

1

Einleitung

Dieses Buch soll dem Leser die Faszination der selektiven enzymatischen Stoffumwandlung näher bringen und anhand einfacher, in jedem gut ausgestatteten chemischen Labor durchführbarer Experimente zeigen, wie leistungsfähig die chemische Katalyse mit Hilfe von Biokatalysatoren ist. Die der Biokatalyse zugrunde liegende Fachrichtung bioorganische Chemie zeichnet sich durch einen ausgesprochen interdisziplinären Charakter aus. Als Schnittstellenwissenschaft *par excellence* ist sie, wie Abbildung 1.1 zeigt, durch das Zusammenspiel verschiedenster Wissenschaftsdisziplinen charakterisiert. Es ist diese Vielfalt, die den besonderen Reiz dieses Forschungsgebietes ausmacht.

Aufgrund ihres Facettenreichtums gibt es keine allgemein gültige Definition für die bioorganische Chemie. In diesem Buch wollen wir sie als die biokatalytische Herstellung chemischer Verbindungen auffassen, also die gezielte chemische Stoffumwandlung mit Hilfe von Enzymen zu Synthesezwecken.

Ziel dieses Kompendiums ist es, anhand der Eigenschaften der verschiedenen Enzymklassen die Vielfalt enzymatischer Reaktionen aufzuzeigen und die Fähig-

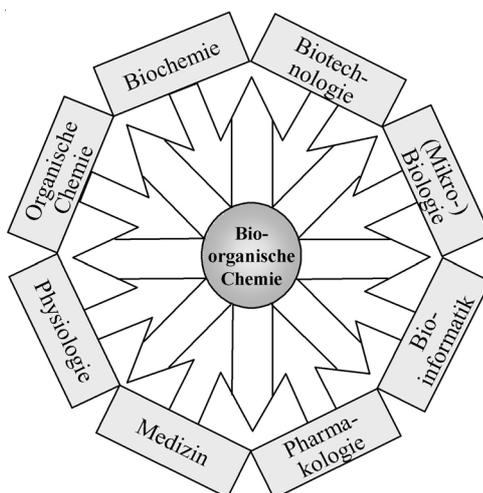


Abb. 1.1 Die bioorganische Chemie ist eine interdisziplinäre Fachrichtung an der Grenzfläche zwischen den verschiedensten Fachrichtungen.

Bioorganikum: Praktikum der Biokatalyse. G. E. Jeromin, M. Bertau
Copyright © 2005 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 3-527-31245-5

2 | 1 Einleitung

keit zu vermitteln, das Synthesepotenzial biokatalytischer Stoffumwandlungen kompetent zu beurteilen. Anhand der zugehörigen Mechanismen enzymkatalysierter Reaktionen soll verdeutlicht werden, wo Unterschiede und Gemeinsamkeiten der bioorganischen Syntheseführung liegen, und wo es zu verschiedenen synthetischen Fragestellungen Alternativen aus nichtverwandten Enzymklassen gibt. Es wird aber auch ersichtlich werden, welche Substrate sich für biokatalytische Reaktionen eignen.

Biotransformationen, selektive enzymatische Stoffumwandlungen nicht-natürlicher Substrate, sind nicht nur aus präparativer Sicht interessant. Es sind genau jene Prozesse, welche über das Schicksal naturfremder (xenobiotischer) Stoffe im menschlichen Stoffwechsel entscheiden: pharmazeutische Wirkstoffe, aber auch Schadstoffe (Noxen). Darüber hinaus finden Biotransformationen auch Anwendung in der Behandlung von Umweltschadstoffen, z. B. in der Dekontaminierung von verseuchtem Erdreich oder für biologisch abbaubare Kunststoffe.

