei der Oxidation bis zur Säure zwei PQQ-Moleküle beteiligt sein. Die Zwischenstufe des Aldehyds muss auch bei der enzymatischen Oxidation durchlaufen werden. Die Frage ist allerdings, ob dieser intermediär gebildete Aldehyd auch als solcher nachweisbar ist oder ob diese Stufe sofort weiteroxidiert wird. Denkbar ist beispielsweise, dass der Aldehyd intermediär am Enzym gebunden wird und in dieser Form weiteroxidiert wird oder ob er möglicherweise sogar in nachweisbaren Konzentrationen gebildet und freigesetzt wird und dann konzentrationsabhängig in einem separaten zweiten Schritt weiter oxidiert wird.

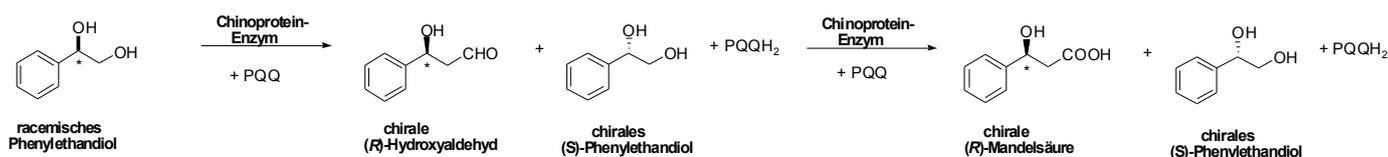
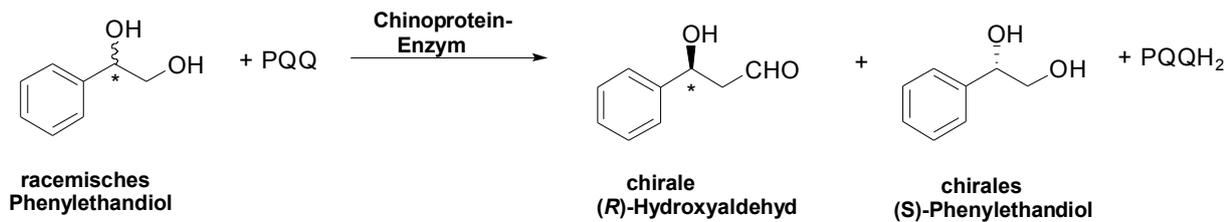


Abb. 29: Oxidation eines Alkohols bis zur Säure über die Aldehydzwischenstufe

Im Folgenden wurde daher versucht zu prüfen, ob ein Aldehyd als Zwischenprodukt nachweisbar ist. Dafür wurde wieder die Standardreaktion der Oxidation von Phenylethandiol verwendet. Die Reaktionsansätze aller im Ergebnisteil folgenden Kapitel wurden mit dem Rohextrakt aus PE1 durchgeführt wie in Abschnitt 2.3.1.4.1 beschrieben.

### 3.5.2 Enzymatische Herstellung und Isolierung des enantiomerenreinen (*R*)-2-Hydroxyphenylethylaldehyds aus rac-1,2-Phenylethandiol

Aldehyde sind interessante Bausteine für die organische Synthese. Allerdings sind Aldehyde sehr reaktive und somit instabile Substanzen, so dass die Synthese von Aldehyden insbesondere dann schwierig ist, wenn sie durch partielle Oxidation aus Alkoholen erzeugt werden sollen. Hierbei besteht leicht die Gefahr, dass der Aldehyd unter denselben Bedingungen sofort weiterreagiert bis zur Säure.



**Abb. 30: Enzymatische Oxidation vom Diol zum enantiomerenreinen Aldehyd**

Der Standardtest für die Überprüfung der Aktivität des Rohextrakts von *Pseudomonas* sp. wurde mit rac. PED zur Synthese von (*R*)-Mandelsäure durchgeführt. Dies dient als Referenzreaktion für Aktivität, Umsatzgrad und Enantiomerenreinheit. Bei der Analyse mit der chiralen GC wurde ein Peak bei 6,7 min detektiert, der parallel zur Abnahme des (*R*)-Diols quantitativ zunahm (24-h-Probe) und dann bei vollständiger Oxidation von (*R*)-Diol nach 72 h komplett abgebaut war. Erst dann konnte das Endprodukt der Oxidation, die (*R*)-Mandelsäure, quantitativ nachgewiesen werden, wie in Abbildung 31 deutlich zu sehen ist.

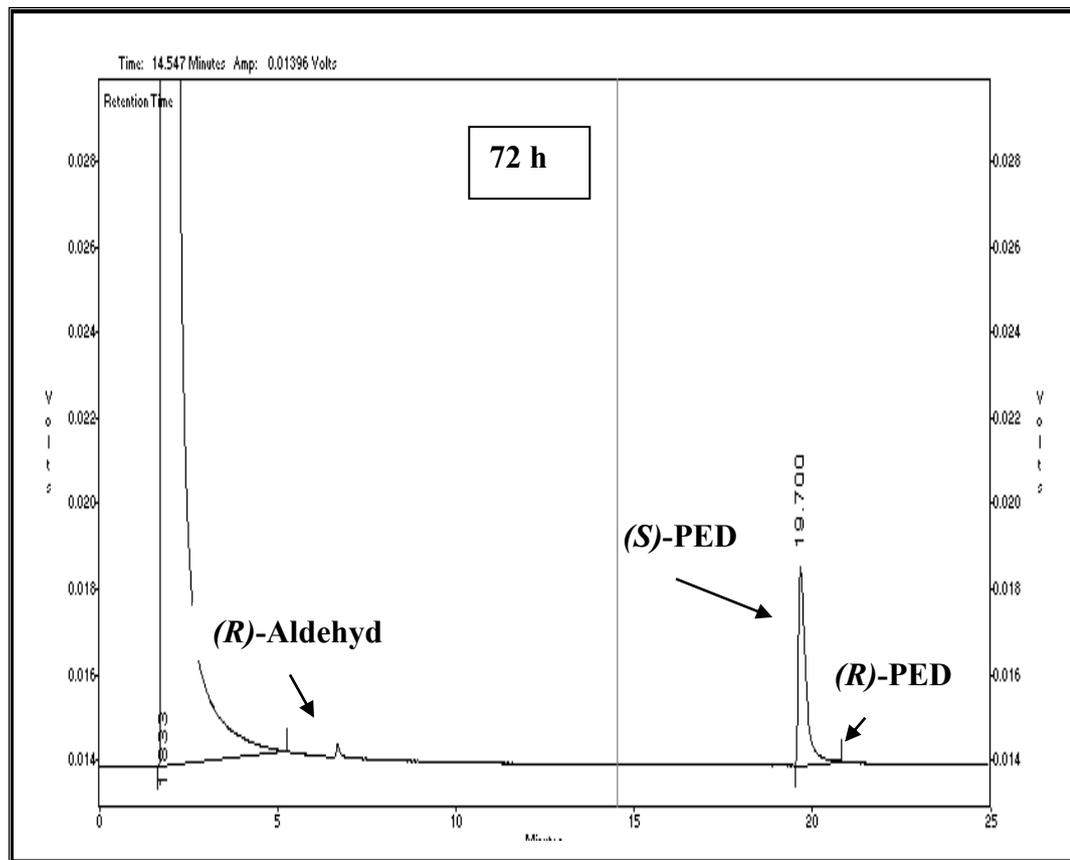
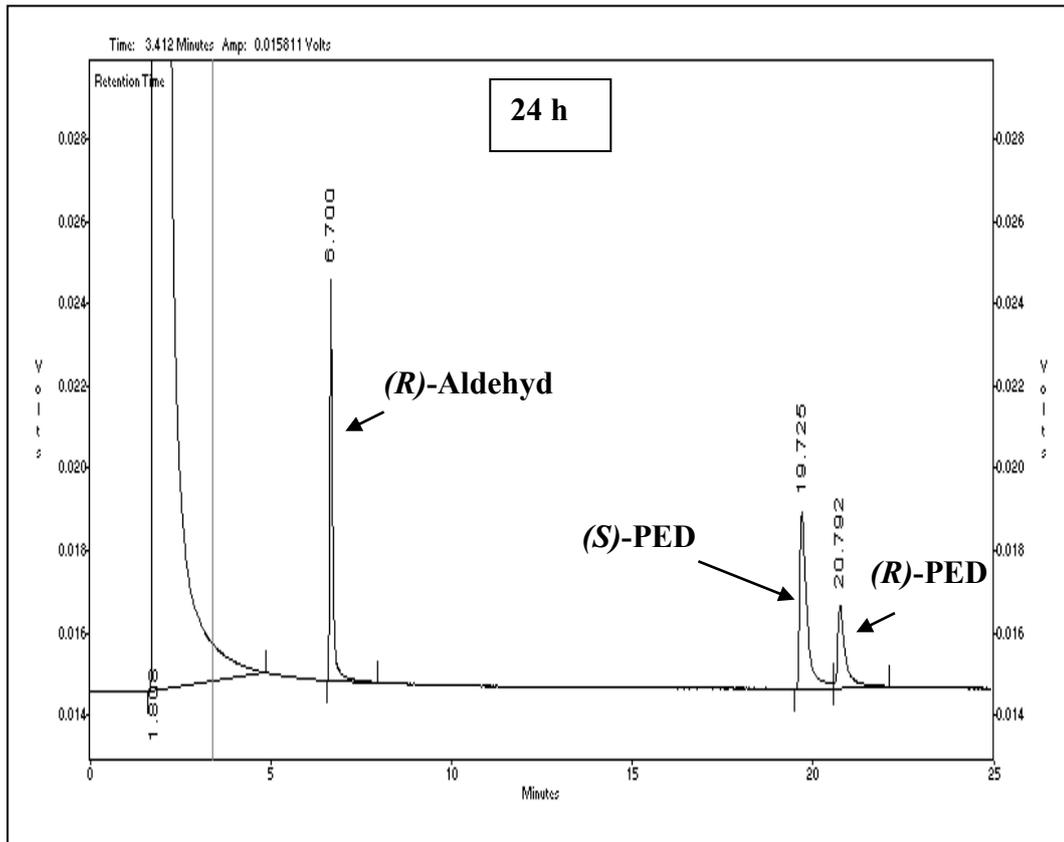
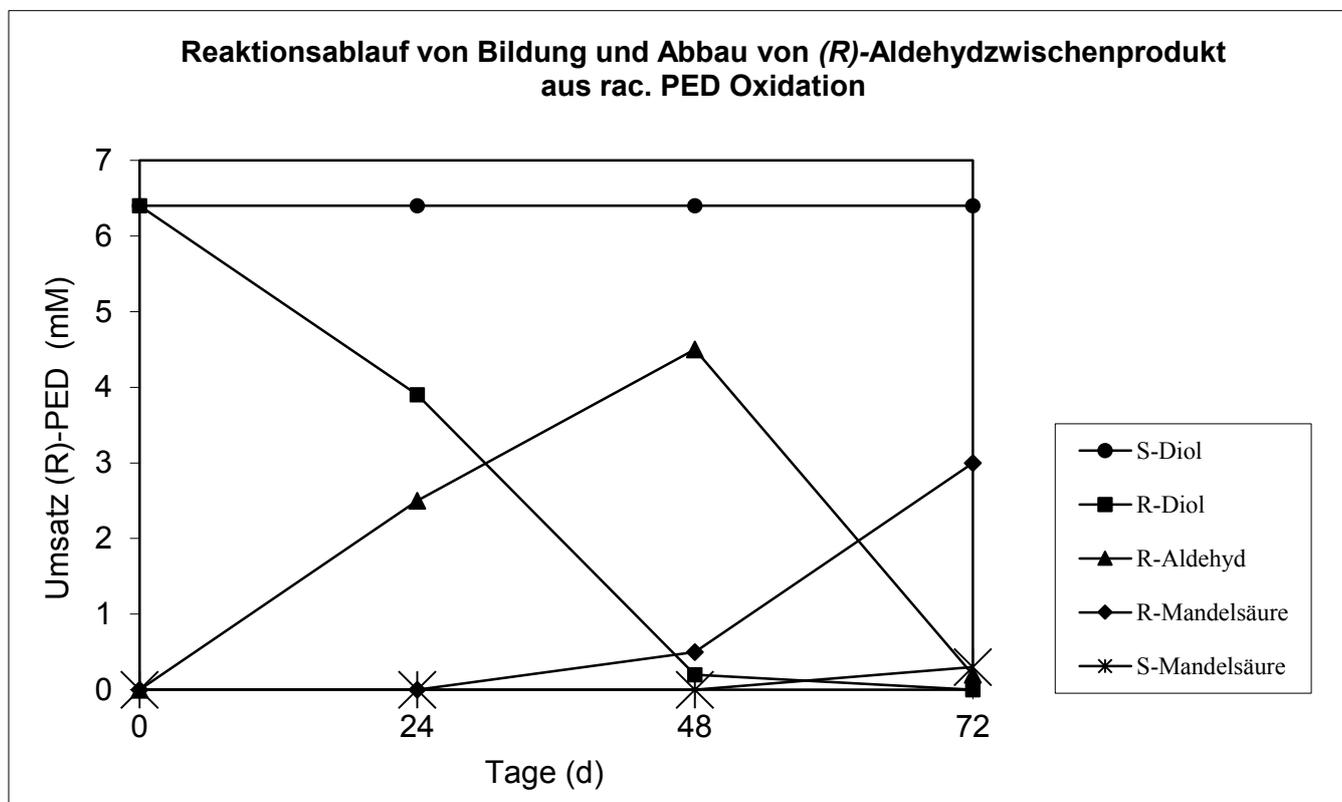


Abb. 31: GC-Spektrum zum Nachweis des Aldehyds als Zwischenprodukt

Die Retentionszeit des Aldehyds wurde bei der Cyclodex-Säule ohne Derivatisierung bei 6,6 min detektiert. Er ist mittels GC/MS identifizierbar (s. Abb. 31).



**Abb. 32: Zeitabhängiger Umsatz von rac. PED zum (*R*)-Aldehyd und zur (*R*)-Mandelsäure**

Aus dem Diagramm geht hervor, dass bei der Oxidationsreaktion das (*R*)-Diol kontinuierlich abgebaut und für die Bildung des Intermediats (*R*)-Aldehyd eine Zunahme bis 48 h Reaktionszeit gemessen wurde. Nach 72 h ist das (*R*)-Diol vollständig abgebaut und der Aldehydpeak, der sein Maximum bei 48 h erreichte, wurde dann vollständig nach 72 h Reaktionszeit zur (*R*)-Mandelsäure oxidiert. In den GC-Chromatogrammen ist die gebildete (*R*)-Mandelsäure nicht in dem Maß quantitativ nachweisbar wie es dem Abbau des Diols eigentlich entsprechen müsste. Das liegt daran, dass bei der Extraktion der hydrophilen Mandelsäure aus der wässrigen Phase mit Ethylacetat maximal 2-2,5 mM Mandelsäure aus dem Reaktionsansatz extrahiert werden

Die Probe aus der 24-h-Reaktion (Abb. 31) wurde auch auf GC/MS aufgetragen und ein Molekülpeak bei 136 wurde detektiert. Dieser Molekülpeak wurde auch bei dem racemisch hergestellten Aldehyd mit TEMPO-Katalysator gemessen und es wurde damit nachgewiesen, dass der Peak zum Aldehydintermediat gehört.

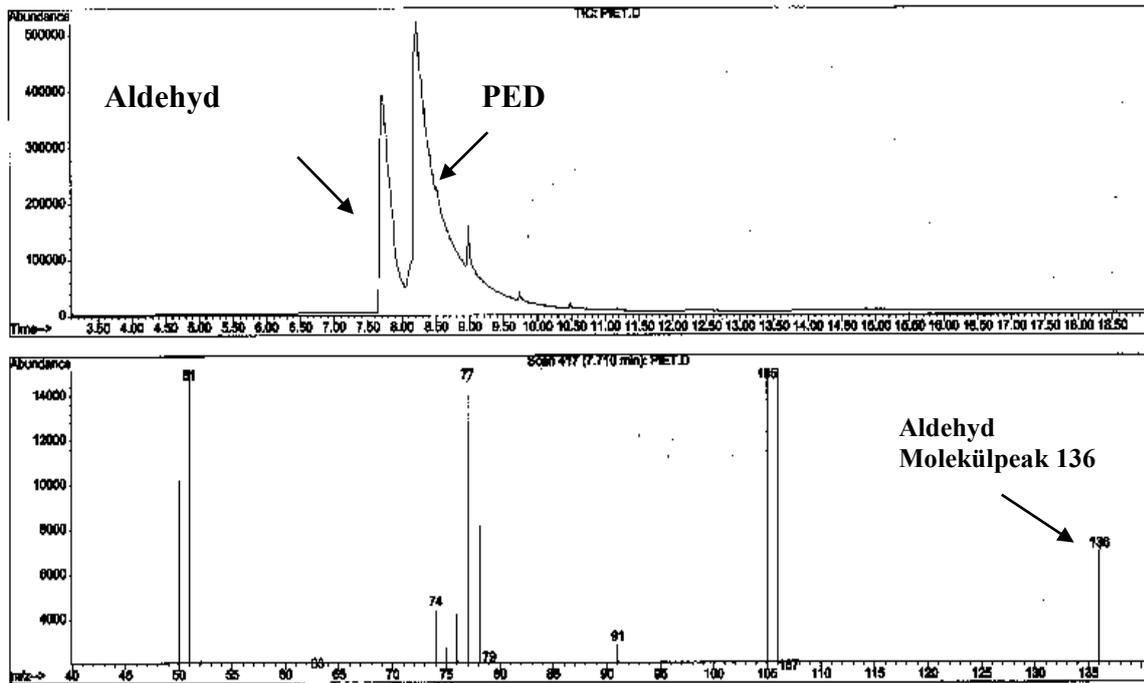


Abb. 33: GC/MS-Spektrum zur Nachweis des Aldehyd-Zwischenprodukts

Interessant ist, dass die grafische Auftragung über die Reaktionszeit zeigt, dass die Oxidation des Diols tatsächlich zweistufig verläuft: Eine Bildung der Säure wird erst beobachtet, wenn das Diol nahezu vollständig zum Aldehyd umgesetzt wurde. Offensichtlich ist das Diol im Vergleich mit dem Aldehyd das bessere Substrat für das Enzym. Wahrscheinlich ist die chemische Stabilität des enantiomerenreinen Hydroxyphenylethanal durch die Anwesenheit des aromatischen Rings und die stabilisierenden funktionellen Gruppen zu begründen.

