

ANGEWANDTE CHEMIE

97. Jahrgang 1985

Heft 8

Seite 617-720

Enzyme in der organischen Synthese

Von George M. Whitesides* und Chi-Huey Wong

**Neue synthetische
Methoden (53)**

Enzyme haben als Katalysatoren in der organischen Synthese eine große Zukunft. Bisher sind ihre Anwendungen auf einige industriell in großem Maßstab durchgeführte Hydrolysen sowie die Herstellung zahlreicher Reagentien für Analysen und Synthesen im Laboratoriumsmaßstab beschränkt. Verbesserungen bei der Produktion von Enzymen, die zum einen auf neuen Erkenntnissen der klassischen Mikrobiologie und zum anderen auf ersten erfolgversprechenden Ansätzen der Gentechnologie beruhen, sowie bei ihrer Stabilisierung und Handhabung machen diese Katalysatoren für einen Gebrauch in der organischen Synthese immer attraktiver. Dieser Aufsatz beschreibt den aktuellen Stand auf dem sich schnell entwickelnden Gebiet der enzymkatalysierten organischen Synthese; daneben werden auch die Entwicklungsmöglichkeiten erörtert.

1. Einleitung

Gegenwärtig sieht sich die präparative Organische Chemie zunehmend mit Fragestellungen aus der Biologie konfrontiert. In der Molekular- und Zellbiologie, in Genetik, Immunologie, Endokrinologie, Neurobiologie sowie in der Biochemie der Rezeptoren und Membranen sind in jüngster Zeit erstaunliche Fortschritte gemacht worden, und der Ablauf vieler biologischer Schlüsselprozesse ist heute in groben Zügen bekannt. Soll das detaillierte Verständnis dieser Prozesse auf molekularer Ebene zur Herstellung wohldefinierter Verbindungen, die für Medizin, Landwirtschaft und Biologie von Nutzen sein können, angewendet werden, so erfordert dies Substanzklassen, die bisher nicht im Brennpunkt der Aktivitäten in der organischen Synthese gestanden haben: Peptide und Proteine, Oligo- und Polysaccharide sowie Nucleinsäuren und dazu Kombinationen, Analoga und Derivate dieser Spezies. Mit ihrer Synthese hat sich die moderne präparative Organische Chemie bisher nur wenig beschäftigt. Damit die Chemie

die Entwicklung der Molekularbiologie fördert und von dieser auch wieder profitiert, muß sie die Synthese derartiger Verbindungen ebenso gut beherrschen wie heute z. B. die von Kohlenwasserstoffen und Heterocyclen. Dies könnte dazu beitragen, daß die Molekularbiologie einen möglichst großen gesellschaftlichen Nutzen entfalten kann.

Aus vier Gründen haben sich präparativ arbeitende Organiker nur zögernd den Syntheseproblemen gewidmet, die die Molekularbiologie stellt:

1. Viele der biologisch wichtigen Substanzen haben ungewohnte und unbequeme physikalische Eigenschaften. Häufig sind sie wasserlöslich, geladen, schwerflüchtig und hochmolekular. Sie können instabil und schwer zugänglich sein, und ihre Reinigung kann große Probleme aufwerfen. Bei der Bestimmung ihrer Struktur sind spektroskopische Methoden oft nur von begrenztem Wert.

2. Einige der charakteristischen Probleme, denen man bei der Synthese dieser Substanzen begegnet – z. B. die Bildung von Amid-, Phosphodiester- und Glycosidbindungen in repetitiven Verfahren, oder die Modifizierung von Kohlenhydraten –, sind lange als „chemisch uninteressant“ angesehen worden.

3. Für einige dieser Probleme bietet die klassische organische Synthese nicht die besten Lösungen. Fermentations-, Zellkultur- und DNA-Rekombinationstechniken werden

[*] Prof. Dr. G. M. Whitesides
Department of Chemistry, Harvard University
Cambridge, MA 02138 (USA)

Prof. Dr. C.-H. Wong
Department of Chemistry, Texas A & M University
College Station, TX 77843 (USA)

bei der Produktion von Proteinen eher benötigt als rein chemische Verfahren, und für die Herstellung von Polysacchariden ist die Fermentation derzeit die einzige praktikable Route; für viele andere Produkte ist noch unklar, ob sie besser auf mehr chemischem oder mehr biologischem Weg synthetisiert werden können.

4. Diese Probleme sind schlicht nicht en vogue gewesen.

Damit die organische Synthese bei der Herstellung biologisch wichtiger Substanzen möglichst effektiv ist, sind Veränderungen im Methodenarsenal sowie bei der Auswahl der bearbeiteten Probleme und der wissenschaftlichen Gesprächspartner nötig. Zwar sind diese Veränderungen, die den Synthesestil und die Syntheseeziele betreffen, substantiell, doch bleibt das zentrale Anliegen präparativ arbeitender Organiker, reine, wohldefinierte molekulare Einheiten zu synthetisieren, unverändert bestehen.

Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über ein Gebiet der chemischen Synthese, das im Grenzbereich zwischen Organischer Chemie und Biochemie liegt: Die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Synthese^[1-12]. Unter den biologischen Synthesemethoden stehen diese der Chemie am nächsten. Chemiker verwenden heute ohne weiteres Platin als Katalysator, sie werden bald nicht mehr zögern, auch Lipase zu verwenden. Enzyme sind Katalysatoren, die naturgemäß bei der Synthese biologisch relevanter Substanzen hilfreich sind und die eine weniger drastische Umstellung der Arbeitsbedingungen erfordern als dies bei Fermentationsprozessen mit obligaten Anaerobiern oder Säugetier-Zellkulturen der Fall ist. Die Enzymologie liefert in gewissem Sinn auch die Grundlagen der biologischen Synthesemethoden, denn auch die dem Chemiker weniger vertrauten Verfahren mit lebenden Zellen beruhen letzten Endes auf der Wirkung von Enzymen. Selbstverständlich bietet die enzymatische Synthese (sei sie mehr biologisch oder mehr chemisch) nicht unbedingt für jedes beliebige Syntheseproblem aus dem Bereich der Biologie die beste Lösung^[9,10]. Ein Ziel dieses Aufsatzes ist es, die Bereiche zu nennen, in denen enzymatische Methoden die vorteilhafteren sind.

2. Aktuelle Anwendungsgebiete

Enzyme sind Katalysatoren, die ihren großen Nutzen und ihr Potential in einigen Bereichen der Organischen und Pharmazeutischen Chemie bereits unter Beweis gestellt haben.

2.1. Chirale Synthesebausteine

Das erste Gebiet, in dem Enzyme vielseitig Anwendung gefunden haben, ist die Darstellung chiraler Synthesebausteine, wobei vor allem die kinetische Racematspaltung wichtig ist. Die pharmazeutische Industrie ist an diesen Methoden aus zweierlei Gründen interessiert: Sie braucht leistungsfähige Synthesen, und sie muß gesetzlichen Vorschriften genügen, nach denen zunehmend die Herstellung enantiomerenreiner Substanzen anstelle von Racematen gefordert ist. Enantioselektive Synthesen mit optisch aktiven Übergangsmetallkatalysatoren werden deshalb gegenwärtig ebenfalls intensiv bearbeitet^[13-17]. Die biologischen

Verfahren haben sich bisher jedoch als breiter anwendbar erwiesen.

2.2. Spezialprodukte und Feinchemikalien

Bei der chemischen Manipulation von Zuckern, Nucleinsäuren, Aminosäuren und Lipiden ist der Nutzen von Enzymen unbestritten, und in der Tat liegen alle industriellen Anwendungen der Enzymologie auf diesen Gebieten^[18]. Es hat sich gezeigt, daß Enzyme unter geeigneten Bedingungen auch großtechnische Prozesse katalysieren können^[9]: Fructosereicher Maissirup wird in den USA in einer Größenordnung von $> 10^5$ t jährlich produziert, und Asparaginsäure, Äpfelsäure sowie Guanosin-5'-monophosphat (GMP, Aromastoff) werden enzymatisch in erheblichen Mengen hergestellt.

Zahlreiche Chemikalien für die Biochemie und die Pharmakologie konnten ebenfalls am besten auf enzymatischem Weg erhalten werden.

2.3. „Biologische“ Pharmaka

Die pharmazeutische Forschung widmet sich gegenwärtig intensiv komplexen biogenen Substanzen – insbesondere Proteinen, Polypeptiden und verwandten Stoffen, die durch molekulargenetische Methoden erhalten wurden^[7,9]. Enzyme spielen bereits heute – und sie werden dies in Zukunft noch mehr tun – eine wichtige Rolle, wenn es darum geht, die fermentativ erhaltenen Produkte zu modifizieren. So werden mit Peptidasen selektiv Peptidbindungen gespalten (und auch geknüpft), mit anderen Enzymen werden selektiv Oligosaccharideinheiten mit Proteinen verknüpft, Glycoproteine werden modifiziert usw. Ein Verfahren zur Umwandlung von Schweineinsulin in Humaninsulin war das erste Beispiel einer solchen Anwendung im großen Maßstab; das so erhaltene Produkt ist auf dem Markt.

2.4. Biotechnologie^[9,10]

Viele Anwendungen aus dem Bereich der Biologie, die unter dem Begriff „Biotechnologie“ zusammengefaßt werden, erfordern die Manipulation biogener oder biologisch wichtiger Substanzen. In der klinischen Analyse, für Biosensoren, für Aroma- und Duftstoffe sowie für andere Zwecke werden Verbindungen benötigt, die möglicherweise eine enzymatische Synthese oder Modifizierung erfordern.

Wir möchten ausdrücklich anmerken, daß die Bearbeitung der enzymatischen Katalyse in der organischen Synthese – wie die von Katalysen überhaupt – im Grunde Verfahrenswissenschaft ist. Das heißt, ihr Hauptziel ist die leistungsfähige und wirtschaftliche Synthese bestimmter Verbindungen (Abb. 1). In dieser Hinsicht unterscheidet sie sich von einem großen Teil der präparativen Arbeiten, die heute an Universitäten durchgeführt werden, in denen die spezielle Verbindung weniger wichtig ist als die einzelnen Stufen (oder die gesamte Synthesestrategie), die neue und oft sehr verallgemeinerungsfähige chemische Prinzipien aufzeigen.