1.1

Kurze Geschichte der bioorganischen Chemie

Bereits seit mehr als 8000 Jahren verwendet der Mensch Mikroorganismen – und damit Enzyme – für seine Zwecke. Dienten sie zu Beginn vorwiegend der Herstellung von Brot, Bier, Wein oder Milcherzeugnissen zu Konservierungszwecken, wurden sie erstmals 1858 von Pasteur zu präparativen Zwecken eingesetzt, als er mit Hilfe des Pilzes *Penicillium glaucum* racemisches Ammoniumtartrat in reine (-)-(S,S)-Weinsäure überführte [1]. Es sollte noch einmal 28 Jahre dauern, bis Brown mit einem aus Essig isolierten und von ihm *Bakterium xylinum* genannten Mikroorganismus biokatalytische Stoffumwandlungen durchführt, indem er Propanol in Propionsäure überführt und Mannitol in Fructose [2]. Mit Buchners Entdeckung der alkoholischen Gärung in zellfreiem Hefeextrakt im Jahr 1897 gewinnt die Verwendung von Mikroorganismen in der Chemie stetig an Bedeutung. Galt sie im 1. Weltkrieg noch vornehmlich der Produktion von Glycerin zur Herstellung von Explosivstoffen [3], gipfelte die Entwicklung im Jahr 1921 in der Entdeckung von Neuberg und Hirsch (Knoll AG), dass lebende Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) aus Benzaldehyd Phenylacetyl-Carbinol (PAC) produziert, das eine Vorstufe des Ephedrins darstellt [4]. Im gleichen Jahr erscheint der erste Übersichtsartikel über Fermentationsprozesse zur Herstellung organischer Chemikalien [5]. Damit war der Siegeszug bioorganischer Synthesemethoden in der Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen, aber auch Naturstoffen oder Aromastoffen nicht mehr aufzuhalten. Zwar fanden biokatalytische Stoffumwandlungen zunächst nur Anwendung in Waschmitteln, doch seit den 1990er Jahren ist die bioorganische Chemie in Form von Biotransformationen mit isolierten Enzymen bzw. ganzen Zellen auch in der Chemie- und Pharmaindustrie eine etablierte Synthesetechnologie [6–14].

1.2 Biotransformationen

Eine Biotransformation ist definitionsgemäß die chemische Umwandlung einer definierten, nichtnatürlichen Substanz (Substrat) in ein in der Regel nichtnatürliches Produkt durch eine lebende Zelle oder ein Enzym(-gemisch). Die beteiligten Enzyme sind *in vivo* für den normalen Ablauf des Stoffwechsels erforderlich, in einer Biotransformation fungieren sie als Katalysatoren (Biokatalysatoren) für chemische Reaktionen. Denn viele Enzyme können außer ihren natürlichen Substraten auch nichtnatürliche (xenobiotische) Verbindungen umsetzen. Die Biotransformation kann daher als eine besondere Form der chemischen Synthese angesehen werden.

Die Biotransformation unterscheidet sich somit von der *Fermentation*. Darunter versteht man die Herstellung einer chemischen Verbindung durch einen oder mehrere Stoffwechselwege einer lebenden Zelle. Damit nutzt die Fermentation unmittelbare Lebensprozesse eines Mikroorganismus zur Produktion von Chemikalien. Bekannte Beispiele sind:

- Antibiotika (Penicillin)
- Alkohole (Ethanol, Glycerin)
- organische Säuren (Essigsäure, Zitronensäure)
- Lösungsmittel (Aceton)
- Aminosäuren (Lysin)

Eingesetzt werden meist billige C- und N-Quellen und keine definierten Substrate. Fermentationsprodukte sind natürliche Produkte, für deren Herstellung lebende Zellen benötigt werden. Bei Biotransformation hingegen werden auch zellfreie Extrakte und isolierte Enzyme eingesetzt, und die C- und N-Quellen dienen lediglich als Zellnahrung. Während die Biotransformation einfache und spezifische Veränderungen im Substratmolekül katalysiert, werden bei Fermentationen oftmals hochkomplexe chemische Verbindungen erzeugt. Eine schematische Übersicht liefert Abbildung 1.2.

Von der *klassisch-chemischen Katalyse* grenzt sich die Biotransformation dahingehend ab, dass sie ihre volle Aktivität meistens unter milden Bedingungen zwischen 20 und 40 °C, bei Atmosphärendruck und pH-Werten um den Neutralpunkt entfaltet. Chemische Katalysatoren arbeiten dagegen meist unter (hohem) Druck und erhöhter Temperatur sowie im nicht pH-neutralen Bereich. Unter solch drastischen Bedingungen geht die katalytische Aktivität von Enzymen gewöhnlich verloren. Denn die katalytische Aktivität eines Enzyms ist abhängig von seiner Proteinstruktur, die durch van-der-Waals-Kräfte und ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken aufrechterhalten wird. Die Zufuhr thermischer Energie zerstört diese hochgeordneten Systeme, indem Strukturdomänen der Proteine zu Schwingungen und Rotationen angeregt werden. Eine interessante Ausnahme stellen Extremophile dar. Das sind Mikroorganismen, die an die extrem hohe Temperaturen, beispielsweise in Schwefelquellen (ca. 100 °C) gewöhnt sind oder an die tiefen Temperaturen und hohen Drücke der Tiefsee.