### 3.5.3 Ergebnisse zu Nachweis und Enantiomerenreinheit des (*R*)-Aldehyds

Racemischer Aldehyd konnte durch chemische Oxidation mit dem TEMPO-Katalysator gewonnen werden. Es zeigte sich, dass dieses Racemat auf der Lipodex-G-Säule getrennt werden kann. Die beiden chemisch synthetisierten Enantiomere werden bei 52 bzw. 53 min detektiert, wie in der Abbildung 34 ersichtlich. In dem zweiten GC-Bild in der Abbildung sieht man einen enantiomerenreinen Peak bei 53 min. Hier wurde auf derselben GC-Säule unter denselben Bedingungen der enzymatisch hergestellte Aldehyd aufgetragen und es zeigt sich, dass man durch die enzymatische Reaktion enantiomerenreinen Aldehyd erhalten hat. Da das (*R*)-PED abgebaut wurde und letztlich die (*R*)-Mandelsäure gebildet wird, sollte es sich bei dem Aldehyd um das (*R*)-Enantiomer handeln. Es ist zu beobachten, dass das Produkt der enzymatischen Reaktion ein enantiomerenreiner Aldehyd ist und dass dieser nicht racemisiert.

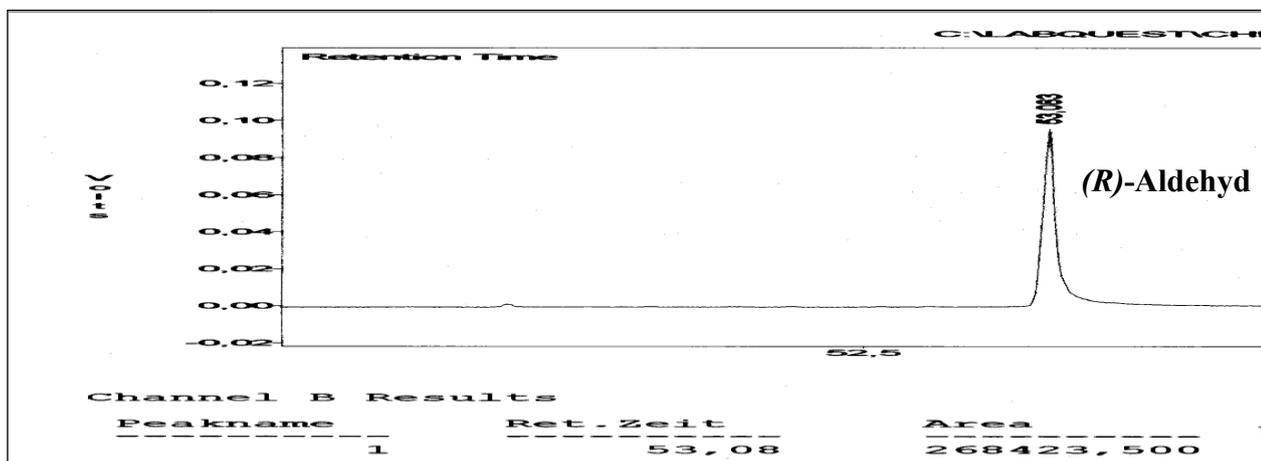
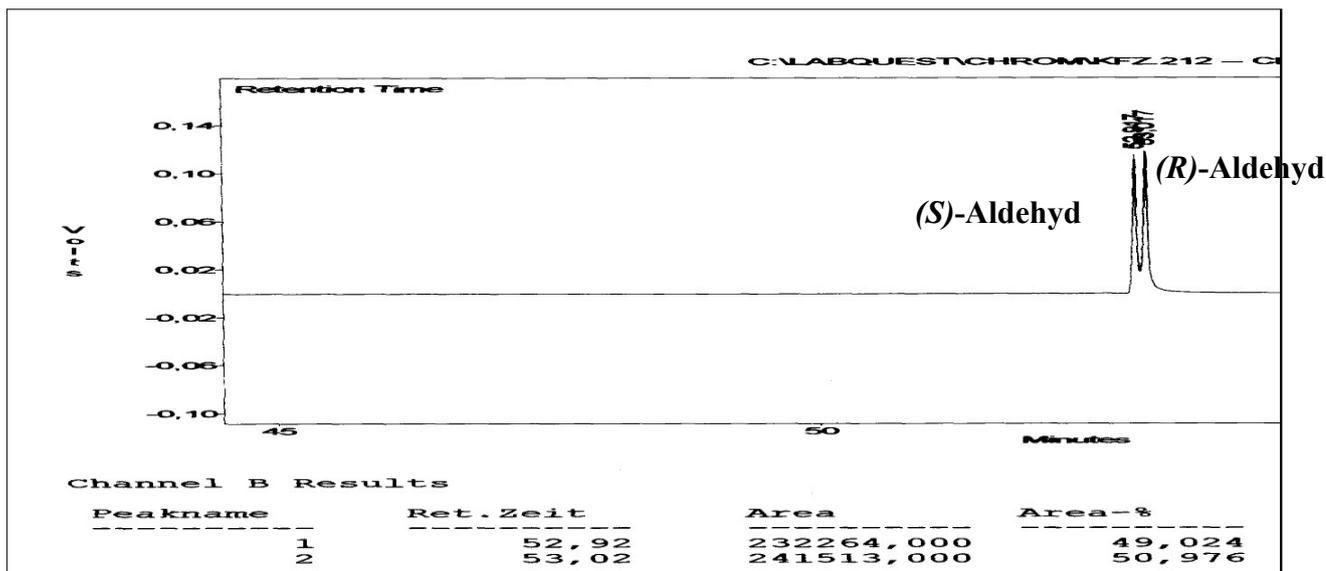


Abb. 34: GC-Spektren des enzymatisch hergestellten, reinen und des racemischen Aldehyds

### 3.5.5 Direkte *in situ*-C-C-Bindungsknüpfung: Direkte Weiterreaktion des Aldehyds mit einer Transketolase

#### 3.5.5.1 Methode zur C-C-Bindungsknüpfung

In diesem Experiment wird der Versuch unternommen, die stabile Aldehydzwischenstufe der enzymatischen Oxidationsreaktion durch direkte Kopplung mit einer Transketolase (aus Bäckerhefe) für eine C-C-Verknüpfungsreaktion einzusetzen und damit in diesem Fall chirale Zuckerbausteine zu synthetisieren.

Wie in Abb. 31 beschrieben, entsteht in der Standard-Oxidationsreaktion nach 48 h ein stabiles enantiomerenreines (*R*)-Hydroxyphenylethanal als Aldehydzwischenstufe aus rac. 1,2-

Phenylethandiol. Bevor nach 72 h aus dem Aldehyd die Hydroxysäure quantitativ als Produkt entsteht, wird diese Reaktion zur Herstellung optisch reiner 5-Phenyl-5-deoxy-D-xylulose verwendet (s. Abb. 35).

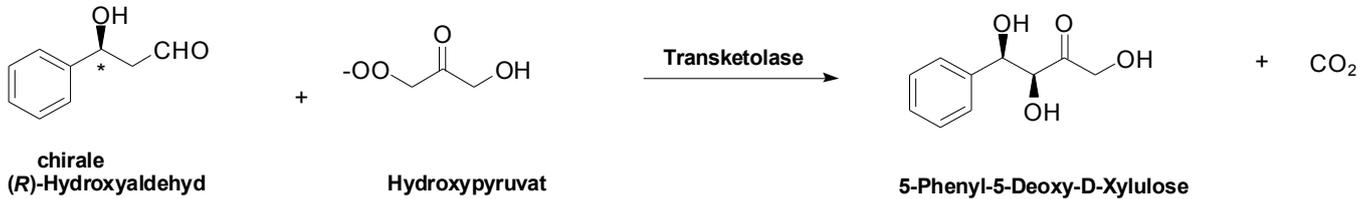


Abb. 35: Reaktionsschema zur Herstellung chiraler Hydroxyketone

Da das Produkt wegen der drei OH-Gruppen extrem hydrophil ist, konnte nach der Extraktion mittels GC nur eine kleine Konzentration chiraler Zuckerbausteine nachgewiesen werden. Allerdings konnte, wie die Abb. 36 zeigt, das Produkt eindeutig durch GC/MS nachgewiesen werden

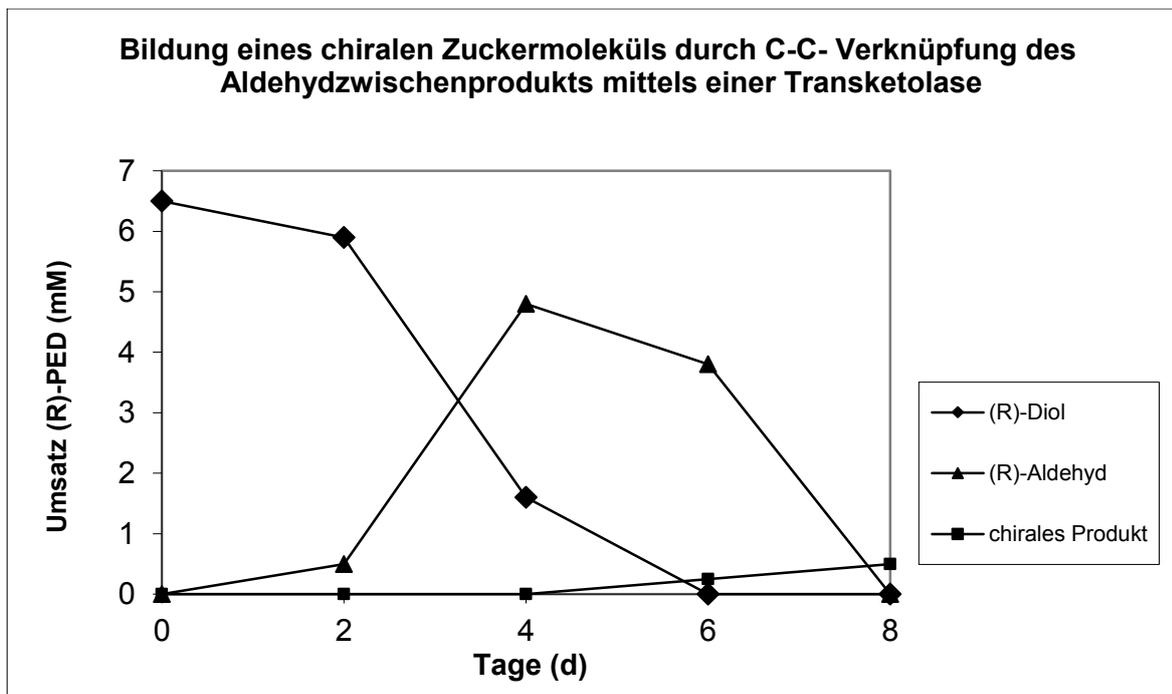


Abb. 36: Umsetzung von rac. PED über die Aldehydzwischenstufe zum Hydroxyketon mittels chiraler GC-Analytik aus den Reaktionsproben

Nach der maximalen Bildung des (R)-Aldehyds nach 48 h werden die Komponenten für die zweite Reaktion hinzugegeben und nach deren Zugabe wird über 4 Tage Gesamtreaktion die Abnahme des Aldehyds beobachtet und die Bildung des Hydroxyketons gaschromatographisch dokumentiert. Das Chromatogramm zeigt, dass der Aldehyd von der Transketolase abgefangen und zum Hydroxyketon umgesetzt wurde. Die Transketolase

verknüpft hochspezifisch den (*R*)-Aldehyd mit Hydroxypyruvat. In dieser Reaktion wird der Aldehyd vollständig abgebaut. Das Produkt ist nur in einer geringen Konzentration mittels chiraler GC wegen des extrem hydrophilen Charakters detektierbar, über GC/MS ist das Produkt aber über die Molekülpeaks und dazu gehörige Fraktionen im unten abgebildeten GC/MS-Diagramm eindeutig charakterisiert und nachgewiesen.

Das Produkt wurde mit GC/MS bestimmt und die Fragmente werden wie folgt detektiert:

**Molekülpeak 198: 5-Phenyl-5-deoxy-D-xylulose**

Fragmentpeak 57:  $\text{COCH}_2\text{CHO}$  ( $\text{M}^-$ )

Fragmentpeak 71:  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CHO}$  ( $\text{M}^+$ )

Fragmentpeak: 77:  $\text{C}_6\text{H}_6$  ( $\text{M}^+$ )

Fragmentpeak 79:  $\text{C}_6\text{H}_6$  ( $\text{M}^-$ )

Fragmentpeak 107:  $\text{C}_6\text{H}_6\text{CHOH}$

Fragmentpeak 138:  $\text{C}_6\text{H}_6\text{CHOHCHOH}$

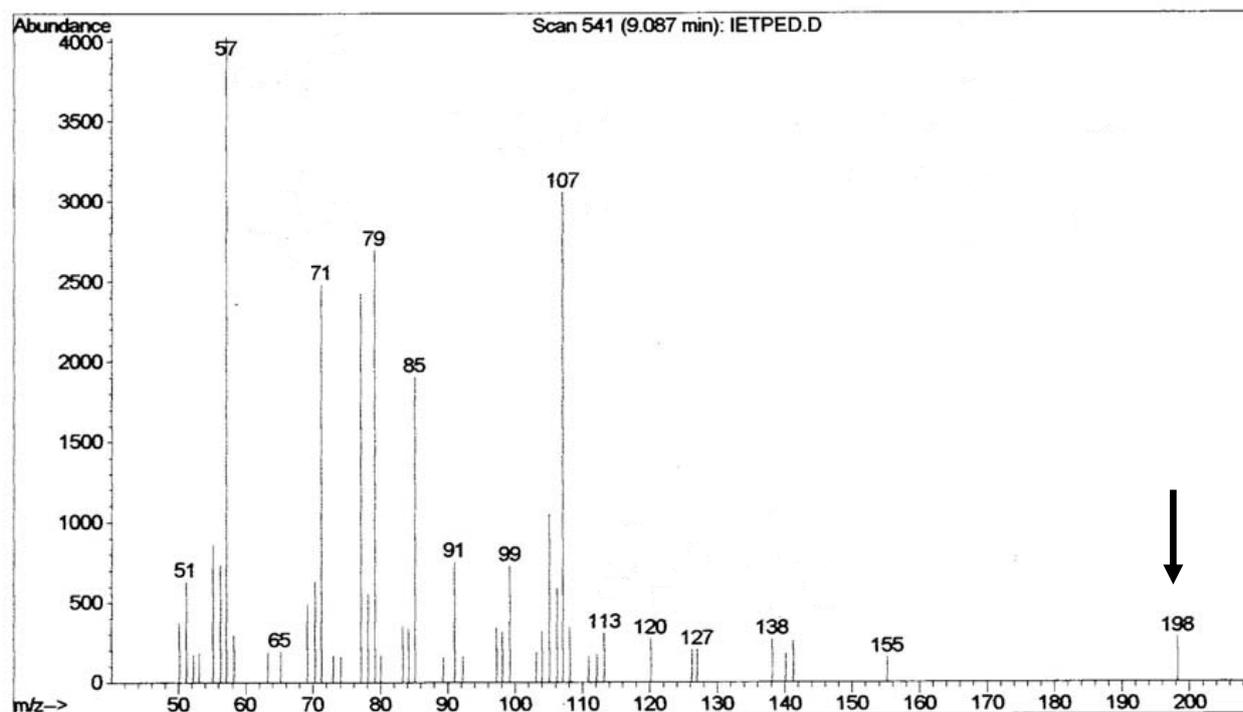


Abb. 37: GC/MS des chiralen Hydroxyketons

### 3.5.6 Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem

#### 3.5.6.1 Oxidations- und Racemisierungsreaktion mit einem Rutheniumkatalysator in einem Zweiphasensystem

Die folgende Versuchsreihe wurde am Institut der Organischen Chemie, Universität Stockholm, in der Arbeitsgruppe von Prof. Bäckvall durchgeführt. Hier wurde der

Racemisierungsgrad verschiedener aromatischer Alkohole mit dem „Shvo-Katalysator“ (Abb. 38) untersucht.

