

Screening nach einer enantioselektiven N-Acylase

verfaßt von

Andreas Paris

Kegelgasse 32, 1030 Wien

eingereicht in Zürich

am 31. Oktober 2005

am **Departement für Maschinenbau und Verfahrenstechnik**
der **Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich**
Heimatuniversität: Technische Universität Wien
zur Erlangung des akademischen Grades eines Diplomingenieurs.

Betreut durch: **Univ. Prof. Dr. Sven Panke, ETH Zürich**

Univ. Prof. Dr. Oreste Ghisalba, Novartis

Univ. Prof. Dr. Robert Mach, TU Wien

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Dr. Laumen in der Zeit von September 2004 bis Juni 2005 im Labor für Enzyme-Assisted Organic Synthesis der Firma Novartis in Basel durchgeführt.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Oreste Ghisalba, der mir die Möglichkeit, unter optimalen Bedingungen zu arbeiten, gegeben hat. Weiters danke ich Prof. Ghisalba und Dr. Laumen für die interessante Themenstellung, die mir einen tiefen Einblick in das Gebiet der biologischen Chemie und der Biokatalyse ermöglichte. Ebenso danke ich für deren Betreuung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Sven Panke, der die Kooperation zwischen der ETH Zürich und der Fa. Novartis erst ermöglichte, und dessen ermunternde Ratschläge mich bis zum Ende dieser Arbeit motivierten.

Weiters geht mein Dank an meinen Diplombetreuer, Herrn Prof. Robert Mach, der die Anerkennung und Benotung der Arbeit an der TU Wien durchführte.

Mein Weiterer Dank gilt:

Dr. M. Kittelmann, der besonders meine biologischen Fragen in ausführlichen Gesprächen beantwortete und mir wichtige Inputs zu dieser Arbeit weitergab.

- meinen Kollegen: A. Kuhn, L. Dias, D. Janus, A.Vargas, M.Ketterer, A. Riepp.
- M. Kessler und J. Kühnöl für Ihre chiralen HPLC-UV und LC-MS Analysen.
- dem Labor Dr. Strauss und E. Weber, bei denen ich die Tätigkeiten durchführen konnte, für die mein Labor nicht ausgerüstet war.
- den Kollegen und Freunden, die mit Ihrem Wissen und Ihrer Erfahrung in vielen Gesprächen neue Ideen und wissenschaftliche Inputs brachten.
- den Kollegen der ETH Zürich, besonders M. Held, der mir seine Erfahrung im Umgang mit den Screeningsystem „Duetz“ für Mikrotiterplatten weitergab.

Besonderer Dank an Sibylle Schweiker für alle Tips und Korrekturen, u.v.a.m. .

Schließlich noch vielen Dank an alle Freunde, die immer an mich glaubten und mich unterstützen.

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

1. Abkürzungen	4
2. Zusammenfassung	6
3. Einleitung	7
3.1. Acylasen	8
3.2. Aminosäuren	9
3.3. Enzymscreening und Produktionsoptimierung	12
3.4. α -Aminosäuren	12
3.4.1. Kinetische Trennung von Racematen	13
3.4.2. Enantioselektive Einführung von α -Wasserstoff	14
3.4.3. Enantioselektive Einführung der α -Aminofunktion	14
3.4.4. Asymmetrische Synthesen	14
3.4.5. Biokatalytische Verfahren	14
3.5. β -Aminosäuren	16
3.5.1. Einleitung	16
3.5.2. Gewinnung von β -Aminosäuren in enantiomerenreiner Form	18
3.5.3. Racematspaltungen	19
3.5.4. <i>Chiral pool</i> Synthesen	19
3.5.5. Asymmetrische Synthesen	20
3.5.5.1. Reduktion α,β -ungesättigter Ester oder Nitrile	20
3.5.5.2. Asymmetrische Aminohydroxylierung	20
3.5.5.3. Stereoselektive Alkylierung	20
3.5.5.4. <i>Curtius</i> Umlagerung	20
3.5.5.5. <i>Mannich</i> -artige Reaktion von Iminen	20
3.5.5.6. Konjugierte Addition	21
3.5.5.7. Katalytische Verfahren	21
3.5.5.8. Ringöffnung von β -Lactamen	21
3.6. Enantiomerenreine β -Aminosäuren durch Biokatalyse	22
3.6.1. α -substituierte- β -Aminosäuren	22
3.6.2. α,β -disubstituierte- β -Aminosäuren	22
3.6.3. α -Hydroxy- β -Aminosäuren	22
3.6.4. β -substituierte- β -Aminosäuren	23

4. Zielsetzung	24
5. Materialien und Methoden	25
5.1. Herkunft der Chemikalien	25
5.2. Herkunft der Stammkulturen	25
5.3. Analytik	25
5.3.1. Dünnschichtchromatographie	25
5.3.2. High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	26
5.3.2.1. HPLC Gradientenentwicklung	26
5.3.2.2. Chirale HPLC Analysen	27
5.3.2.3. Berechnung der Konzentrationen	28
5.3.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	28
5.3.4. Säulenchromatographie	28
5.3.5. Messung des Bakterienwachstums	28
5.3.6. Enzymaktivitätsbestimmung	29
5.4. Mikrobiologische Verfahren	30
5.4.1. Medien	30
5.4.1.1. Standardlösungen	30
5.4.1.2. Stammlösungen	31
5.4.1.3. Spezielle Medien	32
5.4.2. Screening	35
5.4.2.1. Agarplattenkulturen	35
5.4.2.2. Flüssigmedienkulturen	35
5.4.2.3. Reaktionsverlauf mit <i>Rhodococcus globerulus</i> (K1/1)	37
5.4.2.4. Schüttelkolbenscreening	37
5.4.2.5. Literansätze in Schüttelkolben	37
5.4.2.6. Reaktionsverlauf in Schüttelkolben	37
5.4.2.7. Zellproduktion in Schüttelkolben	38
5.4.2.8. Reaktionsumsatz in Schüttelkolben in pH 7 Puffer	39
5.4.2.9. Chirale Analyse der Substrate	39
5.4.2.10. Gradientenagarplatten	39
5.4.2.11. Lichtmikroskopie	40

6.Resultate	41
6.1. Organische Synthese	41
6.1.1. 3-Amino-3-phenylpropionsäure 1	43
6.1.2. 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäure 4	44
6.1.3. 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester 5	44
6.1.4. Säulenchromatographie von N-Ac-Methylester 5	45
6.1.5. Synthese von Aminester und Hydrochlorid 2 und 3	46
6.1.6. Synthese der N-Propionyl-Substanzen 6 und 7	46
6.1.7. Synthese von N-Acetyl-Phenylethylamin 15	46
6.1.8. HPLC Retentionszeiten	47
6.2. Mikrobiologische Verfahren	48
6.2.1. Screening in den 96-Lochplatten	48
6.2.2. Reaktionsverlauf mit <i>Rhodococcus globerulus</i> (K1/1)	49
6.2.3. Reduktion von 147 auf 9 Stämme	49
6.2.3.1. Erstes Schüttelkolben Screening	51
6.2.3.2. Enzymaktivitätstests	52
6.2.3.3. Induktions- und Eduktspezifitätstests	55
6.2.3.4. Zweiter Screeningansatz	58
6.2.3.5. Zusammenführung beider Ansätze	58
6.2.4. Reaktionsverlauf der 9 Stämme in min. Medium	59
6.2.5. Zellernte bei höchster Aktivität in min. Medium	63
6.2.6. Reaktionsumsatz in pH 7 Phosphatpuffer	64
6.2.7. Chirale Analyse der Substrate	65
6.2.8. Konservierung der Stämme	68
6.2.9. Ergänzende Tests	69
6.2.9.1. Gradientenagarplattentests	69
6.2.9.2. Lichtmikroskopie	70
6.2.9.3. Enzymaktivitätstests	72
6.2.9.4. Test des Substratspektrums	74
7. Diskussion	76
8. Ausblick	78
9. Literaturverzeichnis	79

1. Abkürzungen:

Ac	Acetyl
AS	Aminosäure(n)
bidest. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CAL-A, (-B)	<i>Candida antarctica</i> Lipase-A, (-B)
CIP Nomenklatur	Cahn Ingold Prelog Nomenklatur
cm	Zentimeter
CPS	Cer(IV)-Phospho-Ammoniummolybdatreagens in H ₂ SO ₄
D-	Dexter (Rechts, nach Fischer)
DC	Dünnschichtchromatographie
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	enantiomeric excess (enantiomerer Überschuß)
Et	Ethyl
Fa.	Firma
F-Moc	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl
g	Erdbeschleunigung
g/l	Konzentration in Gramm/Liter
°C	Grad Celsius
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IU	International Unit
L-	Laevus- (Links, nach Fischer)
L.	Liter
Lsm	Lösungsmittel
log.	logarithmisch
Lsg. oder -lsg.	Lösung
mbar	Millibar
Me	Methyl
min	Minute
min. (Medium)	mineralisches (Medium)

ml	Milliliter
mM, mmolar	millimolar
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	normal
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N/m	Anzahl N theoretischer Böden pro m Chromatographiesäule
OD (OD ₆₆₀)	optische Dichte (bei 660 nm)
org.	organisch
P(G)A	Penicillin-(G)-Acylase
PEA	Phenyl-Ethyl-Amin
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
R-	Rectus (Rechts, nach CIP Nomenklatur)
rac	racemisch
RT	Raumtemperatur
S-	Sinister (nach CIP Nomenklatur)
SN ₂	nukleophile Substitution 2
<i>sp.</i>	<i>species</i>
t-Boc	tertiär-Butoxycarbonyl
TFE	Trifluorethanol
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamin
Vol.	Volumen
(v/v)	Verhältnis (Volumen/Volumen)
(w/v)	Verhältnis (Gewicht/Volumen)

2. Zusammenfassung

Es wurde ein Enzymscreening nach einer enantioselektiven N-Acylase mit einer schon auf Acylaseaktivität getesteten „in house“ Bakterienstammkultursammlung durchgeführt. Die Substanzklasse, auf die untersucht wurde, war N-Acetyl-(Ac)- β -Aminosäure-(AS)-Ester, im konkreten Fall war es der N-Acetyl-3-amino-3-phenylpropionsäuremethylester. Man arbeitete mit der racemischen Mischung.

Der N-Ac- β -AS-Ester wurde in drei Stufen synthetisiert, die erste Stufe aus den Grundsubstanzen Benzaldehyd, Malonsäure und Ammoniumacetat gebildet [1].

Ziel war es, eine Acylase zu finden, welche die Acetylschutzgruppe am Stickstoff enantioselektiv abspaltet. Dies wäre die einfachste und für eine zukünftige Produktion günstigste Variante, diesen β -AS-Ester enantiomerenrein herzustellen.

In dieser Arbeit sollte anstatt eines klassischen Systems mit Agarplatten und Schüttelkolben ein „medium throughput Screening“ [2,3] mit 96-Lochplatten getestet und nach positivem Verlauf die Platten als Kryostammkulturen angelegt werden, um ein schnelleres Screeningsystem für zukünftige Tests zur Verfügung zu haben. Auf Grund nicht aussagekräftiger Ergebnisse wurde auf das klassische Screeningsystem gewechselt (Details siehe Seite 48). Die Reinisolate wurden auf Agarplatten ausgestrichen, danach Flüssigmedien mit je einer Kolonie angeimpft. Die unselektiven Medien enthielten einen Kohlenstoff-(C)-Quellenmix, dem in geringen Mengen entweder N-Ac-Phenylethylamin-(PEA) oder N-Ac- β -AS-Ester als Induktor zugesetzt wurde.

Der letzte Schritt war die enzymatische Umsetzung von 18 mM (4g/l) N-Acetyl-AS-Ester in pH 7 Phosphatpuffer mit Hilfe der gewonnenen Zellen. Hier ließ man so lange reagieren, bis ca. die Hälfte des Eduktes umgesetzt war. Danach wurde der Aminester entweder direkt zum N-Propionyl-AS-Ester oder zuerst das nicht umgesetzte Edukt mit Methylenchlorid extrahiert und sodann das zurückgebliebene Produkt zum N-Acetyl-AS-Ester umgesetzt. Auf diese Weise wurden Edukt und Produkt mittels chiraler HPLC auf ihre Zusammensetzung untersucht.

Vier Stämme mit einem enantiomeren Überschuss (ee) bis 98% wurden bei ca. 35 bis 50% Umsatz ermittelt. Ebenfalls wurde mit weiteren β -AS-Estern das Substratspektrum der Acylasen getestet.

3. Einleitung

Die Suche nach chemischen Strukturen, die bestimmte biochemische Wirkungen hervorrufen oder unterdrücken können, ist eines der wichtigsten Arbeitsgebiete der pharmazeutischen Forschung. Besonderes Interesse gilt dabei der Entdeckung neuer Leitstrukturen, d.h. typischen Anordnungen von funktionellen Gruppen und Substrukturen, die zur Wechselwirkung mit einem bestimmten Rezeptor fähig sein sollten.

Sowohl der biochemischen wie der organischen Synthesechemie kommt hierbei die entscheidende Aufgabe zu, einen möglichst effizienten Zugang zu einer Vielzahl von Derivaten der Leitstruktur zu schaffen. Durch Fortschritte sowohl bei der Synthese als auch bei der Analyse konnten diese Strukturen optimiert werden. Ich möchte ebenso auf den verstärkten Einsatz von Computermodellen zur Darstellung möglicher dreidimensionaler Strukturen hinweisen. In Hinblick auf die Eigenschaften, Synthese- und Screeningmethoden von AS beziehe ich mich hauptsächlich auf die nachfolgend angegebenen Arbeiten [4-10].

Die Möglichkeiten, durch Kombination von kombinatorischer Chemie und moderner Testverfahren, z.B. immobilisierte Enzyme auf Mikrochips [22], wie durch elektronische Steuerung und Datenverarbeitung eine große Anzahl von chemischen Verbindungen zu testen, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Es wurden hochautomatisierte Techniken entwickelt, wobei bekannte Enzyme in 96-, 256- oder 1024-Lochplatten mit neuen Testsubstanzen auf ihre Aktivität und ihr Substratspektrum analysiert werden. Innerhalb weniger Monate können mit Hilfe obiger Methoden Wirkstoffbibliotheken mit bis zu einer Million Substanzen hergestellt und bezüglich ihrer Bindung an ein entsprechendes Zielmolekül untersucht werden [22,23].

Das kombinatorische Wirkstoffdesign wird durch rationales Design unterstützt, bei dem versucht wird die essentiellen Parameter zu erfassen, welche für die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung von Rezeptor und Wirkstoff verantwortlich sind. Dabei kann bei Kenntnis der Struktur des biologischen Zielmoleküls mit Hilfe von Computerprogrammen abgeschätzt werden, wie stark die Bindung der untersuchten Verbindung an das Zielmolekül ist. Die Optimierung der Leitstruktur ist ein sehr aufwendiger und teurer Prozeß. Neue Entwicklungen, wie das Vorscreenen großer, per Computer generierter Verbindungsbibliotheken

(„in silico-screening“ oder „virtual screening“), unterstützen die Wirkstoffentwicklung im Labor [24-26]. Es werden virtuelle Verbindungsbibliotheken generiert und mit Hilfe von Computerprogrammen bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum eines Zielproteins getestet. Dessen Struktur muß dafür allerdings bekannt sein. Die besten Verbindungen werden synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Ziel der Leitstrukturoptimierung ist es, in möglichst wenigen iterativen Schritten einen geeigneten Wirkstoff zu erhalten.

Sind die Zielmoleküle chiral, müssen sie in enantiomeren- bzw. diastereomerenreiner Form hergestellt werden, da meist nur ein Isomer das Aktive ist. Das oder die übrigen Isomere können im besten Fall keine oder aber eine toxische Wirkung hervorrufen (Thalidomid[®]) [86]. Dadurch hat die asymmetrische Synthese einen starken Impuls erfahren. So stellt die pharmazeutische Wirkstoffforschung der organischen Chemie immer neue Herausforderungen, die zur Entwicklung neuer Synthesemethoden führen. β -AS sind beispielhaft hierfür: Sie sind in einer Reihe biologisch interessanter Naturstoffe als Teilstruktur enthalten [11,12].

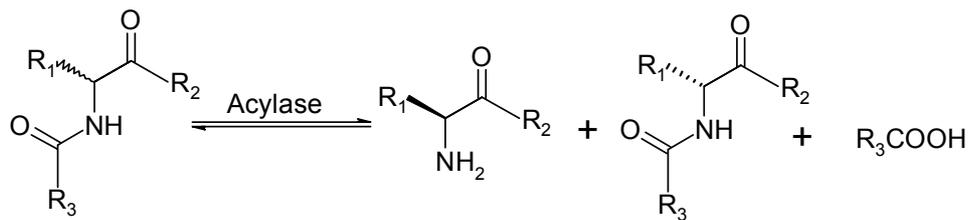
In biologisch aktiven Peptiden ist der Ersatz von α - durch β -AS eine vielversprechende Strategie zur Steigerung deren enzymatischer Stabilität, wodurch sich die Rückhaltungsdauer des Pharmakons im Körper erhöhen sollte [11-13]. Dieses pharmazeutisch begründete Interesse an β -AS-Derivaten stellt Syntheschemiker vor die Herausforderung, möglichst effiziente und vielseitige Methoden zur stereoselektiven Synthese von beliebig substituierten β -AS zu entwickeln und das Potential von diesen β -AS [4,14-17] als Synthesebausteine für Naturstoffe, β -Peptide und β -Lactame [18-20] auszuschöpfen. Abhandlungen zu diesem Thema sind Ende der 1980er, vor allem seit den 1990er Jahren erschienen [14].

Hierzu sollte in dieser Arbeit ein neuer biokatalytischer Ansatz erprobt werden.

3.1. Acylasen (Enzymklasse E.3.5.)

Acylasen gehören zu der Familie der Hydrolasen. N-Acylasen katalysieren die Hydrolyse von N-acylierten Aminen zu freien Aminen [10]. In unserem Fall sind die verwendeten Ausgangssubstanzen Derivate von AS (siehe Schema 1).

Schema 1 Acylasekatalysierte hydrolytische Racematspaltung



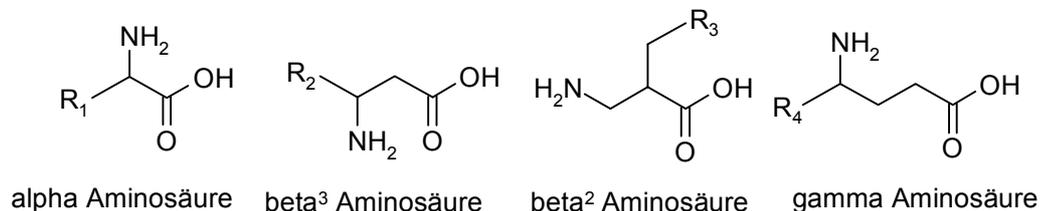
R₁ = Rest der Aminosäure, R₂, R₃ = Schutzgruppen meist Methyl (Me.), Ethyl (Et.), Amin (NH₂), Phenyle oder substituierte Phenyle

In diesem System werden die Acylasen eingesetzt, um enantiomerenreine AS zu erhalten. Wichtige Beispiele sind die Penicillin G Acylase aus *Escherichia coli* (*E. coli*), die den Phenylacetylrest enantioselektiv abspaltet, Hydantoinase aus *Agrobacterium radiobacter* und *Pseudomonas putida* (siehe Punkt 3.4.5.), die racemisches Hydantoin in D- oder L-N-Carbamoyl-Aminosäuren umwandeln und weitere Acylasen aus *Aspergillus*, *Penicillium* und aus oben genannten Isolaten.

3.2. Aminosäuren

Aminosäuren sind Carbonsäuren mit einer Aminofunktion und damit bifunktionelle, teilweise kristalline Verbindungen. Die Nomenklatur unterscheidet in α -, β -, γ - bis ω -AS (Schema 2). Dabei ist das zur Carboxygruppe benachbarte C-Atom das α -C-Atom, das darauffolgende ein β -C Atom und so fort.

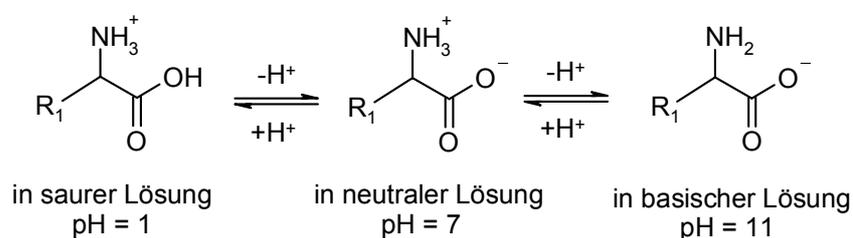
Schema 2 Definition der Nomenklatur



Mit Ausnahme von Glycin besitzen alle α -AS ein chirales Zentrum am α -C-Atom, viele β - bis ω -AS verfügen über ein oder mehrere chirale Zentren. Es gibt bei Molekülen mit einem chiralen Zentrum zwei enantiomere Formen, bei mehreren chiralen Zentren (n) pro Molekül gibt es (n^2) stereoisomere Formen (Definition und Beispiel siehe folgende Seiten).

Aminosäuren haben sowohl basischen als auch sauren Charakter, zeigen daher amphoterer Verhalten und bilden Zwitterionen aus. Daher können sie ein inneres Salz bilden: eine Betainstruktur. Da in neutraler Lösung das Gleichgewicht zwischen ungeladener und geladener Form auf Seiten des Zwitterions liegt, ergeben sich daraus ihre physikalischen Eigenschaften. AS sind teils gut (Cys, Lys, Pro), teils kaum (Asp, Glu, Tyr) wasserlöslich, schwer löslich in organischen Lösungsmitteln (Lsm), kristallisierbar und hochschmelzend. Hingegen sind alle proteinogenen AS besser in Eisessig als in Wasser löslich. Die Eigenschaften der AS bei verschiedenen pH Werten werden in Schema 3 dargestellt.

Schema 3 Eigenschaften der AS bei unterschiedlichen pH Werten



Man kann AS in die 20 proteinogenen, welche die Grundbausteine der Proteine bilden, und in die nicht-proteinogenen einteilen [27-29]. Die proteinogenen AS sind chiral und besitzen die relative L-Konfiguration nach *Fischer*, welche bis auf L-Cystein der absoluten (S)-Konfiguration nach der *Cahn-Ingold-Prelog*-(CIP)-Nomenklatur entspricht. AS können racemisieren, wobei die Racemisierungsgeschwindigkeit von der Temperatur, dem pH Wert und anderen Faktoren abhängt.

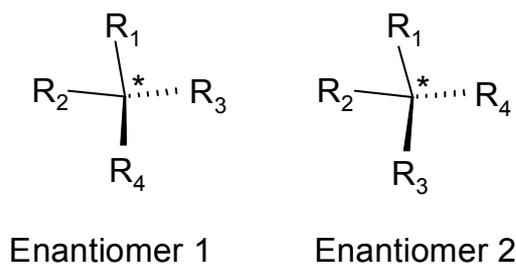
Alle anderen AS werden als nicht-proteinogene, auch als seltene oder unübliche Aminosäuren bezeichnet. Darunter fallen D-Formen der proteinogenen AS sowie alle β - bis ω -AS. Diese Gruppe von Aminosäuren wurde in den letzten Jahren ein wichtiges Forschungsgebiet, da viele dieser AS als Anteile von Antibiotika, Toxinen, Aminosäure-Antagonisten und weiteren Naturstoffen in natürlich vorkommenden Organismen entdeckt und zur Synthese von Wirkstoffen, Peptidanaloga, Pflanzenschutzmittel und anderem verwendet wurden.

Definition von Enantiomeren:

Enantiomere sind chemische Isomere, die sich nicht in der Konstitution, sondern in der Konfiguration unterscheiden. Sie sind Stereoisomere. Zwei Enantiomere unterscheiden sich dadurch, daß sich ihre räumlichen Strukturen wie Bild und

Spiegelbild verhalten (Schema 4). Deshalb werden sie auch Spiegelbildisomere genannt. Sie können nicht durch Drehung zur Deckung gebracht werden. Die Ursache der zentralen Chiralität sind asymmetrische C-Atome. Enantiomere unterscheiden sich durch ihre optische und biologische Aktivität. Bei ersterer drehen sie die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht nach links oder rechts. Man bezeichnet sie dann als linksdrehend oder rechtsdrehend.

Schema 4 Enantiomere

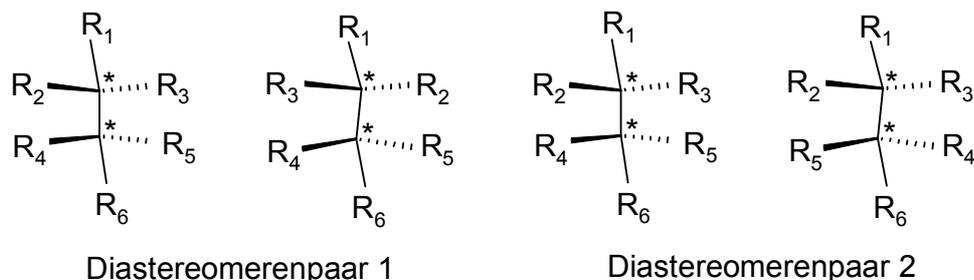


es muß gelten: $R_1 \neq R_2 \neq R_3 \neq R_4$, * = asymmetrisches C Atom

Definition von Diastereomeren:

Diastereomere sind stereoisomere Moleküle, welche zwar die gleiche Summenformel und Konstitution aufweisen, sich aber in der räumlichen Anordnung der Atome voneinander unterscheiden (Chiralität) und keine Enantiomere sind. Daher müssen mindestens zwei Chiralitätszentren vorhanden sein. An solchen Chiralitätszentren sind, bedingt durch die tetraedrische Struktur der C-Atome, mehrere nicht zur Deckung zu bringende Konfigurationen möglich. Diastereomere haben in der Regel unterschiedliche physikalische Eigenschaften (z.B. Schmelzpunkt, Löslichkeit). Sie bilden Diastereomerenpaare (siehe Schema 5).

Schema 5 Diastereomere



hier muß gelten: $R_1 \neq R_2 \neq R_4 \neq R_6$, oder $R_1 \neq R_3 \neq R_5 \neq R_6$

* = asymmetrisches C Atom

3.3. Enzymscreening und Produktionsoptimierung

Um den Anforderungen nach neuen enzymkatalysierten Prozessen gerecht zu werden, ist die Suche (das Screening) nach neuen Enzymen mit verschiedenen Varianten ein wichtiger Teil der aktuellen Forschung. Neben der, in dieser Arbeit verwendeten klassischen Methode, bei der üblicherweise mit ganzen Zellen in Flüssigmedien und Schüttelkolben gearbeitet wird, gibt es neuere Testverfahren. Dabei werden sogenannte „medium-“ oder „high-throughput“ Screenings in 24-, 96- oder 256-Lochplatten und erheblich kleineren Volumina durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit zu screenen wurde durch die Entwicklung des Klonierens ermöglicht. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, daß man dadurch einen Großteil der bekannten Mikroorganismen, von denen derzeit nur ca. 1% [21] kultivierbar ist und deren Eigenschaften daher ungenutzt bleiben müßten, doch verwenden kann. Es werden dabei DNA-Abschnitte von aktiven Mikroorganismen in Produktionsstämme übertragen. Durch die Expression der Gene in den Wirtszellen können die neuen Eigenschaften der rekombinanten Zellen untersucht und die Produktion der gewünschten Substanzen unter definierten Bedingungen optimiert werden. Als Mikroorganismus der Wahl für das Klonieren von DNA-Stücken in bekannte Produktionsstämme sei hier besonders *E. coli* genannt. Dieses Bakterium ist durchsequenziert und seine Eigenschaften sind nach langjährigem Einsatz in der Forschung hinreichend bekannt.

Neben diesen Methoden, die Biodiversität von Expressionsbibliotheken zu testen und auszunützen, muß auch an der Optimierung der Produktionsbedingungen gearbeitet werden, z.B. Verwendung nicht, bzw. metabolisierender ganzer Zellen oder nur der Enzyme. Weitere zu beachtende Faktoren sind Temperatur, Immobilisierung, Sauerstoffgehalt, Produktinhibierung und Schaumbildung. Optimierung der Medien in Hinblick auf pH Wert, C-, N-Quelle und weitere sind entscheidende Probleme, die vor einer industriellen Anwendung zu klären sind.