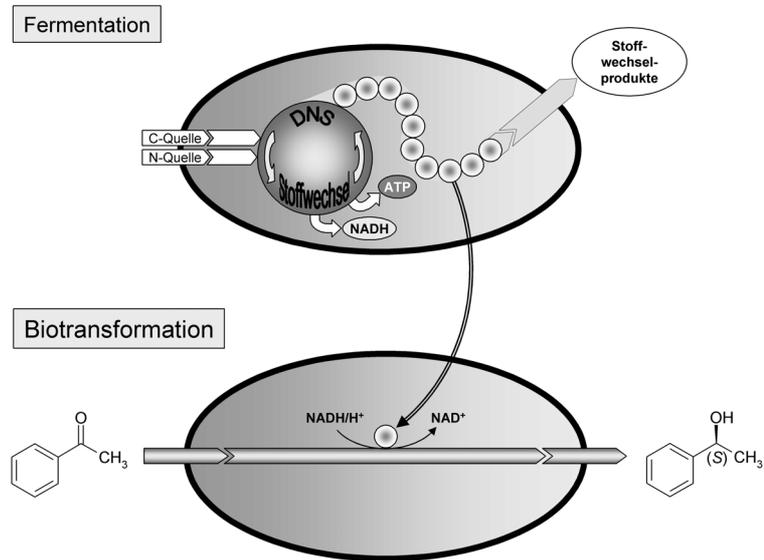


Abb. 1.2 Unterschied zwischen Biotransformation und Fermentation. In einer Fermentation produziert ein Mikroorganismus Stoffwechselprodukte aus natürlichen Nahrungsquellen (z. B. Zucker, NH_3). Eines der vielen Stoffwechselprodukte ist das gesuchte Produkt (z. B. Penicillin), ein Naturstoff.

In einer Biotransformation erfolgt die Umwandlung eines definierten nichtnatürlichen Substrats (z. B. Acetophenon) in ein definiertes Produkt (z. B. (S)-1-Phenylethanol) durch ein Enzym der lebenden Zelle (z. B. eine Alkoholdehydrogenase, ADH). Das Produkt ist gewöhnlich kein Naturstoff.

Die hohe Selektivität vieler Enzyme ist in vielen Fällen erwünscht und ein synthetischer Vorteil. Sie kann aber Einschränkungen bedeuten: z. B. ist Platin mit seiner Fähigkeit, ein weites Spektrum von Verbindungen zu reduzieren, der Biokatalyse weit überlegen. Dagegen verlaufen enzymatische Reaktionen oftmals stereoselektiv und bedürfen keiner chiralen Liganden oder chiraler Auxiliare. Sie sind bereits hochstereoselektive Katalysatoren.

1.3

Der Unterschied zwischen isolierten Enzymen und ganzen Zellen

Welcher Biokatalysator zum Einsatz kommt, hängt sehr stark vom Synthesziel und den Reaktionsbedingungen ab. Generell gilt, dass es keine Patentlösung gibt. Weder isolierte Enzyme noch ganze Zellen eignen sich für alle Fragestellungen. Tabelle 1.1 zeigt einige wichtige Kriterien für die Entscheidungsfindung.

Der große Vorteil von isolierten Enzymen besteht darin, dass sie oftmals leicht und kostengünstig zu erhalten sind. Das gilt insbesondere für Hydrolasen. Ein weiterer, gewichtiger Vorteil des Arbeitens mit isolierten Enzymen besteht in der hohen Selektivität der durch sie katalysierten Reaktionen. Nebenreaktionen, wie

Tabelle 1.1 Wichtige Eigenschaften von Biokatalysatoren für die Mehrzahl der Anwendungen. Im Einzelfall kann es auch Ausnahmen geben.

Biotransformationen	
↓	
Enzyme und lebende Zellen als Katalysator → Biokatalysatoren als Synthesewerkzeug	
↓	
Enzyme	Ganze Zellen
+ hochselektiv	+ außergewöhnliche Reaktionen
+ einfache Anwendung	+ Reaktionsmonopol
+ einfache Apparaturen	+ großes Reaktionsspektrum
+ einfache Aufarbeitung	+ Cofaktorrecycling <i>in situ</i>
	+ einfache Anwendung
	+ einfache Apparaturen
– Verfügbarkeit	– Aufarbeitung (Biomasse)
– limitiert auf eine Reaktion	– Nebenreaktionen
– Cofaktorrecycling	– erfordert u. U. experimentelle Erfahrung