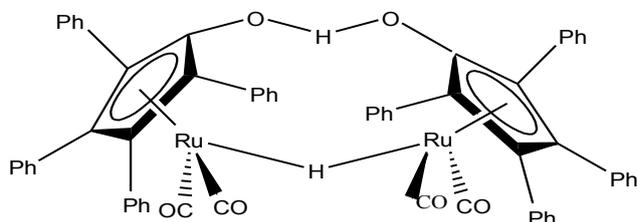


Abb. 38: Ru<sup>II</sup>- Katalysator (Shvo-Katalysator)

In einer Publikation der Arbeitsgruppe Bäckvall (Bäckvall, 1997) wird eine Möglichkeit zur Racemisierung sekundärer Alkohole vorgestellt, bei der eine enzymatische Racematspaltung von Alkoholen gekoppelt wird mit einer Ruthenium-katalysierten Racemisierungsreaktion des Alkohols. Bei der Ruthenium-katalysierten Transferhydrierung wird dabei eine schnelle Racemisierung von sekundären Alkoholen am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom wie folgt beobachtet.

Die Transferhydrierung des Rutheniumkatalysators funktioniert über eine temporäre Oxidation vom Alkohol zum Keton und eine Rehydrierung des Ketons.

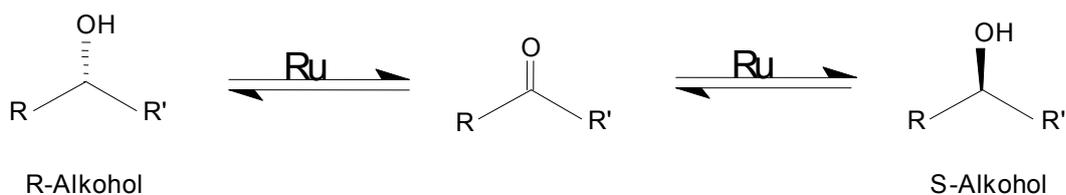


Abb. 39: Racemisierungsreaktion mit Hilfe des Ru<sup>II</sup>-Katalysators

Der genaue Mechanismus wird in der nächsten Abbildung erläutert:

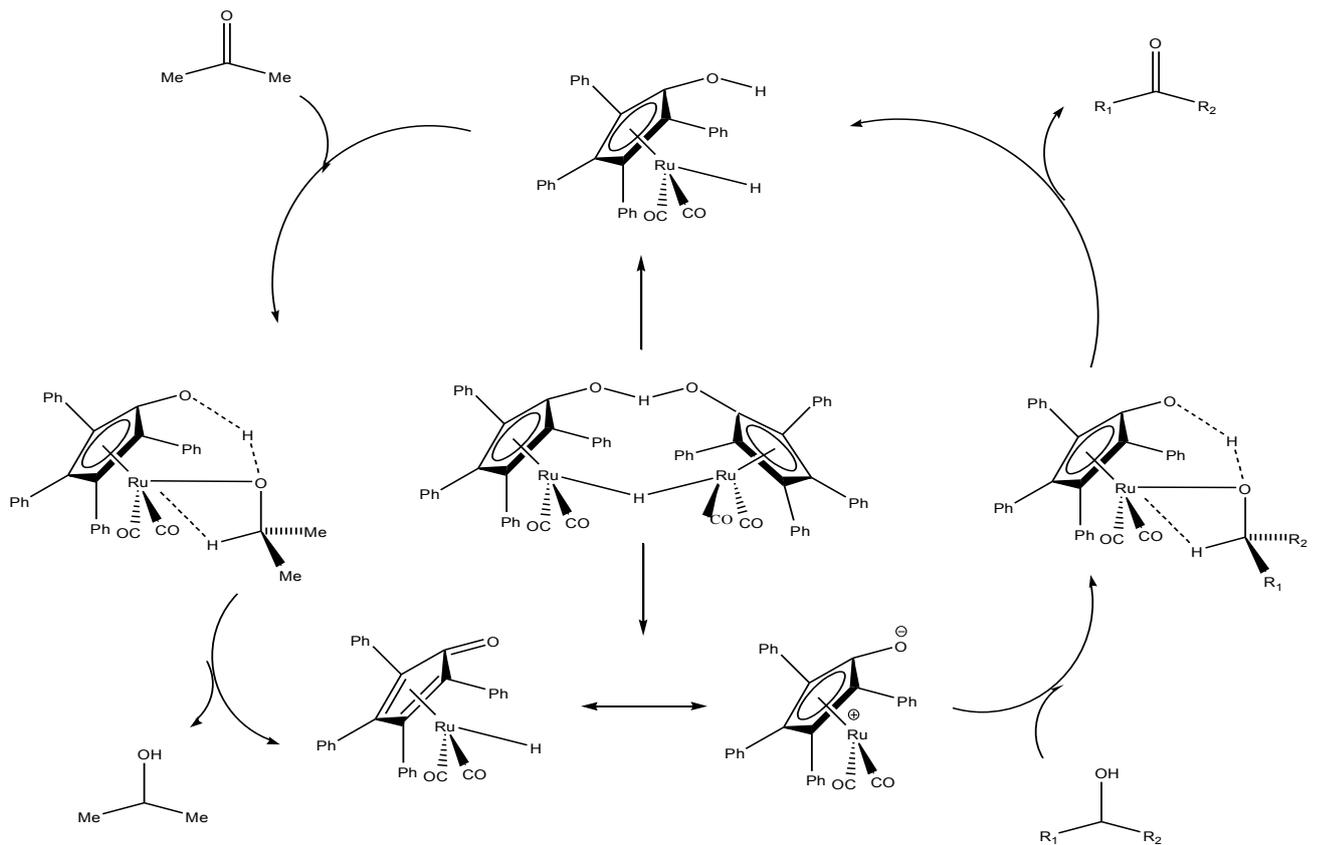


Abb. 40: Racemisierungsmechanismus des Rutheniumkatalysators

Bei einer erfolgreichen Racemisierung wird dann diese Racemisierungsreaktion mit den Reaktionsbedingungen der enzymatischen Reaktion gekoppelt, so dass durch diese Kopplung mehr als 50 % Ausbeute beobachtet werden, die in einer normalen Racemattrennung zu erreichen sind.

Dieses Reaktionsprinzip soll im Folgenden auch auf die Racemattrennung der Q-ADH-katalysierten Oxidation angewandt werden. Wenn die Racemisierung des verbleibenden (*S*)-Alkohols erfolgreich ist, müssten auch in diesem Fall mehr als 50 % Ausbeute an (*R*)-Säure zu beobachten sein. Die Racemisierung des verbleibenden (*S*)-Alkohols erhöht die Menge an (*R*)-Alkohol über 50 %, der wiederum als Edukt für die enzymatische Oxidationsreaktion zur Verfügung steht (s. Abb. 41).

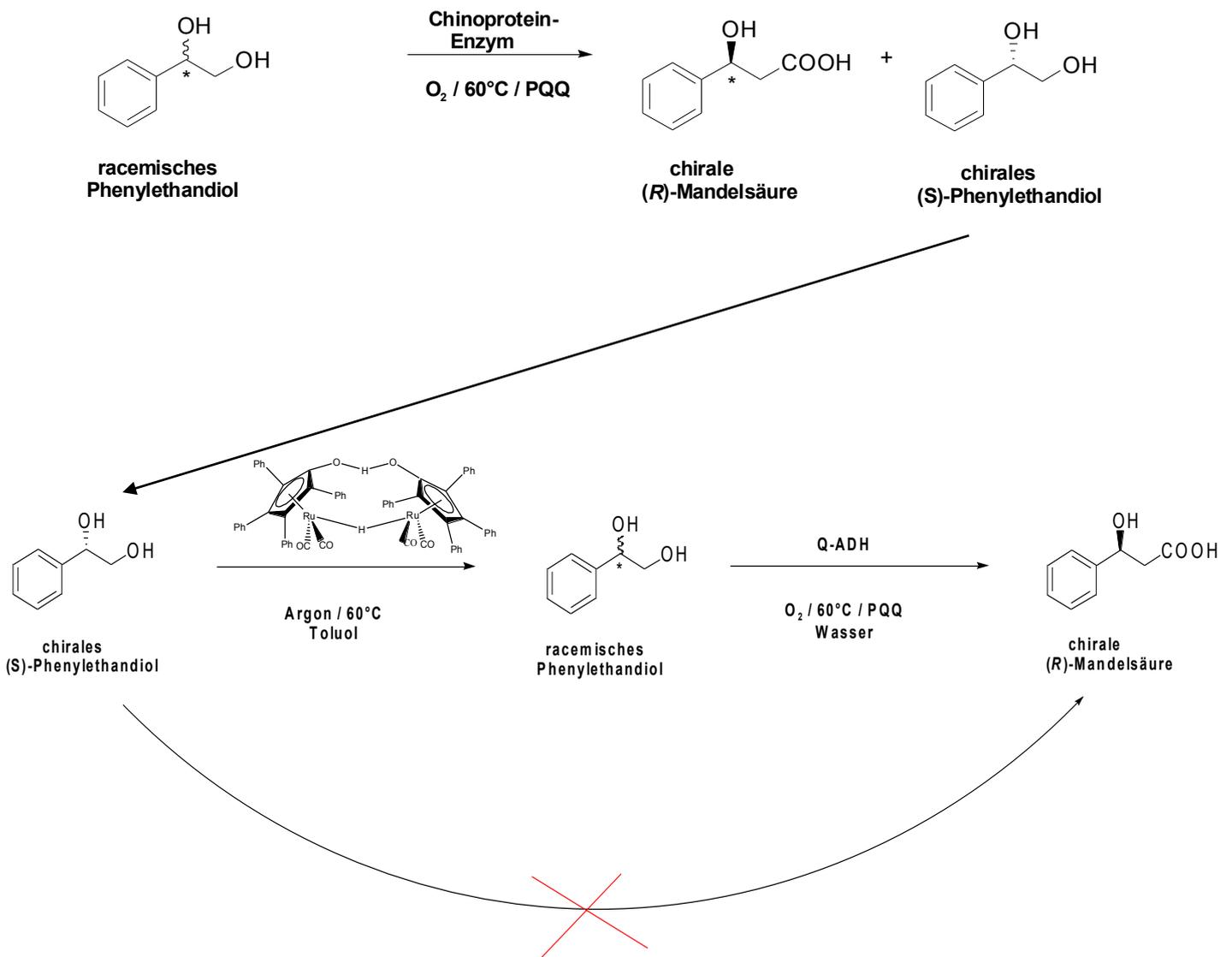


Abb. 41: Enzymatische Oxidationsreaktion kombiniert mit dem Ru<sup>II</sup>-Katalysator zur Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem

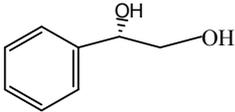
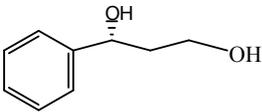
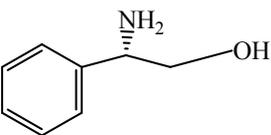
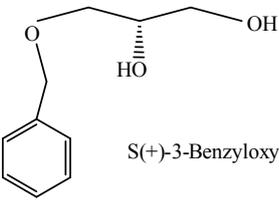
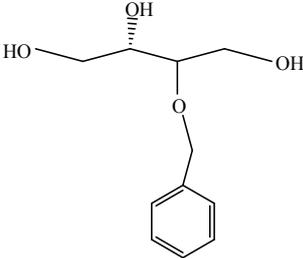
### 3.5.6.2 Substratspektrum für die Racemisierungsreaktion

Alle untersuchten Alkohole können relativ gut von der wässrigen Phase in eine organische Phase extrahiert werden.

#### 3.5.6.2.1 Analytik

Hier wird der qualitative und quantitative Nachweis der Racemisierung mittels HPLC durchgeführt. Die (S)-Alkohole, die racemisiert werden sollen, werden mittels chiraler HPLC nachgewiesen und detektiert, um als Referenzpeak zu dienen.

Tab. 11: Referenzpeaks der enantiomerenreinen Substrate mittels HPLC

Substrat	Struktur	Retentionszeit (min)	Lösungsmittel Hexanol/ Isopropanol (%)	Injektionsvolumen ( $\mu\text{L}$ )
(S)-1	 <p>S(+)-1-Phenyl-1,2-Ethandiol</p>	35,4	95/5	10
(S)-2	 <p>S(+)-1-Phenyl-1,3-Propanediol</p>	77,4.	97/3	5
(S)-3	 <p>L(+)-Phenylglycinol</p>	25	95/5	10
(S)-4	 <p>S(+)-3-Benzyloxy-1,2-Propanediol</p>	70,9	95/5	2
(S)-5	 <p>(2,3S)-(+)-2-Benzyloxy-1,3,4-Butantriol</p>	18,9	85/15	5

### 3.5.6.2.2 Racemisierungsreaktion

Die Reaktion wird mit dem (*S*)-Alkohol gestartet. Nach 48 h wird der Racemisierungsgrad mittels HPLC qualitativ und quantitativ bestimmt.

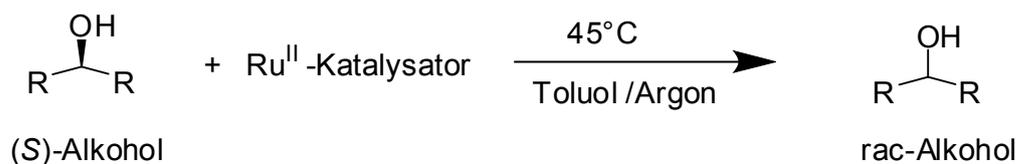


Abb. 42: Racemisierungsreaktion bei 45°C gestartet mit (*S*)-Alkohol für 48 h mit 0,5 mM Substrat, 2 mol-% (20 mg) Ru-Katalysator und 2-4 mL Toluol

In der Tabelle 12 werden die Racemisierungsgrade der zu untersuchenden Substrate mit dem Shvo-Katalysator angegeben.

Tab. 12: Racemisierungsgrad des getesteten Substrats mit Shvo-Ru-Katalysator

Substrat	Lösungsmittel Hexanol / Isopropanol (%)	Retentionszeit (min)	Racemisierungsgrad (%)
( <i>S</i> )-1	95/5	S: 34,7 R: 32,1	S: 54,9 R: 29,7
( <i>S</i> )-2	97/3	S: 76,7 R: 83,1	S: 50,1 R: 18,4
( <i>S</i> )-3	95/5	S: 25,3 R: -----	0 %
( <i>S</i> )-4	95/5	S: 69,6 R: 54,6	S: 71,5 R: 28,5
( <i>S</i> )-5	90/10	S: 27,6 R: 43,4	S: 32,1 R: 67,9

Der eingesetzte Shvo-Ru-Katalysator kann die (*S*)-Alkohole 1, 2, 4 und 5 zum Teil racemisieren. Anscheinend wird der chirale (*S*)-Aminoalkohol (Nummer 3) nicht racemisiert. Die

Racemisierung ist nicht vollständig abgelaufen, da nachweislich ein Teil des (*S*)-Alkohols, wie in der Abbildung 39 zu sehen ist, während der Racemisierung auf der Ketonstufe verbleibt und nicht mehr zu (*R*)-Alkohol oder zurück zum (*S*)-Alkohol rehydriert wird. Außerdem ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Racemisierung zum Nachteil der (*R*)-Alkoholbildung langsamer.

Trotzdem ist bei allen Alkoholen ein Racemisierungsgrad zu messen, so dass diese dann in einer Folgereaktion mit Q-ADH zur (*R*)-Säure oxidieren können.

Um die Fähigkeit des Shvo-Ru-Katalysators zur Racemisierung der (*S*)-Alkohole wie in der Tabelle 12 zu demonstrieren, wurde ein ähnlicher kommerziell erhältlicher Ru<sup>II</sup>-Katalysator, und zwar (PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>RuCl<sub>2</sub>, gekauft und in demselben Reaktionsansatz und unter den gleichen Bedingungen wie in der Tabelle 12 angesetzt und getestet. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tab. 13: Racemisierungsgrad des getesteten Substrats mit kommerziellem Ru-Katalysator**

Substrat	Lösungsmittel Hexanol / Isopropanol (%)	Retentionszeit (min)	Racemisierungsgrad (%)
( <i>S</i> )-1	95/5	S: 34,6 R: -----	0 %
( <i>S</i> )-2	97/3	S: 79,1 R: -----	0 %
( <i>S</i> )-3	95/5	S: 23 R: ---	0 %
( <i>S</i> )-4	95/5	S: 70,2 R: -----	0 %
( <i>S</i> )-5	85/15	S: 18,4 R: -----	0 %

Die Ergebnisse in Tabelle 13 zeigen, dass keiner der (*S*)-Alkohole unter denselben Reaktionsbedingungen racemisiert wurde. Das zeigt die hohe Spezifität des Shvo-Ru-Katalysators, wenn er auf die hier aufgelisteten (*S*)-Diole angewendet wird.

### 5.6.3 Oxidation und Racemisierungsreaktion in dem Zweiphasensystem gestartet mit (*S*)-PED

Als erste Reaktion wurde reines (*S*)-PED eingesetzt, um zu testen, ob die beiden verschiedenen Phasen überhaupt kompatibel sind und somit eine gezielte Reaktion durchführbar ist. Die Konditionen waren wie folgt:

- Temperatur: 45°C
- Sauerstoff: 2 min mit 0,5 bar/d (Sättigung des Puffers) mit gleichzeitigem Argon-Strom in Toluolphase.

Der Argon-Gegenstrom war ausreichend, um für die Reaktion einen ungestörten Ablauf zu ermöglichen und die Inaktivierung des Rutheniumkatalysators durch Sauerstoff zu verhindern. Gleichzeitig wurde aber auch die Sauerstoffversorgung zur PQQ-Regeneration gewährleistet. Der Sauerstoffgehalt wurde mit einem Sauerstoffsensor gemessen.