3.4. α -Aminosäuren

α -Aminosäuren erfüllen viele und wichtige biologische Aufgaben [5,28]. Die Anzahl von bekannten natürlich vorkommenden nicht-proteinogenen AS ist bis 1987 auf

über 700 angestiegen [5]. Die Hauptaufgaben der AS sind ihre Beteiligung an Proteinen, Peptiden und Peptidoglykanen der Zellwände. Ebenso haben z.B. Glycin und Glutamat Funktionen in der neuronalen Signaltransduktion.

Hauptsächlich Mikroorganismen und Pflanzen produzieren nicht-proteino-gene Aminosäuren als Teilstrukturen großer Moleküle, die meist zur Abwehr feindlicher Organismen, durch Eingriff in deren biochemische Abläufe, dienen. Häufig, in hoher Analogie zu diesen Strukturen, werden künstliche AS für pharmazeutische Anwendungen oder den Pflanzenschutz synthetisiert.

Zur Synthese von α -AS in enantiomerenreiner Form gibt es allgemeine Übersichtsartikel [30-36] ebenso über industrielle Aspekte der Synthesen [37-41]. Erwähnt werden muß, daß besonders für empfindliche Aminosäuren, z.B. β,γ -ungesättigte AS, die Abtrennung der Schutzgruppe und die letzte Aufreinigung die Hauptprobleme darstellen. Proteinogene L-AS können im industriellen Maßstab durch biotechnologische Methoden gewonnen werden [37-41]. Es werden auch Aminosäuren durch Extraktion aus pflanzlichen oder tierischen Abfällen gewonnen, darauf wird hier aber nicht näher eingegangen.

Die wichtigsten Synthesemethoden werden nun im Überblick angeführt.

3.4.1. Kinetische Trennung von Racematen

Die kinetische Auftrennung eines Racemats nützt die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomere mit einem chiralen Reagens aus. Als chirale Reagenzien werden z.B. Tartrate [42,43], Hydrierungskatalysatoren oder hydrolytische Enzyme eingesetzt [6 und Zitate darin]. Im Idealfall hört die Reaktion bei 50% Umsatz auf.

Die optischen Reinheiten von umgesetztem Produkt und nicht umgesetztem Edukt hängen von der Verschiedenheit der Geschwindigkeitsraten ab. Wenn eine Racemisierung des Ausgangsmaterials möglich ist, kann 100% Ausbeute erzielt werden. Verwendete Enzyme sind Aminopeptidasen und Nitrilasen zur Hydrolyse von AS Amidien und AS Nitrilen respektive oder Lipasen und Proteasen zur Hydrolyse der Estergruppe sowie Acylasen zur Spaltung der N-Acyl Gruppen [6 und Zitate darin].

3.4.2. Enantioselektive Einführung von α -Wasserstoff

Die vier Mechanismen der enantioselektiven Einführung von Wasserstoff sind die asymmetrische Hydrierung von α,β -Didehydro- α -Aminosäuren, die Hydrolyse von α -Amino-Ketenen, die asymmetrische Protonierung von Enolaten und die reduktive Aminierung von α -Keto-Säuren [6].

3.4.3. Enantioselektive Einführung der α -Aminofunktion

Nukleophile und elektrophile Aminierung sind die angewandten Reaktionsmechanismen zur Einführung der Aminofunktion. Erstere basiert meist auf einer S_N2 Substitution, weshalb die Chiralität schon vor der Aminierung in dem umzusetzenden Edukt vorhanden sein muß. Chirale Epoxide, Brom-Glycinsäure und α -Hydroxy-Carboxylate (als Alkohole oder als Tosylate) sind einige dieser chiralen Edukte. Enolate werden mit elektrophiler Aminierung zu α -AS umgesetzt [6].

3.4.4. Asymmetrische Synthesen

Aus einem Amin und Aldehyd bildet sich im ersten Schritt eine *Schiff*-Base, diese wird mittels Addition eines nukleophilen Carboxylates zur α -AS umgewandelt. Übliche Reagenzien sind Cyanide (bei *Strecker* Synthese) und Isocyanate (bei *Ugi* Synthese). Die Chiralität kann einerseits über chirales Amin, Aldehyd oder Nukleophil, andererseits über einen chiralen Katalysator eingebracht werden [6].

3.4.5. Biokatalytische Verfahren

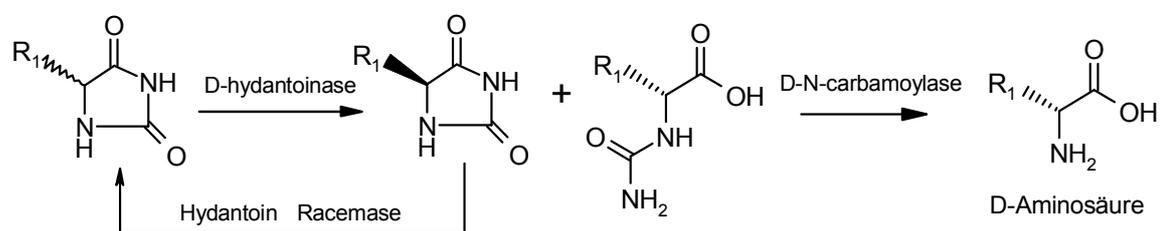
Es können sowohl natürliche als auch synthetische AS hergestellt werden. Die biokatalytischen Verfahren unterscheiden sich in Fermentationen, hier werden lebende Mikroorganismen verwendet und in Biotransformationen, dabei werden isolierte Enzyme oder metabolisch inaktive Zellen eingesetzt [37,75]. Durch Fermentationen können theoretisch alle proteinogenen AS hergestellt werden. Man nützt dabei den Syntheseapparat der Mikroorganismen aus und versucht durch Einsatz günstiger Rohmaterialien kostendeckend zu produzieren oder durch Zugabe von Aminosäurevorstufen, sogenannten Precursoren, zu den

Nährmedien den Umsatz zu erhöhen. Durch den Einsatz leicht zu regulierender Gram-positiver Mikroorganismen, im besonderen *coryneformer* Bakterien, konnten die beschränkenden Regulationsmechanismen so verändert oder ausgeschaltet werden, daß hohe Ausbeuten erreicht wurden. So werden z.B. L-Lysin, L-Glutaminsäure und L-Isoleucin durch Fermentation hergestellt [37,75].

Da man bei Biotransformationen nicht auf lebende Zellen angewiesen ist, ist es möglich, das Substratspektrum der Enzyme für die Herstellung von D-AS und weitere nicht natürliche AS auszunützen. Die derzeit meist verwendeten Enzyme [87] sind Lyasen, AS Dehydrogenasen, AS Oxidasen und Aminotransferasen, letztere setzt man in Kombination mit nachfolgender chemischer Hydrierung ein. Ein weiterer Punkt sind die enzymatischen Racemattrennungen. Hier sind die hauptsächlichen Prozesse Umsetzungen von Aminosäuren oder deren Derivaten mit Acylasen, Esterhydrolasen wie Lipasen oder Proteasen, Nitrilhydrolasen wie Peptidasen, Hydantoinasen oder Nitrilasen und Amidhydrolasen wie Amidasen.

Die wichtigsten Verbesserungen der biokatalytischen Verfahren waren veränderte Reaktoren wie Festbett- oder Membranreaktoren, Einsatz von 2-Phasensystemen, Immobilisierung der Enzyme, Screenen nach neuen oder Veränderung von Mikroorganismen durch gezielte genetische Eingriffe [46]. Ein weiteres Beispiel einer Verbesserung ist in Schema 6 zu sehen. Hier wird versucht, durch eine Racemase das nicht gewünschte Enantiomer in das Racemat enzymatisch umzuwandeln, um es wieder in den Prozeß einzubringen. Auf diese Weise kann man die theoretische Ausbeute des Prozesses auf 100% erhöhen.

Schema 6 Synthese nach dem Hydantoinaseweg



Degussa entwickelte den Hydantoinaseweg für die Produktion von D-AS auf Basis der Arbeiten von *Cecere et al.* [85] und *Yamada et al.* [45] und setzte ihn für industrielle Anwendungen ein [46]. Die Spezifität der Hydantoinase von *Arthrobacter sp.* wurde durch gerichtete Evolution von L- in D- umgewandelt. Es muß hinzugefügt werden, daß es auch in der Natur D-spezifische Hydantoinasen gibt [47,48]. Zur Anwendung für die Industrie wurde die entwickelte Hydantoinase

zusammen mit der D-spezifischen Carbamoylase und einer Racemase von *Arthrobacter sp.* in *E. coli* exprimiert. Der Prozeß mit diesem Organismus konnte mit 100% Ausbeute und einem ee von 99,9% durchgeführt werden (Schema 6).

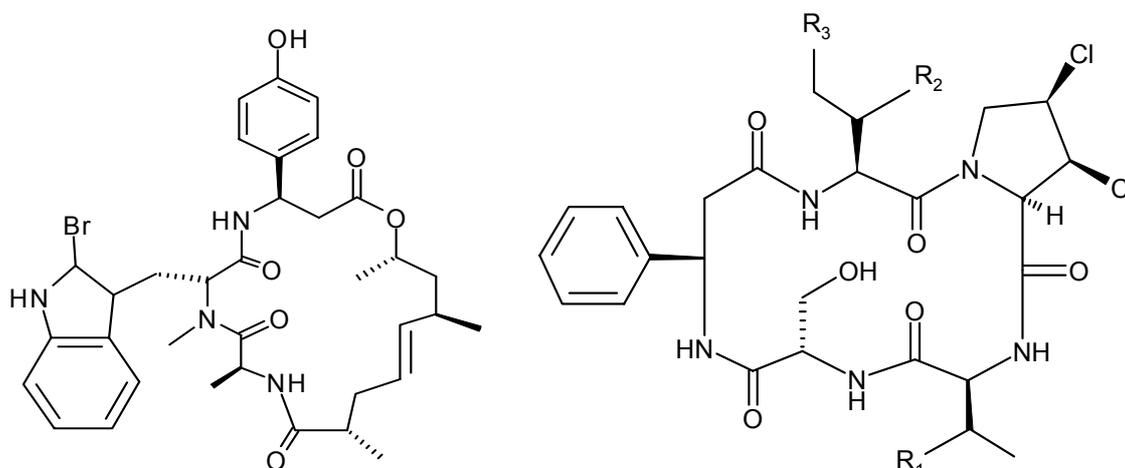
Beispielsweise werden bei der Firma DSM Prozesse mit Hydantoinasen, Carbamoylasen und Amidasen großtechnisch angewendet [44]. L-Amidasen bildet man aus den Organismen *Pseudomonas putida* und *Ochrobactrum anthropi*, D-N-Carbamoylase und D-Hydantoinase von *Agrobacterium radiobacter* und Enzyme für α,α -disubstituierte AS von *E. coli* (pLAMOa). Manchmal ist die in-situ Racemisierung des ungewollten Enantiomers möglich (z.B. Hydantoinaseweg).

3.5. β -Aminosäuren

3.5.1. Einleitung

Bei der retrosynthetischen Analyse einer Vielzahl von Naturstoffen entdeckt man β -AS als wichtige Teilstrukturen. Sie sind in etlichen Peptiden enthalten wie z.B. in Jasplakinolid [49], einem Schwammmetabolit, der eine β -Tyrosingruppe enthält und als Fungizid, Insektizid und Antihelminthikum wirksam ist. Eine β -Phenylalanineinheit ist in den Antitumoragentien Astin A, B und C enthalten.

Schema 7 Naturstoffe mit β -AS als Teilstrukturen



Jasplakinolid

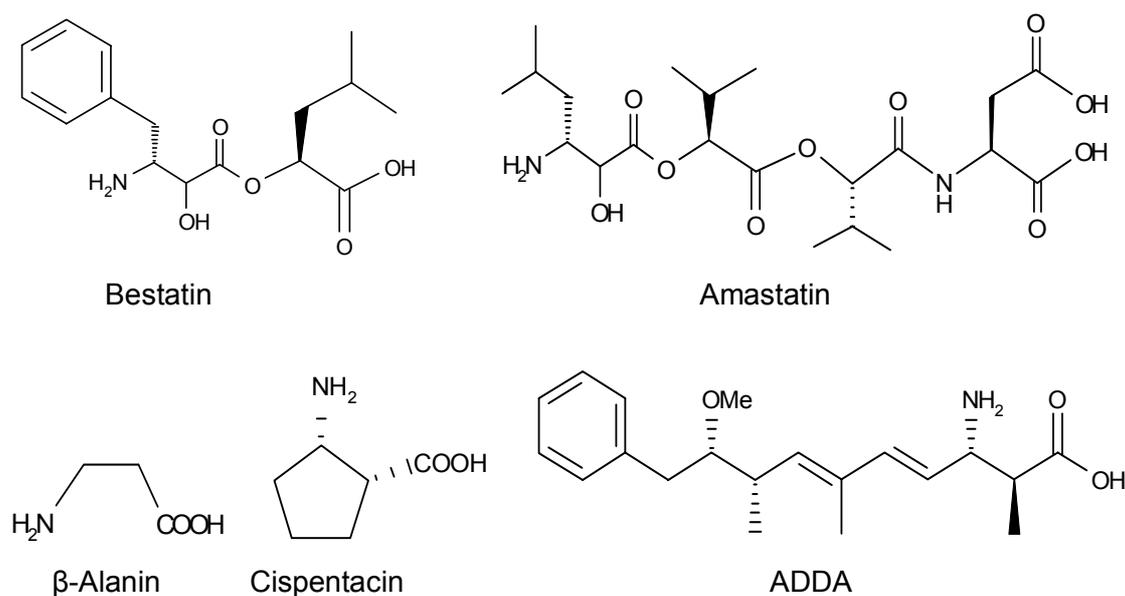
Astin A: $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=H$

Astin B: $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$

Astin C: $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=H$

Eine Reihe von nicht-zyklischen Peptiden mit β -AS-Komponenten besitzen interessante biologische Aktivitäten (Schema 8). Substituierte α -Hydroxy- β -AS sind in verschiedenen Naturstoffen enthalten, sie kommen z.B. in den Amino-peptidaseinhibitoren Bestatin [50] und Amastatin vor. (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-enoic-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid (ADDA) ist Teil der Antibiothika Cyanovinin RR, Nodularin und Microcystin LR [51]. Auch als Monomere wirken β -AS: Cispentacin [52,53] ist ein antifungales Antibiotikum.

Schema 8 β -AS Komponenten mit biologischen Aktivitäten



Als Alternativen zu α -Peptiden eröffnen Peptide aus β -Aminosäuren ganz neue Möglichkeiten [54]. Besonders bemerkenswert ist die außerordentliche Stabilität von β -Peptiden gegenüber dem Abbau durch Proteasen und Peptidasen, einschließlich der aggressivsten unter diesen Enzymen, wie die Pronase und die Proteinase K [55,56], sodaß β -Peptide oral verabreicht werden können.

Durch Funktionalisierungsmöglichkeiten in α - und β -Position kann eine Strukturvielfalt erzeugt werden, deren Erforschung gerade erst aufgenommen wurde.

Im Unterschied zu α -Peptiden bilden β -Peptide, auch schon bei kurzer Kettenlänge, stabile Sekundärstrukturen in festem und gelöstem Zustand aus. Daher sind in der medizinischen Chemie β -Peptide vielversprechende Kandidaten für den Ersatz von α -Peptiden [7].

3.5.2. Gewinnung von β -AS in enantiomerenreiner Form

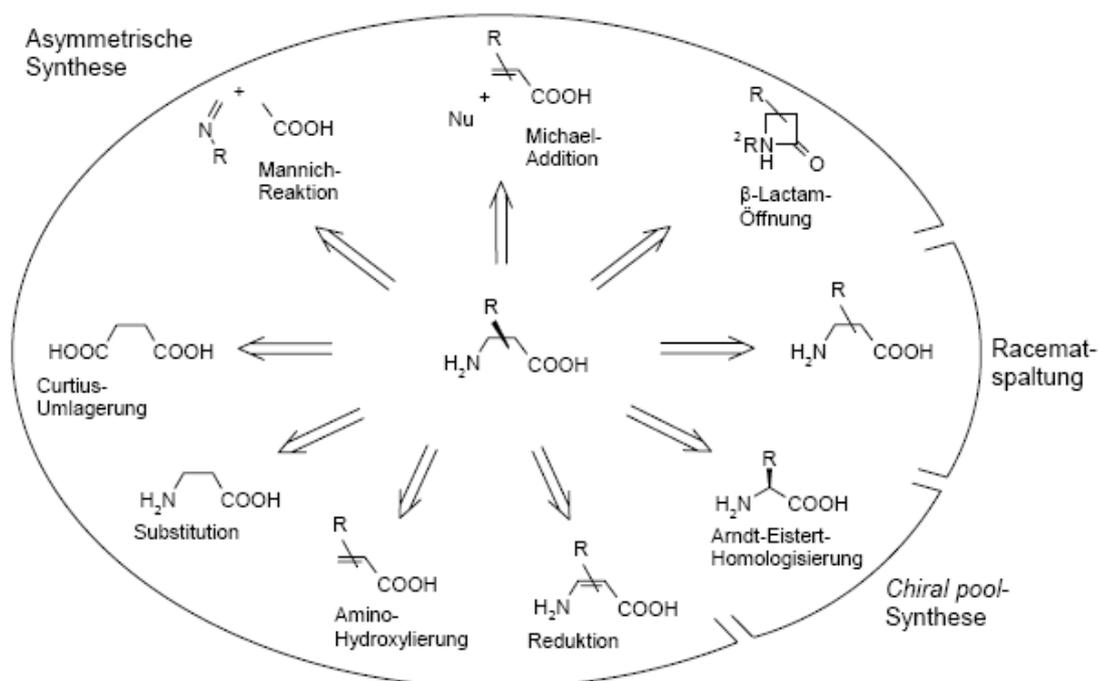
β -Aminosäuren sind durch Racematspaltungen sowie durch *chiral pool*- und durch asymmetrische Synthesen in enantiomerenreiner Form [4,14-17] zugänglich. Ein Überblick wird in Schema 9 gegeben.

Racematspaltungen haben jedoch den Nachteil, daß nur maximale Ausbeuten von 50% pro Enantiomer erreichbar sind, falls das unerwünschte Enantiomer nicht mittels Racemisierung zurückgeführt werden kann.

Chiral Pool bezeichnet ein Reservoir an Substanzen, die mindestens ein chirales Zentrum enthalten, als Syntheseedukte verwendet werden können, günstig und leicht zu erhalten sind. Der Vorteil von *chiral pool* Synthesen liegt in der kommerziellen Verfügbarkeit vieler Edukte in hoher optischer Reinheit. Hier werden z.B. α -AS als Edukte für die Synthese von β -AS mittels Homologisierung verwendet.

Eine herausragende Bedeutung bei der Gewinnung von β -AS in enantiomerenreiner Form haben hingegen die asymmetrischen Synthesen erlangt [4,14-17]. Unter diesen nehmen auxiliar-kontrollierte Synthesen in der Literatur den größten Umfang ein. Dagegen sind Erfolge der katalytischen Varianten erst unlängst veröffentlicht worden [57,58] und noch nicht allgemein einsetzbar.

Schema 9 Überblick über die β -AS Synthesewege [7]



In den nächsten Kapiteln wird ein Überblick der wichtigsten Synthesen gegeben. Eine ausführliche Dokumentation ist in den Literaturquellen [4,7] zu finden.

3.5.3. Racematspaltungen

Enzymatische Racematspaltungsmethoden von β -AS haben im Gegensatz zu α -Aminosäuren bisher nur geringe Bedeutung erlangt. Der Grund dürfte in der geringen Enantioselektivität sowie in der meist geringen Substrattoleranz der Enzyme bei der Umsetzung von β -Aminosäurederivaten zu sehen sein [4]. Als effizient erwiesen sich bisher die biokatalytischen Methoden von *Soloshonok et al.* [59] bzw. *Cardillo et al.* [60], bei welchen *N*-Phenylacetyl-derivate mit Penicillin-G-Acylase (PGA) enzymatisch hydrolisiert wurden.

3.5.4. Chiral pool Synthesen

Von den *chiral pool* Strategien sind vor allem die *Arndt-Eistert*-Homologisierung von α -AS unter Bildung von β -AS zu nennen. Bei der von *Liguori et al.* [61] beschriebenen Methode verläuft die Umsetzung annähernd quantitativ. Eine Veresterung oder Racemisierung tritt nicht auf. Bei der Synthese von α,β -disubstituierten- β -AS war die Ausbeute schlecht [62]. Ein weiterer Nachteil von *Arndt-Eistert* besteht in der schwierigen Handhabbarkeit und Toxizität von Diazomethan. Ebenso verursachen die eingesetzten Katalysatoren hohe Kosten, weshalb sich Anwendungen in der Regel auf kleinere Ansätze beschränken [4].

Weitere Möglichkeiten sind die Synthesen aus Asparaginsäure oder L-Asparagin. Im ersten Fall haben *Jefford et al.* [4] über Tosylierung, Anhydridbildung und nachfolgende selektive Reduktion mittels NaBH_4 ein vielseitiges Ausgangsprodukt zur stereoselektiven Synthese von unterschiedlichen β -AS synthetisiert. Die effektivste Methode zur Synthese von α,α -disubstituierten- β -AS [4] wurde von *Juaristi et al.* [63] durchgeführt und ausführlich untersucht. Hier synthetisierte man in mehreren Stufen (R)- α -Alkyl- β -AS aus natürlich vorkommendem L-Asparagin über das enantiomerenreine Schlüsselzwischenprodukt einem N,N-Acetal-pyrimidinon. Das (S)-Isomer konnte günstig durch Epimerisierung gewonnen werden.

3.5.5. Asymmetrische Synthesen

3.5.5.1. Reduktion α,β -ungesättigter Ester oder Nitrile

Es wurde mit substituierten Aminoacrylaten gearbeitet, man benötigt Rhodium(I) Katalysatoren in Gegenwart chiraler Phosphinliganden [64]. Die Aminoacrylate wurden mit Hilfe der Katalysatoren enantioselektiv hydriert, dabei erhielt man N-Acetyl- β -AS-Ester.

3.5.5.2. Asymmetrische Aminohydroxylierung

Mit asymmetrischer Aminohydroxylierung von α,β -ungesättigten Estern ist es möglich, α -Hydroxy- β -AS darzustellen [65,66]. Ein Vorteil der Methode liegt darin, daß bei Einsatz von Dihydrochinidin (DHQD) bzw. Dihydrochinin (DHQ) als chirale Liganden, Produkte mit entgegengesetzter absoluter Konfiguration entstehen.

3.5.5.3. Stereoselektive Alkylierung

Die Synthese von α -substituierten β -AS wurde durch das Hydropyrimidin-Auxiliar ermöglicht [67]. Für die Gewinnung des enantiomerenreinen Auxiliars mußte allerdings auf der Stufe des Pyrimidons eine präparative Racematspaltung auf einer chiralen HPLC-Säule vorgenommen werden.

3.5.5.4. Curtius Umlagerung

Sibi et al. [68] setzen 1,4-Dicarbonsäurederivate durch selektive Alkylierung und anschließender *Curtius*-Umlagerung unter Erhalt der Stereochemie zu α - sowie β -substituierten β -AS um. Chemoselektive Hydrolyse der Ester- oder der Imidfunktion vor der *Curtius* Umlagerung ermöglicht den Erhalt von β -Aminosäuren.

3.5.5.5. Mannich-artige Reaktion von Iminen

Asymmetrische *mannich*-artige Reaktionen von Iminen mit Esterenolaten eröffnen einen bezüglich des Substitutionsmusters besonders flexiblen Zugang zu β -AS. *Ellman et al.* [69] gingen von substituierten chiralen Titan-Carbonsäureesterenolaten und Sulfiniminen aus und setzten diese zu β -substituierten

sowie β,β -disubstituierten- β -AS um. Im Allgemeinen unterliegt diese Synthesestrategie jedoch gewissen Einschränkungen. Die Iminfunktion besitzt nur eine relativ geringe Elektrophilie und kann leicht zu Enaminen tautomerisieren [4].

3.5.5.6. Konjugierte Addition

Die konjugierte Addition von Nucleophilen an α,β -ungesättigte Ester stellt eine besonders attraktive Lösung dar [4]. Für reagenskontrollierte, stereoselektive Additionen wurden chirale Amine als Ammoniak-Äquivalente eingesetzt. *Davies et al.* [70,71] addierten beispielsweise *N*-Benzyl-PEA an unterschiedlich substituierte α,β -ungesättigte Ester. Anschließende hydrogenolytische Debenzylierung und Esterhydrolyse führte zu β -substituierten- bzw. α -Methyl- β -substituierten- β -AS. Durch die diastereoselektive Oxidation des intermediären Esterenolats mit dem Oxaziridin lassen sich sogar β -substituierte- α -Hydroxy- β -AS synthetisieren [72].

3.5.5.7. Katalytische Verfahren

Eine katalytische, enantioselektive Synthese von β -AS eröffnet die Addition von *N*-Nucleophilen an *Michael*-Systeme in Gegenwart chiraler *Lewis*-Säuren. *Jacobsen et al.* [73] verwendeten Azid als Nucleophil und einen chiralen (Salen)-Al(III)-Komplex als *Lewis*-Säure. Hydrolyse der Imidfunktion und Reduktion des Azidrestes führten schließlich zu den β -substituierten- β -AS.

Eine weitere Möglichkeit ist die katalytische asymmetrische Hydrierung von ungeschützten Enaminen [58]. Das Problem dieser Variante ist das üblicherweise notwendige Schützen der Aminogruppe. In dieser Arbeit [58] ist es gelungen für ungeschützte β -Enamin-Ester und -Amide mit einem neuen Katalysator (einem Fe-Sandwich-Komplex) und passendem Lösungsmittel (Lm) eine Hydrierung ohne Schützen der Aminofunktion durchzuführen.

3.5.5.8. Ringöffnung von β -Lactamen

Durch Ringöffnung von β -Lactamen mit Nucleophilen kann man β -AS synthetisieren [74]. Methoden der Synthese von β -Lactamen in enantiomerenreiner Form [19,20] können auch zur Synthese von enantiomerenreinen β -AS genutzt werden.

3.6. Enantiomerenreine β -AS durch Biokatalyse

Wie in Punkt 3.1. angedeutet, wird das Gebiet der Synthese von enantiomerenreinen β -Aminosäuren durch Biokatalyse intensiv erforscht. Im Gegensatz zu den oben erwähnten α -AS ist es noch nicht gelungen, eine Synthese in industriellem Maßstab zu entwickeln [75-77].

Zur übersichtlicheren Einteilung der folgenden Katalysevarianten werden die β -Aminosäuren bezüglich der Position ihrer Substituenten unterschieden.

3.6.1. α -substituierte- β -Aminosäuren

Der racemische Methylester von α -Methyl- β -Alanin wurde durch die Lipasen *Candida antarctica* Lipase-A (CAL-A) und CAL-B mit Ethyl- und Butylbutanoaten in organischen Lösungsmitteln umgesetzt. Es wurde in zwei Stufen gearbeitet: Im ersten Schritt acylierte CAL-A selektiv die S-Form, während CAL-B im zweiten die R-Form einer Interesterifizierung unterwarf. Beide Schritte sind enantioselektiv, die ee Werte der einzelnen Stufen erreichten 96% bzw. 97% [78].

3.6.2. α,β -disubstituierte- β -Aminosäuren

Aus leicht zugänglichen, racemischen 2-Alkyl-3-phenylacetyl- β -aminobutansäuren, Synthese nach *Seebach und Estermann* [79], konnte durch Reaktion mit PGA eine selektive Spaltung in die (2S,3S)- und (2R,3R)-Phenylacetyl- β -AS erreicht werden [60]. Nach der Auftrennung der Produkte erzielte man ee Werte von >94%. Anderweitig wurde mit Lipase „PS“ von *Pseudomonas cepacia* und Lipase „SP526“ von *Candida antarctica* gearbeitet [80].

3.6.3. α -Hydroxy- β -Aminosäuren

Wie im obigen Abschnitt wurde im ersten Schritt mit der PGA ein racemisches Gemisch gespalten. In der zitierten Quelle [81] kam N-Phenylacetyl-3-amino-3-phenylpropansäure zum Einsatz. Das enantiomerenreine Zwischenprodukt wurde verestert und nach der Methode von *Seebach und Prelog* [82] in drei Stufen zu dem α -Hydroxy- β -Aminosäureester umgesetzt. Bei dieser Methode blieb das chirale Zentrum am C2 Atom erhalten („syn“ Selektivität).