sie beim Multienzymsystem der ganzen Zelle charakteristisch sind, werden hier nicht beobachtet. Der Vorteil der unaufwendigen Reaktionsführung, bei Hydro-lasen genügt in der Regel ein pH-Stat, geht jedoch dann verloren, wenn das Enzym Cofaktoren benötigt, die nach jedem Katalysezyklus regeneriert werden müssen. Ein typisches Beispiel sind Oxidoreduktasen. Sie benötigen NAD(P)H/H⁺ bzw. FADH₂ für Reduktionen. Da diese Cofaktoren die Wasserstoffüberträger darstellen, müssten sie im Grunde genommen in stöchiometrischen Mengen zugegeben werden. Dadurch würde eine Biotransformation schnell unbezahlbar. Man bedient sich in solchen Fällen eines zweiten Co-Systems zur biokatalytischen Regeneration des verbrauchten Cofaktors. Eine elegante Lösung bietet die Formiatdehydrogenase-katalysierte Oxidation von Ameisensäure. Da das entstehende CO₂ entweicht, bleibt die Cofaktorregeneration weitgehend ohne negativen Einfluss auf die enzymkatalysierte Reduktion. Abbildung 1.3 veranschaulicht diesen Lösungsansatz.

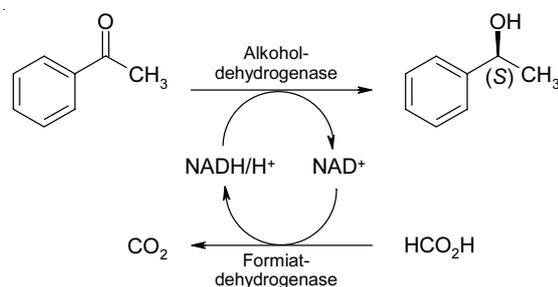


Abb. 1.3 Enzymkatalysierte Reduktion eines Ketons unter Cofaktorregenerierung mit Formiatdehydrogenase (FDH).

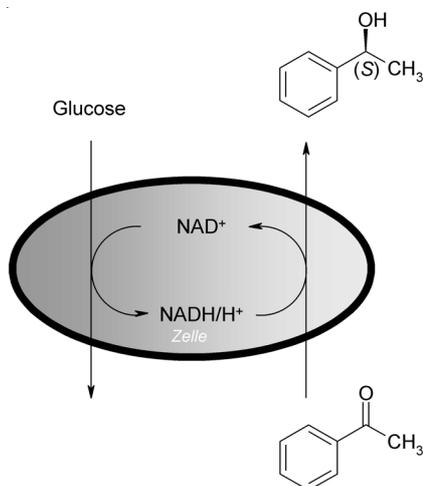


Abb. 1.4 Cofaktorrecycling durch eine ganze Zelle. Glucose ist nicht nur eine Kohlenstoffquelle für den Mikroorganismus, sondern auch Cosubstrat für die Ganzzell-Reduktion des Ketons.

Trotz aller Vorteile lohnt sich diese Variante jedoch nur dann, wenn sich mit einem Ganzzell-System keine vergleichbaren Resultate erzielen lassen. Denn sofern die benötigte Oxidoreduktase nicht leicht zu erhalten ist, muss das Enzym zunächst aufwendig identifiziert, isoliert und charakterisiert werden, bevor es in der Biokatalyse zum Einsatz kommt. Ganze Zellen bieten hier den großen Vorteil, dass die Zelle selbst das Cofaktorrecycling übernimmt (Abbildung 1.4).

Sofern das Multienzymsystem über ausreichende Selektivität verfügt, bietet sich dieser Weg häufig an. Gerade Ganzzell-Biotransformationen mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sind in dieser Hinsicht sehr gut untersucht und erprobt. Dieser Mikroorganismus bietet zudem den präparativ unschätzbaren Vorteil, dass die Reaktionsführung nicht steril erfolgen muss. Dagegen erfordern viele bakterielle Biotransformationen sowie alle Umsetzungen mit (potenziell) pathogenen und gentechnisch modifizierten Organismen die sterile Reaktionsführung in einem Fermenter.

Ganze Zellen bieten ferner die Möglichkeit, auch mit Enzymen Biotransformationen zu betreiben, die sich außerhalb ihrer natürlichen Umgebung nicht oder nur schlecht handhaben lassen. Das betrifft z. B. membrangebundene Proteine. Auf diese Weise besitzen sie für einige Reaktionstypen ein Monopol.

Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass das Multienzymsystem der ganzen Zelle in vielen Belangen anders reagiert, als es sich der Experimentator wünscht. Prinzipiell stellt jede Biotransformation mit einem nichtnatürlichen Substrat einen substanziellen Stress für die Zelle dar, die auf verschiedene Weise darauf reagieren kann [15]. Das Ausmaß der Zellstressantworten ist nicht vorhersehbar und verlangt mitunter einige experimentelle Erfahrung. Das Spektrum reicht von konkurrierenden Hydrolysen über Dehalogenierungen bis hin zu Decarboxylierungen und Transaminierungen (Abbildung 1.5) [16].