Nach gaschromatographischer Analyse sind die Phasen kompatibel, d. h. keine der Phasen inhibiert die in der anderen Phase ablaufende Reaktion und jede Reaktion läuft in der eigenen Phase problemlos ab (Racemisierung in der organischen Phase und Oxidation in wässriger Phase). Das Zweiphasensystem kann somit sowohl mit dem (*S*)-Diol als auch mit racemischem Phenylethandiol zwecks Ausbeuteerhöhung von (*R*)-Mandelsäure (>50 % Ausbeute bzw. 6,3 mM) eingesetzt werden (siehe Abb. 43). Die Reaktion bei 45°C brauchte eine längere Zeit (10 Tage), um eine signifikante Racemisierungs- und Oxidationsreaktion in Gang zu setzen. Schneller verläuft die Reaktion bei 60°C, hier verkürzte sich die Reaktionszeit auf 72 h (siehe Abb. 44). Bei beiden Reaktionen konnten die selektive Abnahme des (*R*)-Diols und die Bildung des (*R*)-Aldehyds sowohl über chirale GC als auch mit GC/MS nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser drei Komponenten ist ausführlich in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben. Hier wurde nur die Aldehydbildung gemessen, womit die Oxidationsreaktion von (*S*)-Diol zur (*R*)-Diol zur Racemisierung und anschließend Oxidation zum (*R*)-Aldehyd geprüft wird. Der Mandelsäuregehalt wurde anschließend wie in Kapitel 3.5.6.4 beschrieben gemessen (siehe Abb. 45) .

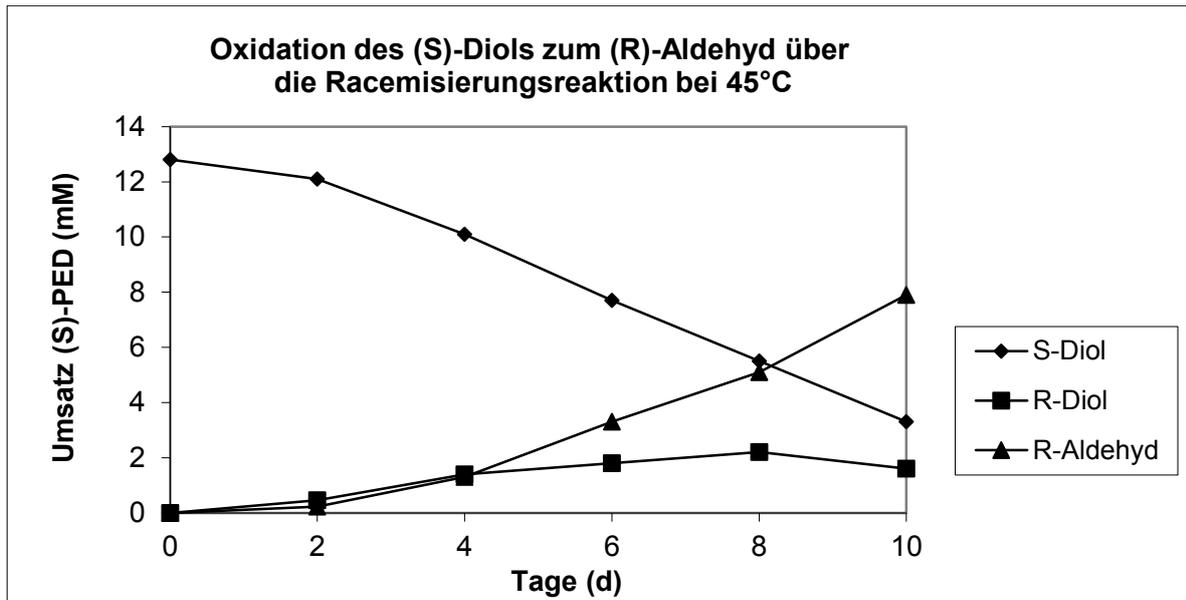


Abb. 43: Oxidation des (S)-Diols zum (R)-Aldehyd über die Racemisierungsreaktion bei 45° C gestartet mit (S)-Diol mit Nachweis über chirale GC und GC/MS

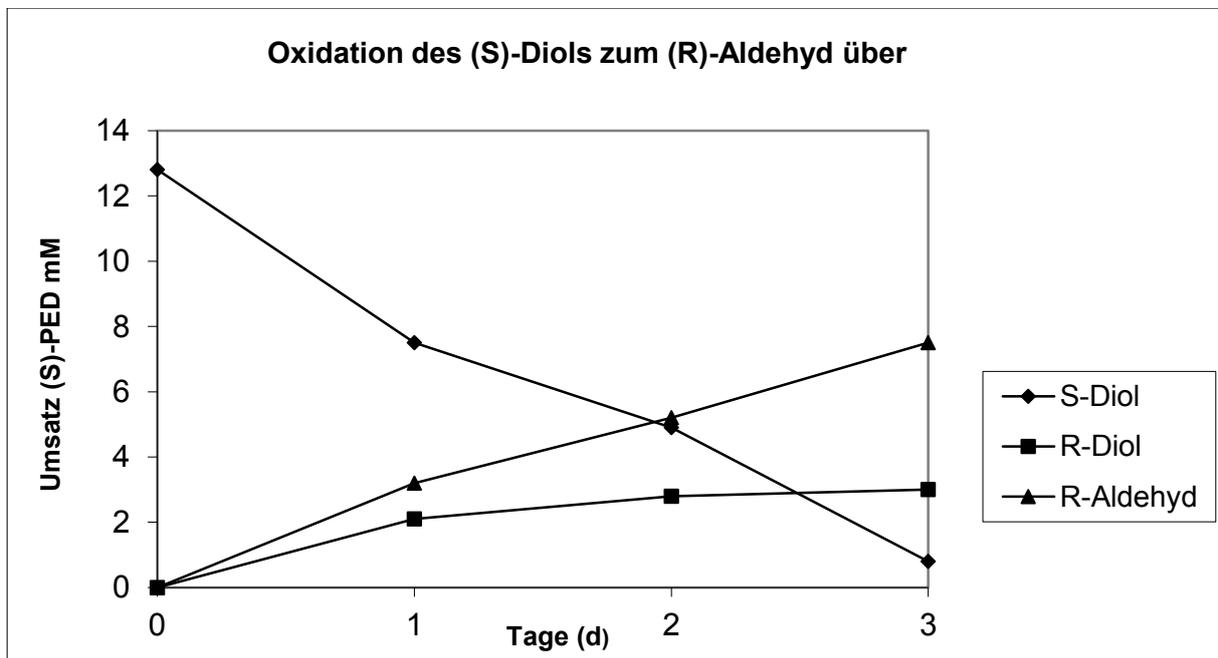


Abb. 44: Oxidation des (S)-Diols zum (R)-Aldehyd über Racemisierungsreaktion bei 60°C gestartet mit (S)-Diol mit Nachweis über chirale GC und GC/MS

#### 3.5.6.4 Oxidations- und Racemisierungsreaktion in einem Zweiphasensystem gestartet mit rac. PED

Ziel dieses Versuchs ist es herauszufinden, welcher prozentuale Anteil des (*S*)-Diols durch den Racemisierungskatalysator noch zusätzlich zu dem bereits oxidierten (*R*)-Diol zur (*R*)-Mandelsäure oxidiert wird. Der Versuch wurde mit rac. PED gestartet, nach 72 h war das komplette (*R*)-PED in (*R*)-Mandelsäure umgewandelt: Es konnte kein Aldehyd und auch keine Mandelsäure nachgewiesen werden. Diese Reaktion wurde unter Begasung in einem einphasigen System durchgeführt, da erst das (*R*)-Diol abgebaut wird und danach der Einsatz des Ru<sup>II</sup>-Katalysators zur Racemisierung des übriggebliebenen (*S*)-Diols eingesetzt wird, um somit auch über die Racemisierung einen Teil des (*S*)-Diols in (*R*)-Mandelsäure umzuwandeln. Somit wurde die organische Phase addiert und angepasst. Danach wurden wieder (*R*)-PED und eine (*R*)-Aldehydbildung nachgewiesen. Die außerordentlich stabile Form des Enzyms sichert den Reaktionsablauf über mehrere Tage. Nach weiteren drei Tagen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass etwa 1 mM zusätzliche (*R*)-Mandelsäure gebildet worden ist. Das bedeutet, dass eine Ausbeute von 61 % Mandelsäure mit einem *ee*-Wert von 95 % für das (*R*)-Enantiomer erreicht wurde. Eine Ausbeute von über 50 % zeigt daher, dass tatsächlich eine Racemisierung mit der gekoppelten Reaktion des Racemisierungskatalysators erreicht worden ist. Das Reaktionssystem ist im Methodenteil (Abschnitt 2.5.7.2) beschrieben und bildlich dargestellt.

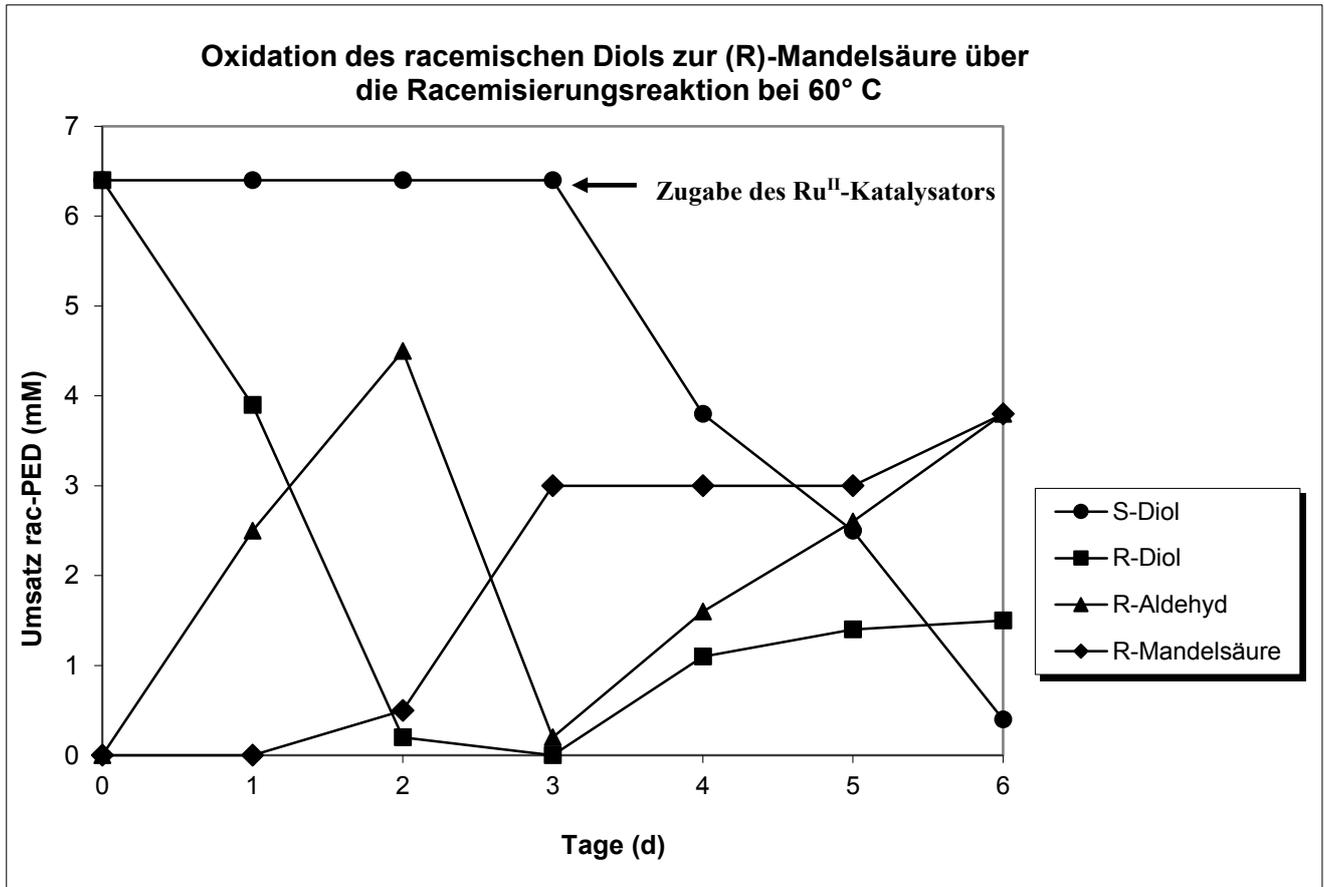


Abb. 45: Oxidation und Racemisierung von rac-PED bei 60°C im Zweiphasensystem mit Ru<sup>II</sup>-Katalysator

## 4 Diskussion

### 4.1 Biochemische Reinigung

In Vorversuchen wurde herausgefunden, dass der unbehandelte Rohextrakt aus *Pseudomonas* sp. in der Lage ist, ausgehend von racemischen Diolen ein Enantiomer selektiv zur Säure zu oxidieren, während das andere Diol nicht umgesetzt wird. Modellreaktion ist die Oxidation von 1,2-Phenylethandiol; dieses wird zu (*R*)-Mandelsäure oxidiert, während man gleichzeitig bei vollständigem Ablauf der Reaktion enantiomerenreines (*S*)-Phenylethandiol zurückbehält. Eine detaillierte Analyse zeigt, dass diese Reaktion mit dem Cofaktor PQQ (Pyrrolochinolinchinon) abläuft.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es zu versuchen, dieses Enzym zu isolieren, proteinchemisch zu charakterisieren und das chemoenzymatische Synthesepotenzial aufzuzeigen.

Zu Beginn wurde versucht, den unbehandelten zellfreien Rohextrakt mit Standardmethoden, also durch chromatographische Reinigung an verschiedenen Materialien, anzureichern. Allerdings waren diese Versuche durchweg ohne Erfolg, d. h. es konnte kein aktives Enzym nach Überprüfung der Fraktionen wiedergefunden werden. Eine partielle Anreicherung konnte lediglich durch die Temperatur- und pH-Fällung erzielt werden. Bei diesen Schritten wurde kein Enzymverlust beobachtet.

In mehreren Publikationen sind Standardmethoden zur Reinigung von ADHs aus verschiedenen Mikroorganismen erfolgreich angewandt worden. Als ein Beispiel sei hier die Isolierung einer ADH aus *Gluconobacter suboxydans* mit DEAE-Sephadex A-50 und Hydroxylapatit erwähnt (Adachi *et al.*, 1978).

Diese Art von thermotoleranter ADH aus Essigsäurebakterien haben auch biotechnologische Bedeutung, so sind die Chinoprotein- und Flavoprotein-ADHs für die D-Gluconat- oder D-Sorbitol-Fermentation eingesetzt worden (Adachi *et al.*, 2003). Auch aus dem thermotoleranten Bakterium *Acetobacter pasteurianus* sind entsprechende ADHs unter Verwendung von DEAE-Toyopearl-Chromatographie und über einen Membranfilter isoliert und aufkonzentriert worden (Kanchanarach *et al.*, 2010).

Von Yamada *et al.* (2013) wurde eine thermostabile Aldose-Dehydrogenase (tPQQ-ADH) aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* untersucht. Es wurde in einer Enzym-Elektrode immobilisiert eingesetzt, die bei Temperaturen von bis zu 70°C funktioniert. Hier wurde auch PQQ als Cofaktor verwendet und es wurden Calcium-Ionen zur Stabilisierung dieser Q-ADH zugesetzt. Die Temperatur kann sogar die Endproduktproduktion signifikant beeinflussen. Saichana *et al.* (2009) haben mit einem

thermotoleranten *Gluconobacter*-Stamm gearbeitet, der bei einer Temperatur von 30°C angezogen wird und hauptsächlich 2-Keto-D-Gluconsäure produziert, hier ist ein FAD-abhängiges, GADH genanntes Enzym für die Oxidation verantwortlich. Zieht man diesen Stamm bei 37°C an, wird die FAD-GADH desaktiviert und die PQQ-Glyceroldehydrogenase wird hauptsächlich gebildet, die die Synthese von 5-Keto-D-Gluconsäure in Verbindung mit CaCl<sub>2</sub> *in vitro* bis 90 % Umsatz begünstigt.

Der Überstand der pH- und Temperaturfällung des in dieser Arbeit charakterisierten Enzyms aus *Pseudomonas* sp. konnte mit Hilfe von Viva-Spin-Membranen, also selektiven Membranen, die Proteine nach Größe trennen, weiter gereinigt werden. Dabei wurde bei Verwendung einer Membran mit einem Cut-off von 5 kDa die Aktivität im Überstand wiedergefunden; im Filtrat wurde keine Aktivität gemessen. Da hier das Filtrat der 10-kDa-Filtration und der Überstand der 5-kDa-Filtration Enzymaktivität zeigen, kann man mit Sicherheit sagen, dass das Enzym eine Größe zwischen 5 kDa und 10 kDa hat. Laut Aminosäureanalyse liegt der ungefähre kDa-Wert bei 10 kDa, so dass diese Messung die Größe des Enzyms untermauert. Somit muss das Enzym ungewöhnlicherweise eine relativ kleine ADH sein. Allerdings ist das Präparat nach diesen, insgesamt wenig selektiven Schritten noch nicht sauber genug, um eine eindeutige Aminosäuresequenz zu ergeben, da dieses Enzym N-terminal blockiert ist.