3.6.4. β -substituierte- β -Aminosäuren

Für diese Gruppe existieren die meisten Untersuchungen, da die Transformationen in der Regel die Amino/Amid Gruppe betreffen und β -substituierte AS das chirale C-Atom benachbart zur Aminogruppe besitzen, was die stereochemischen Eigenschaften stark beeinflusst.

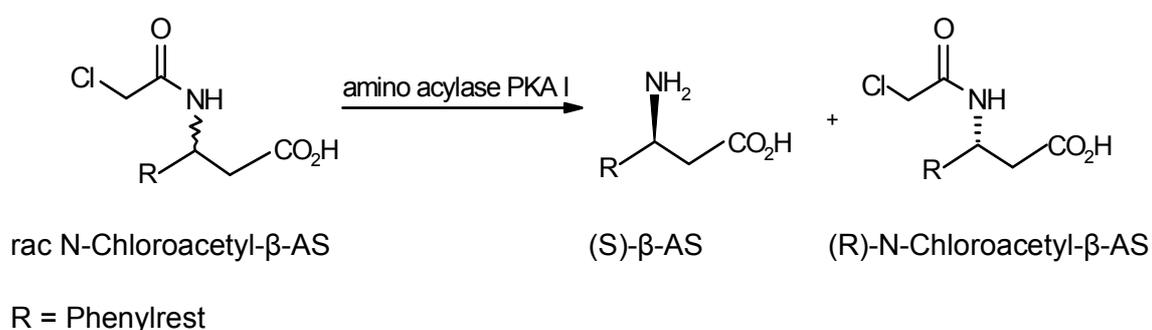
Faulconbridge gelang es, nicht geschützte Aminoester mit der Lipase „Amano PS“ aus *Burkholderia cepacia* durch selektive Hydrolyse der Estergruppe enantioselektiv zu spalten [83].

Für weitere Untersuchungen testete man die Lipasen mehrerer Mikroorganismen, dabei wurden wieder die Lipasen CAL-A und CAL-B eingesetzt. *Juaristi et al.* [16] gehen ausführlich auf die Ergebnisse der Untersuchungen ein.

Abschließend muß noch ein aktueller Forschungsbericht von *Gröger et al.* [84] aus dem Forschungslabor der Firma Degussa erwähnt werden, der Parallelen zur vorliegenden Arbeit aufweist. Gearbeitet wurde mit N-acylierten racemischen β -AS. In den Ergebnissen zeigte sich, daß die verwendete „Porcine Kidney Acylase Typ1“ (PKA 1) die N-Chloroacetyl- β -AS umsetzte, jedoch nicht die N-Acetyl- β -Aminosäure. Nach 48 Stunden Reaktionsdauer erreichte die Acylase einen Umsatz von 49% und einen ee von >98% (Schema 10).

Damit wurden wie in der vorliegenden Diplomarbeit β -aromatisch substituierte β -Aminosäuren eingesetzt. Im Unterschied dazu wurde in der vorliegenden Arbeit nicht mit der N-Chloroacetyl-Gruppe und der freien Aminosäure, jedoch mit den Methylestern und der N-Acetyl-Schutzgruppe gearbeitet.

Schema 10



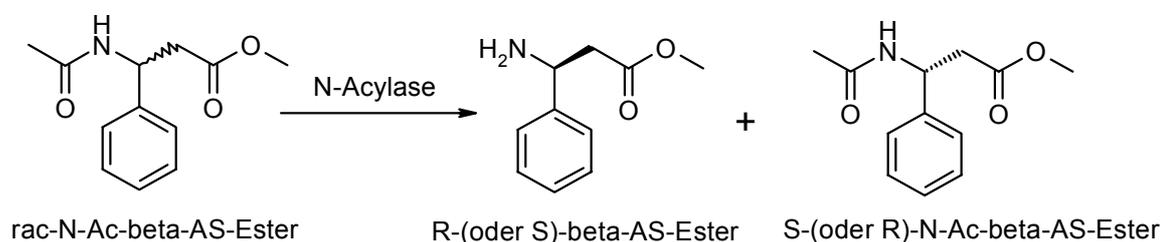
4. Zielsetzung

Das Interesse an β -AS hat in jüngster Zeit rasant zugenommen: Bis 1980 sind nur fünf Fachpublikationen über β -AS erschienen, von 1980-1989 waren es elf und von 1990-2004 schon mehr als 500 [10]. In dem sprunghaften Anstieg der Publikationen kommt einmal die zunehmende Bedeutung dieses Forschungsgebietes zum Ausdruck. Darin spiegelt sich aber auch der Bedarf an effizienteren und vielseitigeren Synthesemethoden für enantiomerenreine β -AS wieder. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Konzept zur biokatalytischen Spaltung racemischer β -Aminosäuren erprobt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen stereoselektiven Zugang zu β -Phenyl- β -AS-Estern zu entwickeln. Die Ergebnisse sollten u. a. als Ausgangspunkt für Untersuchungen von weiteren aromatischen β -AS-Estern dienen, welche am Phenylring substituiert waren. Das Reaktionsschema der Umsetzung mit der von uns gesuchten N-Acylase ist in Schema 11 dargestellt, als Substrat wurde der, organisch chemisch synthetisierte, N-Acetyl- β -amino- β -phenylpropionsäuremethylester eingesetzt. Das racemische Ausgangsprodukt wurde selektiv gespalten.

Die Feststellung der Umsatzgeschwindigkeit und der Enantioselectivität waren die beiden Hauptkriterien des durchgeführten Screenings.

Schema 11



5. Materialien und Methoden

5.1. Herkunft der Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in den Reinheitsgraden „zur Analyse“, „reinst“ oder „für biochemische Zwecke“ der Firmen Merck (Darmstadt, D), Fluka (Buchs, CH) oder Riedel de Haën (Hannover, D) bezogen. Argon wurde von der Firma Westfalia (Hagen, D) bezogen. Sofern nicht anders beschrieben, wurden diese ohne weitere Reinigung eingesetzt.

5.2. Herkunft der Stammkulturen

Die verwendeten Kulturen sind Reinisolate aus Bodenproben früherer Screenings, die von Dr. Laumen und Mitarbeitern auf N-Acylaseaktivität getestet worden waren. Die damals verwendeten Testsubstanzen waren N-Ac-Phenylethylamin, N-Ac-Piperidin, N-Ac-2-Amino-1-phenylpenten und N-Ac-Cyclohexylamin. Die Isolate wurden in einer Glycerin-Konservierungslösung bei -80°C gelagert.

5.3. Analytik

5.3.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde zur Reaktionskontrolle der organischen Synthesen sowie zur Auswahl und Optimierung der Laufmittel für nachfolgende Säulenchromatographien verwendet.

Es wurden 5x10cm Platten aus Kieselgel 60 (F254) der Fa. Merck eingesetzt. Als Laufmittel dienten je nach Polarität der zu trennenden oder nachzuweisenden Stoffe unterschiedliche Mischungen von Methylenchlorid, Hexan, Diethylether, Acetonitril, Methanol, Ethanol, Wasser und Essigsäure. Die Laufzeit betrug 7-10 Minuten, in geschlossenen Glaskammern, mit laufmittelgetränkten Papierstreifen zur Sättigung der Gasphase. Die Detektion wurde mittels UV Aktivität durch Bestrahlung mit einer 254nm UV Lampe erreicht. Ebenfalls wurden

die Sprühreagenzien 0,2% (w/v) Ninhydrin in Ethanol (für primäre und sekundäre Aminogruppen) oder das Cer(IV)-Phosphor-Ammoniummolybdatreagens (CPS) in H₂SO₄ eingesetzt. Dieser Nachweis wurde durch Gelb- bis Rot- oder Blaufärbung der reagierenden Stellen nach Erhitzen mit einem Heißluftföhn durchgeführt.

5.3.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Es wurden in dieser Arbeit zwei HPLC-Anlagen mit UV-Detektor verwendet. Die eine, eine Merck-Hitachi (Darmstadt, D), wurde für die Analysen der Schüttelkolbenversuche eingesetzt, die andere, eine Agilent 1100 der Firma Agilent (New York, USA), wurde zur Messung der 96-Loch Mikrotiterplatten herangezogen. Letztere besaß einen Probenautosampler für zwei 96-Lochplatten.

Als Säule kam bei beiden Geräten eine Chromolith Performance RP-18e Säule der Fa. Merck zum Einsatz. Die Länge der Säule betrug 100mm, der Durchmesser 4,6mm, die Porengröße der Chromolithstruktur betrug 2µm, die der Mesoporen 13nm. Die innere Oberfläche wird mit 300m²/g und das Trennvermögen mit 100.000 N/m angegeben. Der Durchfluß bei allen Analysen betrug 2ml/min. Die Laufmittel waren: „A“: 3mM H₃PO₄ in bidest. H₂O, „B“: Acetonitril.

Die Merck-Hitachi Anlage:

- D 2500 – Chromato-Integrator
- L 6210 – Intelligent Pump mit Gradientenmischer
- L 4000 – UV-Detektor
- AS 2000 – Autosampler

5.3.2.1. HPLC Gradientenentwicklung

Zur Erarbeitung eines passenden Gradienten wurde mit N-Ac-β-AS-Ester **5** und in weiterer Folge mit verschiedenen Gemischen aus den Produkten **1** bis **7** aus Tabelle 1 (Seite 41) gearbeitet. Ziel der Gradientenentwicklung war es, möglichst unterschiedliche Retentionszeiten für die Peaks von Aminester **2** und N-Acetyl-β-AS-Ester **5**, sowie **5** und N-Propionyl-β-AS-Ester **7** zu erhalten. Zu Beginn der Tests kamen zwei weitere Säulen der Firma Merck zum Einsatz: einmal die LiChroCart 125-4, RP-18e (5µm), weiters die Chromolith Performance RP-8e Säule. Mit beiden konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden.

Als ideale Säule für den Gradienten mit der kürzesten Laufzeit stellte sich die Chromolith Performance RP-18e heraus. Ebenfalls wurden verschiedene Durchflußgeschwindigkeiten und Variation des pH Wertes des Laufmittels von pH 3 auf pH 4 getestet. Anfangs wurde mit dem UV-Detektor bei 210nm, später zur selektiveren Analyse bei 254nm gemessen. Wichtig ist zu erwähnen, daß sowohl das Spülen der Säule mit 100% Laufmittel B als auch mit 95% A und 5% B am Ende der Analyse in der angegebenen Dauer notwendig war, da man bei Verkürzung dieser Zeiten Geisterpeaks zu Beginn der nächsten Analyse detektiert hatte.

Gradient der Merck-Hitachi Anlage:

Zeit [min.]	Gradient	
	[%A]	[%B]
0,0	95	5
1,5	95	5
5,0	20	80
5,2	0	100
7,7	0	100
8,0	95	5
10,0	95	5

Gradient für die Agilent 1100 HPLC:

Zeit [min.]	Gradient	
	[%A]	[%B]
0.0	95	5
1.0	95	5
3.6	20	80
3.8	0	100
4.9	0	100
5.1	95	5
5.5	95	5

5.3.2.2. Chirale HPLC Analysen

Die chiralen HPLC Analysen führte man mit einer Merck „La Chrom“ DAD-TFA und der Säule Chiralpak AS-H 1161 der Firma Daicel (Osaka, Japan) durch. Gemessen wurde bei Raumtemperatur, die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,5ml/min und das Laufmittelgemisch bestand aus 85% Hexan und 15% Ethanol. Die Analyse führte man mittels UV Detektion bei 210nm durch. Das Einspritzvolumen wurde je nach Konzentration der Proben zwischen 0,5 und 10µl variiert. Die Proben setzte man gelöst in Methanol zur Analyse ein.

5.3.2.3. Berechnung der Konzentrationen

Es wurden die Peakflächen der zu analysierenden Substanzen ausgewertet und mittels Standard-Verdünnungsreihen für jedes einzelne Produkt eine Eichkurve bestimmt. Mit Hilfe der Eichkurve berechneten sich die Konzentrationen aus den Peakflächen der zugehörigen Substanzen.

5.3.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Die ^1H NMR Analysen wurden in einem Spectrospin 400MHz/52mm der Firma Bruker-Biospin (Billerica, USA) durchgeführt. Die Proben waren je nach Löslichkeit in CDCl_3 (99,8% + 0,03% TMS) der Fa. Acros Organics (Geel, Belgien), in MeOD (99,5%) oder D_2O (99,8%) der Firma Dr. Glaser AG (Basel, CH) gelöst.

5.3.4. Säulenchromatographie

Die Glassäulen wurden oberhalb des Ablaufs mit Watte bedeckt, darauf wurde geglühter Seesand (Cristobalit, Fa. Schweizerhall Chemie AG, Basel, CH) 1-2cm dick waagrecht geschichtet. Das Kieselgel 60 (Korngröße: 0,06-0,20mm) der Fa. Merck wurde im Laufmittelgemisch aufgeschwemmt, zügig in die Säule eingegossen und setzte sich waagrecht ab. Darüber brachte man noch eine ca. 1cm dicke Seesandschicht auf, um eine gleichmäßige Säulenbeladung zu erreichen. Ebenso ist diese ein Schutz vor dem Trockenlaufen der Säule und gegen ein Aufschwemmen bei weiterer Flüssigkeitszugabe. Nach möglichst konzentrierter Probenaufgabe wurde die Säule mit ausreichend Hexan unpolar gestellt. Danach erfolgte die Auftrennung mit dem jeweiligen Laufmittelgemisch. Über den Schliffaufsatz konnte ein Überdruck von maximal 1,4 bar angelegt werden.

5.3.5. Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) mit dem Zweistrahlphotometer Shimadzu UV-160A der Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan) bei 660nm bestimmt. Als Referenz diente bidestilliertes (bidest.) Wasser. Die Zellsuspensionen wurden in UV Küvetten von 1cm Dicke gemessen. Proben mit einer höheren OD_{660} als 0,5 verdünnte man mit Wasser.

5.3.6. Enzymaktivitätsbestimmung

Definition der Einheit „International Unit“:

Eine Internationale Unit [IU] wurde als die Enzymmenge definiert, welche 1 μmol einer Substanz, in unserem Fall den racemischen N-Acetyl-3-amino-3-phenylpropionsäuremethylester (N-Ac- β -AS-Methylester), innerhalb einer Minute unter den unten angegebenen Bedingungen umsetzt.

Standard Enzym Assay:

Es wurden zwei Tests entwickelt, die sich nur im eingesetzten Volumenverhältnis der Substratlösung zu der Zellsuspension unterschieden.

Man legte 360 μl einer 25mM (entspricht 5,5g/l) N-Ac-AS-Methylesterlösung, in 69mM pH 7 Phosphatpuffer vor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μl Zellsuspension gestartet. Es lag eine Gesamteduktkonzentration von 22,5mM vor.

Die Mischung wurde in 1,5ml verschließbaren Safe-Lock Eppendorf-Tubes der Firma Eppendorf (Hamburg, D) in einem Eppendorf-Thermomixer bei 30°C und 1000 U/min inkubiert. Nach einer Zeitspanne von 5min bis zu 24h wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μl Methanol gestoppt und kurz mit einem Vortex Mischer der Bender & Hobein AG (Zürich, CH) homogenisiert. Methanol stoppte die Reaktion, ohne die Proteine zu präzipitieren, dies konnte jedoch durch Abkühlen der Mischung für 25 Minuten auf Trockeneis erreicht werden. Des Weiteren zentrifugierte man die Proben vor der Analyse für 15 Minuten in einer Sigma 4K15 der Firma Sigma (Osterode am Harz, D) mit dem Aufsatz für 30 Eppendorf-Tubes bei 15000 U/min (entspricht ca. 25000g). Anschließend wurde die Flüssigkeit in HPLC Röhrchen überführt und analysiert.

Bei der zweiten Version des Tests wurden 200 μl Zellsuspension zu 200 μl einer 25mM N-Ac-AS-Methylesterlösung hinzugefügt. Das erhöhte die Zelldichte der Testlösungen um den Faktor fünf, was zu höheren Produktkonzentrationen bei den Analysen führte. Zum besseren Vergleich der Enzymaktivitäten dividierte man die gemessenen Produktkonzentrationen wieder durch den Faktor fünf, um so vergleichbare Ergebnisse zu den bis dahin durchgeführten Tests zu erhalten. Dies sollte im Hinblick auf die Größe der Umsätze, den teilweise verkürzten Reaktionszeiten und den übrigen Fehlerquellen die Ergebnisse dieser Tests nicht verfälschen.

Medienanalysen:

Bei den Analysen zur Bestimmung der Edukt- und Produktkonzentration wurden je Flüssigmedium 750µl entnommen, 750µl Methanol hinzugefügt, mit einem Vortex Mixer homogenisiert, auf Trockeneis für 25min gekühlt und nach 15min Zentrifugation in der Sigma 4K15 in HPLC Fläschchen zur Analyse überführt.

5.4. Mikrobiologische Verfahren

5.4.1. Medien

Alle Medien, mit Ausnahme der Vitaminlösung, wurden mit NaOH oder HCl auf einen pH Wert zwischen 6,8 und 6,9 eingestellt und bei 121°C für 20 Minuten dampfautoklaviert. Die Vitaminlösung und der gelöste N-Ac-β-AS-Methylester wurden durch einen Sterilfilter mit 0,2µm Porengröße zugegeben. Bei Medien mit N-Ac-AS-Ester gab man den Ester in konzentrierter 80/20 (v/v) MeOH/Wasser Lösung zu, so daß maximal eine Gesamtkonzentration von 2,5% (v/v) Methanol im jeweiligen Medium entstand. Alle Vitamin- und Spurenelementelösungen wurden als 10-Fachkonzentrate eingesetzt.

Alle Medien wurden, außer gesondert angegeben, in dest. H₂O angesetzt.

5.4.1.1. Standardlösungen

Mineralmedium:

KH ₂ PO ₄	5,00 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 g/l
CaCl ₂	0,025 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,025 g/l
Spurenelementlsg.	1,50 ml/l

Puffermedium (69mM pH 7 Phosphatpuffer):

Na ₂ HPO ₄	41 mmol
KH ₂ PO ₄	28 mmol

5.4.1.2. Stammlösungen

Für 96-Lochplatten

Vitaminlösung 10-fach Konzentrat:

Thiamin-HCl (Vit.B ₁)	0,500 g/l	
Riboflavin (Vit.B ₂)	0,250 g/l	Fa. Serva (Heidelberg, D)
Pyridoxamin-HCl (Vit.B ₆)	0,500 g/l	
Cyanocobalamin (Vit.B ₁₂)	0,001 g/l	
Biotin (Vit.H)	0,005 g/l	
Folsäure	0,015 g/l	
Nicotinsäure	0,500 g/l	
Nicotinamid	0,250 g/l	
4-Aminobenzoessäure	0,050 g/l	
Ca-Pantothenat	0,500 g/l	
Pyridoxin	0,500 g/l	

Spurenelementelösung 10-fach Konzentrat:

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,844 g/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,254 g/l
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0,100 g/l
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,100 g/l
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,020 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,136 g/l
FeCl ₃ · 6H ₂ O	2,000 g/l
CaCl ₂	0,220 g/l

Für Schüttelkolbenversuche

Spurenelementelösung 10-fach Konzentrat:

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,000 g/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,300 g/l
Na ₂ B ₄ O ₇	2,500 g/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,000 g/l
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,100 g/l
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,200 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,300 g/l

Vitaminlösung 10-fach Konzentrat:

Thiamin-HCl (B ₁)	0,500 g/l
Riboflavin (B ₂)	0,250 g/l
Pantothensäure (B ₅)	0,500 g/l
Pyridoxamin-HCl (B ₆)	0,500 g/l
Cyanocobalamin (B ₁₂)	0,050 g/l
Biotin (Vit.H)	0,020 g/l
Folsäure	0,020 g/l
Nicotinsäure	0,500 g/l
Nicotinamid	0,250 g/l
α-Liponsäure	0,060 g/l
4-Aminobenzoessäure	0,050 g/l
Pyridoxin	0,500 g/l

Konservierungslösung:

Glycerin	60,0 ml	≥99,5%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trypton	2,50 g	Fa. Merck, Casein enzymatisch hydrolysiert
NaCl	2,50 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
Wasser deionisiert	182,0 ml	

5.4.1.3. Spezielle Medien

Medien für die 96-Lochplatten

Anzuchtagarmedium (1):

Plate Count Agar	19,8 g/l (0,9%)	Fa. Merck
Agar-Agar	11,0 g/l (1,1%)	Fa. Merck

Anreicherungsmedium (2):

Hefeextrakt	3,0 g/l	Fa. Merck
Pepton	3,0 g/l	Fa. Merck, Casein pankreatisch verdaut
N-Ac-β-AS-Methylester	1,0 g/l	
Vitaminlösung	2,0 ml/l	
in Mineralmedium		

Anreicherungsmedium (3) mit N-Ac-PEA:

Hefeextrakt	2,0 g/l
Pepton	2,0 g/l
N-Ac-PEA	1,0 g/l
Vitaminlösung	2,0 ml/l
in Mineralmedium	

Anreicherungsmedium (4) mit Essigsäure:

Hefeextrakt	1,5 g/l
Pepton	1,5 g/l
N-Ac-PEA	2,0 g/l
Essigsäure (100%)	2,0 ml/l
Vitaminlösung	2,0 ml/l
in Mineralmedium	

Selektives Medium (5):

N-Ac- β -AS-Methylester	2,0 g/l
in pH 7 Phosphatpuffer	

Medien für die Schüttelkolbenversuche

Agargrundmedium (6):

Bacto Agar	19,0 g/l	Fa. Difco (USA)
Hefeextrakt	25,0 mg/l	
Vitaminlösung	3,0 ml/l	
in Mineralmedium		

Anreicherungsagarmedium (7):

N-Ac-PEA	2,0 g/l
in Agargrundmedium	

Anreicherungsagarmedium (8):

N-Ac-PEA	1,0 g/l
Natriumacetat	0,67 g/l
in Agargrundmedium	

Selektives Agarmedium (9):

N-Ac- β -AS-Methylester 3,0 g/l
in Agargrundmedium

Flüssiggrundmedium (10):

Vitaminlösung 3,0 ml/l
Hefeextrakt 25,0 mg/l
in Mineralmedium

N-Ac-PEA Medium (11):

N-Ac-PEA 2,0 g/l
in Flüssiggrundmedium

N-Ac- β -AS-Methylester Medium (12):

N-Ac- β -AS-Methylester 2,0 g/l
in Flüssiggrundmedium

Wachstumsmedium (13):

N-Ac-PEA 1,0 g/l
Natriumacetat 0,67 g/l
in Flüssiggrundmedium

Komplexes Reaktionsmedium (14):

N-Ac- β -AS-Methylester 1,5 g/l
N-Ac-PEA 1,0 g/l
Natriumacetat 0,67 g/l
in Flüssiggrundmedium

Selektives pH 7 Medium (15):

N-Ac- β -AS-Methylester 2,0 g/l
in pH 7 Phosphatpuffer

Selektives Reaktionsmedium (16):

N-Ac- β -AS-Methylester 4,0 g/l
in pH 7 Phosphatpuffer

5.4.2. Screening

Die folgenden Kapitel nehmen Bezug auf die Arbeitstechniken. Es wurde mit Agarkulturen in 10cm Petrischalen und mit Flüssigmedien in Erlenmeyer-glaskolben von unterschiedlicher Größe gearbeitet. Im ersten Ansatz kamen 96-Lochplatten in zwei Größen zum Einsatz: für Agarmedien und die HPLC Analyse die flachen, für Flüssigkulturen die höheren, sogenannten „Deepwell“ Platten. Für alle Versuche wurde entweder N-Ac-PEA **15** oder das Substrat, der N-Ac-AS-Ester **5**, als Induktor der Acylaseaktivität verwendet. Es wurden Konzentrationen zwischen 1 und 2g/l zur Induktion eingesetzt. Alle Schüttler besaßen einen 5cm Auslenkradius, wenn nicht anders beschrieben.

5.4.2.1. Agarplattenkulturen

Alle Agarplattenkulturen, sowohl die der 96-Lochplatten mit rundem Lochquerschnitt (0,31ml Lochvolumen) der Fa. TPP AG (Trasadingen, CH), als auch die der 10cm Petrischalen, ließ man in einem Inkubator 500 der Fa. Memmert GmbH (Schwabach, D) bei 28°C für vier bis sieben Tage wachsen. Zur Aufrechterhaltung einer höheren Luftfeuchtigkeit wurde eine Glasschale mit destilliertem Wasser in den Schrank gestellt.

Die Reinisolate der -80°C Kryoröhrchen übertrug man mit sterilen Plastikspitzen in die einzelnen Löcher der 96er Platten. Zur Kontrolle der Sterilität der Medien und der sterilen Arbeitsweise wurde pro Platte in mehrere Plätze nur Medium eingefüllt. Die Isolate wurden pro Platte doppelt und beim letzten Versuch auch eine Parallelserie auf zusätzlichen Platten inokuliert. Die Löcher waren mit 150µl Medium (1) befüllt. Nach der Inokulation im Inkubator ließ man die Kulturen wachsen. Nachdem Bewuchs festzustellen war, wurde beim ersten Ansatz 50µl steriler pH 7 Phosphatpuffer zugegeben, nach kurzem Schütteln die Zellsuspension mit Pipetten aufgezogen und das sterile Medium (2) angeimpft.

5.4.2.2. Flüssigmedienkulturen

Die Flüssigkulturen der „Deepwell“ 96-Lochplatten mit quadratischem Lochprofil und 2,5ml Lochvolumen der Firma HJ-Bioanalytik GmbH (Mönchengladbach, D) wurden mit je 500µl Medium pro Loch befüllt und mit einem „Lab-Shaker“ der Firma Kühner AG (Birsfelden, CH) bei 28°C und 300 U/min während 4-8 Tage

geschüttelt. Das Klemmsystem bestand aus einem Metalldeckel mit einer luftdurchlässigen, die Sterilität dennoch garantierenden autoklavierbaren Kunststoff-Sandwichkonstruktion und einer Spange, welche diesen fixierte, sowie der Bodenplatte. Zentrifugiert wurden die Platten in einer Sigma 4K15 mit dem Adapter für 96-Loch-Platten „09366“ bei 6000 U/min entspricht ca. 4025g bei 10°C und für 15 Minuten. Vor der Inkubation mit selektivem Medium wurden die erhaltenen Zellen zweimal mit ca. 100µl sterilem pH 7 Phosphatpuffer re-suspendiert, danach zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Daraufhin wurde das selektive Medium zur weiteren Umsetzung zugegeben.

Bei Ansatz zwei impfte man Medium (3) und im dritten Ansatz das Medium (4) mit dem „System Duetz“ Replikator der Firma Kühner AG steril an. Alle Ansätze wurden, steril verschlossen, auf dem „Lab Therm Shaker“ sieben Tage lang geschüttelt. Danach wurden die Platten zentrifugiert und das unselektive Medium entfernt. Im Anschluß fügte man je 500µl des selektiven Mediums (5) hinzu und inkubierte für weitere sieben Tage, wie oben beschrieben.

Zur Aufarbeitung und Vorbereitung der Analyse wurden bei den beiden ersten Tests 500µl Isopropanol, bei allen nachfolgenden (inkl. Schüttelkolbenversuchen) wurden 500µl Methanol zugefügt und 30 Minuten geschüttelt. Danach wurde abzentrifugiert, der Mischung 200µl entnommen und in eine für die Analyse in der Agilent 1100 passende 96-Lochplatte überführt. Um Verdunstung zu verhindern, waren die Platten mit einer selbstklebenden sterilen Plastikfolie abgedeckt und die Temperatur der Probenkammer auf 15°C eingestellt.

Dieses Screening wurde dreimal durchgeführt, folgende Variationen wurden vorgenommen: Um die Zellen in eine Wachstumsphase zu bringen, wurde bei der ersten Serie fünf Stunden vor Zugabe des selektiven Mediums nochmals unselektives zugegeben. Bei der zweiten Serie gab man an Stelle des N-Ac-β-AS-Methylesters **5** das N-Ac-PEA **15** als Induktor zu. Bei der dritten Serie erfolgte zusätzlich die Zugabe von Essigsäure zu dem neuen Induktor, um die Kolonien schon an das Acetat zu gewöhnen.