1.4 Ganzzell-Biokatalysator oder isoliertes Enzym? Die Qual der Wahl | 7

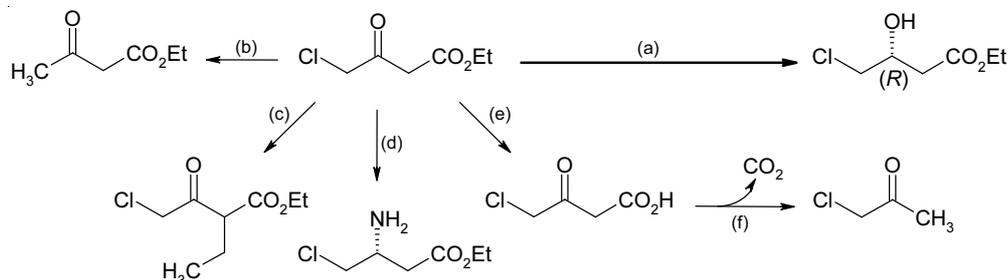


Abb. 1.5 Mögliche Nebenreaktionen während der Ganzzell-Biotransformation von 4-Chlor-acetessigsäure-ethylester zu (*R*)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäure-ethylester: (a) Enantioselektive Reduktion, (b) Enthalo-genierung, (c) Alkylierung, (d) Transaminierung, (e) Esterhydrolyse, (f) Decarboxylierung.

Auch C–C-Bindungsknüpfungen werden beobachtet. In einigen Fällen kann, sofern geeignete Inhibitoren zur Verfügung stehen, die unerwünschte Enzymaktivität unterdrückt werden. Dennoch vermögen ganze Zellen Reaktionen zu katalysieren, die anderweitig nicht oder nur schlecht realisierbar sind. Darin liegt die besondere Stärke der Ganzzell-Biotransformationen.

Die Aufarbeitung gelingt klassischerweise am einfachsten für Umsetzungen mit isolierten Enzymen. Bei Ganzzell-Biotransformationen kann sie dagegen in vielen Fällen problematisch sein. Jüngste Entwicklungen belegen aber, dass auch diese Herausforderung elegant lösbar ist [17]. Hierauf wird später noch gesondert eingegangen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass über das Für und Wider einer Biotransformation mit isolierten Enzymen gegenüber ganzer Zellen nur die individuelle Anforderung des einzelnen Experimentes entscheiden kann.

1.4 Ganzzell-Biokatalysator oder isoliertes Enzym? Die Qual der Wahl

Der Einsatz von isolierten Enzymen kann große Vorteile haben, insbesondere wenn das Enzym kommerziell, d. h. ohne zusätzlichen präparativen Aufwand erhältlich ist. Hauptkriterien für die Anwendung dieses Biokatalysatortyps sind, dass es sich hierbei um ein genau definiertes System mit eindeutiger Selektivität handelt, und dass sich dadurch die Reaktion sehr gut kontrollieren lässt. Ferner lassen sich mit isolierten Enzymen leichter kontinuierliche Verfahren realisieren.

Die Vorteile ganzer Zellen liegen eindeutig in der Cofaktorregeneration und in ihrem Vermögen auch mit Enzymen zu arbeiten, die extrazellulär nicht stabil bzw. einsetzbar sind.

Unabhängig von der Wahl des Biokatalysators ist es hilfreich, sich genauso wie bei jeder chemischen Synthese auch, die Eigenschaften des verwendeten Reaktionssystems bewusst zu machen.

1.4.1

Isolierte Enzyme

Nachdem ein geeignetes Enzym identifiziert wurde, das den Anforderungen des Syntheseziels genügt, empfiehlt es sich, die enzymatische Reaktion hinsichtlich ihrer Reaktionsparameter zu untersuchen:

- Enzymeigenschaften
 - Abhängigkeit der Enzymaktivität von Substratkonzentration, Temperatur, pH
 - Abhängigkeit der Enzymstabilität von Substraten und Produkten
 - Abhängigkeit der Enzymselektivität von den Reaktionsbedingungen
 - Reaktorkonzept
 - Einsetzbarkeit von organischen Lösungsmitteln oder Tensiden für die Substratbioverfügbarkeit
- Eigenschaften des Reaktionssystems
 - Gleichgewichtskonstanten reversibler Reaktionen
 - Nebenreaktionen beeinflussende Faktoren (katalysiert, unkatalysiert)
 - Effekt von Temperatur und pH auf die Reaktion und die Löslichkeiten von Substraten und Produkten
 - Stabilität von freiem NAD(P)⁺ unter den gewählten Bedingungen
- Kinetische Untersuchungen
 - Enzymkinetik
 - Biotransformation