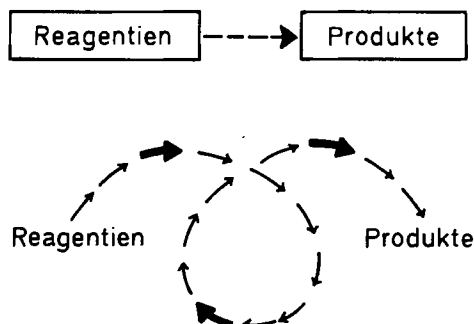


Abb. 1. Zwei Arten, an Syntheseprobleme heranzugehen: Die obere zielt auf die Entwicklung praktikabler und leistungsfähiger Synthesewege für definierte Produkte, während die untere in der Synthese hauptsächlich ein Mittel zur Veranschaulichung von Reaktionsprinzipien und Synthesestrategien sieht. Die enzymatische Synthese gehört ebenso wie ein Großteil der metallkatalysierten im wesentlichen (wenn auch nicht ausschließlich) zur oberen Herangehensweise.

3. Charakteristische Eigenschaften von Enzymen als Katalysatoren

Enzyme als Katalysatoren zeichnen sich durch drei typische Merkmale aus:

1. Sie beschleunigen Reaktionen.
2. Sie sind selektiv, d.h. die Reaktion einer bestimmten Substanz kann drastisch beschleunigt werden, während die einer strukturell eng verwandten Substanz unbeeinflusst bleibt.
3. Sie können Regulationsprozessen unterliegen, d.h. die katalytische Aktivität kann stark durch die Konzentrationen von Substraten, Produkten oder anderen gelösten Spezies beeinflusst werden.

Die Selektivität von Enzymen ist mitentscheidend für ihre Bedeutung in der organischen Synthese. Enzyme bieten die Möglichkeit, sehr selektive Umwandlungen durchzuführen, eine Eigenschaft, die bei der Arbeit mit chiralen und multifunktionellen Molekülen sehr wertvoll ist. Für den Stoffwechsel ist die Regulation der Enzymaktivitäten unerlässlich, während sie bei Anwendungen in der organischen Synthese, vor allem wegen der Produkthemmung, meist ein Hindernis darstellt. Die katalytische Aktivität des Enzyms nimmt ab, wenn die Konzentration eines Produktes einen bestimmten Wert erreicht^[19, 20]. Um die Produkthemmung auszuschalten, ist es unter Umständen nötig, das Produkt aus dem Reaktionsgemisch laufend zu entfernen^[20] (was in der Praxis oft schwierig ist), niedrige Produktkonzentrationen und damit eine aufwendige Aufarbeitung zu akzeptieren oder große Mengen des Enzyms zu verwenden; alle drei Faktoren erhöhen die Kosten. Ein Phänomen wie die Regulation gibt es in der Übergangsmetallkatalyse nicht, obwohl die Vergiftung des Katalysators durch Produkt oder Ausgangsmaterial eine gewisse Entsprechung darstellt.

Einige Eigenschaften der Enzyme sind für ihre Anwendung in der organischen Synthese wichtig:

1. Ihre Verfügbarkeit, ihr Preis und ihre Lebensdauer variieren beträchtlich. Ein Enzym enthält typischerweise ein aktives Zentrum auf je 20000–50000 Molekularge-

wichtseinheiten. Dieses ungünstige Verhältnis kann durch eine hohe Wechselzahl (Turnover-Zahl, mol Produkt pro Zeiteinheit und mol Enzym) ausgeglichen werden, aber nicht immer. Die Wirtschaftlichkeit der Enzymanwendung hängt von mehreren Faktoren ab: vom Preis des Enzyms, seiner spezifischen Aktivität und seiner Lebensdauer. In Tabelle 1 sind die Kosten für Forschungsmengen charakteristischer, käuflicher Enzyme, die in der Synthese nützlich

Tabelle 1. Spezifische Aktivitäten und Kosten einiger im Handel erhältlicher Enzyme, die sich zur Anwendung in der organischen Synthese eignen [a].