In der Folge wurde eine weitere Reinigung mittels HPLC durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm, da Peptidbindungen hier absorbieren. Die verwendete Nucleosil-C18-Nautilussäule (Macherey-Nagel) ist hydrophil und auch bei Verwendung eines Laufmittels mit 100 % Wasser oder Puffer absolut stabil. Der Rohextrakt wurde portionsweise aufgetragen, später wurden die einzelnen Fraktionen der sechs Peaks vereinigt und mit der Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) aufkonzentriert (Abb. 17). Nach der Reinigung wurde nur in einer Fraktion Aktivität festgestellt. Diese Fraktion sollte praktisch homogen sein, damit man eine Proteinsequenzierung durchführen kann. Die anschließende Sequenzierung erbrachte kein Ergebnis, offensichtlich war der N-Terminus nicht zugänglich.

In weiteren Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob es sich überhaupt um ein katalytisches Peptid bzw. Protein handelt. Dazu wurde das hoch gereinigte katalytische Material mit folgenden weiteren Methoden charakterisiert:

- FT-IR-Spektrum, um charakteristische Peptidbindungen in dem Material nach der HPLC-Reinigung nachzuweisen
- Aminosäureanalysator, damit die im Protein vorkommenden Aminosäuren bestimmt werden können

Die Ergebnisse aus der Reinigung zeigen, dass es sich um ein kleines Enzym mit einer Molmasse von ca. 10 kDa handelt.

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für katalytisch wirksame Peptide zu finden. Beispielsweise sind in Publikationen von Miller (2000) und Barbas (2000) zahlreiche chemische Reaktionen beschrieben, die mit Prolin-haltigen Peptiden als Katalysator stattfinden. Die Peptide sind entweder zyklische Dipeptide oder ein größeres Peptid, das katalytische Fähigkeiten ausbilden kann. In der genannten Literatur sind Aminosäuren oder Peptide mit unter 50 Aminosäuren beschrieben, also von ca. 5 kDa Größe. Auch Prolin selbst kann Aldolreaktionen katalysieren. Als Beispiel für zyklische Dipeptide können diese die Hydrocyanierung mit Iminen katalysieren. Poly-(L)-Alanine können zur Epoxidierung eingesetzt werden. Poly-(L)-Leucine, die alpha-helicale Peptide bilden, besitzen gute katalytische Fähigkeiten zur Epoxidierung; diese haben mehr als 10 Aminosäuren. Mit 30 Aminosäuren erzeugen die zyklischen Polypeptide die beste Enantioselektivität in diesen Reaktionen, da ca. 30 Aminosäuren eine stabile helicale Struktur ausbilden. Octapeptide können enantioselektiv Alkohole verestern. Auch in einer Publikation von Zou et al. (2005) sind Peptide beschrieben, die Aldolreaktionen mit einem *ee*-Wert von 99 % katalysieren. Hier sind meist Dipeptide eingesetzt worden. In der Veröffentlichung von Aziz Sancar and Gwendolyn B. Sancar (1988) sind zahlreiche Glycosylasen beschrieben und charakterisiert, für die eine Enzymgröße von 20-30 kDa bestimmt wurde.

In der Publikation von Monti und Riva (2000) wird über Enzyme diskutiert, die katalytische Wirkung zeigen und max. 10 kDa groß sind. Diese werden auch peptidische Biokatalysatoren genannt. Eine Esterase mit 5,7 kDa aus *Candida lipolytica* wurde über Gelfiltration gereinigt und mit Olivenöl auf Veresterungsaktivität positiv getestet. Die Enzymgröße wurde über SDS Page ermittelt, eine Sequenzierung war nicht möglich. Ein Chymosin-Enzym (Rennin) aus thermophiler Actinomycete zeigt auch bei Zugabe von Calcium-Ionen katalytische Aktivität. Das Enzym wurde über SDS PAGE charakterisiert und die molekulare Größe beträgt 9,7 kDa. Hier wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt und neunmal Prolin ermittelt; auch dieses Enzym konnte nicht sequenziert werden.

Interessant ist auch eine Protease aus *Kurthia spiroforme* mit einer Größe von 8 kDa aus der Publikation von Steele *et al.*, (1992), die thermophil (60°C) und pH-stabil (pH 11) ist. Diese Eigenschaften sind auch in Q-ADH wiederzufinden. Hier ist ebenfalls eine Sequenzierung nicht gelungen.

In einer Publikation von Fan und Matthey (1999) ist eine extrazelluläre Esterase aus *Emericella nidulans* und eine weitere aus *Talaromyces emersonii* beschrieben, die unter 10 kDa groß sind. Diese Enzyme wurden über Filtration und anschließende HPLC mit einer

Nucleosil-C18-Säule isoliert und bei 214 nm wurde der Proteinpeak gemessen. Die beiden letzten Reinigungsschritte wurden ebenfalls bei der Q-ADH in dieser Arbeit angewandt.

### Nachweis der Peptidbindung

Die aufkonzentrierte Probe aus der HPLC-Reinigung wurde in flüssiger Form auf die Scan-Oberfläche aufgetragen und trockengeblasen. Die feine kristalline Haut, die nach der Trocknung entstanden ist, wurde im Bereich von 2000-1000 Wellenzahl/cm<sup>-1</sup> gescannt. Deutliche Zeichen einer Proteinstruktur gibt es bei den Wellenzahlen 1658 bzw. 1573, da diese Wellenzahlen typisch und charakteristisch für Peptidbindungen sind. Eine peptidische Struktur wird auch durch die anderen Wellenzahlen bestätigt, die ebenfalls auf für Aminosäure typische funktionelle Gruppen hinweisen. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergibt die Aufsummierung von 100 Aminosäuren.

Über Struktur, Reaktionen und Anwendungen von PQQ-abhängigen ADH aus Essigsäure-Bakterien wird ausführlich von Yakushi und Matsushita (2010) berichtet, die den Reaktionsmechanismus wie in dem nachfolgend aufgeführten Schema genau darstellen und aufklären.

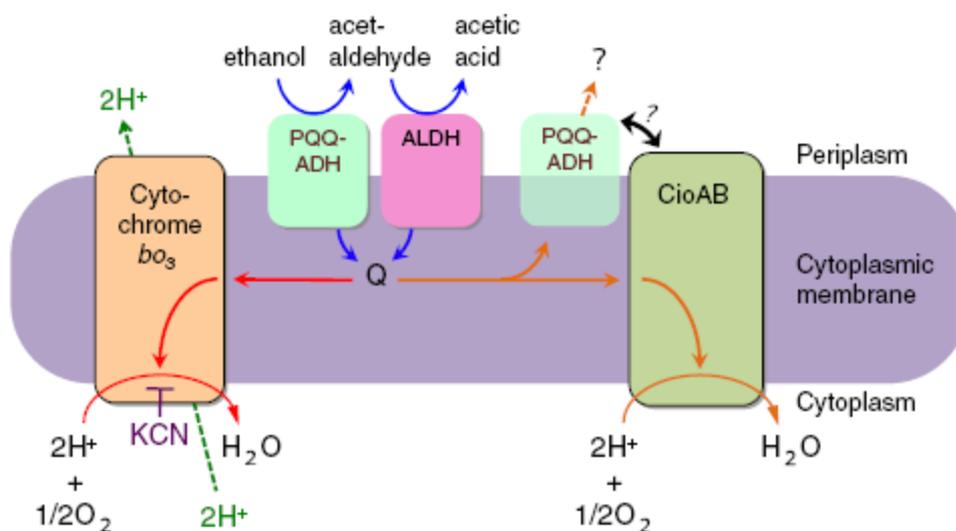


Abb. 46: Zellbiotransformation von Essigsäure-Bakterien (Yakushi und Matsushita, 2010)

Die PQQ-abhängige ADH aus Essigsäure-Bakterien ist ein membrangebundenes Enzym, das bei Fermentation Ethanol zur Acetaldehyd und anschließend zur Essigsäure oxidiert, gekoppelt mit einer Reduktion von Ubichinon, das hier dann Sauerstoff zu Wasser reduziert, indem dessen Cofaktor den Wasserstoff bindet (Abb. 46)

Für diese Reaktion existiert eine Redoxreaktionskaskade (Abb. 47), die wie folgt aussieht:

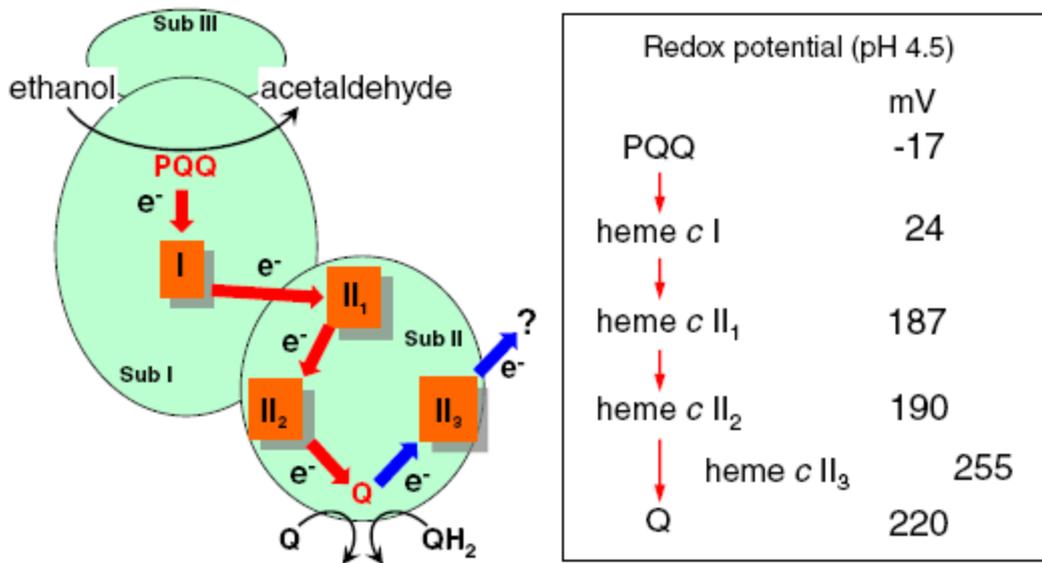


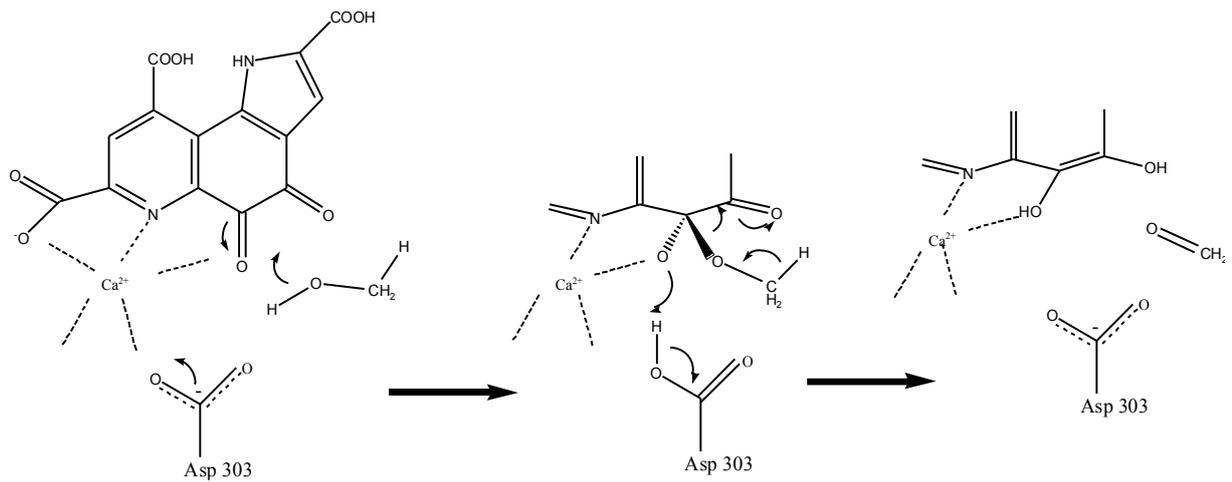
Abb. 47: Redoxreaktionskaskade des Essigsäure-Bakteriums

Durch die detaillierte Aufklärung der Redoxreaktionsmechanismen und die Fähigkeit der Racematspaltung durch die Oxidation von Alkoholen zu achiralen oder chiralen Aldehyden und Säuren wird also ein erweitertes Applikationsfeld erschlossen.

Der Elektronentransport dieser PQQ-ADH von Alkohol kann bei der Herstellung von chiralen Produkten in der chemischen und der pharmazeutischen Industrie ein wichtiges Reaktionssystem bieten und auch in der Herstellung von Biosensoren und Elektrozellen eine Rolle spielen.

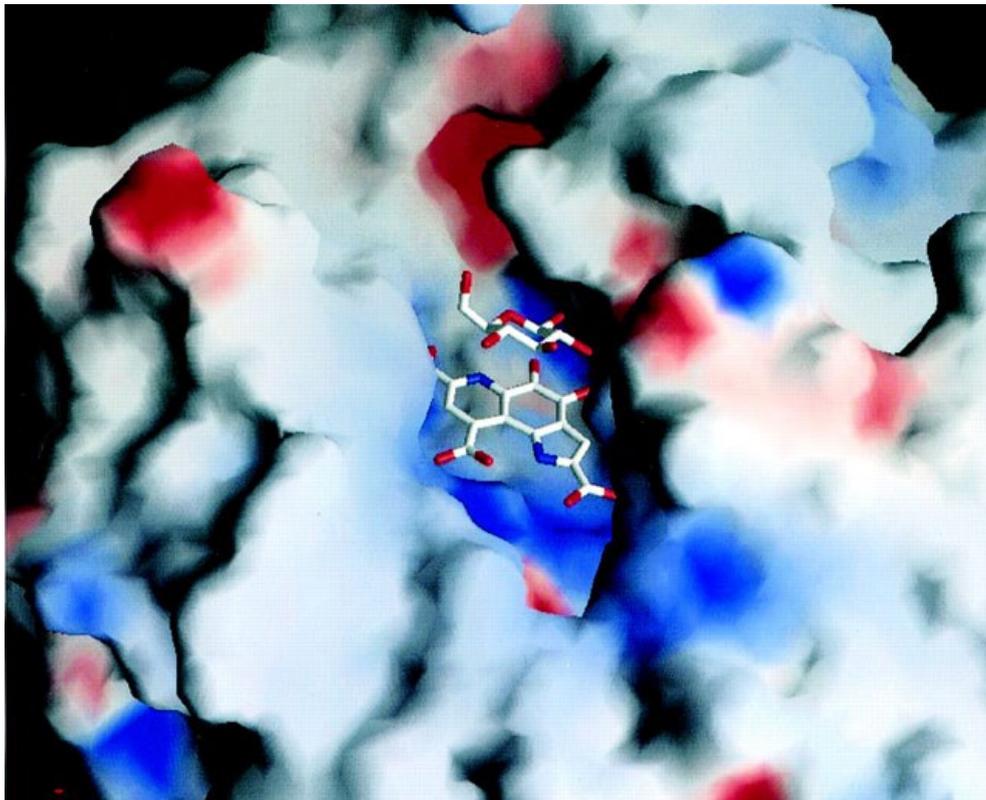
In einem aktuellen Review-Artikel von Gvozdev *et al.* (2012) wurde dieses Thema nochmals zusammengefasst und die Wichtigkeit des Cofaktoraustauschs erfasst sowie die Bedeutung der Anwesenheit von Calcium-Ionen in dem oxidativen Mechanismus deutlich gemacht.

Für die PQQ-abhängige Methanoldehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* ist der Reaktionsmechanismus der Oxidation wie in Abb. 48 dargestellt schon bekannt. Der Oxidationsmechanismus zeigt, dass Asparaginsäure mit der Carboxylat-Gruppe in der Seitenkette hierbei eine zentrale Rolle für die Oxidation spielt. Von dieser Aminosäure sind in dem Protein aus *Pseudomonas* sp. 11 Einheiten vorhanden.



**Abb. 48: Reaktionsmechanismus der Oxidation der PQQ-abhängigen Methanoldehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* (Anthony, 1998 und Anthony, 2001)**

Beide Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Probe Peptidbindungen besitzt, welche aus 100 Aminosäuren oder einem Mehrfachen davon bestehen, wobei die für den Katalysemechanismus erforderliche Aminosäure Asparaginsäure mehrfach vorhanden ist.



**Abb. 49: Dreidimensionales Bild mit Bindung der PQQH<sub>2</sub> und Glucose an (S)-GDH mit der Programm GRASP (Nicholls *et al.*, 1991).**

Strukturell gibt es verschiedene Arten von Chinoproteinen, unter denen man membranständige und lösliche Enzyme sowie Enzyme mit kovalent gebundenem oder auch mit freiem Cofaktor vorfindet. Aus Abb. 49 kann man sehr gut einen dreidimensionalen Blick auf die Position und Bindung von PQQ und Glucose an der GDH sehen. Das PQQ der Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. ist nicht kovalent an das Enzymprotein (Apo-Enzym) gebunden. Diese Art von freiem Cofaktor in einem löslichen Enzym konnte bislang in mehr als zehn verschiedenen Arten von Enzymen gefunden werden, die alle mehrheitlich als Dehydrogenasen zur Oxidation von primären und sekundären Alkoholen oder Zucker beschrieben sind. In Chen *et al.* (2002) ist auch detailliert die Struktur der Bindung von PQQ und Chinohemoproteinalkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas putida* HK5 zur oxidativen Katalyse und die spezifische Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  beim oxidativen Mechanismus der Alkoholgruppe im Aldehyd und anschließend in der Säure untersucht worden.