1.4.2

Ganze Zellen

Für eine mikrobielle Ganzzelltransformation ist zu bestimmen:

- Eigenschaften des Mikroorganismus
 - Abhängigkeit der Zellvitalität von Substratkonzentration, Temperatur, pH
 - Abhängigkeit der Zellvitalität von Substraten und Produkten (Cytotoxizitäten von Substrat, Produkt und Nebenprodukten)
 - Abhängigkeit der Zellvitalität von den Reaktionsbedingungen
 - Reaktorkonzept, Aerobizität
 - Einsetzbarkeit von organischen Lösungsmitteln oder Tensiden für die Substratverfügbarkeit
- Eigenschaften des Reaktionssystems
 - Gleichgewichtskonstanten reversibler Reaktionen
 - Nebenreaktionen beeinflussende Faktoren (katalysiert, unkatalysiert)
 - Effekt von Temperatur und pH auf die Reaktion und die Löslichkeiten von Substraten und Produkten
 - Geeignete C-Quelle, Vitamine, Spurenelemente
 - Enzym vorhanden/induziert?
 - Inhibitoren oder Induktoren

- Kinetische Untersuchungen
 - Zellwachstum
 - Biotransformation

Primär betreffen Änderungen der Reaktionsbedingungen bei isolierten Enzymen die Enzymaktivität (Gefahr der Denaturierung), bei ganzen Zellen die Zellvitalität.

1.5 Anwendungen

Die besondere Stärke von Biotransformationen liegt in der stereoselektiven Synthese, wo man gezielt die Eigenschaft vieler Enzyme nutzt, stereoisomerenreine Verbindungen zu produzieren. Die Biokatalyse steht dabei nicht etwa nicht in Konkurrenz zu etablierten Wissenschaftszweigen. Sie stellt vielmehr eine synthetisch äußerst wertvolle Ergänzung und Weiterentwicklung der vorhandenen präparativen Methodik dar und findet ihr Einsatzgebiet dort, wo klassisch-chemische Ansätze versagen oder unzureichende Ergebnisse liefern. In einigen Fällen sind Biotransformationen bei gleichem Ergebnis auch eleganter oder weniger aufwendig und können auf diese Weise eine umweltfreundliche Alternative zu bestehenden Prozessen bieten. Abbildung 1.6 gibt eine Übersicht über die Anwendungsbreite der verschiedenen Enzymklassen in der bioorganischen Synthese. Aus ihr geht die alles überragende Dominanz Hydrolase- und Oxidoreduktase-katalysierter Biotransformationen eindeutig hervor [18].

Dementsprechend sind die Haupteinsatzgebiete für Biotransformationen:

- Racematspaltung
- selektive Umwandlung einzelner funktioneller Gruppen in mehrfach funktionalisierten Substraten. Die verschiedenen funktionellen Gruppen können sich dabei in ihren Reaktionsverhalten sehr ähnlich sein
- Einführung eines chiralen Zentrums
- Funktionalisierung ausgewählter, formal nicht aktivierter Zentren im Substratmolekül

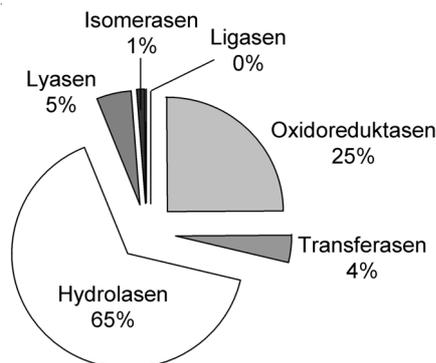


Abb. 1.6 Anwendungen der verschiedenen Enzymklassen in der bioorganischen Synthese.

Im Folgenden sollen nun die präparativen Potenziale der Biokatalyse anhand ausgewählter Beispiele diskutiert werden. Für das Verständnis der Reaktionsvielfalt enzymkatalysierter Reaktionen werden die zu Grunde liegenden Mechanismen eingehend behandelt. Auf diese Weise soll es dem Leser ermöglicht werden, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Reaktionen zu erkennen, die von Enzymen aus verschiedenen Enzymklassen katalysiert werden und sie für die präparative Anwendung im Labor gezielt einzusetzen.