Enzym [b]	E.C.- Nummer	Spezifische Aktivität [U/mg Protein]	Kosten (US-\$/ 1000 U) [c]
Pferdeleber-ADH	1.1.1.1	2	50
ADH aus Hefe	1.1.1.1	400	0.2
ADH aus <i>T. bruckii</i>	1.1.1.2	15	53
Glycerin-DH (<i>Cellulomonas sp.</i>)	1.1.1.6	50	56
L-Lactat-DH	1.1.1.27	1400	0.5
D-Lactat-DH	1.1.1.27	300	26
Malat-DH	1.1.1.37	3000	1.3
6-Phosphogluconat-DH	1.1.1.44	50	280
Glucose-DH (<i>B. cereus</i>)	1.1.1.47	250	160
Glucose-6-phosphat-DH	1.1.1.49	400	15
Glucose-Oxidase	1.1.3.4	200	0.4
Galactose-Oxidase	1.1.3.9	300	20
Formiat-DH	1.2.1.2	3	667
Aldehyd-DH	1.2.1.5	25	140
Glutaminsäure-DH	1.4.1.3	40	2.5
Leucin-DH	1.4.1.9	80	1750
L-Aminosäure-Oxidase	1.4.3.2	1	500
D-Aminosäure-Oxidase	1.4.3.3	1	50
Katalase	1.11.1.6	20000	0.00005
Meerrettich-Peroxidase	1.11.1.7	330	1.8
Tyrosinase	1.14.18.1	4000	0.1
Galactosyl-Transferase	2.4.1.22	5	5000
Hexokinase	2.7.1.1	300	2.7
Phosphoribulokinase	2.7.1.19	4	50
NAD-Kinase	2.7.1.23	20	85
Glycerokinase	2.7.1.30	150	33
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	500	0.6
Acetat-Kinase	2.7.2.1	600	50
Polynucleotid-Phosphorylase	2.7.7.8	35	428
Schweineleber-Esterase	3.1.1.1	100	10
Schweinepankreas-Lipase	3.1.1.3	50000	0.00002
Phospholipase A ₂	3.1.1.4	1500	5.3
Cholesterin-Esterase (Rinderpankreas)	3.1.1.13	3	200
Pancreatin [d]			
α-Amylase (<i>B. licheniformis</i>)	3.2.1.1	500	0.01
Amylo-1,6-Glucosidase	3.2.1.3	70	0.004
NADase	3.2.2.5	3	667
Chymotrypsin	3.4.21.1	50	0.1
Trypsin	3.4.21.4	10000	0.0009
Papain	3.4.22.2	40	1.5
Carboxypeptidase A	3.4.17.1	50	8
Protease [e]			
Acylase (<i>Aspergillus sp.</i>)	3.5.1.14	150	0.006
Penicillinase	3.5.2.6	2000	4
Aldolase (Kaninchenmuskel)	4.1.2.13	20	5
Sialinsäure-Aldolase	4.1.3.3	1	5000
Tryptophanase	4.1.99.1	1	200
δ-Aminolävulinsäure-Dehydrase	4.2.1.24	2	7500
Phenylalanin-Ammonium-Lyase	4.3.1.5	3	6670
UDP-Galactose-4-Epimerase	5.1.3.2	15	1330
Glucose-Isomerase	5.3.1.5	30	0.005
Phosphohexose-Isomerase	5.3.1.9	800	3

[a] Die Kosten können je nach Bezugsquelle und Menge erheblich variieren. [b] Abkürzungen: ADH = Alkohol-Dehydrogenase; DH = Dehydrogenase. [c] 700 U Enzymaktivität erzeugen unter günstigen Bedingungen ungefähr ein mol Produkt pro Tag. [d] Pancreatin ist ein rohes und mit ca. US-\$ 20.–/kg preiswertes Enzymgemisch, das oft die billigste Quelle für Lipasen, Cholesterin-Esterase sowie bestimmte Proteasen und Glycosidasen ist. [e] Eine Vielzahl von Proteasen geringer Reinheit (Pronase, Thermolysin, Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BPN, Newlase, Papaya und andere) sind recht preiswert erhältlich (US-\$ 0.1–1.–/1000 U).

sind, zusammen mit ihren spezifischen Aktivitäten aufgeführt. Bezugsgröße ist die Internationale Einheit (International Unit, IU) der Enzymaktivität, die so definiert ist, daß 1 U pro min 1 µmol Produkt erzeugt; 700 U Enzymaktivität produzieren etwa 1 mol Produkt pro Tag. In der letzten Spalte sind die Kosten für die Menge des Enzyms aufgeführt, die zur Produktion von 1 mol Produkt benötigt wird, ideale Bedingungen – d.h. maximale Anfangsgeschwindigkeit (v_{\max}) – vorausgesetzt. In Wirklichkeit laufen nur wenige Synthesen unter idealen Bedingungen ab, und die Enzymmengen, die für eine bestimmte Syntheseleistung benötigt werden, können das zwei- bis hundertfache der berechneten Menge betragen.

2. Manche Enzyme benötigen Cofaktoren, die verbraucht werden oder regeneriert werden müssen und die deshalb auf die Wirtschaftlichkeit einer enzymatischen Reaktion einen ebenso großen Einfluß haben können wie das Enzym.

3. Die meisten Enzyme sind wasserlöslich; ihre größte Aktivität zeigen sie in wäßriger Lösung bei pH 7–8 und Raumtemperatur. Die Bedeutung der Wasserlöslichkeit als Nachteil für die Anwendung von Enzymen in der Synthese ist von vielen Organikern wahrscheinlich überschätzt worden. Wenn auch die meisten Enzyme mit völlig wasserunlöslichen Substanzen nicht reagieren, so können diese doch oft in heterogenen Reaktionen umgesetzt werden, wobei nur geringe Mengen des Substrates in der wäßrigen, enzymhaltigen Lösung vorliegen^[21–24]. In bestimmten Fällen verträgt das Enzym auch mäßige Konzentrationen organischer Cosolventien wie Ethylenglycol, Glycerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF)^[25–27].