Bei allen Schüttelkolbenversuchen verwendete man Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die mit sterilen Wattestopfen und Stoffgaze verschlossen waren. Es wurde, wenn nicht anders erwähnt, auf dem „Pilot Shake RC-6-U“ Schüttler der Fa. Kühner bei 30°C inkubiert. Bei Animpfen von Flüssigmedien aus anderen fügte man eine angemessene Menge der Vorkultur mittels steriler Pipetten zu.

5.4.2.3. Reaktionsverlauf mit *Rhodococcus globerulus* (K1/1)

In einem 200ml Erlenmeyerkolben wurden 125ml Medium eingesetzt, 0,5g Zellfeuchtmasse zugefügt und auf dem Kühner „Lab Therm Shaker“ geschüttelt. Zur Analyse des Reaktionsfortschrittes wurden jeweils 3ml Zellsuspension entnommen, mit 3ml Methanol homogenisiert und nach Zentrifugation für die Analyse in der Agilent 1100 verwendet. Man berechnete die Konzentrationen in [g/l] aus den Peakflächen, wobei die Fläche des Eduktes zur Zeit $t = 0h$ gleich 2g/l gesetzt wurde. Die Konzentrationen der übrigen Substanzen berechneten sich aus dem Absorptionskoeffizientenabgleich mit dem Edukt (siehe Diagramm1, Seite 49).

5.4.2.4. Schüttelkolbenscreening

163 Kolben für 147 Stämme plus Doppel- und Leerproben wurden mit 50ml Medium (12) in 200ml Erlenmeyerkolben vorgelegt, inokuliert und bei 120 U/min geschüttelt. Nach sechs Tagen wurden die OD_{660} gemessen, die Suspension in sterile 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit der „Cryofuge8000 Sepatech“ Zentrifuge der Firma Heraeus-Christ (Osterode, D) mit einem 6-Arm-Aufsatz für 50ml Zentrifugenröhrchen bei 5000 U/min (entspricht ca. 4700g) für 10min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen, die Zellen mit sterilem pH 7 Puffer gewaschen, nochmals zentrifugiert und dann mit 50ml Medium (16) in sterile 200ml Erlenmeyerkolben überführt. Man ließ sechs Tage lang zu obigen Bedingungen schütteln, danach bestimmte man die OD_{660} Meßwerte. Ebenfalls gemessen wurden Edukt- und Produktkonzentration der Medien, die restlichen Suspensionen wurden in 50ml Zentrifugenröhrchen bei 4°C gelagert.

5.4.2.5. Literansätze in Schüttelkolben

Mit je ca. 20ml Zellsuspension aus den 200ml Schüttelkolben des Induktionstests (Seite 55 f.) wurde 1 Liter (L.) des Mediums (13) angeimpft, jenes war in 3 Literkolben vorgelegt. Nach sechs Tagen Schütteln des inokulierten Mediums mit 180 U/min bei 30°C führte man 24h Enzymtests durch.

5.4.2.6. Reaktionsverlauf in Schüttelkolben

Für den Reaktionsverlauf wurden 600ml Medium (14), ein mineralisches (min.) Medium mit einem C-Quellenmix, in 1 Liter Erlenmeyerkolben vorgelegt, welches

mit 10ml der Zellkonzentrate der neun aktivsten Stämme angeimpft wurde. Man ließ bei 30°C und 180 U/min auf dem Kühler „Lab Therm Shaker“ reagieren.

Die Medien der Stämme LE4/4.7 und AcR30A(4) wurden bereits von Anfang an, alle anderen erst ab dem Meßzeitpunkt bei 31h analysiert. Nach 97h gab man nochmals Substanz **5** steril zu, so daß eine Konzentrationserhöhung um 2g/l erreicht wurde. Damit sollten die Kulturen im Bezug auf Aktivitätsanstieg und Geschwindigkeit weiterer Produktbildung getestet werden.

Medienanalysen und OD₆₆₀ Messungen führte man laut Vorschrift durch. Bei den Enzymaktivitätsmessungen wurde die Inkubation, je nach Bedarf zwischen 5 und 40 Minuten, durch die Zugabe von 400µl Methanol gestoppt. Zu Beginn wurde ein Verhältnis von 40µl Zellsuspension und 360µl Substratlösung, ab der letzten Analyse wurden je 200µl der beiden Flüssigkeiten eingesetzt. Dies behielt man für den Rest dieser Arbeit bei. Diese Änderung wurde vorgenommen, damit man bei den Tests höhere Produktkonzentrationen erhielt, die weniger nahe an der Nachweisgrenze der HPLC lagen. Damit erreichte man kleinere relative Fehler bei den Messungen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß durch Befüllen der 1 Literkolben mit 600ml Medium stark sauerstofflimitierende Verhältnisse vorlagen. Das dürfte der Grund gewesen sein, daß kein höherer OD₆₆₀ Wert als 0,85 erreicht wurde.

5.4.2.7. Zellproduktion in Schüttelkolben

Um genügend Zellmasse für den nächsten Schritt herzustellen, impfte man je ausgewähltem Stamm vier Kolben an. Um sauerstofflimitierenden Bedingungen vorzubeugen wurden 500ml Medium (14) in 3 Literkolben vorgelegt, mit ca. 25ml Suspension angeimpft und bei 180 U/min geschüttelt.

Zur Ernte wurden die Suspensionen in 1 Liter Zentrifugenbecher überführt, für 25min mit einer „JB-6BIP“ Zentrifuge und dem 6-Arm-Aufsatz „TY JS 4.2“ der Firma Beckmann (München, D) bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden je zwei Mal mit 250ml sterilem pH 7 Phosphatpuffer gewaschen und abzentrifugiert, danach als Zellfeuchtmasse gewogen. Zur Lagerung wurden sie in ca. 45ml pH 7 Phosphatpuffer suspendiert und in 50ml Zentrifugenröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

5.4.2.8. Reaktionsumsatz in Schüttelkolben in pH 7 Puffer

Es wurde 250ml Medium (16) in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 8ml der Zellsuspension des letzten Ansatzes (siehe 5.4.2.7.) angeimpft, für 300h, bei 30°C und mit 180 U/min geschüttelt. Aufarbeitung erfolgte nach Variante 2 (Punkt 5.4.2.9.).

5.4.2.9. Chirale Analyse der Substrate

In Variante eins wurden die Medienüberstände mit gesättigter NaHCO₃ Lösung auf pH 8,5 eingestellt. Danach wurden unter starkem Rühren äquimolar, die Menge Aminester **2** war in vorangegangenen HPLC Analysen bestimmt worden, NaOH Pellets und nach deren Auflösung Propionsäureanhydrid zugegeben. Um mögliche Fehler der Analyse auszugleichen, gab man 10% mehr Reagens zu als berechnet.

Die Umsetzung wurde in Bechergläsern bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt, der Reaktionsfortschritt mittels DC und HPLC kontrolliert. Nach einer weiteren Zugabe der gleichen Mengen an NaOH und Propionsäureanhydrid, 4h nach der ersten, ließ man über Nacht rühren. Die Produkte N-Acetyl-AS-Ester **5** und N-Propionyl-AS-Ester **7** wurden mit Methylenchlorid extrahiert und als Gemisch am Rotavapor vollständig vom Lösungsmittel befreit. Die festen Rückstände wurden in 4-5ml Methanol aufgenommen und zur chiralen Analyse eingesetzt.

Bei der zweiten Variante extrahierte man zuerst nicht umgesetzten **5** mit Methylenchlorid. Um **2** in der wäßrigen Lösung (Lsg.) zu halten, wurde davor das Medium mit HCl auf pH 2,5 eingestellt. Damit wurde **2** protoniert und blieb in der wäßrigen Phase. Nach vollständiger Extraktion wurde in Bechergläsern und unter starkem Rühren mit NaOH das wäßrige Medium neutral gestellt. Danach wurde äquimolar mit NaOH in der Folge mit Essigsäureanhydrid umgesetzt und mit Methylenchlorid extrahiert. Beide organischen (org.) Phasen wurden getrennt vom Lösungsmittel befreit, in Methanol aufgenommen und in der chiralen HPLC untersucht. Damit befand sich in der ersten Fraktion nicht umgesetzter **5**, in der zweiten der wieder zu **5** umgesetzter **2** aus dem enzymatischen Umsatz.

5.4.2.10. Gradientenagarplatten

Die untere Schicht der Platten bestand aus dem nicht selektiven Agargrundmedium (6), dem 2g/l Na-Acetat als einzige C-Quelle zugefügt wurden. Dieses

goß man in die schräg gestellten Petrischalen (10cm Durchmesser) ein. Nach dem Aushärten dieser Schicht wurde die Platte waagrecht gestellt und das selektive Agarmedium (9) so eingegossen, daß auf der einen Seite das selektive Medium gerade das nicht selektive bedeckte. Um die Schichten zu unterscheiden, wurde bei der ersten Serie in die untere Schicht Rhodamin B beigemischt. Durch die geringe Schichtdicke der Platten konnte die Rotfärbung jedoch kaum von der Agarfarbe unterschieden werden. Ebenso entstanden in einigen Kolonien rote Einschlüsse. Eventuell auftretende, bei vorangegangenen Platten schon festgestellte, Eigenfärbungen mancher Kolonien konnte man nur schwer erkennen. Die Agarplatten wurden jedoch verwendet, bei den nächsten Versuchen wurde eine neue, erheblich verbesserte Variante eingesetzt.

Bei der neuen Variante wurde in die untere Schicht Methylenblau zugegeben, was diese leicht grün färbte. In die obere Schicht gab man weniger Rhodamin B als beim ersten Versuch zu. Hier konnte man die Schichten des Agargradienten gut erkennen. Zusätzlich wurde der Boden der Platte an der Stelle mit nur selektivem Medium markiert, auch konnte man die Eigenfärbung der Kolonien erkennen. Die verwendeten Stämme wurden in einer abgewandelten Form eines Verdünnungsausstriches aufgetragen, so daß man den zweiten Strich möglichst gut über den ganzen Gradienten der Agarplatte verteilte. Damit sollten Einzelkolonien über den ganzen Gradienten verteilt beobachtet werden können.

5.4.2.11. Lichtmikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde das Dialux 22 Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar, D) mit 100-fach Immersionsölokular und einer Gesamtvergrößerung von 2500-fach eingesetzt. Es wurden immer Standardglasplättchen (40x20x1,5mm) mit Deckglas (15x15x0,5mm) und Immersionsöl Leitz DIN 58884 mit dem Brechungsindex $n^e = 1,5180$ verwendet. Die Proben aus Flüssigmedien wurden steril direkt auf das Glasplättchen übertragen, Kolonien von Agarplatten wurden in einem davor auf das Glasplättchen aufgebrachten dest. Wasser Tropfen suspendiert. Dies wurde mit sterilen Platinösen durchgeführt.

6. Resultate

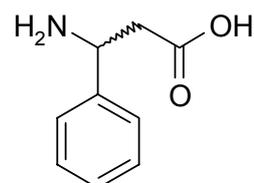
6.1. Organische Synthese

Die in Tabelle 1 angeführten Substanzen **1–7** und **15** wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit nachsynthetisiert. Zu Beginn dieser Arbeit wurden mir die von der Fa. Novartis im Labor Dr. Laumen synthetisierten Substanzen **1–5**, **8–13** und **15** freundlicherweise zur Verfügung gestellt. **14** wurde in Synthesequalität als Ausgangssubstanz für die Synthese von Verbindung **15** bezogen.

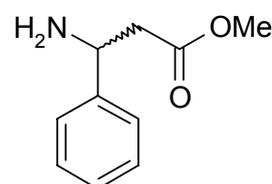
Tabelle 1 Aufzählung und Abbildung der verwendeten Screeningsubstanzen

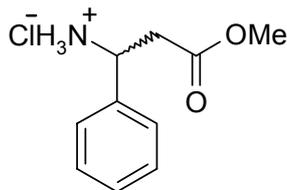
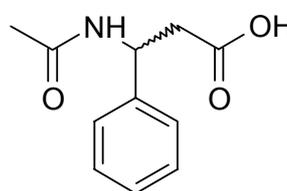
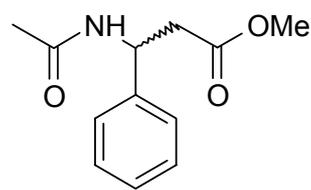
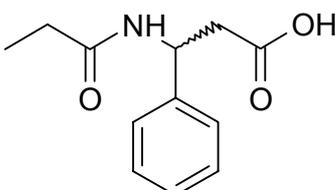
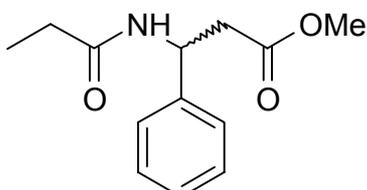
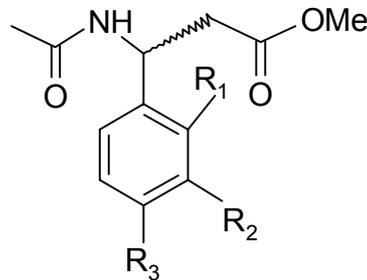
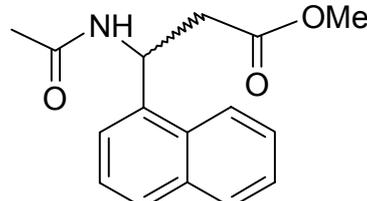
- 1** 3-Amino-3-phenylpropionsäure
- 2** 3-Amino-3-phenylpropionsäuremethylester
- 3** 3-Amino-3-phenylpropionsäuremethylesterhydrochlorid
- 4** 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäure
- 5** 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester
- 6** 3-N-Propionyl-amino-3-phenylpropionsäure
- 7** 3-N-Propionyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester
- 8** 3-N-Acetyl-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäuremethylester
- 9** 3-N-Acetyl-amino-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-propionsäuremethylester
- 10** 3-N-Acetyl-amino-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propionsäuremethylester
- 11** 3-N-Acetyl-amino-3-(4-methoxyphenyl)-propionsäuremethylester
- 12** 3-N-Acetyl-amino-3-(3-methoxyphenyl)-propionsäuremethylester
- 13** 3-N-Acetyl-amino-3-naphtyl-propionsäuremethylester
- 14** 1-Phenylethylamin
- 15** N-Acetyl-phenylethylamin

- 1** 3-Amino-3-phenylpropionsäure
MW = 165,2
MF = C₉H₁₁NO₂



- 2** 3-Amino-3-phenylpropionsäure-
methylester
MW = 179,2
MF = C₁₀H₁₃NO₂

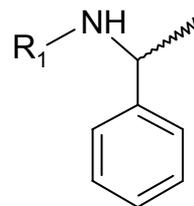


- 3** 3-Amino-3-phenylpropionsäuremethylesterhydrochlorid
 MW = 215,7
 MF = C₁₀H₁₄NO₂Cl
- 
- 4** 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäure
 MW = 207,2
 MF = C₁₁H₁₃NO₃
- 
- 5** 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester
 MW = 221,3
 MF = C₁₂H₁₅NO₃
- 
- 6** 3-N-Propionyl-amino-3-phenylpropionsäure
 MW = 221,3
 MF = C₁₂H₁₅NO₃
- 
- 7** 3-N-Propionyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester
 MW = 235,3
 MF = C₁₃H₁₇NO₃
- 
- 8 – 12**
- 8** R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Cl
9 R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OCH₃
10 R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃
11 R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OCH₃
12 R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = H
- 
- 13** 3-N-Acetyl-amino-3-naphtylpropionsäuremethylester
 MW = 257,3
 MF = C₁₅H₁₅NO₃
- 

14 – 15

14 R1 = H

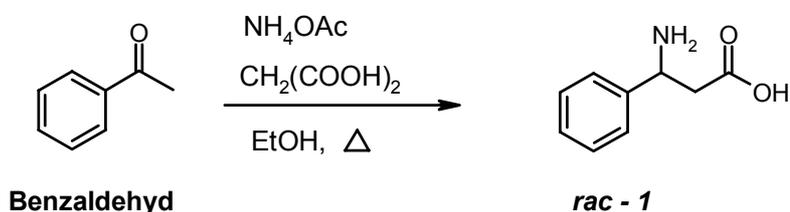
15 R1 = COCH₃



6.1.1. 3-Amino-3-phenylpropionsäure **1**

Die Herstellung der AS **1** wurde nach der Vorschrift von *Tan* und *Weaver* [1] für unsubstituierte Phenylfunktion als Eintopfsynthese durchgeführt. Ausgangssubstanzen waren Benzaldehyd, Malonsäure und Ammoniumacetat (Schema 13).

Schema 13



Gearbeitet wurde in einem Vierhalssulfierkolben mit Rührer, Rückflußintensivkühler und Tropftrichter. Die Temperierung erfolgte mittels eines elektronisch geregelten Ölbad. Nach Vorlage der Malonsäure und des Ammoniumacetats in absolutem Ethanol wurde unter Rühren Benzaldehyd zugetropft. Bei einer der weiteren Synthesen kam Methanol als Lösungsmittel zum Einsatz, jedoch waren keine Unterschiede in der Synthese bezüglich Ausbeute oder Reinheit des Produkts zu erkennen. Nach 4-6h Rühren bei ca. 70°C (mit Methanol bei ca. 55°C) wurde per DC und/oder HPLC der Reaktionsumsatz bestimmt. Unter ständigem Rühren ließ man auf Raumtemperatur abkühlen.

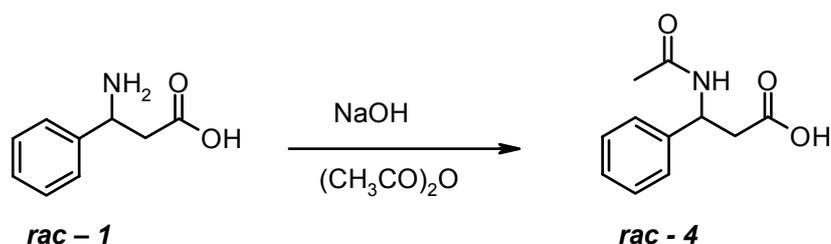
Das Produkt fiel weiß und kristallin aus. Analog zu Arbeitsvorschrift [1] wurde Zimtsäure als Nebenprodukt der Synthese festgestellt. Nach Abfiltrieren und Trocknen der weißen Kristalle über Nacht in einem Vakuumtrockenschrank der Fa. Salvis (Schweiz) bei ca. 45°C und 0,67mbar, kamen diese für den nächsten Syntheseschritt zum Einsatz. Es wurden ca. 60% der theoretischen Ausbeute erreicht. Allerdings muß gesagt werden, daß dies lediglich inklusive der Verunreinigungen, auch wenn diese laut NMR nur gering gewesen waren, erreicht wurde. Die Analyse der verunreinigten Aminosäure **1** erfolgte mittels ¹H NMR.

Daten: ¹H NMR (D₂O): δ 7,20-7,31 (m,5H), δ 4,43 (t,1H), δ 2,57-2,75 (m,2H)

6.1.2. 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäure **4**

Gelöst wurde die Aminosäure **1** mit ca. der zehnfachen Menge destillierten Wassers in einem Becherglas. Dieser Lsg. wurde unter starkem Rühren in dieser Reihenfolge äquimolare Mengen an NaOH und Essigsäureanhydrid zugegeben. Dies wiederholte man einmal nach 3-4h Rühren und Kontrollieren des Umsatzes.

Schema 14



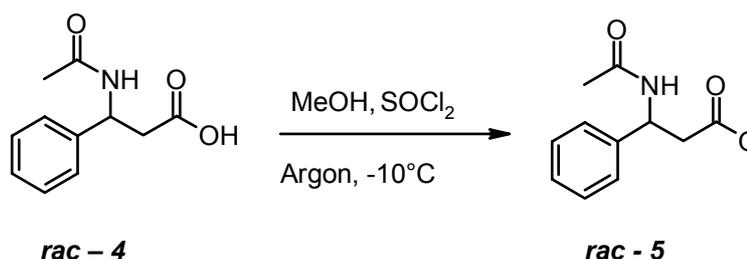
Nach einer Umsatzkontrolle wurde die wäßrige Lsg. mit HCl auf pH 2-3 eingestellt, in einen Scheidetrichter überführt und das Produkt mit Methylchlorid extrahiert. Nach Trocknen der org. Lsg. über MgSO₄ und Abfiltrieren wurde das Produkt am Rotavapor vollständig vom Lsm befreit, die weißen Kristalle pulverisiert und im Vakuumtrockenschrank zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhielt **4** zu 78-85% der theoretischen Ausbeute, wobei der geringere Wert bei größeren Ansätzen erreicht wurde. Diese Substanz wurde direkt für die Synthese von **5** verwendet. Die Analyse des Produkts erfolgte mittels ¹H NMR.

Daten: ¹H NMR (MeOD): δ 7,22-7,41 (m,5H), δ 5,36 (t,1H), δ 2,73-2,88 (m,2H), δ 1,97 (s,3H)

6.1.3. 3-N-Acetyl-amino-3-phenylpropionsäuremethylester **5**

Das Edukt wurde in absolutem Methanol gelöst und in einem Vierhalssulfierkolben vorgelegt. Rührer, Thermometer und ein Tropftrichter mit Inertgaspülungsaufsatz wurden angebracht. Die Medientemperatur von -10°C wurde mittels Außenkühlung durch eine CO₂ Eismischung in Ethanol in einem Thermokübel aufrechterhalten. Um die Aufnahme von Feuchtigkeit aus der Umgebung zu verhindern, wurde mit Argon gespült, bevor man das Reagens zugab. Die Reaktion wurde durch langsames Zutropfen von Thionylchlorid gestartet. Hierbei mußte darauf geachtet werden, daß die Temperatur über die gesamte Dauer der Zugabe des Thionylchlorids hinweg bei ca. -10°C blieb (Schema 15).

Schema 15



Erst nachdem alles Reagens zugefügt war, wurde die Kühlung des Kolbens entfernt und die Reaktion erreichte unter ständigem Rühren Raumtemperatur. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die Inertgaszufuhr gestoppt, jedoch blieb die Apparatur verschlossen. Das Produkt wurde am Rotavapor gänzlich vom Lösungsmittel befreit und auskristallisiert. Die Kristalle wurden pulverisiert und im Trockenschrank zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach der ^1H NMR Analyse wurden Verunreinigungen festgestellt (ohne Angabe der Daten).

6.1.4. Säulenchromatographie von N-Ac-AS-Methylester 5

Da die Zimtsäure nach dem ersten Schritt nicht entfernt worden war, konnte jetzt Zimtsäuremethylester als Nebenprodukt festgestellt werden. Dieser wurde in der folgenden Säulenchromatographie von dem β -AS-Ester **5** abgetrennt.

Die mit dem Rohprodukt beladene Säule wurde mit reinem Hexan gespült, um sie apolar einzustellen. Danach wurde der Zimtsäureester mit einer Mischung von Hexan/ Et_2O im Verhältnis 1/1 eluiert. Das Lösungsmittelverhältnis war in vorangegangenen Laufmittel- (R_f -)Tests mit DC Platten bestimmt worden. Es wurden mehrere Fraktionen gesammelt und mittels DC auf Produktgehalt kontrolliert. Es wurde so lange eluiert, bis kein Nebenprodukt festzustellen war. Nach Wechsel des Laufmittels auf Methylenechlorid/Methanol = 9/1 (v/v) wurde Substanz **5** von der Säule heruntergespült. Nach Vereinigung der produkt-haltigen Fraktionen wurde zunächst am Rotavapor ein Großteil, in der Folge im Vakuumtrockenschrank der Rest des Lsm verdampft. Das reine Endprodukt **5** wurde mittels ^1H NMR und HPLC bestimmt und auf seine Reinheit kontrolliert.

Daten: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,24-7,37 (m,5H), δ 6,56 (br-d,1H), δ 5,44 (q,1H), δ 3,15 (s,3H), δ 2,81-2,97 (m,2H), δ 2,15 (s,3H)

6.1.5. Synthese von Aminester **2** und Hydrochlorid **3**

Produkt **2** wurde hergestellt, indem man die nicht acylierte AS **1** wie unter 6.1.3. veresterte. Da der Ester die Referenz der enzymatischen Umsetzung des nachfolgenden Screenings war, wurde er mit ^1H NMR und HPLC analysiert.

Daten: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,23-7,38 (m,5H), δ 4,41-4,46 (m,1H), δ 3,68 (s,3H), δ 2,67-2,71 (m,2H)

Produkt **3** wurde hergestellt, indem man die AS **1** wie unter 6.1.3. veresterte, dann aber mit HCl versetzte und ansäuerte, wobei mit der Aminogruppe das Hydrochlorid gebildet wurde. Das Lösungsmittel zog man direkt aus der wäßrigen Phase ab. Die entstandenen Kristalle wurden getrocknet und pulverisiert.

6.1.6. Synthese der N-Propionyl-Substanzen **6** und **7**

Produkt **6** erzeugte man durch Acylierung der AS **1** mit Propionsäureanhydrid. Es wurde wie unter 6.1.2. vorgegangen. Ebenso verlief die Weiterreaktion zu Produkt **7** wie unter 6.1.3. . Beide Produkte wurden mit ^1H NMR analysiert.

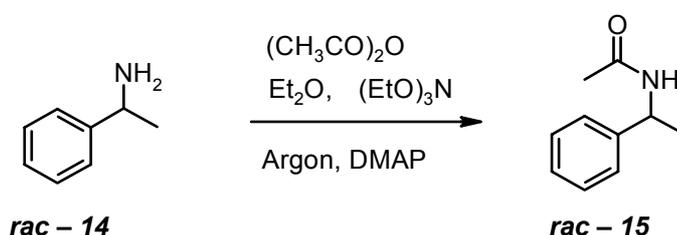
Produkt **6**, Daten: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,24-7,38 (m,5H), δ 6,60 (br-d,2H), δ 5,46 (q,1H), δ 2,85-3,02 (m,2H), δ 2,39 (q,2H), δ 1,16 (t,3H)

Produkt **7**, Daten: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,24-7,38 (m,5H), δ 6,55 (br-d,2H), δ 5,46 (q,1H), δ 3,62 (s,3H), δ 2,81-2,97 (m,2H), δ 2,26 (q,2H), δ 1,16 (t,3H)

6.1.7. Synthese von N-Acetyl-Phenylethylamin **15**

Hier wurde in einem Vierhalssulfierkolben gearbeitet. Man verwendete einen Rührer, einen Tropftrichter und einen Intensivkühler. N-Ac-PEA **14** wurde in Diethylether gelöst vorgelegt, Triethylamin und eine katalytische Menge an 4-Dimethylamino-pyridin (DMAP) zugegeben (Schema 16).

Schema 16



Die Apparatur wurde mit Argon gespült und Essigsäureanhydrid tropfenweise zugegeben, sodaß das Lsm zu sieden begann. Nach vollständiger Zugabe wurde 2h bei RT gerührt. Nach Umsatzkontrolle mit DC wurden 200ml dest. Wasser zur Etherphase zugegeben, alles in einen Scheidetrichter überführt und die org. Phase abgetrennt. Diese wurde in dieser Reihenfolge nacheinander mit 300ml 1-molarer HCl, gesättigter NaCl und NaHCO₃ Lösung ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotavapor vom Lsm befreit. Das Produkt kristallisierte aus, wurde abfiltriert und im Vakuumtrockenschrank zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Analyse erfolgte mittels ¹H NMR.

Daten: ¹H NMR: (CDCl₃), δ 7,22-7,37 (m,5H), δ 5,85 (s,1H), δ 5,07-5,17 (m,1H), δ 1,96 (s,3H), δ 1,46 (d,3H).

6.1.8. HPLC Retentionszeiten

Ziel der HPLC-Gradientenentwicklung war es, die Peaks der unterschiedlichen Edukte und der daraus umgesetzten Produkte möglichst eindeutig aufzutrennen. Die Schwankungen der Peaks lagen meist im Zehntelminutenbereich, nur der Aminester **2** stellte eine Ausnahme dar, er zeigte besonders große Verschiebungen. Dies konnte besonders bei unterschiedlichen Konzentrationen (Verdünnungsreihe) festgestellt werden. Die Retentionszeiten der analysierten Substanzen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Substanzen der HPLC Analyse stammen sowohl von org. chemisch synthetisierten Substanzen, die auch für die Verdünnungsreihen verwendet wurden, als auch von enzymatischen Umsetzungen.