Weiterhin wird auch von Itoh *et al.* (1998) die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  deutlich nachgewiesen. In der Tabelle 14 wurde der Mechanismus bezüglich der Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  in einem calciumgebundenen Chinoprotein-ADH untersucht und es wurden verschiedene zweiwertige Ionen untersucht und nachgewiesen, wobei gefunden wurde, dass  $\text{Ca}^{2+}$  die größte enzymatische Oxidationsaktivität bei einer PQQ-abhängigen Oxidation hervorruft.

Die folgende Tabelle zeigt, dass das Calcium-Ion die höchste Aktivität aufweist.

Tab. 14: Zugabe von Metall-Ionen zu einer Alkohol/MeCN-Lösung mit PQQ-Derivat

alcohol	$K_{\text{add}} (\text{M}^{-1})^a$			
	without $\text{M}^{2+}$	with $\text{Ca}^{2+}$	with $\text{Sr}^{2+}$	with $\text{Ba}^{2+}$
methanol	0.63	3.6	1.1	1.0
ethanol	0.20	1.2	0.74	0.41
2-propanol	0.019	0.32	0.27	0.16

<sup>a</sup> The experimental error is within  $\pm 5\%$ .

## 4.2 Das präparative Potenzial der PQQ-abhängigen Dehydrogenase

In dieser Arbeit sind mehrere Anwendungen des Enzyms für die Oxidation aufgezeigt worden. Es wurden sowohl Diole als auch primäre Alkohole mit dem Rohextrakt und auch mit partiell gereinigtem Enzympräparat oxidiert. Setzt man racemische Diole ein, zeigt sich, dass das Enzym nur das (*R*)-Enantiomer oxidiert. Es wurden bei Verwendung von racemischem Phenylethandiol weder (*S*)-Mandelsäure noch das Intermediat, der (*S*)-Aldehyd, gefunden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine große Anzahl an aromatischen und aliphatischen Diolen oxidiert werden kann; ebenso sind Ketale geeignete Substrate. Der Vergleich der Ausbeuten

für verschiedene Umsetzungen zeigt, dass aromatische Diole besonders bevorzugte Substrate sind.

Mit der PQQ-abhängigen Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. hat man die Möglichkeit, beim Einsatz von racemischen Diolen durch selektive Oxidation enantiomerenreine Hydroxysäuren zu gewinnen. Chirale Hydroxysäuren sind auch mit einer Vielzahl anderer Verfahren zugänglich. Beispiele sind die folgenden:

So beschreiben Yamamoto *et al.* (1991) ausgehend von Mandelonitril die Gewinnung von (*R*)-Mandelsäure mit Zellen von *Alcaligenes faecalis* in Form ganzer Zellen (91 % Ausbeute, >99 % *ee*). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Umsetzung als Ganzzellbiotransformation durchgeführt werden kann. Bei dieser Methode ist es allerdings nicht möglich, wie bei der Racematspaltung von Phenylethandiol enantiomerenreines (*S*)-Mandelonitril zu gewinnen, da dies spontan racemisiert.

Casy *et al.* (1992) beschreiben die Umsetzung von aliphatischen und aromatischen Ketosäuren mit Hilfe von NADH-abhängigen (*S*)- und (*R*)-Lactatdehydrogenasen, die jeweils die entsprechenden (*S*)- oder (*R*)-Hydroxysäuren bilden. In aller Regel erreicht man hohe Enantiomerenüberschüsse (>95 % *ee*). Nachteilig ist bei dieser Methode, dass die Ketosäuren als Ausgangsverbindungen relativ instabil und chemisch schwer zugänglich sind. Zudem muss der Cofaktor NADH in einer weiteren Reaktion regeneriert werden, was den Einsatz eines Co-Substrats erfordert und – je nach Regenerierungsmethode – auch ein Co-Produkt ergibt, was wiederum die Aufarbeitung und Reinigung der gewünschten chiralen Hydroxysäure erschweren kann.

Taylor *et al.* (1997) beschreiben eine Methode, bei der über eine Dehalogenierung von rac. 2-Chlorpropionsäure bei Einsatz einer (*R*)-spezifischen Dehalogenase aus *Pseudomonas putida* (*S*)-Hydroxypropionsäure hergestellt wird (>98 % *ee*). Hier ist die Gemeinsamkeit der Methoden nur in der Entstehung von Hydroxysäure als Endprodukt sichtbar. Sowohl die Synthesemethode als auch der Typ des Enzyms und des verwendeten Substrats sind hier grundverschieden.

Bei Strauss und Faber (1999) wird die Herstellung von (*S*)-*o*-Acetylmandelsäure über eine Deracemisierungsreaktion in einem kombinierten System aus einer Lipase aus *Pseudomonas* sp. mit einer Mandelatracesemase beschrieben. Hier wird racemische Mandelsäure zu *O*-Acetylmandelsäure (80 % Ausbeute, 98 % *ee*) umgesetzt. Es wird auch hier eine Zwei-Stufen-Reaktion benutzt. Die Reaktion wurde hier in organischem Lösungsmittel durchgeführt, da unter diesen Bedingungen die Lipasereaktion optimal abläuft. Durch Einsatz der Racemase wird die Ausbeute an (*S*)-Hydroxysäure bis auf 80 % erhöht. Es wurden hohe Ausbeute und Reinheit erreicht.

Andersson *et al.* (1998) beschreiben die Synthese von (*S*)-3-Chloromilchsäure (81 % Ausbeute, >97 % *ee*) unter Einsatz einer Oxidoreduktase aus *Proteus vulgaris*. Die Reaktion wurde mit ganzen Zellen durchgeführt. Der genaue Reaktionsverlauf ist jedoch nicht bekannt, da das für diese Reaktion verantwortliche Enzym nicht näher charakterisiert wurde.

Häufig werden zur Herstellung enantiomerenreiner Hydroxysäuren Ganzzellbiotransformationen angewendet, anstatt dass – wie in dieser Arbeit – die Umsetzung mit isolierten Enzymen durchgeführt wurde. Es ist aber ein Fakt, dass durch die Ganzzellbiotransformation oder mehrstufigen Reaktionen eine hohe Ausbeute von einem der Enantiomere erreicht werden kann.

### 4.3 Chemoenzymatische Synthesen

#### 4.3.1 Synthese von chiralen Hydroxyketonen

In diesem Experiment wurde der Versuch unternommen, die stabile Aldehydzwischenstufe der enzymatischen Oxidationsreaktion mit Einsatz einer Transketolase aus Bäckerhefe in einer C-C-Verknüpfungsreaktion abzufangen und damit chirale Zuckerverbindungen zu synthetisieren. Da bei der Standardreaktion des rac. 1,2-Phenylethandiols mit dem partiell gereinigten Rohextrakt enantiomerenreiner (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd entsteht, wird diese Reaktion zur Herstellung optisch reiner 5-Phenyl-5-deoxy-D-xylulose verwendet (Kapitel 3.5.5.).

Da das Produkt stark hydrophil ist, konnten nach Extraktion und Nachweis am GC nur etwa 0,5 mM dieses Produktes nachgewiesen werden. Das GC/MS zeigt aber eindeutig die Bildung des in Abb. 37 dargestellten Zuckers.

Chirale Zuckerbausteine sind schwer zu synthetisieren. Sie sind aber wertvolle chirale Bausteine für die pharmazeutische Industrie. Üblicherweise ist es sehr schwer, die Aldehydzwischenstufe, die bei der Oxidation eines Alkohols entsteht, in stabiler Form zu gewinnen, da Aldehyde unter oxidativen Bedingungen eigentlich sofort bis zur Säure weiterreagieren. In diesem Fall handelt es sich aber offensichtlich um eine schonende, milde Oxidation, bei der die Aldehydstufe – möglicherweise durch Keto-Enol-Tautomerie – als stabiles Zwischenprodukt isolierbar ist. Der Aldehyd ist dabei so weit stabil, dass er vor der Weiterreaktion zur Säure durch die gekoppelte Reaktion mit einer Transketolase abgefangen und zum chiralen Hydroxyketon verknüpft werden kann.

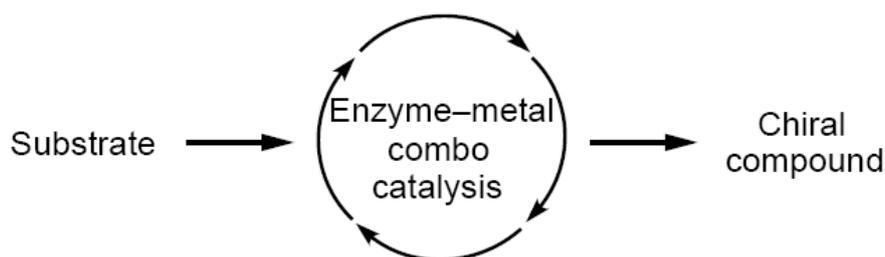
Von Effenberger *et al.* (1992) wird berichtet, wie ein racemischer Hydroxyaldehyd mit Hydroxypyruvat unter Einsatz der Hefe-Transketolase 5-Deoxy-D-xylulose synthetisiert wird. Die Reaktion wurde erfolgreich unter Verwendung des chiralen Aldehyds mit Einsatz von Transketolase, TPP und  $Mg^{2+}$  durchgeführt. In dieser Arbeit wird im Gegensatz zur Literatur

direkt ein chiraler aromatischer Aldehyd eingesetzt. Der (*R*)-Hydroxyphenylethylaldehyd wurde direkt aus der Oxidationsreaktion isoliert und zum ersten Mal für solche Reaktion direkt eingesetzt, da er nicht kommerziell erhältlich ist

#### 4.3.2 Oxidations- und Racemisierungsreaktion mit einem Rutheniumkatalysator in einem Zweiphasensystem

In einer Publikation von Bäckvall (1997) wird eine Möglichkeit zur Racemisierung sekundärer Alkohole vorgestellt („Enzymatische Racematspaltung von Alkoholen gekoppelt mit Ruthenium-katalysierter Racemisierung des Substrat-Alkohols“). Bei einer Ruthenium-katalysierten Transferhydrierung wurde dabei eine schnelle Racemisierung von sekundären Alkoholen am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom beobachtet.

Die Versuchsreihe in dieser Arbeit zeigt, dass sich metallorganische Katalyse und enzymatische Katalyse in einfacher Form der Eintopfreaktion ohne Nutzung von getrennten Kammern oder Filtern zur Herstellung chiraler Produkte kombinieren lassen, wie in Abb. 50 dargestellt (Kim *et al.*, 2002).



**Abb. 50: Die effiziente Kombination der metallorganischen Katalyse mit Enzymen**

In einer Publikation von Ivanova und Ryabov wird die Oxidation von D-Glucose mit Hilfe eines Ruthenium<sup>III</sup>-Komplexes mit Einsatz einer Glucoseoxidase oder Glucosedehydrogenase beschrieben. Hierbei wird Ruthenium<sup>III</sup> zu Ruthenium<sup>II</sup> reduziert und die Reaktion ist in dieser Richtung begünstigt (Ivanova und Ryabov, 2002). In der Arbeitsgruppe Bäckvall wird die Machbarkeit dieser Art von Reaktionen und Synthesen dargestellt und untermauert.

Dabei wird die Rolle der Rutheniumkatalysatoren beim Hydrogentransfer genau dargestellt: Speziell die Katalysatoren von Noyori, Aren-Ru<sup>II</sup>-diamin und der Shvo-Hydroxycyclopentadienyl-Ruthenium<sup>II</sup>-Katalysator sind hierfür sehr geeignet und können diesen Hydridtransfer mit einer Serie von Substraten tätigen.

Der Vorteil der beiden Katalysatoren ist, dass man hierbei keine Base braucht, um den Hydridtransfer von einem Alkohol an ein Keton zu begünstigen.

Der Shvo-Katalysator ist im Stande, einen sekundären Alkohol zu racemisieren, und das Enzym, nämlich die PQQ-abhängige ADH, kann in einem Eintopfsystem gleichzeitig das neu entstandene (*R*)-Diol in Hydroxysäure verwandeln. Somit wird am Ende die Ausbeute an (*R*)-Hydroxysäure höher als 50 % liegen. Die Bildung dieser Enantiomere mit einer Ausbeute höher als 50 % wird durch den Hydridtransfer des Shvo-Katalysators kinetisch begünstigt (Bäckvall 2003).

Einer der Meilensteine der Organochemiker und Enzymtechnologien ist die Kopplung der metallorganischen Katalyse mit einem Enzym. Hier wird verstärkt Forschung betrieben. Damit erreicht man höhere Ausbeuten und hat Zugang zur Herstellung von Zwischenprodukten oder Produkten, die in einer rein enzymatischen oder chemischen Reaktion nicht zugänglich sind. Die gekoppelte Reaktion ergibt Vorteile bezüglich des Materialeinsatzes, der Reinigungsschritte und der Produktausbeute und spart somit natürlich auch Zeit. Es gibt allerdings auch Produkte, die durch den physikalisch-chemischen Charakter nicht in einer Zweistufenreaktion in einer einzigen Phase hergestellt werden können, da sie sich entweder gegenseitig stören oder deutliche Löslichkeitsunterschiede zeigen. Hierbei bedient man sich häufig eines Zweiphasensystems. Durch ein Zweiphasensystem kann man sich im Einzelnen auch die Verwendung von Membranfiltern oder anderen Vorrichtungen ersparen, durch welche die Reaktionsräume voneinander getrennt werden.

Die folgende Versuchsreihe wurde am Institut der Organischen Chemie, Universität Stockholm, in der Arbeitsgruppe von Prof. Bäckvall durchgeführt. Hier wurde der Racemisierungsgrad verschiedener aromatischer Alkohole mit dem Shvo-Katalysator untersucht.

Hier wird eine neue Möglichkeit der Ruthenium-katalysierten *in situ*-Racemisierung durch Transferhydrierung beschrieben. Mit Hilfe dieses Katalysators wird eine schnelle Racemisierung von sekundären Alkoholen am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom beobachtet

Die Transferhydrierung des Rutheniumkatalysators funktioniert über eine temporäre Oxidation vom Alkohol zum Keton und dann eine Rehydrierung des Ketons.

Bei Csjernyk *et al.* (2004) ist der detaillierte Racemisierungsmechanismus von (*S*)-Alkoholen in rac. Alkohol wie in Abb. 51 dargestellt:

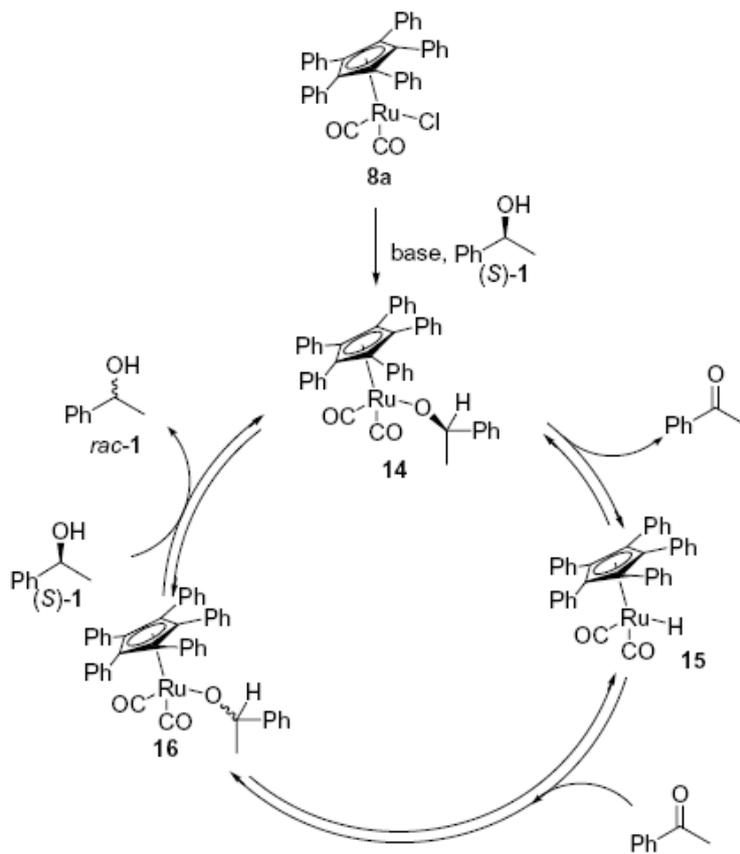


Abb. 51: Detaillierter Mechanismus der Racemisierung von Alkoholen

#### 4.3.3 Oxidation und Racemisierungsreaktion im Zweiphasensystem gestartet mit *(S)*-Diol

In mehreren Publikationen der Arbeitsgruppe Bäckvall (z. B. Bäckvall 1997, 2003 und 2004) sind die Racemisierungsreaktionen durch den Rutheniumkatalysator in einer gekoppelten Reaktion von enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionen beschrieben.

Huerta *et al.* (2001) ist es gelungen, ein System für einen robusten Rutheniumkatalysator zu entwickeln, das keine externe Base mehr für die Racemisierung braucht. Somit wird die gekoppelte Enzymaktivität nicht beeinflusst und es wird eine Base-katalysierte Transesterifikation verhindert.

Ivanova *et al.* (2003) haben sogar speziell die kinetische Oxidation von Glucose in D-Gluconolacton unter Einsatz eines  $\text{Ru}^{\text{II}}$ -Katalysators und einer PQQ-abhängigen Glucosedehydrogenase untersucht. Hier wird deutlich, dass die Kopplung von metallorganischer Katalyse mit enzymatischer Biotransformation immer mehr an Bedeutung gewinnt.