4. Mehrere Enzyme können kombiniert werden, um mehrere enzymkatalysierte Transformationen sequentiell oder parallel durchzuführen. Diese Eigenschaft der Enzyme beruht darauf, daß sie auch in ihrer natürlichen Umgebung nebeneinander vorliegen. Für nichtenzymatische Mehrkatalysatoren-Systeme gibt es dagegen nur wenige Beispiele.

5. Enzyme werden schon unter relativ milden Bedingungen abgebaut. Chemiker sind es gewohnt, Metallkatalysatoren über lange Zeiträume ohne Aktivitätsverlust aufzubewahren. Enzyme dagegen können beim Lagern auf zahlreichen Wegen denaturiert werden^[28–33]. Mögliche Ursachen sind z.B. Zerstörung durch geringe Mengen von Proteasen, die als Verunreinigung in der Enzympräparation vorhanden sind, Konformationsänderungen, die durch das Medium oder Temperaturänderungen zustande kommen, Verunreinigung durch Mikroorganismen und Autoxidationen. All dies macht den Umgang mit Enzymen schwieriger als den mit anderen Katalysatortypen.

4. Kinetik und Mechanismus von Enzymreaktionen – Bedeutung für die Synthese

Die Erforschung von Kinetik und Mechanismus von Enzymreaktionen ist schon seit jeher ein bedeutender Zweig der Biochemie. Sehr nützlich, wenn auch für die Durchführung von Synthesen nicht unbedingt erforderlich, ist die Kenntnis charakteristischer kinetischer Konstanten der Enzymreaktion (insbesondere der Michaelis-Menten- und

der Inhibitor-konstanten) sowie der pH-Abhängigkeiten^[19,20]. Es ist gerade ein Hauptvorteil der Enzymkatalyse (z.B. im Vergleich mit homogener und heterogener Katalyse durch Metalle), daß mit verhältnismäßig geringem Zeitaufwand die kinetischen Konstanten einer enzymkatalysierten Reaktion bestimmt werden können; dies ist sehr lohnend, weil es ermöglicht, die Aktivität eines Enzyms bei einer Synthese zu steuern. Abbildung 2 und die Gleichungen (a) und (b) beschreiben die wichtigsten Zusammen-

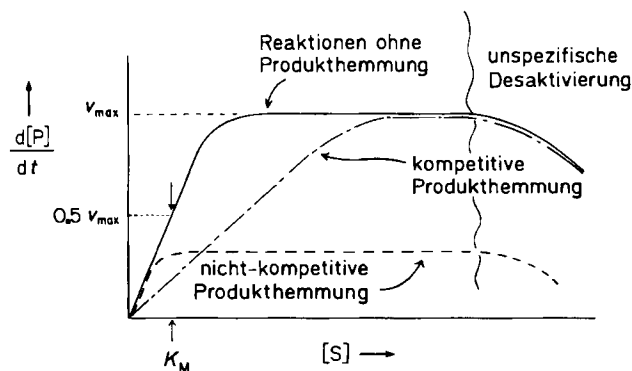


Abb. 2. Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen Reaktionsgeschwindigkeit $d[P]/dt$ und Substratkonzentration $[S]$ für eine einfache, der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchende Reaktion ohne Produkthemmung (—). Die Kurven für kompetitive (---) und nicht-kompetitive (---) Produkthemmung illustrieren den Einfluß einer willkürlich festgelegten Produktkonzentration auf das Verhältnis von $d[P]/dt$ zu $[S]$ im Vergleich zur Situation ohne Hemmung. Die Steigung der Kurve bei niedriger Substratkonzentration und die Höhe des Plateaus bei nicht-kompetitiver Hemmung werden durch die Produktkonzentration und die Inhibitor-konstante bestimmt. Bei höheren Substratkonzentrationen fällt im allgemeinen die Enzymaktivität infolge unspezifischer Desaktivierung ab.

hänge. Im einfachsten Fall, bei dem ein Substrat S durch ein Enzym E nach einer Michaelis-Menten-Kinetik [Gleichung (a)] in ein Produkt P umgewandelt wird, ohne daß eine Hemmung durch das Produkt oder eine andere Spezies stattfindet, wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch Gleichung (b) wiedergegeben.