Tabelle 2 Retentionszeiten der HPLC Analysen

Substanz	Retentionszeit [min]
Aminosäure 1	1,10 - 1,50
PEA 14	1,60 - 1,70
Aminester 2	1,60 - 2,60
N-Ac-Säure 4	4,40 - 4,60
N-Prop-Säure 6	4,55 - 4,70
N-Ac-PEA 15	4,65 - 4,75
N-Ac-AS-Methylester 5	4,70 - 4,85
N-Prop-AS-Methylester 7	5,08 - 5,28

6.2. Mikrobiologische Verfahren

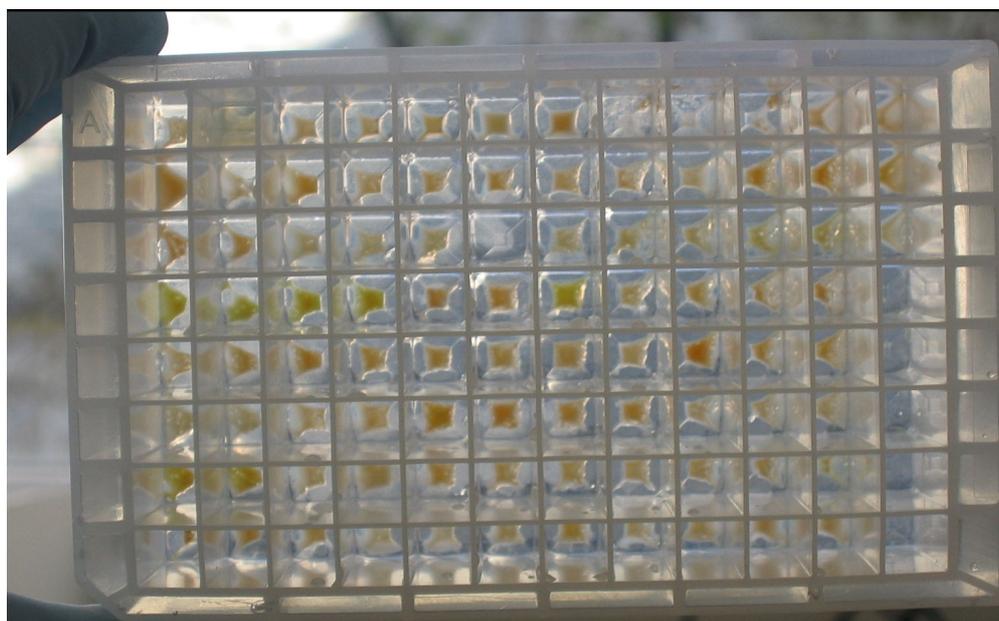
6.2.1. Screening in den 96-Lochplatten

Die ausgewählten Reinisolate aus den -80°C Kryoröhrchen wurden in die Löcher der 96er Platten übertragen (Bild 1). Zur Kontrolle der Sterilität der Medien und der Arbeitsweise wurden pro Platte in mehrere Plätze nur Medium eingefüllt.

Jedoch brachten die Versuche keine eindeutigen Ergebnisse, sodaß auf das Schüttelkolbenscreening mit höheren Volumina gewechselt wurde. Auch wurden in den Leerproben geringe Mengen an Produkt gemessen. Dies konnte nicht mit Verunreinigungen erklärt werden, da sowohl die Medien sterilisiert worden waren als auch bei den Arbeitsvorgängen in allen drei Versuchen sehr auf Sterilität geachtet worden war. Die Platinösen waren gut ausgeglüht und die „laminar flow“ Arbeitsbank war nach dem zweiten Screening zerlegt und gereinigt worden.

Die negativen Ergebnisse kamen wahrscheinlich durch die langen Inkubationszeiten der Platten und der zusätzlichen erheblichen Wartezeit von der Probenahme bis zur HPLC Analyse zustande. Das Produkt, der Aminester **2**, war schon, wie später festgestellt, teilweise abgebaut. Diese geringen Konzentrationen riefen nur minimale Peaks hervor, die knapp an der Detektionsgrenze lagen und deswegen mit der HPLC nicht mehr eindeutig nachgewiesen werden konnten. Dies wurde durch die Reaktionsansätze (Punkt 6.2.2. und 6.2.4.) bestätigt.

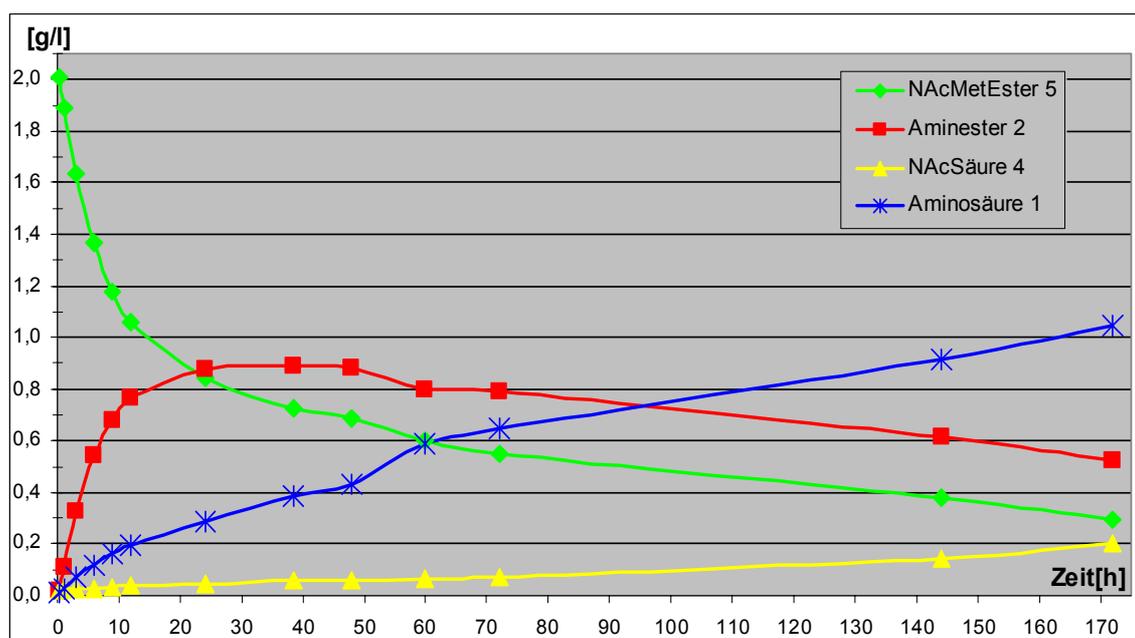
Bild 1 Inkubierte 96-Loch „Deep-Well“ Mikrotiterplatte



6.2.2. Reaktionsverlauf mit *Rhodococcus globerulus* (K1/1)

Der schon bekannterweise aktive Stamm *Rhodococcus globerulus* (K1/1) wurde in einem Reaktionsansatz als Zellfeuchtmasse zu einer pH 7 Phosphatpufferlösung mit 2g/l **5** gegeben. Es sollte damit die Enzymaktivität dieses Mikroorganismus gegenüber Substanz **5** überprüft werden. Aus dem Reaktionsverlauf wurde erkannt, daß ein Umsatz von **5** zum Aminester **2** stattfindet. Nach 35-45h erreichte **2** ein Maximum, um danach kontinuierlich abzunehmen (Diagramm 1). Dies könnte durch einen weiteren enzymatischen Abbau oder Zerfall von **2** verursacht worden sein. Auch zu beobachten war der lange Zeit kontinuierliche Abbau von **5**, was auf eine mäßige Enantioselektivität der Acylase schließen ließ. Im Laufe der Reaktion bildete sich die AS **1**, dies sprach für eine weitere enzymatische Aktivität neben der N-Acylase, die den Methylester weiter abbaute.

Diagramm 1 Reaktionsverlauf mit *Rhodococcus globerulus* (K1/1)

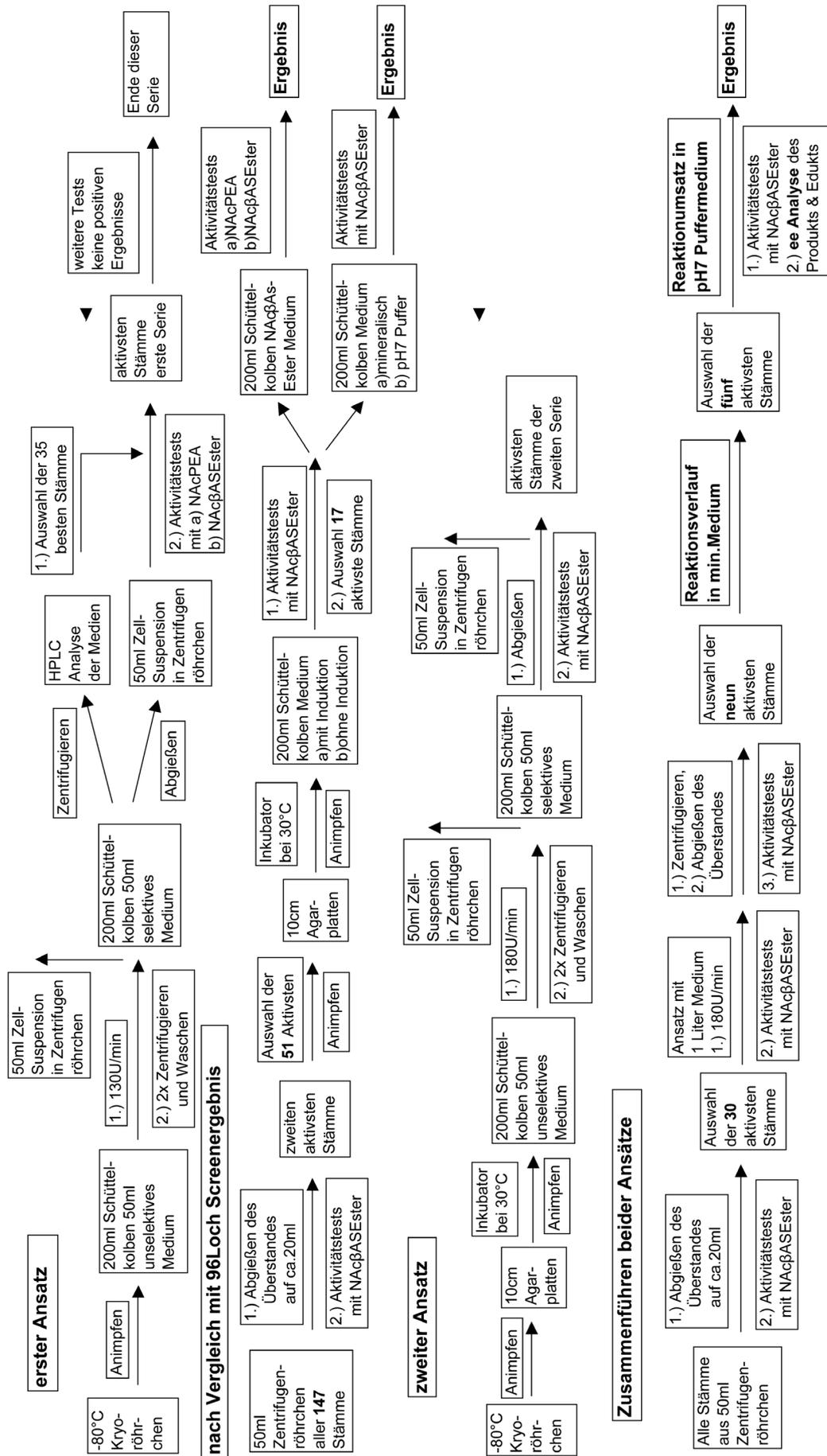


In Diagramm 1 sind die Konzentrationsverläufe von Edukt **5**, Produkt **2** und den Nebenprodukten **4** und **1** des Reaktionsverlaufs mit *Rhodococcus globerulus* (K1/1) dargestellt.

6.2.3. Reduktion von 147 auf 9 Stämme

Der Ablauf des Screenings wurde in dem Fließbild 1 auf der folgenden Seite schematisch dargestellt, danach folgt eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte.

Fließbild 1



6.2.3.1. Erstes Schüttelkolben Screening

Tabelle 2 zeigt eine Auswahl der Stämme geordnet nach der höchsten Produktkonzentration **2**. Es werden die OD₆₆₀-Werte der Ansätze eins mit N-Ac-PEA **15** und zwei mit N-Ac-Me-Ester **5** als C-Quelle angegeben. Dagegen wurde nur die Edukt- und Produktkonzentration der Medien des zweiten Ansatzes aufgelistet.

Tabelle 2 Auswahl aktivster Isolate: OD₆₆₀, Produkt- und Eduktkonzentrationen

Nr.	Name	OD-660nm Werte		Edukt 5	Produkt 2
		Ansatz 1	Ansatz 2	[mM]	[mM]
1	25D1	0,45	0,47	4,4	3,5
2	A11/3.7	0,27	0,41	4,6	2,7
3	15B2b	0,55	0,90	4,2	2,2
4	1B2	0,36	0,28	6,2	2,2
5	8B1	0,38	0,29	4,1	1,9
6	AcR11A	0,61	0,63	3,6	1,8
7	11D1	0,53	0,37	6,6	1,8
8	11D2	0,46	0,33	4,1	1,7
9	25BS2	2,77	2,71	22,6*	1,5
10	24D2weiß	0,56	0,45	7,0	1,4
11	15D2	0,85	0,65	4,4	1,3
12	Leer	0,06	0,29	6,5	1,3
13	13B1a	0,31	0,44	4,1	1,3
14	12B2	0,16	0,35	4,1	1,2
15	13D1	0,51	0,38	6,9	1,1
16	Leer	0,06	0,20	7,6	0,9
17	20D1	0,67	0,59	4,1	0,9
18	13B2	0,15	0,31	4,3	0,8
19	AcR5B	0,52	0,49	3,6	0,6
20	20D3	0,73	0,49	4,1	0,6
21	7B2	0,54	0,40	7,0	0,6
22	23D1	0,92	0,61	3,4	0,6
23	17D2	0,42	0,37	8,0	0,5
24	12D3	0,58	0,46	8,0	0,5
25	24B1a	1,01	0,80	4,0	0,5

OD₆₆₀ Werte von Ansatz 1 sind mit N-Ac-PEA **15**, Ansatz 2 mit N-Ac-Me-Ester **5** als C-Quelle. Die Angaben von Edukt **5** und Produkt **2** beziehen sich auf die im Schüttelkolbenmedium gemessene Konzentration. Eduktausgangskonzentration betrug 9 [mM]. Die Angabe „Leer“ in den Feldern bezeichnet Löcher, die als Kontrollfeld nicht mit Isolat angeimpft wurden. Mit Rot wurden die Stämme der höchsten Produktkonzentration, mit Grün die höchsten OD₆₆₀ Werte hervorgehoben.

* Bei Stamm Nr.9 erhielt man beim Eduktpeak einen falschen Wert (Gerätefehler).

Die beiden Schüttelkolbenansätze zeigten an den OD Werten, daß fast alle Stämme in beiden Medien anwuchsen. Die Stämme, die keine Produktbildung zeigten, teilten sich in zwei Gruppen. Einmal die, welche keinen oder nur geringen Eduktabbau zeigten und denen, die das Edukt bis ca. zur Hälfte ab-

bauten. Aus Tabelle 2 konnte man erkennen, daß das Edukt bei den meisten Stämmen, die Wachstum oder Umsatz zeigten, nur bis ca. zur Hälfte verwertet wurde, dies würde für deren Enantioselektivität sprechen. Man muß dabei die lange Inkubationszeit von ca. 150h miteinbeziehen. Es gab weiters Kulturen, die das Edukt **5** zwar abbauten, jedoch nur wenig Produkt **2** bildeten. Hier könnte **5** direkt zu anderen Substanzen abgebaut worden sein oder das Produkt **2** entstand zunächst und wurde in der Folge durch eine weitere Reaktion verwertet.

Bei anderen Stämmen gab es zwar Wachstum, was an den OD₆₆₀ Werten zu erkennen war, jedoch wurde nur geringer Abbau des Eduktes **5** und kaum Produkt **2** im Medium festgestellt. Bei all diesen Proben wurde eine Abnahme der OD Werte von Ansatz eins zu Ansatz zwei festgestellt (siehe grüne Felder), was die bessere Verwertbarkeit von **15** im Vergleich zu **5** zeigen könnte. Es muß hinzugefügt werden, daß bei der OD₆₆₀ Messung auch abgestorbene Zellen miterfaßt werden, was zusätzlich zu dem Fehlerbereich der Analysen die Interpretation erschwerte.

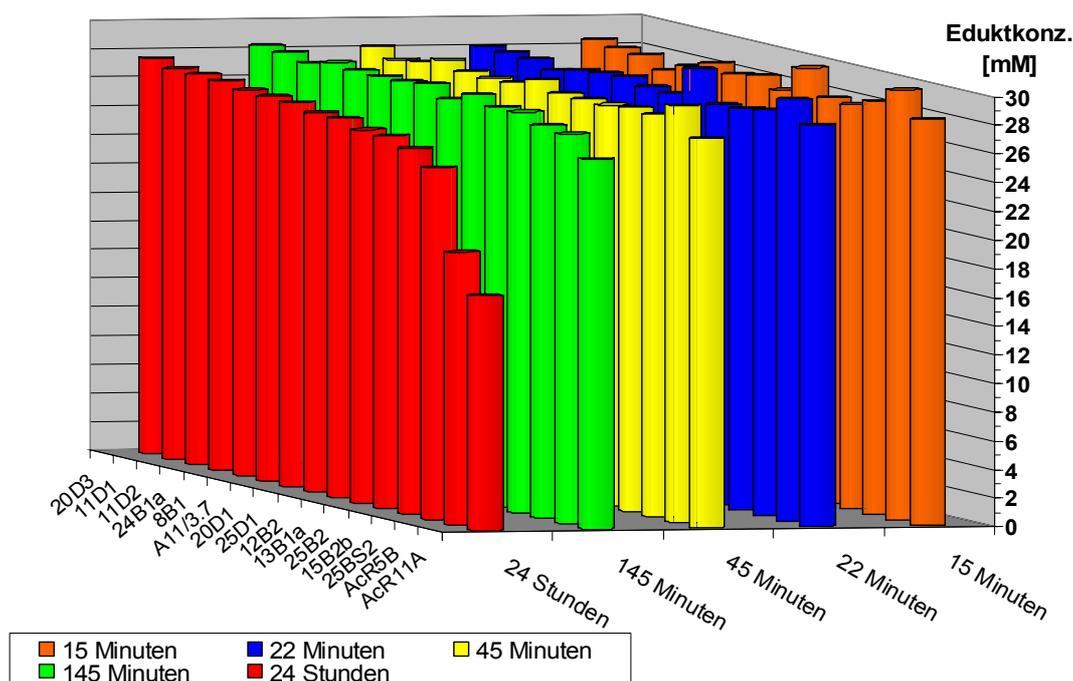
Nicht zu erklären waren die Ergebnisse bezüglich der Leerproben, eine Möglichkeit wären Meßfehler, da in den folgenden Aktivitätstests die Leerproben wie zu erwarten geringste, im Bereich des Meßfehlers, bis keine Aktivität ergaben. In der Folge wurden mit den aktivsten 34 Proben Enzymaktivitätstests durchgeführt.

6.2.3.2. Enzymaktivitätstests

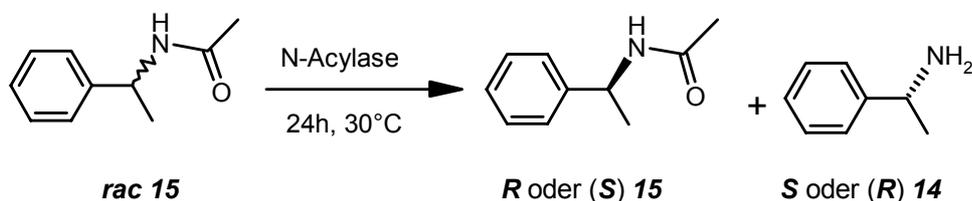
Der erste Test wurde mit N-Ac-PEA **15** als Substrat durchgeführt. Um eine genaue Analyse über den zeitlichen Ablauf zu erhalten, wurde an fünf Meßpunkten analysiert. Die Edukt- und Produktkonzentrationen wurden nach 15, 22, 45 und 145min sowie 24h Inkubationsdauer gemessen. Die ersten zwei Meßpunkte sollten im linearen Aktivitätsbereich liegen, um daraus die Enzymaktivität zu berechnen, die letzteren zwei Punkte sollten eine auftretende Substratlimitierung durch die längere Reaktionsdauer erkennen lassen (Diagramm 2).

Man konnte den Verlauf der Abnahme der Eduktkonzentration bei den aktivsten 15 Stämmen erkennen. Bei Berechnung der Enzymaktivität aus der Eduktabnahme kam man aus den Daten der Meßzeitpunkte 15 und 22 Minuten zu Werten von 110 - 150 [IU], wenn man hingegen über die Produkt-(PEA) Zunahme analysierte, konnte man aus den Zeitpunkten 45min und 145min sowie 24h nur auf geringere Werte im Bereich von 30 - 60 [IU] extrapolieren.

Diagramm 2 Auswahl der aktivsten Stämme des ersten Enzymaktivitätstests



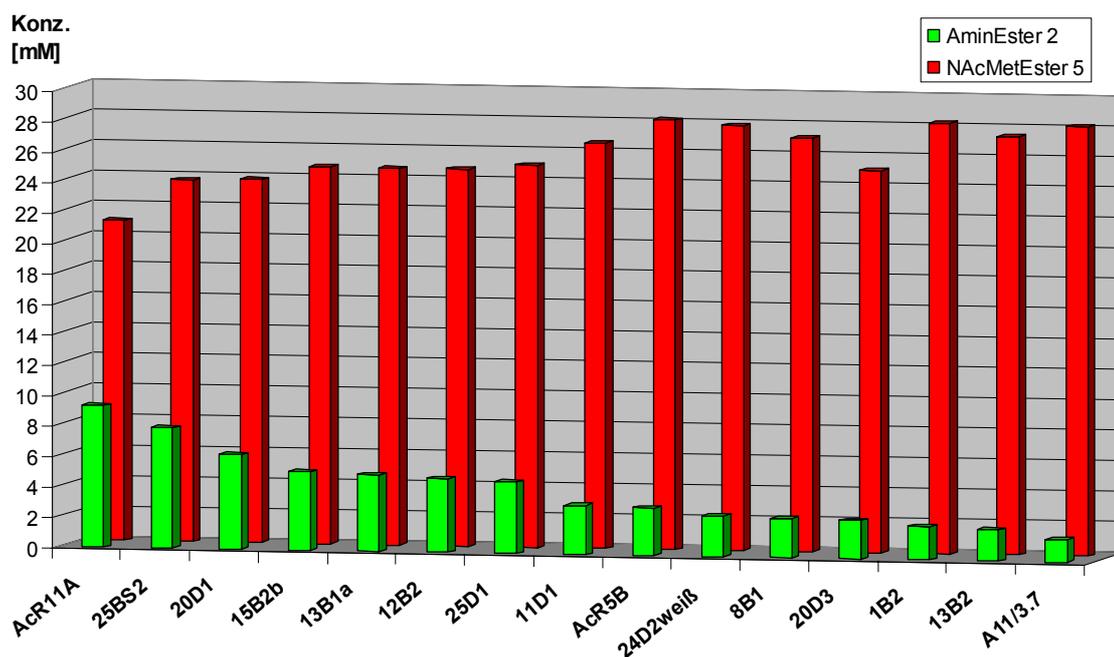
In Diagramm 2 wurde die Abnahme des Eduktes **15** dargestellt. Jede Farbe stellt einen bestimmten Analysezeitpunkt dar (siehe Legende). Die z-Achse gibt die Konzentration des Eduktes in [mM] an. Die Eduktausgangskonzentration betrug 30,6 [mM]. Es wurden die 20 aktivsten Stämme ausgewählt. Reaktionsschema des Aktivitätstests:



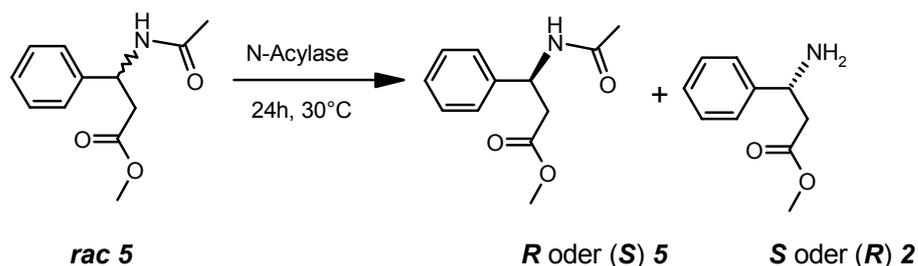
Mit denselben Stämmen wurde ein zweiter 24h Aktivitätstest durchgeführt, in diesem Fall mit N-Ac-β-AS-Methylester **5** als Edukt. Hier wurde lediglich die Aktivität nach 24h gemessen, da die Umsätze zu früheren Zeitpunkten gering waren und zu diesem Zeitpunkt nur die Aktivität an sich und nicht die Umsatzrate für uns interessant war (Diagramm 3). Hier konnte man ebenfalls die Abnahme von **5** erkennen sowie die Zunahme von **2**. Es konnte festgestellt werden, daß die Umsetzung weniger schnell als zuvor mit N-Ac-PEA verlief.

Nach Vergleich der aktivsten Stämme der 96-Loch Mikrotiterplattenversuche mit den aktivsten des ersten Schüttelkolbenansatzes wurden 19 Stämme ausgewählt. Die in 50ml Zentrifugenröhrchen gelagerten Kulturen wurden nach Abgießen des Überstandes auf ca. 20ml für einen weiteren 24h Aktivitätstest mit **5** herangezogen, um die Ergebnisse der 96-Lochplatten zu überprüfen.

Diagramm 3 Auswahl der aktivsten Stämme des zweiten Enzymaktivitätstests



In Diagramm 3 sind die aktivsten Stämme des zweiten Aktivitätstests aufgelistet. Die Eduktausgangskonzentration (Substanz **5** roter Balken) betrug 30,6 [mM], Produkt **2** in Grün zu erkennen.



Da hier weitere aktive Stämme entdeckt wurden, erfolgte ein nochmaliger Test aller übrigen Stämme, wobei wieder vom Überstand der Zellsuspensionen auf ca. 20ml abgegossen wurde. Tabelle 3 zeigt die Auswahl der aktivsten Stämme. Es wurde nach der höchsten Produktkonzentration **2** geordnet.

Durch die höheren Zelldichten wurden größere Umsätze erreicht, wobei aber nicht mehr als 50% des Eduktes abgebaut wurden. Das zeigte wahrscheinlich eine Enantioselektivität der Acylasen, eine genauere Untersuchung erfolgte erst nach der Auswahl der neun aktivsten Stämme. Es zeigte sich, daß diese Umsetzung unter Einbeziehung der Meßfehler ohne Nebenprodukte verlief. Mit den 51 aktivsten Stämmen dieses Tests wurden die folgenden weiteren Untersuchungen durchgeführt. Alle ausgewählten Stämme zeigten eine Aktivität größer als 6,5 [mM] = 1 [g/l] Produktkonzentration in diesem 24h Aktivitätstest.

Tabelle 3 Auswahl der aktivsten Isolate des zweiten Aktivitätsgesamttests

Nr.	Isolatname	Edukt	Produkt	Summe
		5	2	5 + 2
		[mM]	[mM]	[mM]
1	E38/1	15,9	16,7	32,6
2	U72/1	15,6	16,3	31,9
3	D2/2	15,7	15,3	31,0
4	23BS	17,6	14,4	32,0
5	LE5/3.6.5	17,4	14,2	31,6
6	AcR30A	17,2	14,0	31,2
7	LE2/6a.6.5	18,3	14,0	32,3
8	K3/4.6.5	19,9	13,8	33,7
9	23D2	17,3	13,5	30,8
10	W2.6.5	18,6	13,4	32,0
11	E56/1	19,1	12,7	31,9
12	U46/1	19,3	12,4	31,7
13	10B1	19,8	12,4	32,2
14	G4.6.5	20,7	11,8	32,5
15	11B2	20,6	11,8	32,3
16	UV43/2	20,0	11,5	31,5
17	EMS41/2	20,2	11,5	31,6
18	U80/1	20,7	11,5	32,2
19	17D1	20,4	11,4	31,9
20	AC1	21,5	10,8	32,3
21	AC20	20,5	10,7	31,2
22	E38/1	21,7	10,5	32,2
23	UV58/2	22,3	10,3	32,5
24	15B2a	21,6	10,2	31,8
25	A13/1.6.5	22,1	10,0	32,1

In Tabelle 3 ist eine Auswahl der aktivsten Stämme des 24h Enzymaktivitätstests aufgelistet. Das Edukt war N-Ac- β -AS-Me-Ester **5** mit einer Ausgangskonzentration von 30,6 [mM]. Die letzte Spalte der Tabelle zeigt die Summe von Edukt **5** und Produkt **2** nach der Umsetzung.