Wie jede chemische Reaktion verlangt auch die bioorganische Synthese eine genaue Reaktionsplanung. Um dies zu erleichtern werden Biotransformationen im Folgenden unter drei Aspekten betrachtet:

1. Substratsolubilisierung und Substratbioverfügbarkeit
2. Enzymkatalysierte Umsetzung
3. Produktisolierung

1.5.1

Substratlöslichkeit und -bioverfügbarkeit

Die Selektivitäten von Biotransformationen sind Ergebnis des Zusammenspiels einer Reihe verschiedener Faktoren. Zu den Schlüsselkriterien, die das Reaktionsergebnis entscheidend beeinflussen können, gehört zunächst die Substratsolubilisierung sowie dessen Bioverfügbarkeit.

Um zum Biokatalysator zu gelangen, muss ein Substrat als erstes die wässrige Phase durchdringen. Hier spielen Aggregatzustand und Wasserlöslichkeit des Substrats eine große Rolle, denn für lipophile Substanzen wirkt das wässrige Kulturmedium wie eine polare Isolatorschicht zwischen Substrat und lipophiler Zellwand. Auch die chemische Natur des Ausgangsstoffes hat Einfluss auf die Bioverfügbarkeit, was vor allem bei elektronenarmen β -Ketoestern eine große Rolle spielt.

Die Substratlöslichkeit lässt sich durch Zugabe geeigneter Lösungsvermittler modifizieren. Für schwerlösliche Verbindungen sind konventionelle Solubilisierungsstrategien oft ungeeignet, weil Solubilisatoren die Zellwandintegrität und damit die Zellvitalität massiv beeinflussen. Darüber hinaus kann die Bioverfügbarkeit eines Substrats, trotz verbesserter Löslichkeit, infolge intermolekularer Wechselwirkungen mit den Solubilisatoren abnehmen [19]. Es existiert aber eine leistungsfähige Alternativstrategie, die diese Problematik umgeht.

1.5.2

Enzymkatalysierte Umsetzung

Werden *isolierte Enzyme* verwendet, beschränken sich die zu erwartenden präparativen Fragestellungen in der Regel zumeist auf die enzymkatalysierte Umsetzung. Das Experiment profitiert davon, dass Enzyme genau definierte Systeme sind und dass sich viele enzymkatalysierte Prozesse deswegen gut kontrollieren lassen. Gelingt die Anwendung kontinuierlicher Verfahren, beispielsweise

in einem Enzymmembranreaktor (EMR), lassen sich leicht Produktmengen im Multigramm-Maßstab erzeugen. Da sich aber isolierte Enzyme nicht in der schützenden Umgebung des Zellinneren befinden, ist die Wahl der Reaktionsbedingungen von entscheidender Bedeutung, da andernfalls durch Denaturierung der Biokatalysator Schaden nehmen kann, bis hin zum vollständigen Aktivitätsverlust. Der große Vorteil der bioorganischen Chemie, Reaktionen unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können, stellt somit auch Anforderungen an den Experimentator.

Bei *Ganzzell-Biotransformationen* muss ein Substrat jedoch zusätzlich die Barrierefunktion der Zellmembran überwinden, bevor es ins Cytosol eintreten kann. In der Zelle, wo das Substrat der katalytischen Aktivität der zellulären Enzyme sowie der chemischen Reaktivität zelleigener Cytoprotektoren wie Glutathion ausgesetzt ist, findet die eigentliche Biotransformation im Inneren der Zelle statt. Da der Begriff „Ganzzell-Biotransformationen“ definitionsgemäß nur besagt, dass das Substrat durch Enzyme oder anderweitige biologische Systeme einer Zelle umgewandelt wird, kann noch keine Aussage über die Selektivitäten getroffen werden, mit denen die Ausgangsverbindung transformiert wird.

Ohnedies ist über die Vorgänge innerhalb der Zelle wenig bekannt, und die an der biokatalytischen Umsetzung beteiligten Enzyme sind oftmals nicht identifiziert [20]. Die Zellphysiologie ist ein wichtiger Faktor, der die Stereoselektivität einer Ganzzell-Biotransformation in entscheidender Weise beeinflussen kann. Auch das intrazelluläre Abwehrsystem gegen chemische Stressoren entscheidet über das Reaktionsergebnis [15]. Da ein nichtnatürliches Substrat in der Zelle mit einem natürlichen Substrat um Enzymaktivität konkurriert, bedeutet jede Ganzzell-Biotransformation einen Eingriff in das zum Zeitpunkt der Substratzugabe vorgegebene Enzymnetzwerk. Die Zelle reagiert auf diesen Stressfaktor auf verschiedene Weise.