$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]}{1 + \frac{K_m}{[S]}} = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (b)$$

Für Anwendungen in der Synthese ist es günstig, daß bei gegebener Enzymmenge die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substratkonzentration steigt, bis alle verfügbaren aktiven Zentren besetzt sind. Eine weitere Erhöhung von $[S]$ steigert dann die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr. Wenn die Substratkonzentration einen bestimmten Wert überschreitet, werden die meisten Enzyme sogar desaktiviert, weil dann das Lösungsmittel immer weniger den Charakter von Wasser hat. Die höchste Effizienz bei der Anwendung des Enzyms, das meist die teuerste Komponente des Reaktionsgemisches ist, wird in dem Bereich der Substratkonzentration erreicht, in der die Enzymkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (v_{\max} -Bedingungen). Ist die Substratkonzentration zu niedrig, bleibt ein bestimmter Anteil der aktiven Zentren im

Gleichgewicht unbesetzt; bei zu hoher Substratkonzentration dagegen wird das Enzym desaktiviert. Um die untere Grenzkonzentration des Substrates zu bestimmen, die eingehalten werden muß, um das Enzym effizient anzuwenden, ist die Michaelis-Konstante K_m deshalb von großem Wert; die Größe von v_{max} ist nützlich, weil sie angibt, wie schnell ein Produkt bei einer gegebenen Enzymmenge unter idealen Bedingungen höchstens gebildet werden kann. Sowohl K_m als auch v_{max} werden unter Assay-Bedingungen bestimmt; in der Praxis sind diese K_m -Werte meist ungefähr so groß wie die unter Synthesebedingungen beobachteten. Bei Verwendung immobilisierter Enzyme können höhere apparente K_m -Werte auftreten, wenn der Massentransport limitierend wird. Unter Idealbedingungen ist v_{max} meist viel größer als die in Synthesen maximal erreichbaren Reaktionsgeschwindigkeiten, weil im allgemeinen die Enzymaktivität unter Realbedingungen geringer ist. Diese Diskrepanz ist die Hauptursache für Enttäuschungen, die der unerfahrene Anwender von Enzymen in Synthesen erlebt. Die Ursachen können mannigfaltig sein: Unspezifische Desaktivierung durch hohe oder unangemessene Substrat-, Produkt-, Puffer- oder Ionenkonzentrationen kommt dafür ebenso in Frage wie ein Verlust der Aktivität immobilisierter Enzyme infolge chemischer Modifizierung, eine Limitierung durch den Massentransport ebenso wie eine reversible Hemmung durch das Produkt. Die Bedeutung der Produkthemmung wird erst seit kurzem richtig eingeschätzt. Eine detaillierte Diskussion der Enzymkinetik ist äußerst komplex^[20] und für die Anwendung von Enzymen in der organischen Synthese nicht nötig. Es ist jedoch wichtig zu wissen, daß es mehrere Arten der Hemmung gibt (Abb. 2). Die *kompetitive Hemmung* besteht in einer kompetitiven Bindung von Substrat und Produkt am aktiven Zentrum des Enzyms, und sie beeinflusst ledig-

lich K_m ; sie kann – wenigstens im Prinzip – durch höhere Substratkonzentrationen ausgeglichen werden. Die *nicht-kompetitive Hemmung* beeinflusst K_m nicht, erniedrigt aber v_{max} . Eine Steigerung der Substratkonzentration nutzt in diesem Fall nichts; die einzige allgemein wirksame Strategie besteht in einer Erniedrigung der Produktkonzentration, z. B. indem man das Produkt während der Reaktion kontinuierlich entfernt oder die Gesamtmenge des umzusetzenden Substrates begrenzt^[21]. Noch andere Hemmtypen beeinflussen v_{max} und K_m gleichzeitig.

Für den Praktiker sind die beiden wichtigsten Daten der Enzymkinetik also K_m und v_{max} ; ihre Kenntnis ermöglicht, Substrat- und Enzymkonzentration richtig zu wählen. Außerdem muß eine eventuell vorhandene Produkthemmung erkannt und gegebenenfalls die Hemmkonstante K_i grob bestimmt werden, damit durch die richtige Strategie – Erhöhung der Substratkonzentration und/oder Erniedrigung der Produktkonzentration – die Beeinträchtigung der Reaktion auf ein Minimum begrenzt wird.

5. Gelöste Probleme, aktuelle Aktivitäten und Perspektiven

Da die Anwendung von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Synthese ein verhältnismäßig neues Gebiet ist, muß eine große Zahl technischer Probleme gelöst werden, bevor diese Anwendungen zur Routine werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Art der Probleme und darüber, ob sie gelöst sind oder wann mit einer Lösung zu rechnen ist. Das „gelöst“ in Tabelle 2 bedeutet nicht, daß nicht noch Optimierungen möglich wären, doch gewährleisten die heute verfügbaren Verfahren, daß diese Probleme den Fortschritt nicht länger behindern. So sind

Tabelle 2. Einige charakteristische Probleme bei der Verwendung von Enzymen in der organischen Synthese.