6.2.3.3. Induktions- und Eduktspezifitätstest

Die aktivsten 51 Stämme, Tabelle 3 zeigt eine Auswahl, wurden direkt aus den Zentrifugenröhrchen auf Agarplatten mit Medium (7) überimpft. Mit jeweils zwei Einzelkolonien wurden pro Platte je zwei Flüssigmedien, das eine, Medium (13), mit, das andere, (10), ohne Induktor, angeimpft. Dem Medium (10) wurden 1,4g/l Natriumacetat als einzige C-Quelle hinzugefügt. Getestet wurde das Verhalten der Zellen durch einen nachfolgenden Aktivitätstest mit N-Ac- β -AS-Ester **5** als Substrat. Es wurden je 50ml beider Lösungen in 200ml Erlenmeyerkolben vorgelegt, angeimpft und, wie alle folgenden, bei 180 U/min geschüttelt. Durch die höhere Umdrehungszahl konnte die Sauerstoffversorgung verbessert werden. Im Gegensatz zu den ersten Versuchen trat keine Schaumbildung mehr auf. Nach sechs Tagen Schütteln erfolgte die Bestimmung der OD₆₆₀ Werte und der Enzymaktivitäten. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse dieses Tests.

Tabelle 4 Auswahl der aktivsten Stämme des Aktivitätstests zur Induktion

Stammname	OD 660	mit Induktion:		ohne Induktion:		
		Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]	OD 660	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]
AcR30A	0,49	28,4	4,4	0,12	29,6	0,1
K3/4.6.5	0,48	30,3	3,7	0,50	31,1	0,3
11B2	0,41	31,4	2,7	0,53	33,9	0,5
AC22 gelbe Kol.	0,49	31,3	1,4	0,48	33,0	0,1
K3/4.6.5 orange Kol.	0,28	31,7	1,1	0,50	31,1	0,3
D2/2	0,26	31,5	1,0	0,37	32,4	0,0
LE4/4.7	0,44	31,6	1,0	0,53	32,7	0,3
25BS2	0,36	31,4	0,5	0,45	32,1	0,3
AC22	0,26	32,2	0,3	0,48	33,0	0,1
UV43/2	0,18	33,0	0,3	0,09	33,6	0,0
E34/1	0,21	31,3	0,3	0,50	32,5	0,3
U80/1	0,14	33,2	0,3	0,08	33,1	0,0
U69/1	0,18	31,1	0,3	0,11	30,2	0,0
E38/1	0,16	30,2	0,2	0,37	33,3	0,1
15B2a gelbe Kol.	0,34	32,9	0,2	0,09	33,5	0,0
G1.7	0,17	32,9	0,2	0,55	31,3	0,0
AC20 gelbe Kol.	0,75	33,8	0,2	0,32	34,2	0,1

In Tabelle 4 werden die Daten des 24h Enzymaktivitätstest mit Edukt **5** aufgelistet, die Ausgangskonzentration betrug 32,5mM, das Produkt ist Substanz **2**. In den ersten Spalten sind die Konzentrationen der induzierten Stämme, in den letzteren die, der nicht induzierten angegeben. Die Induktion im entsprechenden Medium erfolgte durch Zugabe von 1g/l N-Ac-PEA **15**. Das Medium ohne Induktion bestand aus 1,4g/l Na-Acetat als einzige C-Quelle. Die blau markierten sind die aktivsten Stämme. Die Bezeichnungen orange und gelbe Kolonie bedeuten, daß hier von der Agarplatte eine so gefärbte Einzelkolonie zum Animpfen eines Flüssigmediums verwendet wurde.

In Tabelle 4 sind die aktivsten Stämme des Induktionstests aufgelistet. Man konnte deutlich den Unterschied zwischen induzierter (grün) und nicht induzierter (rot) Serie erkennen. Das Ergebnis war, daß nur Kolonien mit Induktion höhere Produktkonzentrationen aufwiesen. Daraus konnte man folgern, daß das Enzym induzierbar war.

Aus den obigen Tests wurden die 17 aktivsten Stämme für den nächsten Versuch ausgewählt und weiterverwendet. Nach Schütteln für 84h in Medium (10) mit 2g/l N-Ac-β-AS-Methylester **5** als einzige C-Quelle wurden 24h Enzymtests sowohl mit N-Ac-PEA als auch mit N-Ac-β-AS-Methylester als Substrat durchgeführt, um unterschiedliche Aktivitäten gegenüber den beiden Substanzen zu erkennen. Ab diesen Tests wurden Substratkonzentrationen von 25mM eingesetzt.

Das Experiment brachte kein eindeutiges Ergebnis, denn es gab einerseits Stämme die **5**, andere die **15** schneller umsetzen konnten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Auszug aus den Daten der vergleichenden Aktivitätstests

Stammname	AminEster 2	PEA 14	Differenz
	[mM]	[mM]	[mM]
AcR30A	8,6	8,0	0,6
AcR30A gelbe Kol.	0,6	1,3	-0,6
K3/4.6.5 orange Kol.	3,2	2,8	0,4
K3/4.6.5	0,3	0,6	-0,2
W2.6.5	5,0	2,4	2,5
D2/2	0,8	0,7	0,1
11B2	1,5	0,7	0,9
25BS2	1,1	1,1	-0,0
AC22	0,6	0,7	-0,1
AC22 gelbe Kol.	0,2	5,4	-5,2
LE4/4.7	1,0	1,2	-0,2

In Tabelle 5 wurden die Daten je eines 24h Aktivitätstest mit Substanz **5** (erste Spalte) und mit Substanz **15** (zweite Spalte) als Substrat aufgelistet. Die angeführten Konzentrationen beziehen sich auf den gebildeten Aminester **2** (erste Spalte) und PEA **14** (zweite Spalte).

Die 17 Kolben dieses Ansatzes wurden für einen weiteren Test zweier unterschiedlicher Medien verwendet: zum einen (13) ein mineralisches, zum anderen (16) ein pH 7 Phosphatpuffermedium. Nach Inkubation wurden die OD₆₆₀ Werte gemessen und ein 24h Aktivitätstest durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6 Vergleich der Aktivität in min. Medium (13) und pH 7 Medium (16)

Stammname	OD 660	min.Med.	OD 660	pH7 Med.	Differenz
		Produkt [mM]		Produkt [mM]	
AcR30A	0,63	6,8	0,47	7,4	-0,5
K3/4.6.5	0,35	0,8	0,18	0,6	0,3
K3/4.6.5,orange	0,49	2,1	0,20	0,9	1,1
K3/4.6.5	0,44	0,6	0,20	0,2	0,4
W2.6.5	0,30	1,8	0,16	0,5	1,3
D2/2	0,21	0,6	0,14	0,2	0,4
AcR30A,gelb	0,33	0,9	0,13	0,3	0,6
11B2	0,36	1,1	0,21	0,2	0,9
11B2	0,31	1,1	0,17	0,2	0,9
25BS2	0,28	0,4	0,17	0,3	0,1
25BS2	0,27	1,3	0,15	0,1	1,2
AcR30A	0,77	6,8	0,52	6,4	0,4
AC22	0,29	1,0	0,11	0,2	0,8
AC22,gelb	0,67	0,5	0,42	0,2	0,3
AC22	0,37	0,5	0,16	0,2	0,3
LE4/4.7	0,26	1,0	0,18	0,2	0,8
LE4/4.7	0,33	1,3	0,24	0,2	1,1

In Tabelle 6 wurden die Daten der OD₆₆₀ Messungen der Medien und von 24h Aktivitätstests, mit Substanz **5** als Substrat und mit Substanz **2** als Produkt aufgelistet. In der letzten Spalte wurde die Differenz der Produktkonzentrationen gebildet.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war, daß alle Isolate im komplexen mineralischen Medium zu höheren Zelldichten (OD_{660}) wuchsen. Bei der Aktivität wurde festgestellt, daß bis auf den ersten Stamm AcR30A alle übrigen im mineralischen Medium höhere Aktivitäten zeigten. Das könnte man bei gleich angenommener Expression des Enzyms mit den höheren Zelldichten erklären.

6.2.3.4. Zweiter Screeningansatz

Als Kontrolle wurde ein zweiter Screeningansatz durchgeführt. 147 Isolate aus den -80°C Kryoröhrchen und zusätzliche Leerproben wurden verwendet. Der einzige Unterschied war, daß hier zu Beginn Agarplatten angeimpft wurden und immer mit 180 U/min zur besseren Sauerstoffversorgung geschüttelt wurde. Nach dem letzten Schritt des Screenings wurde ein 24h Aktivitätstest durchgeführt.

6.2.3.5. Zusammenführung beider Ansätze

Um sicherzugehen, daß man für die nächsten Schritte die Kolonien der höchsten Viabilität und Aktivität aller zur Verfügung stehenden verwendete, wurden nochmals alle auf ihre Aktivität getestet. Um mit höheren Zelldichten zu messen, wurde der Überstand in den 50ml Zentrifugenröhrchen auf ca. 20ml abgegossen.

Aus allen Aktivitätstests wurden die 30 aktivsten Proben ausgewählt, dies waren die Stämme: U55/1, D1/3, K2/2.7, UV43/2, E38/1, W2.6.5, D3/1, LE4/4.7, 25BS2, A9/1.7, K3/4.6.5 und AcR30A.

Um auf die Anzahl 30 zu kommen, muß erklärt werden, daß 19 verschiedene Proben des Stammes AcR30A aus verschiedenen Ansätzen verwendet wurden, da diese Proben, hier wie auch in allen vorangegangenen Tests, immer als eine der aktivsten aufgefallen waren. Mit je ca. 20ml Zellsuspension der ausgewählten 30 Isolate wurde 1 Liter des Mediums (13), welches in 3 Literkolben vorgelegt war, angeimpft und geschüttelt. Im Anschluß führte man OD_{660} Messungen der Medien und Aktivitätstests aller Proben durch.

Dieser Test zeigte die aktivsten Stämme in größeren Volumina. Man konnte wieder einige hohe Produktkonzentrationen, das bedeutet hohe Enzymaktivität, erkennen. Um höhere Zelldichten zu erhalten, wurden die Literansätze zentrifugiert, der Überstand auf ca. 45ml abgegossen. Zur Auswahl der neun aktivsten Stämme führte man Aktivitätstests dieser Konzentrate durch (siehe Punkt 6.2.4.).

6.2.4. Reaktionsverlauf der 9 Stämme in min. Medium

Zur Reduktion der Auswahl auf neun Kolonien wurden Aktivitätstests der Konzentrate der obigen 1 Literkolben durchgeführt. Aus diesen wurden sechs Stämme ausgewählt. Zusätzlich wurden drei Stämme aus den Zentrifugenröhrchen des ersten Ansatzes ausgewählt, da diese hohe Umsätze gezeigt hatten, auch hier wurde nochmals deren Aktivität bestimmt. Es muß erwähnt werden, daß auf Grund der höheren Zelldichten ($OD_{660} = 3$ bis 10) die Tests nur über eine kürzere Dauer als 24h durchgeführt wurden (siehe Tabelle (7) und (8)).

Tabelle 7 16h Aktivitätstest, Auswahl aus den 1 Liter Ansätzen

Nr.	Name	OD 660	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]
26	UV43/2	5,43	11,3	12,8
30	E38/1	5,47	11,7	12,4
10	AcR30A,25ml	9,17	14,5	12,4
22	U55/1	3,21	13,6	10,1
25	W2.6.5	4,91	14,7	9,3
24	LE4/4.7	7,32	13,7	9,1
2	AcR30A,pH7	4,07	15,8	7,0
27	25BS2	4,04	17,8	5,6
28	K2/2.7	3,95	19,7	3,7
18	AcR30A,pH7	6,06	19,1	9,5

In Tabelle 7 werden die aktivsten Stämme des Aktivitätstests angegeben. Die in Rot dargestellten Stämme wurden für den Reaktionsansatz ausgewählt. Der blau geschriebene Stamm wurde als zusätzlicher Stamm im enzymatischen Umsatz (Punkt 6.2.6.) eingesetzt. Die AcR30A Stämme werden durch ihre Nummer, hier „10“ und „18“ unterschieden.

Tabelle 8 24h Test, Auswahl der aktivsten Stämme aus dem ersten Ansatz

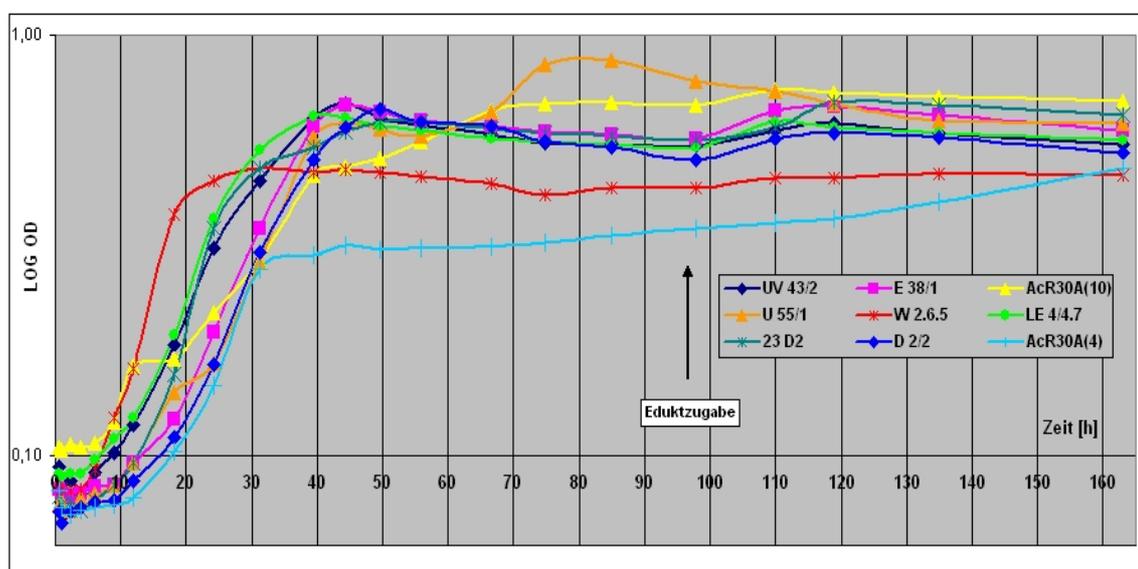
Nr.	Name	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]
120	23D2	16,6	6,9
136	D2/2	15,5	6,5
4	AcR30A	16,4	6,0
145	E38/1	18,4	5,0
64	G4.6.5	18,6	3,3
153	11B2	20,2	2,4
43	UV43/2	19,7	2,4
85	U46/1	21,0	2,3
41	U80/1	20,0	2,3
67	LE2/6a.6.5	19,5	2,3
76	W2.6.5	21,8	2,3

In Tabelle 8 sind die Daten einer Auswahl der aktivsten Stämme eines 24h Aktivitätstest aufgelistet. In Rot sind drei der ausgewählten Kolonien für den folgenden Reaktionsverlauf notiert.

Als Ergebnis der beiden Tests folgte die Auswahl der neun aktivsten Stämme mit denen die folgende enzymatische Umsetzung durchgeführt wurde. Ein Überblick über den Verlauf der Reaktion wird in den folgenden Diagrammen gegeben.

In Diagramm 1 wurde das Zellwachstum durch die OD Werte analysiert. Nach einer kurzen „Lag-Phase“ zu Beginn gingen die Mikroorganismen nach 6 bis 18h in die logarithmische (log.) Wachstumsphase über, welche mit einer Stagnation des Wachstums nach 18 bis 50h endete. Das Wachstum nach N-Ac-β-As-Ester **5** Zugabe bei 97h Reaktionsdauer, durch den Pfeil in den Diagrammen gekennzeichnet, war bei dem Stamm U55/1 negativ, bei den übrigen Kulturen für kurze Zeit (ca.20h) wenig steigend, danach wieder abnehmend. Eine Erklärung könnte sein, daß die Stämme zu Beginn die leichter zu verwertende C-Quelle Na-Acetat umsetzten, den N-Ac-β-As-Ester **5** und N-Ac-PEA **15** jedoch nicht oder nur schlecht verwerten konnten, denn dazu mußte die Enzymexpression erst induziert worden sein. Weshalb nach der Zugabe von 13mM = 2g/l Edukt **5** nach 97h kein weiteres oder kaum Wachstum auftrat, kann am besten mit der Sauerstofflimitierung erklärt werden. Denn durch den Einsatz von mineralischem Medium sollten alle anderen Anforderungen für ein Wachstum erfüllt worden sein.

Diagramm 1 OD₆₆₀ Werte, logarithmische Skala

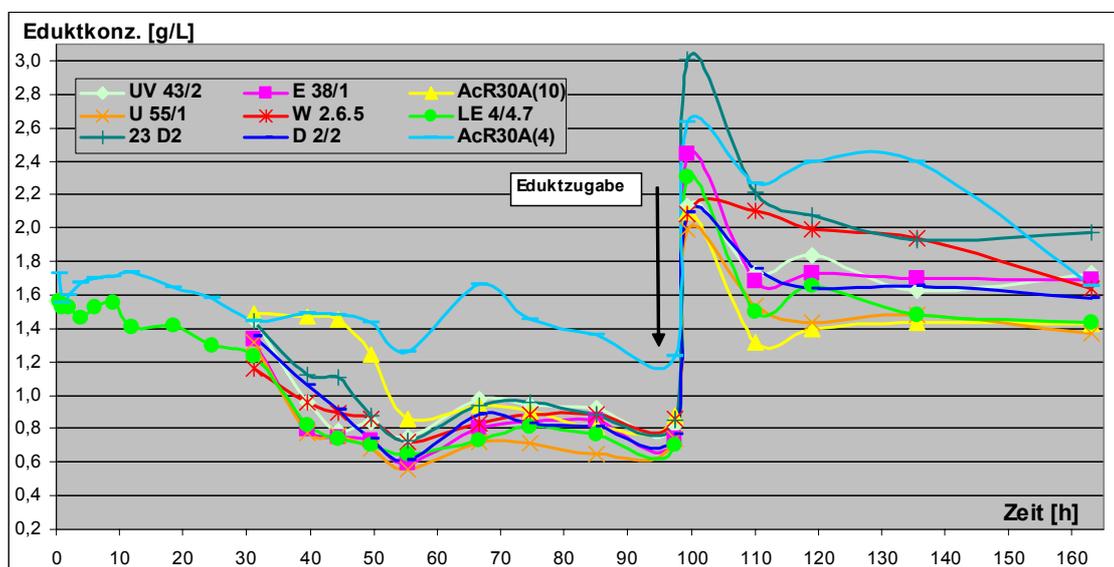


Die OD₆₆₀ Werte des Reaktionsverlaufs werden mit logarithmischer Skala aufgetragen. Der Pfeil bei 97h kennzeichnet die Zugabe von 13mM = 2g/l N-Ac-β-As-Ester **5** zu jedem der Medien.

In Diagramm 2 wurde der Verlauf der Konzentrationen von N-Ac-β-As-Ester **5** in den Medien dargestellt. Die beiden anderen C-Quellen, Na-Acetat und N-Ac-PEA **15** wurden darin nicht berücksichtigt. Der N-Ac-PEA **15** Konzentrationsverlauf

zeigte allerdings Ähnlichkeiten zu dem des N-Ac-β-AS-Esters **5**, ohne Angabe der Daten (sind in den HPLC Unterlagen vorhanden). Wie man an den beiden Stämmen, die von Beginn an gemessen wurden, erkennen konnte, wurde **5** zu Beginn kaum abgebaut, mögliche Gründe hierfür wurden bereits erläutert. Erst ab ca. Stunde 30 bis 55 wurde dieser dann abgebaut. Durch Fehler bei den Manipulationen und der HPLC Analyse könnte die Eduktzunahme zwischen den Stunden 65 und 85 erklärt werden. Es scheint, daß alle Proben aus diesen drei Serien überhöhte Werte ergeben hatten. Festgestellt werden konnte, daß ca. die Hälfte des Edukts abgebaut wurde. Nach der Esterzugabe **5** bei 97h konnte man dessen raschen Abbau erkennen, dies würde die Annahme der Induktion bestätigen und die Umsetzung von Na-Acetat zu Beginn, vor **15** und **5** erklären.

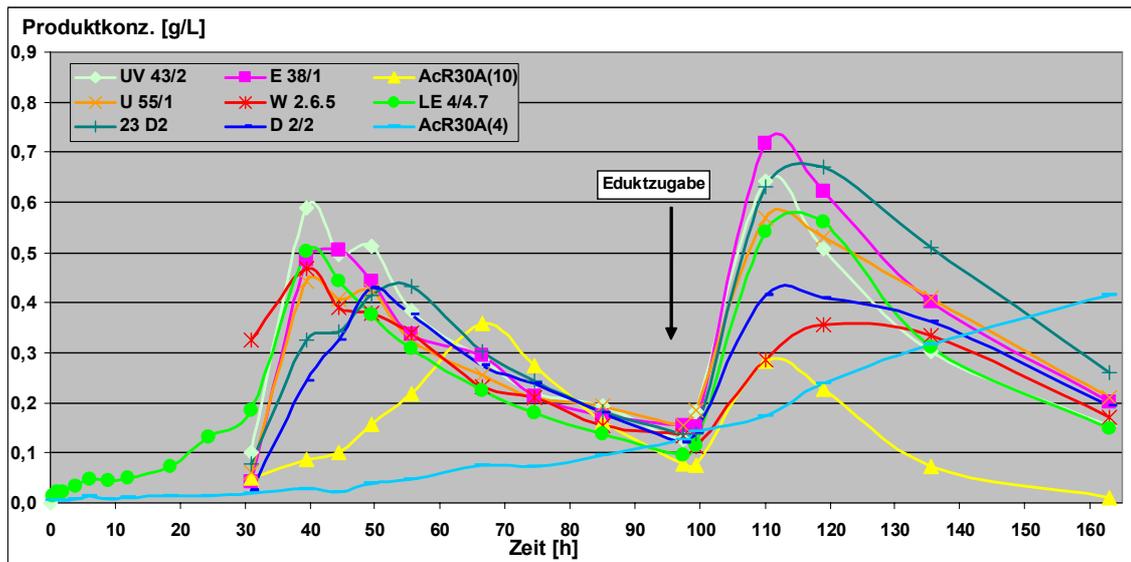
Diagramm 2 N-Ac-β-As-Ester **5** Konzentrationsverlauf der Medien



In Diagramm 2 wird der Konzentrationsverlauf des Eduktes **5** dargestellt. Der Pfeil bei Stunde 97 kennzeichnet die Zugabe von 2g/l Edukt **5**. Es wurden zu Beginn nur zwei Stämme zur Medienanalyse eingesetzt, siehe hellblaue und grüne Linie, erst ab Stunde 31 wurden alle analysiert.

Die Analyse der Produktkonzentrationen **2** zeigte auf, daß nach langsamem Anstieg zwischen 40 und 65h ein Maximum durchlaufen wurde und die Konzentrationen nach diesem Zeitpunkt kontinuierlich abnahmen (Diagramm 3). Nach der Zugabe von Edukt **5** nach 97h wurde in Analogie zur obigen Aussage auch hier das schnelle Reagieren des Systems auf die N-Ac-β-AS-Esterzugabe **5** festgestellt. Die Produktkonzentration **2** erreichte schon nach ca. 15h ein Maximum, um danach wieder abzunehmen. Diese Produktabnahme konnte durch eine weitere enzymatische Aktivität erklärt werden, der Ester **2** wurde zur Säure **1** abgebaut. Ein Zerfall sollte unter den vorliegenden Bedingungen nicht auftreten.

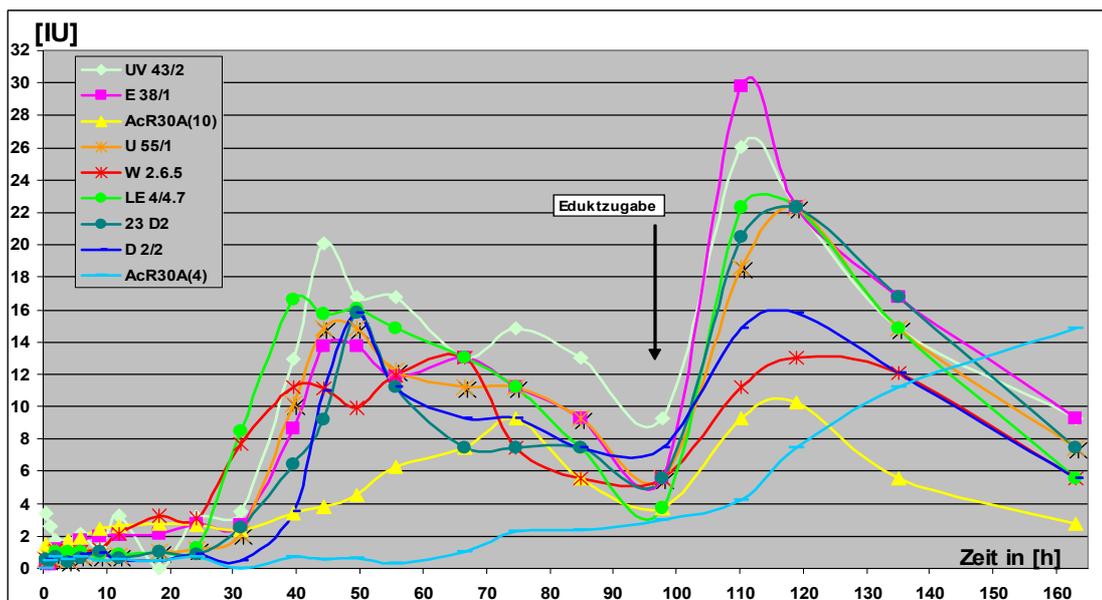
Diagramm 3 Verlauf der Produktkonzentrationen **2**



Darstellung des Verlaufs der Produktkonzentrationen, des Aminesters **2** in den jeweiligen Medien der neun Kulturen. Der Pfeil bei 97h kennzeichnet die Zugabe von 13mM = 2g/l Edukt **5**.

Die Aktivitäten der N-Acylasen wurden bei dieser Untersuchung durch 5-40 – minütige Aktivitätstests bestimmt. Die Enzymaktivität jedes Stammes erreichte gleichzeitig oder kurz nach dem Maximum der Produktkonzentration im Medium ihrerseits die größten Werte (Diagramme 3 und 4). Des Weiteren konnte man erkennen, daß die Acylaseaktivität mit dem Verbrauch des Substrats zurückging.

Diagramm 4 Verlauf der Acylaseaktivität



In Diagramm 4 wurden die Acylaseaktivitäten in [IU] angegeben. Diese wurden aus den nach 30min gemessenen Werten der Aktivitätstests berechnet.

Je kürzer die Testdauer war um so höhere Aktivitäten erhielt man. Für 5min wurden zwischen 50-100 [IU], für 10 und 15min zwischen 25-40 [IU] berechnet. Diese waren allerdings durch die geringen Umsetzungen, die wiederum nahe an der Nachweisgrenze der HPLC lagen, mit großen Unsicherheiten behaftet. In Diagramm 4 sind die Daten für 30min dargestellt, die höchsten Aktivitäten traten bei 40-50h und 110-120h Reaktionsdauer auf. Der schnelle Eduktabbau nach der Zugabe bei 97h könnte durch die schon induzierte Acylaseaktivität sowie dem Fehlen alternativer C-Quellen, wie Na-Acetat oder **15**, erklärt werden. Auch das zu Beginn hinzugefügte **15** konnte nicht vollständig verwertet werden und blieb zu einem gewissen Anteil im Medium zurück, was neben dem enantio-selektiven Abbau von **5** auch auf einen ebensolchen von **15** schließen ließ.