Übertragen auf die durch PQQ-abhängige ADH aus *Pseudomonas* sp. katalysierte Reaktion kann man versuchen, den von Bäckvall entwickelten Racemisierungskatalysator zu nutzen, um den verbleibenden (*S*)-Alkohol zu racemisieren und den dadurch gebildeten (*R*)-Alkohol mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase zur (*R*)-Hydroxysäure zu oxidieren. Somit konnte die Ausbeute in dieser Arbeit auf über 50 % gesteigert werden.

Bei der ersten Reaktion wurde reines (*S*)-Diol eingesetzt, um zu testen, ob die beiden verschiedenen Phasen überhaupt kompatibel sind, so dass sich somit eine gezielte Reaktion durchführen lässt. Der Argon Gegenstrom in der Toluolphase war ausreichend, um die Reaktion ungestört ablaufen zu lassen und die Inaktivierung des Rutheniumkatalysators durch Sauerstoff zu verhindern. Gleichzeitig wurde aber auch die Sauerstoffversorgung über den Diffusionsschlauch in der wässrigen Phase für die PQQ-Regeneration gewährleistet.

In einer der aktuellen Publikation von Warner *et al.* (2011) wird ausführlich der Hydrogentransfer-Mechanismus des Shvo-Katalysators beschrieben (Abb. 52). Es wird gezeigt, dass der Ru<sup>II</sup>-Katalysator einen idealen Racemisierungskatalysator für Alkohole, Aldehyde und Amine darstellt. Auch der Hydrogentransfer auf Ketone und Imine wurde untersucht. Bei Alkoholen, Aldehyden und Aminen kann basierend auf der kinetischen dynamischen Auflösung eine Ausbeute von 100 % ausgehend von dem Ausgangsstoff erreicht werden. Das ist natürlich hinsichtlich der industriellen Anwendung der chiralen Synthese ein sehr interessantes Verfahren zur Ausbeuteerhöhung.

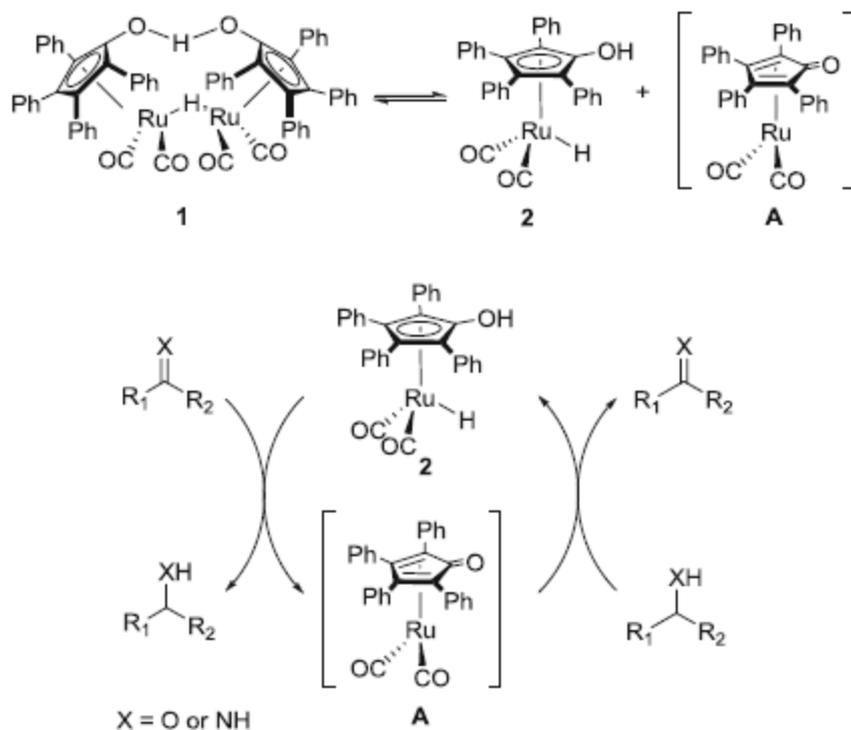


Abb. 52: Mechanismus des Hydrogentransfers mit dem Shvo-Katalysator

Wie bedeutend die Rolle der organometallischen Katalyse beim Einsatz in der modernen biokatalytischen Synthese ist, erkennt man auch aus der Publikation von Manzuna Sapu *et al.* (2011). In dieser Publikation werden mit Schweinepankreaslipase racemische oder prochirale Allene über enantioselektive Transformation in enantiomerenreine Allene umgewandelt, die eine wichtige Rolle in der modernen organischen Synthese spielen (Abb. 53).

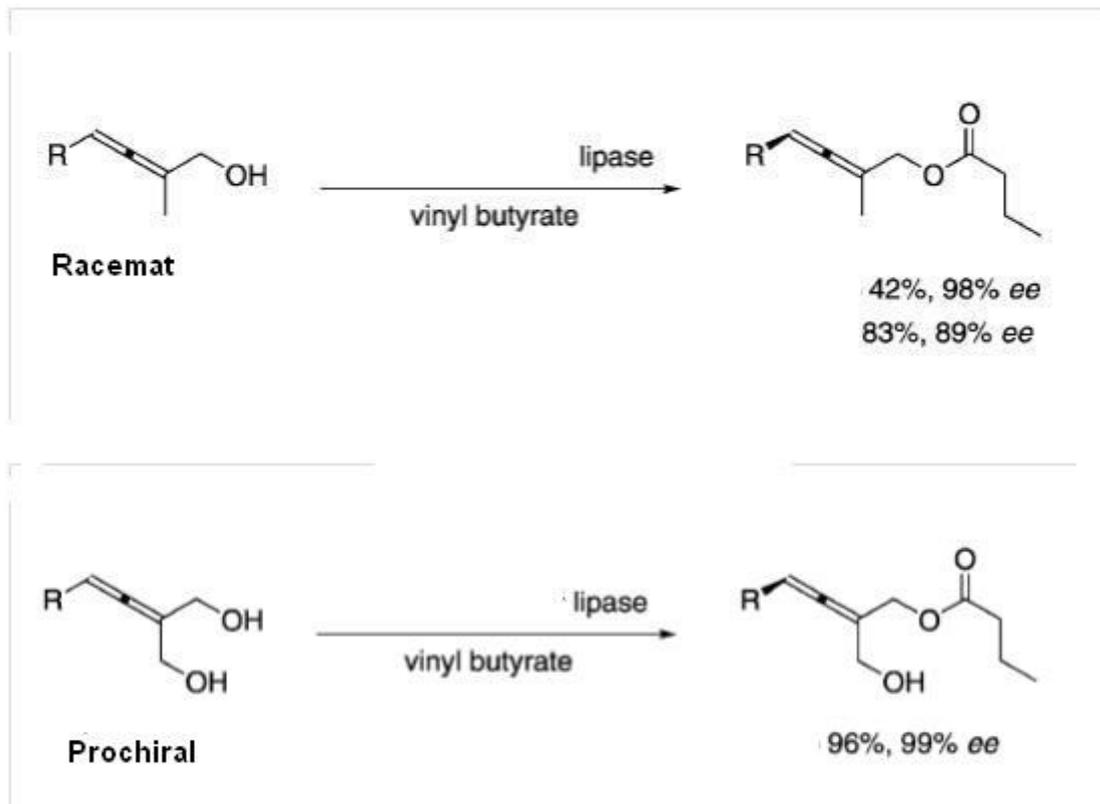


Abb. 53: Enantioselektive Biokatalyse mit axialen chiralen Allenen

Noch ein weiterer Schritt zur Entwicklung homogener, effizienter und umweltfreundlicher katalytischer Synthesen zur Energiegewinnung wird in Kärkäs *et al.* (2011) gezeigt. Hier wird der Rutheniumkatalysator mit einem neuartigen Liganden zur Oxidation von Wasser in Sauerstoff und Wasserstoff in einem homogenen Reaktionssystem bei pH 7 eingesetzt und somit die Photosynthese nachgeahmt. Das ist damit ein bedeutender Schritt zur Gewinnung sauberer Energie mittels dieses Katalysators.

Natürlich werden chirale Hydroxysäuren und Alkohole weiterhin mit chemischen Methoden synthetisiert und weltweit arbeiten viele Arbeitsgruppen auch an der Synthese dieser Verbindungen. Unser Beitrag ist eine Alternative, um bessere und mildere Synthesebedingungen über biotechnologisch-enzymatische Synthesewege anzubieten. In der Einleitung sind mehrere chemische Synthesen vorgestellt worden. Im Folgenden werden als Beispiel noch weitere moderne chemische Methoden vorgestellt, wie von Chang *et al.* (1999).

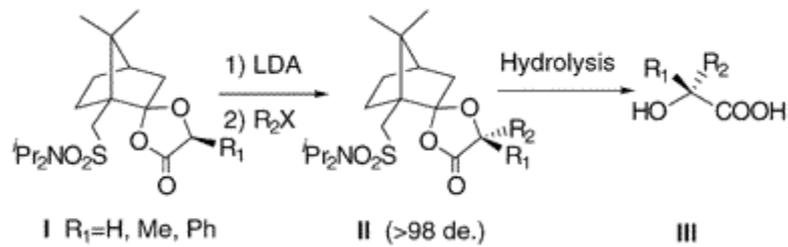


Abb. 54: Moderne chirale Synthese von Hydroxysäure mit LDA

Dabei katalysiert die Lewisäure (BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>) über Kondensation ein chirales 1,3-Dioxolanon zu einem Dimethoxyacetal, das über Hydrolyse eine  $\alpha$ -Hydroxysäure produziert. Die Reaktion ist hoch diastereoselektiv. Es entsteht eine mono- und disubstituierte  $\alpha$ -Hydroxysäure mit hoher Enantiomerenreinheit.

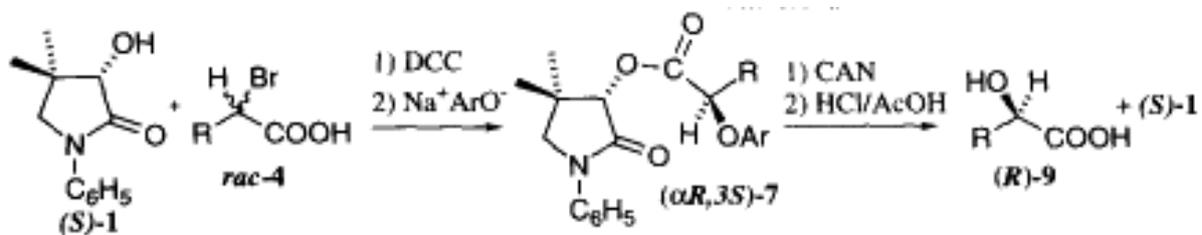


Abb. 55: Moderne Synthese chiraler Hydroxysäuren mit DCC/CAN

In Camps *et al.* (1998) wird die Synthese von (*R*)- oder (*S*)- $\alpha$ -Hydroxysäure über eine Veresterungsreaktion mit einer racemischen  $\alpha$ -Bromsäure (*rac*-4) mit Dicyclohexylcarbodiimid und dem chiralen Substrat (*R*) oder (*S*) dargestellt. Danach wird eine Reaktion mit Natrium-*p*-methoxyphenoxid und Tetra-*n*-hexylammoniumiodid, die diastereoselektiv ( $\alpha$ R,3*S*)- oder ( $\alpha$ S,3*R*)- $\alpha$ -(*p*-Methoxyphenoxy)-ester (7) als Zwischenprodukt herstellt, die dann durch eine Hydrolyse zu einer chiralen Hydroxysäure umgewandelt werden.

In Abb. 56 wird eine klassische Biotransformation mit ganzen Zellen beschrieben, wobei aus chiralen (*R*)- und (*S*)-Hydroxysäuren über die Reduktion von Methylbenzoylformiat chirale Hydroxyester hergestellt werden, die dann durch Hydrolyse zu enantiomerenreinen Hydroxysäuren verseift werden.

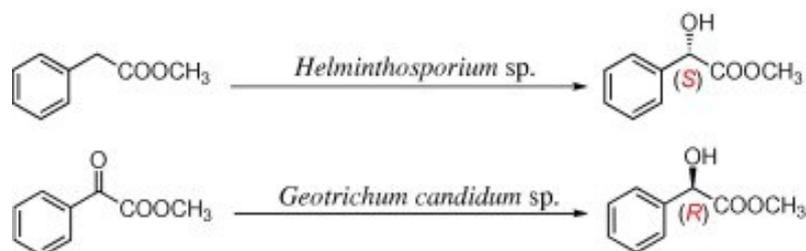
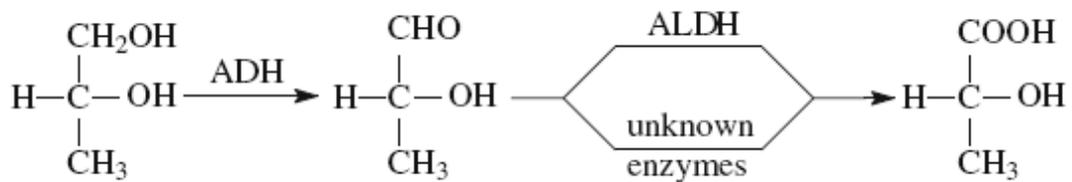


Abb. 56: Biotransformation zur Herstellung von chiralen Hydroxysäuren

Eine chirale Synthese von D(-)Lactonsäure, mit Hilfe von Gene Knockout durch Oxidation von 1,2-Propandiol bei *Gluconobacter oxydans* ist aus der Arbeit von Wei *et al.* (2010) bekannt.

Das verantwortliche Enzym ist in dieser Publikation von Wei charakterisiert (Abb. 57). Es ist eine membrangebundene ADH aus *Gluconobacter oxydans*. Die entfernte ALDH ist zwar in der Reaktion involviert, aber für die Produktion nicht essenziell. Ein zweites Enzym wäre dann parallel für die weitere Oxidation verantwortlich, die noch nicht charakterisiert ist. Diese Art von Charakterisierung ist bedeutend, um die enzymatischen ADH-Oxidationsstufen besser zu verstehen, damit auch die chemoenzymatischen Synthesewege besser erklärt werden können.



**Abb. 57: ADH- und ALDH-Reaktion zur Oxidation von Alkoholen zu chiralen Hydroxysäuren**

Auch acyclische Terpene werden von PQQ-abhängiger Alkoholdehydrogenase (Q-ADH) aus *Pseudomonas aeruginosa* abgebaut. Dies zeigt die Vielfalt an katalytischen Fähigkeiten zum Abbau von nichtaromatischen Verbindungen wie Terpenen, wie z. B. in der Publikation von Chattopadhyay *et al.* (2010).

## 5 Zusammenfassung

Die regio- und stereoselektive Oxidation der primären Alkoholfunktion von 1,2-Diolen führt zu chiralen Hydroxyalkoholen oder chiralen Hydroxysäuren. Eine solche Oxidation kann im Prinzip mit den gut bekannten  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen oder mit FAD-abhängigen Alkohol-Oxidasen durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte für diese Anwendung das Potential von Chinoprotein-Alkohol-Dehydrogenasen untersucht werden, Cofaktor dieser Enzyme ist das Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ). In Vorversuchen konnte ein Bakterium (*Pseudomonas* sp.) identifiziert werden, das in der Lage ist, ausgehend von racemischem 1,2-Phenylethandiol das (*R*)-Enantiomer zu (*R*)-Mandelsäure zu oxidieren. Diese Oxidation kann vollständig ablaufen, so dass enantiomerenreines (*S*)-Phenylethandiol zurückbleibt. Versuche mit zellfreiem Extrakt haben gezeigt, dass die Oxidation als Cofaktor PQQ benötigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das für diese Umsetzung verantwortliche Enzym gereinigt, biochemisch charakterisiert und für chemoenzymatische Synthesen eingesetzt werden. Zur Produktion des Enzyms wurden Zellen von *Pseudomonas* sp. kultiviert, aufgeschlossen und der zellfreie Rohextrakt mit verschiedenen Diolen auf seine oxidative Wirkung hin getestet. Eine geeignete Reinigungsmethode wurde entwickelt und der Rohextrakt so weit wie möglich gereinigt. Die Charakterisierung hat gezeigt, dass der zugrundeliegende Katalysator ein Protein ist, dessen Größe der Proteinkette, Anzahl und Art der Aminosäuren aufgeklärt werden konnte. Die Sequenz konnte nicht festgestellt werden, da das Protein N-terminal blockiert und für den Edman-Abbau nicht zugänglich ist.

Die enzymatischen Oxidationsreaktionen an einer Reihe von Diolen oder primären Alkoholen zeigten das präparative Potenzial des Enzyms auf. Eine Reihe von Diolen wurde enantioselektiv zu (*R*)-Hydroxysäuren oxidiert. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass die eigentlich instabile Aldehydzwischenstufe, die häufig sofort zu einer Hydroxysäure weiteroxidiert wird, im Fall von Phenylethandiol isoliert werden konnte und als enantiomerenreiner Aldehyd für chemoenzymatische Reaktionen zur Verfügung stand. Bei der *in situ*-Kopplung mit einer Transketolase konnte über eine Aldolkondensation ein chiraler Zucker synthetisiert werden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Bäckvall (Universität Stockholm) wurde ein organometallischer Ru-Katalysator zur Racemisierung von sekundären Alkoholen erfolgreich eingesetzt. Hierbei ist der  $\text{Ru}^{\text{II}}$ -Katalysator, der die Reaktion der Racemisierung von reinem (*S*)-Diol zu rac. Diol katalysiert, genutzt worden, um die Ausbeute an (*R*)-Hydroxysäure zu erhöhen. Somit wird bei funktionierendem Racemisierungskatalysator eine Ausbeute an (*R*)-Hydroxysäure von  $> 50\%$  erwartet. In ersten, nicht-optimierten Umsetzungen konnte eine Steigerung auf  $60\%$  (*R*)-

Mandelsäure erreicht werden. Eine besondere Methode, die hier eingesetzt wurde, ist der Verzicht auf einen Filter für eine Zweikammernutzung zur Trennung der beiden Reaktionsmedien, wie es bei homogenen oder nicht kompatiblen Phasen üblich ist. Die sauerstoffempfindliche organische Toluolphase, die unter Argonschutz steht, wurde ohne Einsatz eines Filters mit der wässrigen sauerstoffangereicherten Enzymphase direkt in einem Zweiphasensystem kombiniert. Die Reaktion wurde durch ein technisches Begasungssystem mit Sauerstoff und Argon gesteuert und erfolgreich eingesetzt.