gelöste Probleme	Probleme in Bearbeitung	Probleme, deren Lösung	
		in naher Zukunft	in ferner Zukunft
Immobilisierung	Entwicklung neuer Methoden zur Anwendung von (einfachen) Enzymen (Esterasen, Amidasen, Isomerasen) im Laboratorium	Anwendung von DNA-Rekombinationstechniken zur Enzymproduktion im großen Maßstab	Entwicklung neuartiger Enzyme mit Hilfe der Gentechnologie
Regeneration von Cofaktoren $\text{NAD(P)H} \rightleftharpoons \text{NAD(P)}$ AMP oder ADP \rightarrow ATP	Anwendung von Enzymen auf unnatürliche Substrate; Untersuchungen zur Anwendungsbreite leicht zugänglicher Enzyme	ortsspezifische Mutagenese zur Änderung von Enzymeigenschaften (K_m , K_i , Selektivität, Stabilität)	
Desaktivierung Thiol-Autoxidation Wirkung von Proteasen	Anwendung in Gegenwart organischer Lösungsmittel; Ein- und Zweiphasensysteme	Untersuchung von Enzymen thermophiler und halophiler Organismen auf Anwendbarkeit in der Synthese	
	Produkthemmung	Erprobung komplexer Multienzymsysteme in der Synthese; Vergleich mit intakten Zellen: „künstlicher Metabolismus“	
	Regeneration von Cofaktoren Acetyl-CoA; PAPS [a]	Anwendung zur Synthese von Feinchemikalien und chemischer Spezialprodukte	
	Vergrößern des Synthesemaßstabs in der pharmazeutischen Synthese	Modifizierung der Aktivität von Enzymen auf chemischem Weg: „halbsynthetische Enzyme“	

[a] PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat.

heute zahlreiche Methoden zur Immobilisierung von Enzymen bekannt^[34-39]. Dennoch ist es unerlässlich, die beste Strategie zur Immobilisierung eines bestimmten Enzyms durch intensives „Probieren“ herauszufinden. Insbesondere für die technische Anwendung mit ihren Anforderungen an Langzeitstabilität und hohe Leistungen in Festbettreaktoren wären verbesserte Immobilisierungsmethoden sehr nützlich. Für den Laboratoriums- und Technikumsmaßstab reicht jedoch die bekannte Technologie aus.

Auf manche der Punkte, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, wird im Laufe des Beitrags ausführlicher eingegangen werden; einige verdienen aber einen kurzen Kommentar an dieser Stelle:

- In der Gegenwart gilt die Hauptstoßrichtung der Anstrengungen auf diesem Gebiet der angewandten Enzymologie dem Ausloten der Anwendungsbreite von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Synthese. Können Substrate umgesetzt werden, die von den natürlichen sehr verschieden sind? Wie verändert sich die Enzymaktivität beim Zumischen organischer Lösungsmittel? Sollen sie immobilisiert, in Membranreaktoren oder in Lösung angewendet werden? Unter welchen Umständen bieten sich enzymatische Reaktionen als Methoden an, die den existierenden oder relativ leicht zu entwickelnden klassischen Techniken der organischen Synthese überlegen sind?
- In naher Zukunft werden ortsspezifische Mutagenese und DNA-Rekombinationstechniken bei der Produktion ungewöhnlicher Enzyme angewendet werden (einen Bedarf an großen Mengen dieser Enzyme vorausgesetzt). Es werden neue Enzyme mit unbekannten Eigenschaften aus bisher nicht erschlossenen Quellen entdeckt werden, und Enzymeigenschaften wie die Michaelis-Menten-Konstante, die Substratspezifität oder die thermische Stabilität werden gezielt verändert werden. Durch ortsspezifische Mutagenese gelang in jüngster Zeit z.B. die Erzeugung von T4-Lysozym, das eine künstliche Disulfidbrücke zur Erhöhung der Stabilität enthält^[40a], und einer Tyrosyl-tRNA-Synthetase, die einen niedrigeren K_m -Wert hat als das natürliche Enzym^[40b]. Komplexe Multienzymsysteme werden sicherlich bald bei Synthesen erprobt werden. Grundsätzlich könnten solche Systeme ebenso komplex werden wie große metabolische Reaktionszyklen; da diese Systeme in der Natur nicht vorkommen, erscheint für sie der Begriff „künstlicher Metabolismus“ gerechtfertigt. Es wird zu klären sein, ab welchem Grad an Komplexität zellfreie Systeme in Synthesen nicht mehr mit intakten Zellen konkurrieren können. Auch die chemische Modifizierung bekannter Enzyme zur Änderung von Aktivität, Stabilität oder Selektivität, also die Gewinnung semisynthetischer Enzyme, ist vielversprechend^[41].
- In ferner Zukunft sollte es der Proteinchemie anhand detaillierter Kenntnisse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen möglich sein, neue Enzyme für neue Reaktionen zu konzipieren und sie dann gentechnologisch zu produzieren. Die Aussicht auf völlig neue Katalysatoren ist zwar verlockend, ihre Verwirklichung ist jedoch Zukunftsmusik.

Nach diesen allgemeinen Bemerkungen über die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren in der organi-

schen Synthese sollen nun einzelne Klassen von Enzymen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Synthese geschildert werden. Dabei stehen einzelne Enzyme im Vordergrund. Die Auswahl orientiert sich an der Leichtigkeit ihrer heutigen Anwendung, was nicht ausschließt, daß in Zukunft andere Enzyme eine noch größere Anwendung finden werden.

6. Anwendungsbeispiele

6.1. Enzyme, die keine Cofaktoren benötigen

Einige Enzyme aus dieser Gruppe zeichnen sich durch besonders gute Zugänglichkeit, niedrigen Preis und hohe Stabilität aus. In der organischen Synthese sind sie die bisher am weitesten verbreiteten Enzyme, und sie werden wahrscheinlich als erste zum Standardrepertoire des präparativ arbeitenden Organikers gehören, der sich mit der Darstellung chiraler Synthesebausteine beschäftigt.