Die „Ausreißer“ dieses Tests waren die beiden AcR30A Stämme, besonders Nr.4 (hellblaue Kurve), welcher nach einer kürzeren logarithmischen Wachstumsphase nicht stagnierte, sondern geringfügig und kontinuierlich wuchs. Auch die übrigen Diagramme zeigten Unterschiede der AcR30A Stämme, die bei den Produktkonzentrationen und Aktivitäten sehr niedrige Werte oder schnelle Abnahme zeigten. Auffällig war die kontinuierliche Zunahme der Aktivitäten auf niedrigem Niveau, die die langsame Induktion des Enzyms und/oder langsames Wachstum anzeigen würde. Eine Erklärung wäre eine Sauerstofflimitierung, andererseits könnte es auch ein Zeichen für eine Mischkultur sein, die durch die vorhergehenden Manipulationen, wahrscheinlich seit den Literansätzen, aufgetreten war. Eine weitere Interpretation, daß die unterschiedlichen Formen und Größen der Organismen unter dem Lichtmikroskop nur eine andere Lebensform darstellten, wäre möglich, schien aber unwahrscheinlich (Bilder 5-15, Seiten 70-72).

6.2.5. Zellernte bei höchster Aktivität in min. Medium

Als Konsequenz aus den vorangegangenen Versuchsergebnissen sollte die Zellmasse für den Reaktionsumsatz unter nicht sauerstofflimitierenden Bedingungen produziert und zum Zeitpunkt höchster Aktivität, und damit höchster Produktkonzentration im Medium, geerntet werden. Man ging davon aus, daß dieser Punkt zwischen 40-70h Reaktionsdauer erreicht wäre. Nach einem 8h Aktivitätstest wurden die fünf rot geschriebenen Stämme UV43/2, E38/1, AcR30A(10), LE4/4.7 und AcR30A(4) (Tabelle 9), und ein zusätzlicher aus den Konzentraten der Literansätze (siehe Tabelle 7, Seite 59) ausgewählt, dies war AcR30A(18).

Tabelle 9 Acht Stunden Aktivitätstest, Daten der neun Stämme

	Name	OD 660	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]
1	LE4/4.7	7,01	19,1	8,1
2	UV43/2	5,08	21,7	7,8
3	AcR30A(10)	9,11	20,5	7,2
4	E38/1	4,64	22,4	4,9
5	23D2	5,06	24,3	2,1
6	U55/1	5,10	24,4	2,0
7	AcR30A(4)	3,44	24,3	1,9
8	D2/2	5,90	24,5	1,5
9	W2.6.5	4,12	24,7	1,2

Die in Rot geschriebenen Stämme der Tabelle 9 wurden für den nächsten Ansatz ausgewählt. Es wurde ein 8h Aktivitätstest mit Edukt **5** durchgeführt.

Zur Überprüfung des besten Zeitpunktes wurden zwei Teststämme 2h vor dem großen Ansatz angeimpft. So konnten die Aktivitätstests durchgeführt werden, bevor der Großansatz diesen Zeitpunkt erreichte. Die Teststämme wurden unter den gleichen Bedingungen geschüttelt, nur wurden hier 200ml Medium in 1 Literkolben angesetzt. Das Produkt- und Aktivitätsmaximum wurde nach 50h festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Großansätze vom Schüttler genommen und geerntet. Die erhaltenen Zellfeuchtmassen aus ca. 2 Liter Medium waren:

LE4/4.7 :	3,5g	E38/1 :	2,7g
UV43/2 :	3,0g	AcR30A(10):	2,6g
AcR30A(4):	3,0g	AcR30A(18):	2,5g

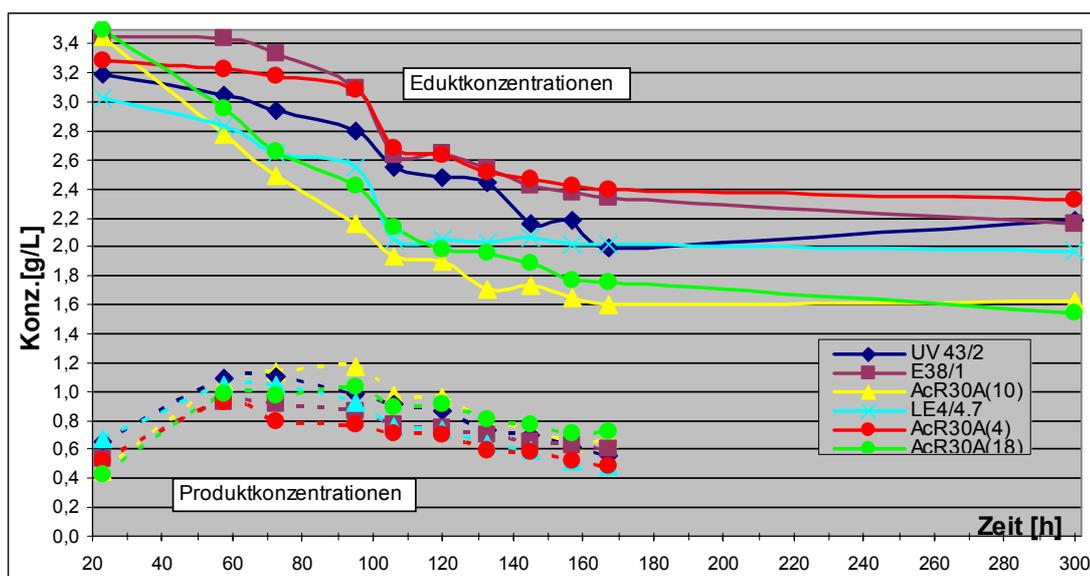
6.2.6. Reaktionsumsatz in pH 7 Phosphatpuffer

In diesem Reaktionsansatz galt es, das erwartete Produkt **2** durch enzymatischen Abbau von **5** in ausreichendem Maß für die chirale Analyse herzustellen.

Hier wurde der Ansatz nicht zur Zeit höchster Produktkonzentration im Medium abgebrochen. Man ließ so lange reagieren, bis ca. die Hälfte des Edukts **5** abgebaut war. Diagramm 5 zeigte, daß die Eduktkonzentration zwischen den Meßpunkten bei 170h und 300h kaum noch eine Änderung erfahren hatte, daher wurde der Umsatz zu diesem Zeitpunkt beendet und analysiert. Die Interpretation der HPLC Daten des Aminesterpeaks war bei 300h nicht eindeutig. Wie zu erwarten, nahm die Konzentration ab ca. 80h Reaktionsdauer ab, doch bei 300h überlagerten sich unserer Meinung nach der AS- **1** und Aminesterpeak **2**. Erkennbar war diese Überlagerung an der Verschiebung des Maximums zu

1,5min Retentionszeit und der Ausbildung der breiten Form (Tailing) lediglich auf der absteigenden Flanke des Peaks. Ein weiterer Hinweis auf die angesprochene Überlagerung war das Fehlen des bis dahin kontinuierlich auftretenden und größer werdenden Peaks bei ca. 1,2min Retentionszeit, welcher **1** darstellte. Eine manuelle Aufteilung der Fläche auf die beiden Substanzen Aminester **2** und Aminosäure **1** war nicht möglich. Daher wurden die Produktkonzentrationen bei 300h nicht angegeben.

Diagramm 5 Edukt- und Produktkonzentration des Reaktionsumsatzes



In Diagramm 5 sind die Daten der Edukt- **5** (durchgezogene Linien) und der Produktkonzentrationen **2** (punktierte Linien) angegeben. Die Zeitachse beginnt bei 20h, da der erste Meßpunkt nach 23h genommen wurde. Zwischen 170 und 300h wurden keine weiteren Analysen durchgeführt. Die Eduktausgangskonzentration betrug ca. 3,7g/l = 24mM der Substanz **5**.

Bei diesem Experiment konnte man zwischen 60 und 80h die maximale Produktkonzentration nachweisen, diese sank von maximal 0,9-1,2g/l auf 0,5-0,7g/l bei 170h Reaktionsdauer. Die Eduktkonzentration nahm je nach Stamm in unterschiedlicher Geschwindigkeit von ca. 3,7g/l auf 2,4-1,6g/l entspricht 65-43% ab.

6.2.7. Chirale Analyse der Substrate

Das Medium des Ansatzes von Punkt 6.2.5. wurde zu Testzwecken nach Variante 1 dem direkten Weg mit Propionsäureanhydrid umgesetzt. Das Medium des pH 7 Reaktionsumsatzes (aus 6.2.6.) wurde nach Variante 2 aufgearbeitet und analysiert (siehe Punkt 5.2.4.9., Seite 39).

In Diagramm 6 wurden die ee Werte von Edukt **5** und Produkt **2** aus den Medien des Reaktionsverlaufs aus Punkt 6.2.5. graphisch dargestellt.

Diagramm 6 ee Werte des min. Mediums bei höchster Aktivität

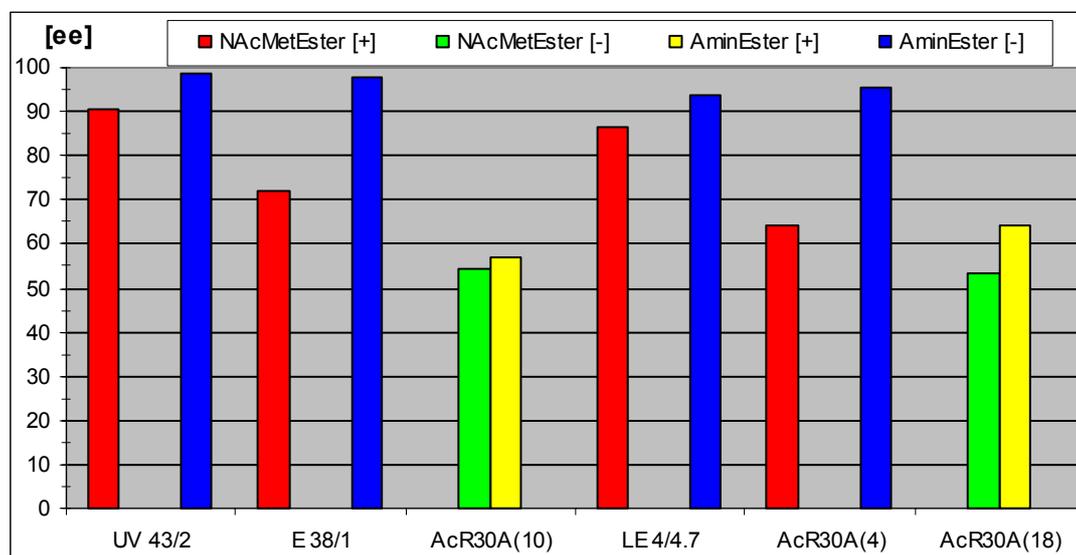


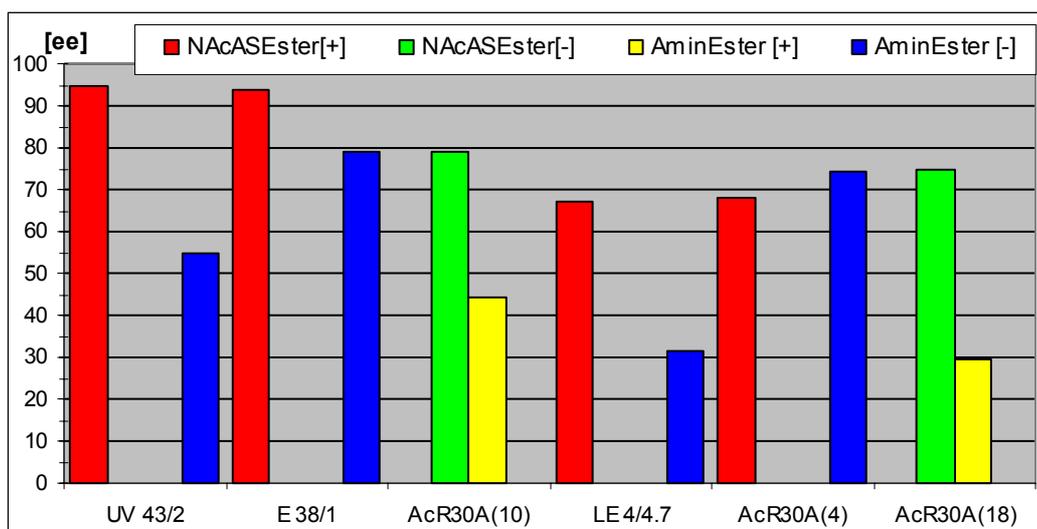
Diagramm 6 gibt die ee Werte der sechs Stämme an. Die Angaben NAcMetEster [+] und [-] definieren die nicht umgesetzten Edukte **5** aus dem enzymatischen Umsatz, Aminester [+] und [-] stellen den zum Aminester **2** abgebauten Anteil des Edukts **5** dar. In diesem Fall wurde der Aminester für die chirale Analyse chemisch zu N-Propionyl-Methylester **7** umgesetzt.

Die Stämme UV43/2 und LE4/4.7 wiesen einen ee von 90% und 85%, E38/1 und AcR30A(4) ca. 70% bezogen auf nicht umgesetzten [+] Ester **5** auf. Hingegen zeigten die Stämme AcR30A(10) und AcR30A(18) ee Werte von ca. 55% bezogen auf nicht umgesetzten [-] N-Ac-Ester **5**.

Für die Aminester **2**, über den Weg der chemischen Umsetzung zu N-Propionyl-AS-Methylester, wurden wie erwartet die entgegengesetzten Drehrichtungen erhalten. Die ee Werte der Produktfraktionen waren sogar um einige Prozent höher als die der nicht enzymatisch umgesetzten Edukte **5**. Sie lagen bei ca. 97% für UV43/2 und E38/1, ca. 93% für LE4/4.7 und AcR30A(4) und bei 60% für die beiden [+] abbauenden AcR30A Stämme. Diese Werte bestätigten die Annahme eines enantioselektiven Abbaues des rac N-Ac-β-AS-Esters **5**.

Die Ergebnisse der ee Bestimmung des Reaktionsumsatzes im pH 7 Medium wurden in Diagramm 7 graphisch dargestellt. Im Unterschied zu obigem Versuch wurden hier die Aminester **2**, nach vorausgehender Extraktion des nicht umgesetzten Edukts **5**, chemisch wieder zu N-Ac-β-AS-Ester **5** umgewandelt.

Diagramm 7 ee Werte aus den Reaktionsumsätzen in pH 7 Medien



Die Bezeichnungen NAcMetEster [+] und [-] definieren die nicht umgesetzten Edukte **5** aus dem enzymatischen Umsatz, Aminester [+] und [-] stellen den zu **2** abgebauten Anteil des Edukts **5** dar. Der Aminester **2** wurde für die chirale Analyse chemisch zu N-Acetyl-MetEster **5** umgesetzt.

Ähnlich wie in obigem Versuch zeigten die nicht abgebauten N-Ac- β -AS-Methylester ee Werte von 95% für die Stämme UV43/2 und E38/1, 68% für LE4/4.7 und AcR30A(4) für das [+] Enantiomer, und 75% für AcR30(10) und (18) für das [-] Enantiomer. Hingegen wurden für die umgesetzten Aminester bei E38/1 und AcR30A(4) ee Werte von 75%, bei UV43/2 von 55%, bei AcR30A(10) 43% und bei den übrigen nur 35% erreicht. Der entscheidende Unterschied, der zu schlechteren ee Werten der enzymatisch abgebauten Aminester **2**, jedoch zu höheren ee Werten bezüglich des nicht umgesetzten Edukts **5** führte, war die längere Inkubationszeit von 300h. Diese längere Inkubationszeit im Vergleich zu dem Ansatz aus Punkt 6.2.5. führte zu einem höheren Reaktionsumsatz. Nach den 300h wurden ca. 50%, in Ansatz aus 6.2.5. wurden nur ca. 37% des Edukts umgesetzt. Laut Faber [10] (Seiten 39 ff.) führt, je nach „Enantiomeric Ratio“, dem „E“ - Wert der Reaktion, ein größerer Umsatz des enzymatischen Abbaues zu geringeren ee Werten für das Produkt jedoch zu höheren bezüglich des Edukts. Es scheint jedoch, daß hier ein weiterer enzymatischer Abbau des Aminesters **2** zur freien Aminosäure stattfindet, wie es auch bei den Medienanalysen der anderen Versuche festgestellt werden konnte.

Bei beiden Experimenten mußte wieder die Frage gestellt werden, ob Mischkulturen vorlagen. Das betraf im besonderen den Stamm AcR30A, denn zwei der Testkolonien waren [+] selektiv während der Stamm AcR30A(4) eine

negative Selektivität aufwies. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß sich aus einer Mischkultur diese gegengleiche Enantioselektivität entwickelt hatte.

In Tabelle 10 wurde nochmals der Überblick über die Ergebnisse der chiralen Analysen gegeben. Es sind die ee Werte aufgelistet. Die Aktivitäten wurden mangels exakter Daten nicht berechnet.

Tabelle 10 Ergebnis des Screenings, Überblick über die ee Werte

Stammname	300h Rkt., pH 7 Medium ca. 50% Eduktabbau		50h Rkt., min. Medium ca. 30% Eduktabbau	
	Edukt ee	Produkt ee	Edukt ee	Produkt ee
UV43/2	+ 94,8	- 54,8	+ 90,7	- 98,8
E38/1	+ 93,6	- 79,0	+ 72,0	- 97,8
AcR30A(4)	+ 68,1	- 74,3	+ 64,4	- 95,3
LE4/4.7	+ 67,0	- 31,5	+ 86,4	- 93,6
AcR30A(10)	- 78,9	+ 44,4	- 54,2	+ 56,9
AcR30A(18)	- 74,6	+ 29,5	- 53,2	+ 64,5

Tabelle 10 zeigt die ee Werte aus den beiden chiralen Analysen, in rot kurze Reaktionsdauer und Analyse bei höchster Aktivität, in grün lange Reaktionsdauer und Analyse bei ca. 50% Umsatz (in blau werden ee Werte über 90 hervorgehoben).

Aus den obigen Diagrammen konnte gefolgert werden, daß der Abbau des rac-N-Ac- β -AS-Methylesters **5** zum Aminester **2** ein enantioselektiver Prozeß war, zur Erhöhung der Ausbeute müßten jedoch weitere Experimente folgen.

6.2.8. Konservierung der Stämme

Vor der Konservierung der verwendeten Isolate des ersten Ansatzes, die weiterhin in Zentrifugenröhrchen im 4°C Kühlraum lagerten, wurden nochmals 48 stichprobenartig ausgewählt und in einem 24h Aktivitätstest analysiert. Die positiven Ergebnisse bestätigten die Viabilität und Aktivität der in den Zentrifugenröhrchen bei 4°C gelagerten Proben. Die sechs zuletzt verwendeten Isolate des Reaktionsumsatzes wurden ebenso konserviert. Zur Konservierung wurde 1ml der Konservierungslösung mit 0,5ml der Zellsuspension in 2ml Kryoröhrchen (Fa. Nalgene, New York, USA) vermischt, auf -80°C abgekühlt und in entsprechenden Boxen bei dieser Temperatur gelagert.

Ebenfalls wurden einige der Proben unter dem Leitz Lichtmikroskop untersucht und die Formen der Mikroorganismen beobachtet (Photos unter 6.2.9.2.).

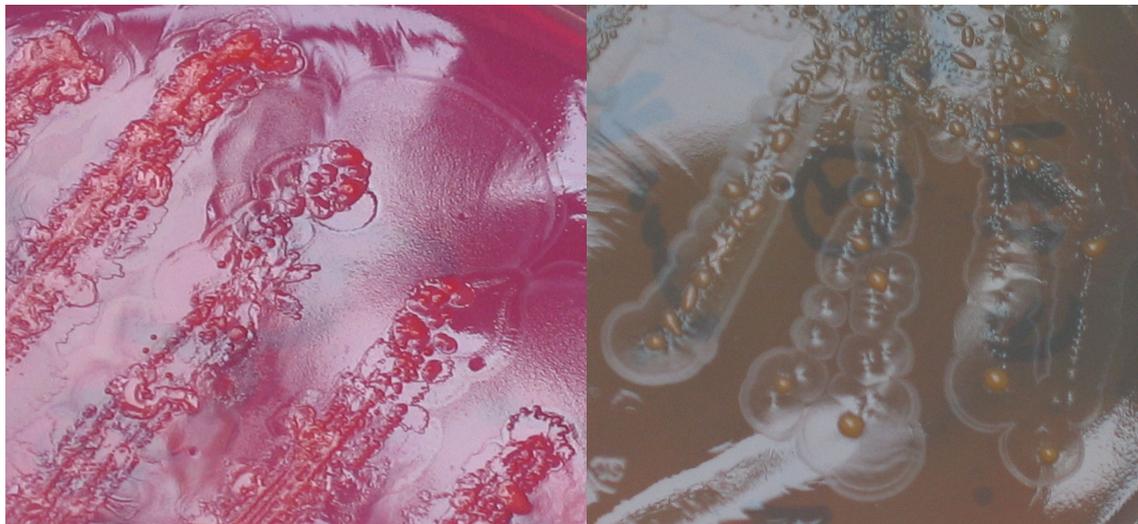
6.2.9. Ergänzende Tests

6.2.9.1. Gradientenagarplattentests

Die Gradientenagarplatten wurden zur Erkennung von Unterschieden beim Verwerten unterschiedlicher C-Quellen eingesetzt.

Beim Betrachten der Agarplatten entdeckte man, daß sich um die Einzelkolonien ein durchsichtiger, leicht gräulicher Schleim gebildet hatte (vgl. Bilder 2-4). Daraufhin wurden die Kulturen dieser Gebiete einmal sofort im Leitz Lichtmikroskop untersucht, ebenfalls wurden sie auf neue Agarplatten übertragen, um daraus Einzelkolonien zu erhalten, um diese dann auch im Mikroskop zu analysieren.

Bild 2 und 3 Gradientenagarplatten Variante 1 und 2, farbige Mischkulturen



In Bild 2, 3 und 4 sind Gradientenagarplatten photographiert dargestellt. Links sieht man die rötliche Platte nach der ersten Variante gegossen, rechts sowie unten die Variante 2.

Man kann in den Bildern die oben beschriebenen leicht gräulichen durchsichtigen Umrandungen der Kolonien erkennen. Gut sichtbar tritt der Unterschied in der Erkennbarkeit einer auftretenden Eigenfärbung der Kolonien hervor. Links kann man nur eine leichte Änderung der Farbe ins Orangerote erkennen, rechts jedoch wird die orange Färbung der Kolonien sehr deutlich sichtbar.

Die entstandenen Mischkulturen versuchte man in mehreren Verdünnungsausstrichen auf oben beschriebenen Agarplatten zu vereinzeln und zu trennen. Nach zweimaligem Agarplattenausstrich konnten die kleinen Stäbchen von den Stammkolonien getrennt werden. In Bild 4 wird eine Agarplatte gezeigt, die durch Animpfen mit Kolonien aus den Umrandungen der Mischkulturen entstanden ist.

Bild 4 Agarplatte mit gräulicher Randkolonie (kl. Stäbchen)



Man konnte weiterhin gut die typischen, gräulich flächigen kreisrunden Bereiche erkennen. Im Gegensatz zu den Bildern 2 und 3, wo größere teilweise gefärbte, sich erhebende Einzelkolonien erkannt wurden, war jedoch hier in der Mitte nur noch ein kleiner weißer Punkt zu sehen.

Die eigentlichen Gradientenagartests brachten das erwartete Ergebnis. Auf der Seite mit der dünneren selektiven Schicht wuchsen die Mikroorganismen zu dichteren und größeren Kolonien heran, auf der anderen Seite die kleineren.

6.2.9.2. Lichtmikroskopie

In den anschließenden Untersuchungen mit dem Leitz Lichtmikroskop konnten wahrscheinlich zwei verschiedene Mikroorganismen wahrgenommen werden. Vergleiche die Erläuterungen zu diesem Thema auf den Seiten 69 und 72. In den Bildern 5-15 sind Fotos der Mikroskopaufnahmen verschiedener Stämme zu sehen.

Bilder 5 bis 7 Stamm AcR30A:

5 - Reinkultur, 6 - Mischkultur, 7 - Reinkultur gräulicher Rand (kl. Stäbchen)

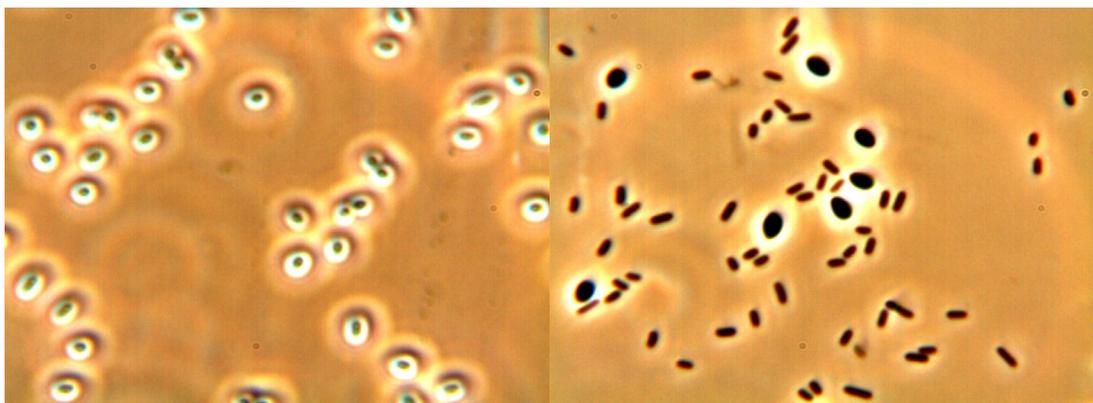




Bild 8 und 9 Stamm LE4/4.7: 8 - Reinkultur, 9 - Mischkultur

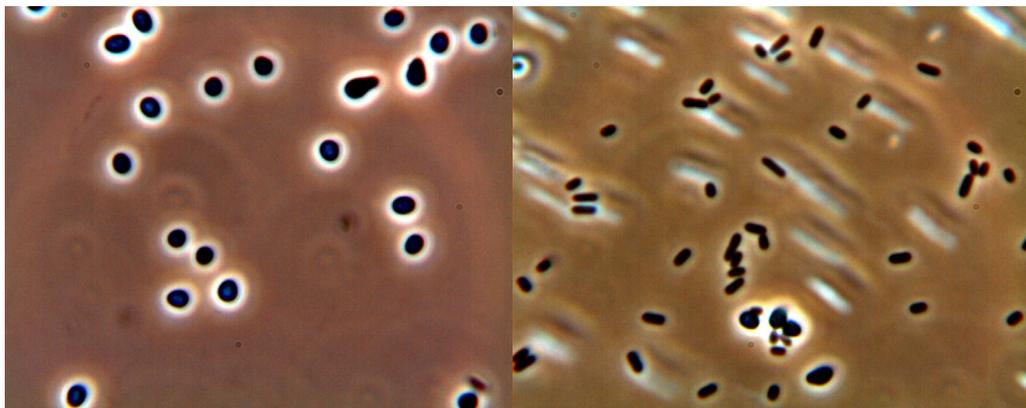
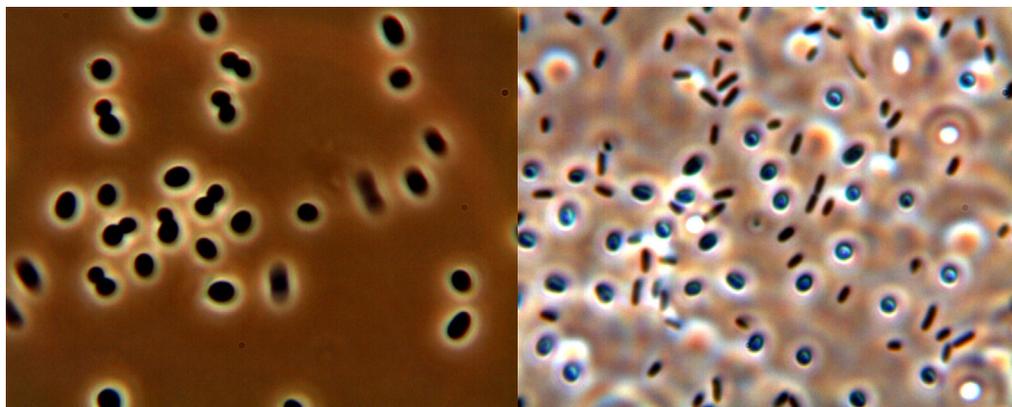
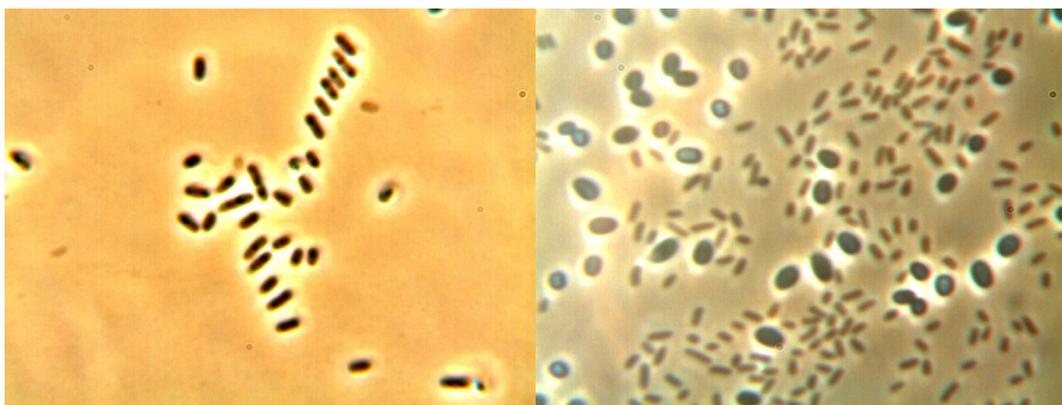
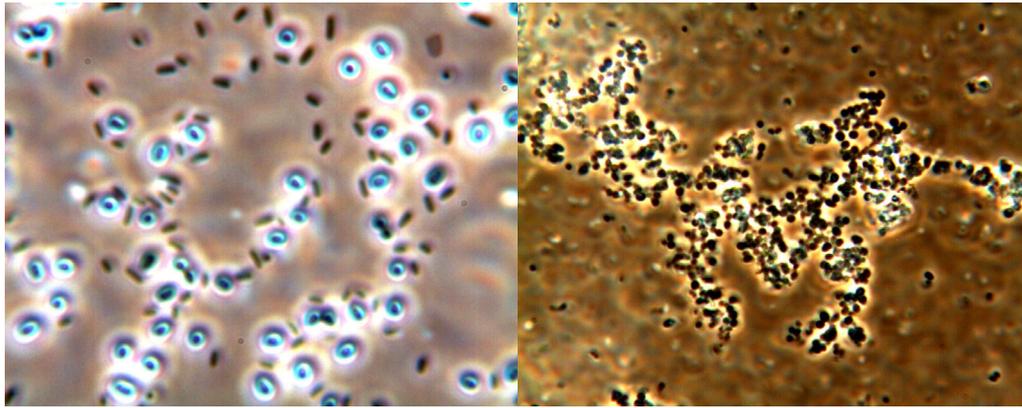


Bild 10 und 11 Stamm E38/1: 10 - Reinkultur, 11 - Mischkultur



Bilder 12 bis 15 Stamm UV43/2: 12 - Reinkultur, 13 - 15 Mischkulturen





Die Organismen der Originalisolate waren oval und in der Breite zwei bis drei Mal größer als die neuen, welche stäbchenförmiges Aussehen besaßen. In der Länge unterschieden sie sich kaum. Genauer konnte man mit der 2500-fachen Vergrößerung nicht feststellen. Die Frage, ob es sich hier um verschiedene Organismen oder um verschiedene Formen derselben Organismen (Poly- oder Pleomorphismus beziehungsweise Differentiation) handelte, konnte mit diesen Untersuchungen nicht geklärt werden.