Intrazelluläre Konkurrenzprozesse können das Reaktionsergebnis also erheblich beeinflussen. Im Idealfall wird das Substrat mit hoher Chemo-, Regio- und Stereoselektivität in die Zielverbindung umgesetzt, die nun ebenso die Zellmembran-Barriere – diesmal nach außen – passieren muss.

Auf der anderen Seite werden substratinduzierte Effekte auf das Enzymnetzwerk der Zelle auch gezielt analysiert, um die intrazellulären Vorgänge während einer Biotransformation besser zu verstehen. Diese Untersuchungen sind Grundlage für mathematische Modelle des xenobiotischen Zellstoffwechsels [21].

1.5.3

Produktisolierung

Die Produktisolierung aus enzymkatalysierten Reaktionen gestaltet sich in der Regel recht einfach und präparative Probleme sind in den seltensten Fällen zu erwarten. Die Produktisolierung aus Hochzell-dichte-Biotransformationen mit ganzen Zellen ist dagegen oftmals nicht trivial, da die Zellen emulgierende Agenzien ins Medium abgeben. Bei extraktiver Aufarbeitung hat dies zur Folge, dass sich bei Zugabe des Lösungsmittels zur wässrigen Phase stabile Gele und Schleime

bilden, welche die Produktextraktion erheblich behindern. Klassischerweise werden die Bioemulgatoren im Vorfeld des Extraktionsschrittes über eine dreistufige Membranfiltration entfernt (Mikro-, Ultra- und Nanofiltration), um die unerwünschte Gelbildung zu umgehen. Alternativ bietet sich die Wasserdampfdestillation oder, wie die aktuelle Entwicklung zeigt, eine enzymatische Spaltung von Gelbildnern an.

Im Folgenden werden Fragen der Substratsolubilisierung, der enzymkatalysierten Umsetzung und der Aufarbeitung eingehender beleuchtet. Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf dem Verständnis der den enzymkatalysierten Reaktionen zugrunde liegenden Mechanismen.

1.6 Literaturempfehlungen

Es existiert eine Reihe verschiedenster Monographien und Übersichtsartikel, die sich mit Themen der bioorganischen Chemie befassen. Angesichts des hohen interdisziplinären Charakters dieser Disziplin wird eine Auswahl weiterführender Bücher und Übersichtsartikel vorgestellt. Dabei werden auch „ältere“ Werke aufgeführt, die an Aktualität nichts eingebüßt haben.

Biokatalyse

- A. S. BOMMARIUS, B. R. RIEBEL, *Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
 K. FABER, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg, 2004.
 K. DRAUZ, H. WALDMANN (Hrsg.), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
 K. FABER, *Biotransformations*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2000.
 A. LIESE, K. SEELBACH, C. WANDREY, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
 H. REHM, H. REED (Hrsg.), *Biotechnology*, 2. Aufl., Band 8a/b, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
 S. M. ROBERTS (Hrsg.), *Biocatalysis for Fine Chemical Synthesis*, Wiley, New York, 1999.
 L. POPPE, L. NOVAK, *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Verlag Chemie, Weinheim, 1992.

Biochemie und Bioanalytik

- G. LÖFFLER, P. E. PETRIDES, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2003.
 M. HESSE, H. MEIER, B. ZEEH, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 2002.
 A. PINGOUD, C. URBANKE, J. HOGGETT, A. JETSCH, *Biochemical Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
 T. G. M. SCHALKHAMMER (Hrsg.), *Analytical Biotechnology*, Birkhäuser Verlag, Basel, 2002.
 D. VOET, J. G. VOET, C. W. PRATT, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.

Organische Chemie

- W. WOLFGANG, W. FRANCKE, *Beyer/Walter Lehrbuch der Organischen Chemie*, 24. Aufl., S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2004.

Mikrobiologie

- A. STEINBÜCHEL, F. B. OPPERMAN-SANIO, *Mikrobiologisches Praktikum*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2003.
- R. SÜSSMUTH, J. EBERSPÄCHER, R. HAAG, W. SPRINGER, *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*, 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.
- H. G. SCHLEGEL, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.

Übersichtsartikel

- E. SANTANIELLO, A. MANZOCCHI, *Trends Org. Chem.* 2000, 8, 21–34.
- N. HOFFMANN, *Chemie in unserer Zeit* 1996, 30, 201–213.
- E. SANTANIELLO, P. FERRABOSCHI, P. GRISENTI, A. MANZOCCHI, *Chem. Rev.* 1992, 92, 1071–1140.
- R. CSUK, B. I. GLÄNZER, *Chem. Rev.* 1991, 91, 49–97.
- S. SERVI, *Synthesis* 1990, 1–25.