## 6 Literatur

- Adachi, O., Tayamae, K., Shinagawa, M., Matsushita, K., Ameyama, M. (1978), *Agric. Biol. Chem.*, 42(11), S. 2045-2056
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa E., Matsushita, K. (2003), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 6, S. 643-653
- Ameyama, M., Shinagawa E., Matsushita, K., Adachi, O. (1978), *Agric Biol Chem*, 42, S. 2045-2056
- Andersson, M., Holmberg, H., Adlercreutz, P. (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, S. 170-178
- Anelli, P. L., Biffi, C., Montanari, F., Quici, S. (1987), *J. Org. Chem.*, 52, S. 2559-2562
- Anthony, C., Zatman, L. J. (1967), *Biochem. J.*, 104, S. 960-969
- Anthony, C. (1998), *Progress in Biophysics, Molecular Biology*, 69, S. 1-21
- Anthony, C. (2001), *Biochemistry*, 40, S. 9799-9809
- Anthony, C., Zatman, L. J. (1964), *Biochem J.*, 92(3), S. 609-614
- Bäckvall, J. E. (1997), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, S. 1211-1212
- Bäckvall, J. E. (2003), *Journal of Organic Chemistry*, 68, S. 7681-7684
- Bäckvall, J. E. (2004), *Tetrahedrons Letters*, 45, S. 6799-6802
- Barbas, C. F. III. (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, S.2395-2396
- BCC Inc. (2012), PR, Newswire, New York, May 31, 2012
- Bommarius, A. S., Drauz, K., Hummel, W., Kula, M. R., Wandrey, C. (1994), *Biocatalysis*, 10, S. 31-47
- Byler, D. M., Susi, H. (1986), *Biopolymers*, 25, S. 469-487
- Camps, P., Pérez, F., Soldevilla, N., (1998), *Tetrahedron: Asymmetry, Volume 9*, 12, S. 2065-2079
- Carrera, A., Poverene, M., Rodriguez, R. H. (1996), *Helia*, 19, S. 19-28
- Casy, G., Lee, T. V., Lovell, H. (1992), *Tetrahedron Lett.*, 33, S. 817-819

- Chang, J.-W., Jang, D. P., Uang, B.-J., Liao, F.-L., Wang, S.-L. (1999), *Org. Lett.*, 1(13), S. 2061-2063
- Chattopadhyay, A., Foerster-Fromme, K., Jendrossek, D. (2010), *Journal of Basic Microbiology*, 50, S. 119-124
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J. (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, 104, S. 7294-7298
- Chen, Z.-W., Matsushita, K., Yamashita, T., Fujii, T., Toyama, H., Adachi, O., Bellamy, H. D., Scott Mathew, F. (2002), *Structure*, 10, S. 837-849
- Csjernyik, G., Bogar, K., Backvall, J. E. (2004), *Tetrahedron Lett.*, 45 (36), 6799-6802
- Day, D. J., Anthony, C. (1990), *Meth. Enzym.*, 188, S. 210-216
- De Jong, G. A. H., Geerlof, A., Stoorvogel, J., Jongejan, J. A., de Vries, S., Duine, J. A. (1995), *Eur. J. Biochem.*, 230, S. 899-905
- Degussa AG (2004): Patent (Patentnr. DE10353548A1 03.06.2004)
- Duine, J. A. (1991), *European Journal of Biochemistry*, 200, 2, S. 271-284
- Duine, J. A. (1992), *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, S. 220-223
- Duine, J. A., Frank, J., Westerling, J. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 524, S. 277-287
- Duine, J. A., Frank, J. (1980a), *Biochem. J.*, 187, S. 213-219
- Duine, J. A., Frank, J. (1980b), *Biochem. J.*, 187, S. 221-226
- Duine J. A., Frank J, Verwiel PE. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 108(1), S. 187-192
- Duine, J. A, Jongejan, J. A. (1989), *Annual review of biochemistry* 58, S. 403-426
- Duine, J. A., Frank, J., van Zeeland, J. K. (1979), *FEBS Lett.*, 108(2), S. 443-446
- Duine, J. A., Frank, J., Westerling, J. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 524, S. 277-287
- Effenberger, F., Null, V., Ziegler, T. (1992), *Tetrahedron Letters*, 33, S. 5157-5160
- Faber, K. (2000): *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4<sup>th</sup> edition, Springer Verlag, Heidelberg
- Fan, X., Matthey, M. (1999), *Biotechnology Letters*, 21, S. 1071-1076
- Fuganti, C., Rosell, C. M., Servi, S., Tagliani, A., Terreni, M. (1992), *Tetrahedron – Asymmetry*, 3, S. 383-386

- Geueke, B., Hummel, W. (2002), *Enzyme Microb. Technol.*, 31, S. 77-87
- Görisch, H., Rupp, M. (1989), *Antonie van Leeuwenhoek*, 56, S. 35-45
- Groen, B., Frank, J. Jr., Duine, J. A. (1984), *Biochem J.*, 223(3), S. 921-924
- Groen, B. W., van Kleef, M. A. G., Duine, J. A. (1986), *Biochem. J.*, 234, S. 611-615
- Gröger, H. (2001): *Advanced Synthesis and Catalysis 6+7* (Wiley-VCH), S. 547
- Gröger, H., Hummel, W., Borchert, S., Krauß, M. (2012), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Third Edition . Wiley-VCH Verlag GmbH
- Gvozdev, R., Tukhvatullin, I. A., Gvozdev, R. I. (2012), *Biochemistry (Moscow)*, 77, 8, S. 843-856
- Hanson, R. L., Bembenek, K. S., Patel, R. N., Szarka, L. J. (1992), *Appl Microbiol Biotechnol*, 37, S. 599-603
- Hanson, R. L., Howell, J. M., Laporte, T. L., Donovan, M. J., Cazzulino, D. L. (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, S. 348-358
- Hardy, G. P., Teixeira de Mattos, M. J., Neijssel, O. M. (1993), *FEMS Microbiol Lett.*, 107, S. 107-110
- Hauge, J. G. (1960), *Biochim Biophys Acta*, 45, S. 250-262
- Hauge, J. G. (1960), *Biochim Biophys Acta*, 45, S. 263-269
- Hauge, J. G. (1964), *J. Biol. Chem.*, 239, S. 3630-3639
- Hauge, J. G., Murer, E. H. Elsevier, ISSN 0926-6569, ZDB-ID 2209410-6 Vol. 8
- Holland, H. L. (1998), *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, S. 77-84
- Huerta, F. F., Minidis, A. B. E., Bäckvall, J. E. (2001), *Chem. Soc. Rev.*, 30, S. 321-333
- Huisman, G. W., Gray, D. (2002), *Current Opinion in Biotechnology*, 13, S. 352-359
- Hummel, W. (1997), *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 58, S. 146-184
- Hummel, W. (1997), *New Enzymes for Organic Synthesis*, S. 145-184
- Hummel, W., Gröger, H., Borchert, S., Krauß, M. (2009), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc.

- Hummel, W., Gröger, H., Weckbecker, A. (2010), *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 120, S. 195-242
- Hummel, W., Kula, M. R. (1989), *European Journal of Biochemistry*, 184(FEBS), S. 1-13
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M.-R. (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, S. 433-439
- Ishihara, K., Yamaguchi, H., Hamada, H., Nakajima, N., Nakamura, K. (2000), *J. Mol. Catal. B – Enzymatic*, 10, S. 429-434
- Itoh, S., Kawakami, H., Fukuzumi, S. (1998), *Biochemistry*, 37, S. 6562-6571
- Ivanova, E. V., Ershov, A. Y., Laurinavičius, V., Meskus, R., Ryabov, A. D. (2003) *Biochemistry (Moscow)*, 68, 4, S. 407-415. Übersetzt aus *Biokhimiya*, Vol. 68, No. 4, 2003, S. 504-513
- Ivanova, E. V., Ryabov, A. D. (2002), *Moscow University Chemistry Bulletin*, 43, 6, S. 424-426
- Jörnvall, H., Persson, B., Jeffery, J. (1987), *Eur. J. Biochem.*, 167, S. 195-201
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Yakushi, T., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K. (2010), *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, S. 741-751
- Kärkäs, D., Johnston, E. V., Karlsson, E. A., Lee, B.-L., Åkermark, T., Shariatgorji, M., Ilag, L., Hansson, Ö., Bäckvall, J. E., Åkermark, B. (2011), *Chem. Eur. J.*, 17, S. 7953-7959
- Kim, M.-J., Ahn, Y., Park, J. (2002), *Current Opinion in Biotechnology*, 13, S. 578-587
- Leonard G. Copping, *Society of Chemical Industry* (1990), *Opportunities in biotransformations*
- Lerch, H. P., Frank, R., Collins, J. (1989), *Gene*, 83(2), S. 263-270.
- Liese, A., Filho, M. V. (1999), *Current Opinion in Biotechnology*, 10, S. 595-603
- Manzuna Sapu, C., Bäckvall, J. E., Deska, J. (2011), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, S. 9731-9734
- Matcham, G., Bowen, A., Lee, S., Pienkos, P., Zeitlin, A. (1994), *Proceedings of Chiral'94 USA Symposium*, Spring Innovations Ltd. 1994, S. 55.
- Matsushita, K., Ameyama, M. (1982), *Methods Enzymol*, 89, S. 149-154.
- Matsushita, K., Ohno, Y., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M. (1980), *Agric. Biol. Chem.*, 44, S. 1505-1512

- Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1994), *Adv. Microb. Physiol.*, 36, S. 247301
- Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O. (2002), *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, S. 13-22
- McIntire, W. S. (1994), *FASEB J. May*, 8(8), S. 513-21
- Miller, S. J. (2000), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, S. 3635-3638
- Monti, D., Riva, S. (2001), *Biocatalysis and Biotransformation*, 19, S. 251-266
- Moorlag, H., Kellogg, R. M. (1991), *Tetrahedron – Asymmetry*, 2, S. 705-720
- Mutzel, A., Goerisch, H. (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, S. 1721-1726
- Naoshima, Y., Akakabe, Y., Takahashi, M., Saika, T., Kamezawa, M., Tachibana, H., Ohtani, T. (1998), *Recent Res. Dev. Phytochem.*, 2, S. 11
- Nicholls, A., Sharp, K., Honig, B. (1991), *Proteins*, 11, S. 281-296
- Niedermeyer, U., Kula, M. R. (1990), *Angewandte Chemie – International Edition in English*, 29, 386-387
- NIST Chemistry WebBook
- Nüsken, F. (2002), *Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau*
- O'Brien, M., Vanasse, B. (2000), *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 3, S. 793
- Ogawa, J., Shimizu, S. (1999), *Trends in Biotechnology*, 17, S. 13-20
- Rasor, J. P., Voss, E. (2001), *Applied Catalysis A: General*, 221, S. 145-158
- Reid, M. F., Fewson, C. A. (1994), *Crit. Rev. Microbiol.*, 20, S. 13-56
- Ress-Loeschke, M., Friedrich, T., Hauer, B., Mattes, R., (2000), *BASF*.
- Römpf Lexikon, 1990
- Rouhi, A. M. (2004), *Chemical & Engineering News*, 82, S. 47
- Rupp, M., Görisch, H. (1988), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, S. 431-439
- Saichana, I., Moonmangmee, D., Adachi, O., Matsushita, K., Toyama, H. (2009), *Applied and Environmental Microbiology*, July 2009, S. 4240-4247

- Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., Kennard, O. (1979), *Nature (London)*, 280, S. 843-844
- Sancar, A., Sancar, G. B. (1988), *Ann. Rev. Biochem.*, 57, S. 29-67
- Schrover, M. J., Frank, J., van Wielink, J. E., Duine, J. A. (1993), *Biochem. J.*, 290, S. 123-127
- Sheldon R. A. (1993): *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds.*, Marcel Dekker, New York, 1993
- Shimao, M., Yamamoto, H., Ninomiya, K., Kato, N., Adachi, O., Ameyama, M., Sakazawa, C. (1984), *Agric. Biol. Chem.* 48, S. 2873-2876
- Sridhara, S., Wu, T. T., Chused, T. M., Lin, E. C. C. (1969), *J. Bact.*, 98, S. 87-95
- Steele, B. D., Fiske, M. J., Steele, B. P., Kelley, V. C. (1992), *Enzyme and Microbiological Technology*, 14, S. 358-360
- Stuart, B. (1997): *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John Wiley & Sons
- Strauss, U. T., Faber, K. (1999), *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, S. 4079-4081
- Sun, H. W., Plapp, B. V. (1992), *J. Mol. Evol.*, 34, S. 522-525
- Takahashi, E., Furui, M., Seko, H., Shibatani, T. (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, S. 173-179
- Taylor, S. C. (1997), *J. Bacteriol.*, 174, S. 2612-2619
- Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M., Adachi, O. (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 2442-2450
- Van Almsick, A., Buddrus, J., Honickeschmidt, P., Laumen, K., Schneider, M. P. (1989), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, S. 1391-1393
- Van den Tweel, W. J. J., de Bont, J. A. M. (1985), *J Gen Microbiol*, 131, S. 3155-3162
- Van Ophem, P. W., van Beeumen, J., Duine, J. A. (1992), *European Journal of Biochemistry*, 206, 2, S. 511-518
- Van Schie, B. J., van Dijken, J. P., Kuenen, J. G. (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 24, S. 133-138

- Vasic-Racki, D., Jonas, M., Wandrey, C., Hummel, W., Kula, M.-R. (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, S. 215-222
- Vellieux, F. M., Frank, J., Swarte, M. B., Groendijk, H., Duine, J. A., Drenth, J., Hol, W. G. (1986), *Eur. J. Biochem.*, 15, 154(2), S. 383-386
- Wang, M.-X., Lu, G., Ji, G.-J., Huang, Z. T., Meth-Cohn, O., Colby, J. (2000), *Tetrahedron Asymm.*, 11, S. 1123-1135
- Warner, C., Casey, C. P., Bäckvall, J. E. (2011), *Top Organomet Chem*, 37, S. 85-125
- Wei, L., Yang, X., Gao, K., Lin, J., Yang, S., Hua, Q., Wei, D. (2010), *Mol Biotechnol*, 46, S. 26-33
- Westerling, J., Frank, J., Duine, J. A. (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87, S. 719-724
- Wills, M., Hannedouche, J. (2002), *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 5, S. 881
- Wong, C. H., Chen, S. T., Hennen, W. J., Bibbs, J. A., Wang, Y. F., Liu, J. L. C., Pantoliano, M. W., Whitlow, M., Bryan, P. N. (1990), *Journal of the American Chemical Society*, 112, S. 945-953
- Yakushi, T., Matsushita, K. (2010), *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, S. 1257-1265
- Yamada, Y., Hayashi, T., Sakuraba, H., Yabutani, T., Takayanagi, T. (2013), *the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 29, S. 79-83
- Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, I. (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, S. 3028
- Zaks, A. (2001), *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, S. 130-136
- Zarnt, G., Schröder, T., Andreesen, J. R. (2001), *J. Bacteriol.*, 183, S. 1954-1960
- Zou, W., Ibrahim, I., Dziedzic, P., Sundén, H., Córdova, A. (2005), *Chem. Commun.*, S. 4946-4948

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die mich immer unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich

- Herrn Prof. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen konstruktiven Anregungen sowie die Betreuung. Ich bedanke mich bei Prof. Hummel auch für die kritische Korrektur und Prüfung der Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die freundliche Übernahme des Korreferats.
- Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula und Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Möglichkeit, an ihrem Institut unter hervorragenden Bedingungen diese Arbeit durchführen zu können.
- Herrn Prof. Dr. J. E. Bäckvall für sein Interesse an meiner Idee und die 3-monatige Aufnahme und Finanzierung des Ruthenium-Projekts in seinem Forschungsteam an der Universität Stockholm (Arrhenius Laboratory, Department of Organic Chemistry).
- Herrn Prof. Dr. Gais von der RWTH Aachen für die stete Diskussionsbereitschaft, sein Interesse an der Arbeit und Bereitstellung von verschiedenen Ketalen aus seiner Forschungsgruppe.
- Frau Vera Ophoven für die technische Unterstützung und die vielen guten Ratschläge.
- Herrn Arsia Ohadi für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.
- Allen, auch ehemaligen Mitarbeitern des IMET für die gute Zusammenarbeit und die schönen Zeiten im Büro und Labor auch zu den späten Stunden.
- Meiner Frau, die mich immer und zur jeder Situation unterstützt hat und die an die Beendigung meiner Arbeit geglaubt hat
- Meinen Eltern, dass sie mir meine Ausbildung in diesem Rahmen ermöglicht haben.