6.2.9.3. Enzymaktivitätstest

Nach erfolgreicher Vereinzelung der obigen Mischkulturen ließ man diese in Schüttelkolben unter den üblichen Bedingungen wachsen. Diese Medien wurden auf OD_{660} , Produkt- **2** und Eduktgehalt **5** untersucht. Im Anschluß wurde ein 16h Aktivitätstest durchgeführt, um die Aktivität den Originalstämmen oder den als kleine Stäbchen definierten zuzuordnen.

Die nochmals aus den -80°C Kryoröhrchen angezüchteten Originalstämme besaßen die höchste Acylaseaktivität. Mischkulturen oder Kulturen von nur „kleinen Stäbchen“ zeigten meist nur geringe Aktivität. Die Ausnahme war eine Kultur, die man aus einer roten AcR30A und einer „kleinen Stäbchen“ Mischkolonie zu vereinzeln versuchte. Diese Mischkultur – eine Vereinzelung nach den zwei Überimpfungen gelang nicht eindeutig – zeigte als solche sogar höchste Aktivität.

Mit den Medienanalysen der Schüttelkolben konnten obige Aussagen nicht bestätigt werden. Man fand zwar dieselben Stämme als nicht aktive, welche auch nur zu geringen OD_{660} Werten (0,17-0,25) wuchsen. Bei den Stämmen mit hohen Produktkonzentrationen traten sowohl Reinkulturen als auch Mischkulturen auf, daher konnten nach den durchgeführten Tests keine expliziten Aussagen über

die Eigenschaften der „kleinen Stäbchen“ gemacht werden. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede zwischen Aktivitäts- und Medienanalysen wären die verschiedenen langen Inkubationszeiten. Bei dem Aktivitätstest waren die Kolonien 16h mit der Probelsg. in Kontakt, bei den Medienanalysen waren es ca. 150h. So konnten auch weniger aktive Kulturen in den Medien hohe Umsätze aufweisen, hingegen bei den aktiveren konnte bei 150h schon der Abbau von Aminester **2** begonnen haben. Bei den Medienanalysen beeinflusste auch die log. Wachstumsphase der Zellen zu Beginn der 150h Schütteln, wie sie im Aktivitätstest nicht vorkam, die Produktbildung.

Ein weiterer Test zur Bestimmung der Induktivität der Enzyme wurde vorgenommen. Dabei wurden Einzelkolonien der Gradientenagarplatten ausgewählt und je ein Medium ohne Induktion, das 1,6g/l Na-Acetat, je 2g/l Dextrose und Glucose enthielt, und eines mit Induktion, das 2g/l N-Ac-PEA zusätzlich zu den obigen Substanzen enthielt, angeimpft. Die Medien ließ man 7 Tage inkubieren, danach wurde die Aktivität der einzelnen Isolate mit dem üblichen Test bestimmt. In Tabelle 11 konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Acylase notwendig war.

Tabelle 11 24h Aktivitätstest der Ansätze mit und ohne Induktion

Stammname	mit Induktion:		ohne Induktion:	
	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]	Edukt 5 [mM]	Produkt 2 [mM]
LE4/4.7 (- 80°C)	10,98	10,32	13,96	0,00
E38/1	20,24	1,18	15,00	0,00
UV43/2 (- 80°C)	17,63	3,06	14,92	0,00
E38/1 (- 80°C)	18,15	4,60	14,88	0,00
AcR30A(18)	20,57	1,37	15,17	0,00
UV43/2	11,93	9,93	9,00	7,34
W2.6.5 (- 80°C)	18,97	3,95	15,10	0,00
EMS41 (- 80°C)			14,63	0,00
AcR30A(14)			15,13	0,00

Der Induktor bei der vorhergehenden Schüttelkolbenanzucht war 2g/l N-Ac-PEA **15**. Die frei gebliebenen Felder bezeichnen Stämme, die nicht getestet wurden. Die Angaben (-80°C) definieren Kolonien, die direkt aus den Kryostammkulturen angezüchtet worden waren. Die übrigen Stämme wurden aus den bei 4°C gelagerten Zentrifugenröhrchen ausgewählt, es handelte sich dabei um die Konzentrate der Ansätze des Schüttelkolbenscreenings. Die höchsten Produktkonzentrationen wurden in der Tabelle grün hervorgehoben.

Neben dem Nachweis der Induzierbarkeit der Acylase wurde bei dem Stamm UV43/2 erkannt, daß dieser auch ohne neuerliche Induktion einen Umsatz zeigte. Die UV43/2 Kolonie, welche die Aktivität zeigte, wurde aus einem der

Arbeitskonzentrate ausgewählt, das heißt, daß diese schon einmal induziert worden war. Es schien daher für diesen Stamm möglich zu sein, das Enzym weiterhin induziert zu lassen. Wie aus dem Parallelversuch mit der -80°C Kolonie von UV43/2 zu sehen war, wurde das Enzym jedoch nicht konstitutiv exprimiert.

Der Aktivitätstest dauerte 24 Stunden, womit durch weitere Untersuchungen zu klären wäre, ob bei diesem Stamm ein schnelles Aktivieren der Enzyme erfolgte, so daß noch während der 24h Edukt gespalten werden konnte, oder, sofern das Enzym von Anfang an induziert war, unter welchen Verhältnissen und über welchen Zeitraum das so festzustellen sein würde. Die übrigen Stämme zeigten nur für den Ansatz mit Induktion Aktivität.

6.2.9.4. Test des Substratspektrums

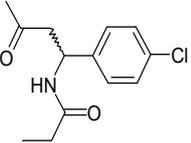
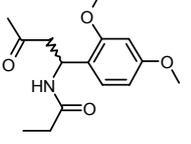
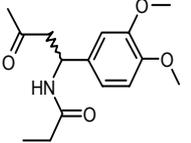
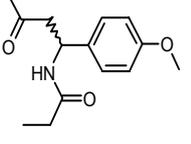
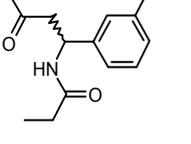
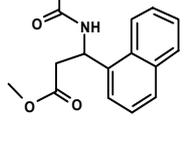
Es wurden die am Phenylring höher substituierten N-Acetyl- β -AS-Ester **8-13** mit ca. 55 ausgewählten Stämmen mit Enzymaktivitätstests untersucht. Diese Tests sollten einen Überblick über das Substratspektrum der Acylase sowie mögliche Grenzen der Verwertbarkeit komplexerer Strukturen liefern. Probleme entstanden durch die teilweise geringe Wasserlöslichkeit der Ester.

Es wurde versucht, durch Zugabe von MeOH die Löslichkeit etwas zu verbessern, wobei die Gesamtkonzentration von MeOH 2,5% (v/v) nicht übersteigen sollte. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse des Tests qualitativ aufgelistet. Für genaue Aussagen müßten weitere Untersuchungen folgen.

Man konnte feststellen, daß die Edukte **11** und **12**, die 4- und 3-Methoxy Substituierten, sowohl gut gelöst, als auch von den eingesetzten Stämmen gut zur Hälfte enzymatisch abgebaut werden konnten. Substanz **9** (2-,4-Dimethoxy-Phenyl) wurde ebenfalls zur Hälfte abgebaut, jedoch konnte kein passender Aminesterpeak bei der HPLC Analyse entdeckt werden.

Das 3-,4-Dimethoxy Derivat **10** war schlechter löslich, es konnte aber ein kleiner Produktpeak festgestellt werden. Die Substanzen **8** und **13**, das 4-Chlor- und das naphtylische Derivat konnten nur geringfügig gelöst werden. Bei ersterem konnte man einen kleinen Produktpeak erkennen, bei letzterem nicht. Zu Substanz **13** muß man noch erklären, daß „kleiner Peak erkennbar“ meint, daß nur wenig Edukt gelöst werden konnte und nicht, daß es in dem Test abgebaut worden war.

Tabelle 11 Überblick über das Substratspektrum

Substanz	Löslichkeit [25mM]	Edukt	Produkt	aktivste Stämme
8 	gelöst +MeOH	fast vollständig erhalten	sehr geringer Peak	U69/1 M9/1 AcR30A E38/1 UV43/2
9 	gelöst +MeOH	zur Hälfte abgebaut	kein Peak erkennbar	M9/1 E50/1 M1/4 SJ2.6.5
10 	gelöst	etwas abgebaut	geringer Peak erkennbar	E38/1 U72/1 UV43/2 UV47/2
11 	gelöst	zur Hälfte abgebaut	großer Peak erkennbar	LE2/6a.6.5 23D2 15B2a 11B2
12 	gelöst	zur Hälfte abgebaut	großer Peak erkennbar	E38/1 D1/3 13B1b G1.7
13 	wenig gelöst	kleiner Peak erkennbar	kein Peak erkennbar	E34/1 U70/1 M1/4 15B2a

Edukte der 24h Aktivitätstests sind die N-Ac-AS-Ester **8-13**. Unter Produkt wurde, da keine Referenz vorhanden war, derjenige Peak der HPLC Analyse ausgewählt, der von der Retentionszeit und der Form (Amin) als Aminester anerkannt werden könnte. Die Bezeichnung „kein Peak“ bedeutet daher, daß kein Peak, der einem Aminester entsprechen würde, vorhanden war.

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurden noch nicht charakterisierte Stämme aus Isolaten unterschiedlicher Bodenproben auf Acylaseaktivität getestet. Das Neuartige an diesem System war die Möglichkeit, aus einem racemischen Gemisch eines N-Acylierten- β -AS-Methylesters durch selektives Abspalten der Acetylgruppe einen R- oder S-Amino- β -AS-Ester zu erhalten.

Dieses System hat unserer Meinung nach nennenswerte Vorteile. Durch Verwendung veresterter β -AS ist eine einfache Trennung des Produkts, dem freien Aminderivat, von dem nicht umgesetzten Edukt, dem N-Acylierten Aminester, unter Ausnützung der unterschiedlichen Löslichkeiten und der höheren Stabilitäten im Vergleich zu den nicht veresterten β -AS möglich. Das Arbeiten an Grenzflächen von wässrigen und organischen Medien wäre durch die unterschiedlichen Lösungseigenschaften der Substanzen ebenfalls möglich, um so etwa eine Produktinhibierung bei der Umsetzung zu umgehen.

Es wurden sechs Stämme gefunden, die einen enantioselektiven Abbau des Eduktes erkennen lassen. Es wurden dabei vier Stämme entdeckt, die das negative Edukt, zwei die das positive Edukt abbauen. Positiv waren die hohen ee Werte von bis zu 98% für einzelne Stämme und dies ohne Optimierung, weder der Medien noch der Reaktionsdauer. Diese Werte sind auch im Vergleich zu ähnlichen Umsetzungen in Literaturstellen als relativ gut einzustufen.

Der Versuch, während dieser Arbeit ein „medium throughput“ System zu testen und für weitere Tests als schnell verfügbares Screeningsystem vorzubereiten, das heißt als Kryokulturen, konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und der Anpassung der Bedingungen sowohl bei den eingesetzten Substratmengen, als auch bei den Inkubationszeiten, sowie bei den Analysemethoden hätte man einen weiteren Mikrotiterplattenversuch starten können. Man hätte so durchaus zu denselben Ergebnissen wie bei dem darauf folgenden Schüttelkolbenscreening kommen können.

Die kritischsten Punkte des Screenings waren die vielen Schritte, um von dem Gesamtpool von 147 Stämmen zu den sechs ausgewählten, mit denen die Reaktionsumsätze durchgeführt wurden, zu kommen. Hier wurden zu viele Schritte und Nebentests durchgeführt.

Als wenig günstig an dieser Arbeit erwiesen sich die, durch die Bildung der gräulichen schleimigen Gebiete um die Kolonien auf den Agarplatten entdeckten, wahrscheinlichen Mischkulturen (oder Polymorphismus derselben Kultur). Nach der Untersuchung im Lichtmikroskop wurde versucht, durch das Vereinzeln der verschiedenen Kulturen die Acylaseaktivität zuzuordnen. Dem konnte jedoch aus Zeitmangel nicht entsprechend nachgegangen werden.

Die Kontamination mit den kleinen Stäbchen konnte, durch Untersuchung aller gelagerten Proben, seit den Literansätzen in den 3 Literkolben nachgewiesen werden. Es sollte sich um einen systematischen Fehler handeln, denn die kleinen Stäbchen konnten in allen Proben jedoch in unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Die Frage ob die Stäbchen auch eine Rolle bei der umgekehrten Selektivität der zwei [+] selektiven AcR30A Stämme spielten, wurde nicht mehr untersucht.

Die Versuche zum Substratspektrum der Stämme konnten nicht optimal durchgeführt werden. Die Hauptprobleme waren die schlechte Löslichkeit einiger N-Ac- β -AS-Ester, die dann durch Zugabe von Methanol etwas verbessert werden konnte. Zudem fehlten auch Referenzproben der zugehörigen Aminester, um in den HPLC Analysen die Peaks zuordnen und mit Verdünnungsreihen die Konzentrationen der Produkte berechnen zu können.

8. Ausblick

Die in der Diskussion genannten Probleme, wie Vereinzelung der Mischkulturen und Zuordnung der Acylaseaktivität zu reinen Einzelkulturen, sollten als nächste Experimente durchgeführt werden.

Ebenfalls geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hoffnung, daß mit weiterer Optimierung der Reaktionsbedingungen besonders im Hinblick auf die Dauer der Umsetzung sowie der verwendeten C-Quellen die ohnehin bereits guten ee Werte noch gesteigert werden können. Das Optimieren der Induktion sollte weitere Verbesserungen bei der Aktivität der Stämme bringen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen es, in der Folge mit den gefundenen Stämmen das Substratspektrum mit weiteren für die Wirkstoffforschung interessanten Ausgangssubstanzen zu testen. Da in dieser Arbeit sowohl [+] als auch [-] selektive Acylasen gefunden wurden, ist es möglich, beide Enantiomere auf dem enzymatischen Weg zu gewinnen.

Es muß, wie oben beschrieben, jedoch möglich sein die Acylaseaktivität eindeutig zuzuordnen, denn die zwei [+] enantioselektiven Stämme waren AcR30A Kulturen, ebenso wie ein weiterer AcR30A Stamm ein [-] enantioselektiver war.

Neben hohen ee Werten sind auch die Umsatzrate, der Umsatz und eine mögliche Racemisierung des unerwünschten Enantiomers besonders für eine industrielle Anwendung entscheidend. In den hier verwendeten Medien wuchsen die Mikroorganismen nicht zu hohen Zelldichten heran, es wurden lediglich maximale OD_{660} Werte unter Eins erreicht.

Es könnte ein weiteres Screening nach einer Racemase erfolgen, oder es könnte die Aktivität des Abbaues zur Aminosäure benutzt werden, um in der Folge bei der N-Acylierung oder Veresterung eine Racemisierung herbeizuführen.

Auch die Erhöhung der Expression der Acylase wäre wichtig für höhere Umsatzraten, durch gerichtete Evolution und verbesserte Induktion, siehe oben, könnten auch hier Verbesserungen erreicht werden.

9. Literaturverzeichnis

- [1] C. Y. K. Tan, D. F. Weaver, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7449-7461
- [2] *Manual "System Duetz"*, **2000**, Firma Kühner AG, Schweiz
- [3] W. A. Duetz, L. Rüdi, R. Hermann, K. O'Connor, J. Büchs, B. Witholt, *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**, *66*, 2641-2646
- [4] M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7991-8035
- [5] G. C. Barrett (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, **1985**, Chapman and Hall, London
- [6] R. O. Durthaler, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 1539-1650
- [7] M. Ege, Neue Methode zur diversitätsorientierten Synthese von β -Aminosäuren, *Dissertation*, **2004**, Ludwig-Maximilians-Universität München
- [8] G. Sulyok, Parallelsynthese von Bibliotheken nicht peptidischer $\alpha\beta$ 3-Antagonisten für den Einsatz in Tumorthherapie und -diagnostik, *Dissertation*, **2001**, Technische Universität München
- [9] F. Theil, *Enzyme in der Organischen Synthese*, **1997**, Spektrum, Heidelberg
- [10] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, **2004**, Springer, Berlin
- [11] T. Hintermann, D. Seebach, *Chimia*, **1997**, *50*, 244-247
- [12] D. Seebach, S. Abele, J. Schreiber, B. Martinoni, A. K. Nussbaum, H. Schild, H. Schulz, H. Hennecke, R. Wössner, F. Bitsch, *Chimia*, **1998**, *52*, 734-739
- [13] D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M.-I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 811-822
- [14] E. Juaristi, H. López-Ruiz, *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 983-1004
- [15] S. Abele, D. Seebach, *Europ. J. Org. Chem.*, **2000**, 1-15
- [16] E. Juaristi, V. Soloshonok (Eds.), *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids 2nd Edition*, **2005**, Wiley-VCH, New York
- [17] E. Juaristi (Ed.), *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids*, **1997**, Wiley-VCH, New York
- [18] M. I. Page, *The Chemistry of β -Lactams*, **1992**, Chapman and Hall, London
- [19] G. I. Georg, *The Org. Chem. of β -Lactams*, **1993**, Verlag Chemie, New York
- [20] C. Palomo, J. Aizpurua, I. Ganboa, M. Oiarbide, *Synlett*, **2001**, *12*, 1813-1826
- [21] F. H. Arnold, *Nature*, **2001**, *409*, 253-257
- [22] T. Mander, *Drug Discovery Today*, **2000**, *5*, 223-225
- [23] J. Xu, J. Stevenson, *J. Chem. Inf. Comput. Science*, **2000**, *40*, 1177-1187

- [24] D. Gorse, A. Rees, M. Kaczorek, R. Lahana, *Drug Discovery Today*, **1999**, 4, 257-264
- [25] M. Hann, R. Green, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, 379-383
- [26] E. Estrada, A. Pena, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2000**, 8, 2755-2770
- [27] J. H. Jones, *Specialist Periodical Report, Amino Acids and Peptides, The Royal Society of Chemistry*, **1992**; Volume 23 (Literature published in 1990)
- [28] E. A. Bell, *Endeavour*, **1980**, Vol. 4 (New Series), 102-108
- [29] I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.*, **1983**, 95, 827-839
- [30] Y. Izumi, I. Chibata, T. Itoh, *Angew. Chem.*, **1978**, 90, 187-194
- [31] K. A. Kochetkov, V. M. Belikov, *Russian Chem. Rev.*, **1987**, 56, 1045-1067
- [32] M. J. O'Donnell, Symposia in Print 33, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 5253-5614
- [33] A. Haemers, L. Mishra, I. Van Assche, W. Bollaert, *Die Pharmazie*, **1989**, 44, 97-109
- [34] J. Mulzer, H. J. Altenbach, M. Braun, K. Krohn, H. U. Reissig, *Organic Synthesis Highlights*; **1991**, Seiten 300 - 305, Verlag Chemie, Weinheim
- [35] K. Ogum, T. Inaba, Y. Gosei, K. Kyokaishi, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **1991**, 49, 575-583
- [36] R. M. Williams, *Synthesis of optically active α -Amino Acids*, **1989**, Vol.7 Organic Chemistry Series, J. E. Baldwin, P. D. Magnus (Eds.), Pergamon Press, Oxford
- [37] W. Leuchtenberger, U. Plockner, *Chem. Ing. Tech.*, **1988**, 60, 16-23
- [38] J. Kamphuis, W. H. J. Boesten, Q. B. Broxterman, H. F. M. Hermes, J. A. M. van Balken, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *Bioprocesses and Applied Enzymology*, **1990**, 42, 134-186, J. Reiser (Ed.), Adv. in Biochem. Engin./Biotechn., A. Fiechter, (Ed.), Springer, Berlin
- [39] J. Kamphuis, E. M. Meijer, W. H. J. Boesten, T. Sonke, W. J. J. van den Tweel, H. E. Schoemaker, *New York Acad. Sci.*, **1992**, 672 (Enzyme Engineering XI), 510-527
- [40] J. W. Scott, *Topics in Stereochemistry*, **1989**, Vol.19, 209-226, E. L. Eliel, S. H. Wilen (Eds.), J. Wiley & Sons, New York
- [41] H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, *Biotechnology Vol.6, Products of Primary Metabolism*, **1996**, VCH Verlag, Weinheim
- [42] T. Shiraiwa, K. Shinjo, H. Kurokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, 64, 3251-3255
- [43] H. Miyazaki, A. Ohta, N. Kawakatsu, Y. Waki, Y. Gogun, T. Shiraiwa, H. Kurokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66, 536-540
- [44] <http://www.dsm.com>

- [45] H. Yamada, S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai, *Journal of Fermentation Technology*, **1978**, *56*, 484-491
- [46] O. May, S. Verseck, A. Bommarius, K. Drauz, *Org. Process Res. and Dev.*, **2002**, *6*, 452-457
- [47] J. Ogawa, S. Shimizu, *Journal of Mol. Catal. B*, **1997**, 163-176
- [48] K. V. Radha Kishan, R. Vohra, K. Ganesan, V. Agrawal, V. Mitra Sharma, R. Sharma, *Journal of Mol. Biology*, **2005**, *347*, 95-105
- [49] P. Crews, L. V. Manes, M. Boehler, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 2797-2800
- [50] R. Roers, G. L. Verdine, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 3563-3565
- [51] M. Namikoshi, K. L. Rinehart, A. M. Dahlem, V. R. Deasley, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4349-4352
- [52] D. Jethwaney, M. Höfer, R. K. Khaware, R. Prasad, *Microbiology*, **1997**, *143*, 397-404
- [53] G. Casiraghi, L. Colombo, G. Rassu, P. Spanu, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6523-6527
- [54] D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M.-I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 811-822
- [55] T. Hintermann, D. Seebach, *Chimia*, **1997**, *50*, 244-247
- [56] D. Seebach, S. Abele, J. Schreiber, B. Martinoni, A. K. Nussbaum, H. Schild, H. Schulz, H. Hennecke, R. Wössner, F. Bitsch, *Chimia*, **1998**, *52*, 734-739
- [57] H. J. Drexler, J. You, S. Zhang, C. Fischer, W. Baumann, A. Spannenberg, D. Heller, *Org. Process Res. and Devel.*, **2003**, *7*, 355-361
- [58] Y. Hsiao, N. R. Rivera, T. Rosner, S. W. Krska, E. Njolito, F. Wang, Y. Sun, J. D. Armstrong, E. J. J. Grabowski, R. D. Tillyer, F. Spindler, C. Malan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9918-9919
- [59] V. A. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, *Tetrahedron Asym.*, **1995**, *6*, 1601-1610
- [60] G. Cardillo, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8651-8654
- [61] A. L. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, G. Sindona, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1997**, 1969-1971
- [62] H. Yang, K. Foster, C. R. J. Stephenson, W. Brown, E. Roberts, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2177-2179
- [63] E. Juaristi, D. Quintana, M. Balderas, E. Garcia-Pérez, *Tetrahedron Asymmetry*, **1996**, *7*, 2233-2246
- [64] G. Zhu, Z. Chen, X. Zhang, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 6907-6910

- [65] G. Li, H. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 451-454
- [66] P. O'Brien, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 326-329
- [67] D. Seebach, A. Boog, W. B. Schweizer, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 335-360
- [68] M. P. Sibi, P. K. Desphande, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **2000**, 1461-1466
- [69] T. P. Tang, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 12-13
- [70] S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron Asym.*, **1991**, *2*, 183-186
- [71] S. G. Davies, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1994**, 1141-1147
- [72] M. E. Bunnage, A. N. Chernega, S. G. Davies, C. J. Goodwin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1994**, 2373-2384
- [73] J. K. Myers, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8959-8960
- [74] A. Bruggink, P. D. Roy, *Synthesis of β -Lactam Antibiotics*, **2001**, A. Bruggink (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- [75] M. Breuer, K. Ditrach, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 788-824
- [76] S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Op. in Biotech.*, **2004**, *15*, 272-279
- [77] T. Sonke, B. Kaptein, A. F. Volker-Wagner, P. Quaedflieg, S. Schultz, S. Ernste, A. Schepers, J. Mommers, Q. B. Broxterman, *J. of Mol. Cat. B. Enzymatic*, **2004**, *29*, 265-277
- [78] M. Solymár, A. Liljeblad, L. Lazar, F. Fülöp, L. T. Kanerva, *Tetrahedron Asymmetry*, **2002**, *13*, 1923-1928
- [79] D. Seebach, H. Estermann, *Tetrahedron Letters*, **1987**, *28*, 3103-3106
- [80] L. T. Kanerva, P. Csomós, O. Sundholm, G. Bernáth, F. Fülöp, *Tetrahedron Assymetry*, **1996**, *7*, 1705-1716
- [81] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 2351-2353
- [82] D. Seebach, V. Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *2*, 654-660
- [83] S. J. Faulconbridge, K. E. Holt, L. G. Sevellano, C. J. Lock, P. D. Tiffin, N. Tremayne, S. Winter, *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 2679-2681
- [84] H. Gröger, H. Trauthwein, S. Buchholz, K. Drauz, C. Sacherer, S. Godfrin, H. Werner, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 1977-1978
- [85] F. Cecere, G. Galli, G. Della-Penna, B. Rappuoli, **1976**, Germ. Patent DE 2422737
- [86] W. H. De Comp, *Chirality*, **1989**, *1*, 2-6
- [87] J. Ogawa, S. Shimizu, *Trends in Biotechn.*, **1999**, *17*, 13-20