6.1.1. Esterasen: Schweineleber-Esterase und Lipasen

Für die Verwendung dieser Enzyme zur kinetischen Racematspaltung gibt es zahlreiche Beispiele^[42-68]. Die Hydrolyse von *meso*-Diestern hat sich besonders bei der Gewinnung chiraler Synthesebausteine bewährt; Theorie und Praxis dieser Strategie sind gut erforscht^[42-53]. Charakteristische Beispiele sind in Tabelle 3 aufgeführt. Mehrere Untersuchungen mit diesen Enzymen aus jüngster Zeit verdienen einen Kommentar, da sie auf allgemein nützliche Eigenschaften und Probleme hinweisen.

Lipasen entpuppen sich immer mehr als eine besonders in der enantioselektiven Synthese äußerst nützliche Klasse von Enzymen. Charakteristisch für sie sind niedrige Kosten, hohe Stabilität und eine große Toleranz gegenüber Änderungen der Substratstruktur^[53-57]. Hinzu kommt, daß sie keine wasserlöslichen Substrate erfordern: Ihre Aktivität ist an der Grenzfläche zwischen organischem und wässrigem Medium am besten; Befunde aus neueren Arbeiten legen nahe, daß Lipasen auch in stark wasserentziehenden und organischen Systemen einen hohen Wirkungsgrad behalten^[60, 69, 70]. *meso*-Substrate wandeln sie in hohen Ausbeuten in chirale Produkte um. Neben der kinetischen Racematspaltung durch Hydrolyse ist auch die durch Umeesterung nützlich^[60, 61].

Chirale Epoxyalkohole können enantioselektiv auf zwei völlig verschiedenen Wegen synthetisiert werden: Durch Lipase-katalysierte Hydrolyse^[71] oder durch übergangsmetallkatalysierte Epoxidierung^[17]. Die enzymatische Hydrolyse leidet unter dem Nachteil, daß sie eine kinetische Racematspaltung ist, d.h. es findet eine selektive Hydrolyse eines Enantiomers in Gegenwart des anderen statt; die Ausbeute kann deshalb höchstens 50% betragen. Dennoch ist dies Verfahren in bestimmten Fällen ein einfacherer Weg zu großen Mengen eines optisch aktiven Epoxyalkohols als das übergangsmetallkatalysierte Verfahren. Die heute verfügbaren enzymatischen und metallkatalysierten Prozesse weisen sehr unterschiedliche Substratspezifitäten auf, so daß sie sich eher ergänzen als daß sie miteinander konkurrieren.

Substrat	Produkt	ee [%]	Lit.							
		77	[43]							
		96	[51, 52]							
		100	[42, 47, 49]							
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
OH	OH	CH ₃	H	H	H	H	H	H	H	PhCH ₂ OCO
CH ₃	H	CH ₂ Ph	NH ₂	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	CHMe ₂		CH ₂ Ph	H
		87	[46]							
		90	[50]							
		95	[53]							
		90	[53]							

Reaktionen Lit.

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{---N---CH(R)---CO}_2^{\ominus} \end{array} \xrightarrow{\text{Acylyase}} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{---N---CH(R)---CO}_2^{\ominus} \end{array} + \text{H}_2\text{N---CH(R)---CO}_2^{\ominus} \quad [35, 72]$$

$$\text{R}^1\text{NH---CH(R}^2\text{)---CO}_2^{\ominus} + \text{H}_2\text{N---CH(R}^3\text{)---CO}_2\text{R}^4 \xrightarrow{\text{Protease}} \text{R}^1\text{NH---CH(R}^2\text{)---C(=O)---CH(R}^3\text{)---CO}_2\text{R}^4 \quad [83, 101]$$

$$\begin{array}{c} \text{Ph} \\ | \\ \text{CH}_2\text{---C(=O)---NH} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{CO}_2^{\ominus} \end{array} \xrightarrow{\text{Penicillinase}} \text{PhCH}_2\text{CO}_2^{\ominus} + \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{CO}_2^{\ominus} \end{array} \quad [102-104]$$

$$\begin{array}{c} \text{S---S} \\ | \quad | \\ \text{Gly---} \quad \text{Asn-OH} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{S} \\ | \quad | \\ \text{Phe---} \quad \text{Arg---Lys-Ala-OH} \end{array} \xrightarrow[\text{Thr-OMe}]{\text{Trypsin}} \begin{array}{c} \text{S---S} \\ | \quad | \\ \text{Gly---} \quad \text{Asn-OH} \\ | \quad | \\ \text{S} \quad \text{S} \\ | \quad | \\ \text{Phe---} \quad \text{Arg---Lys-Thr-OMe} \end{array} \quad [94]$$

Schweineinsulin

Humaninsulin-OMe (92%)

$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{C(=O)OMe} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C(=O)OH} \end{array} \xrightarrow{\text{Cephalosporin-Acylyase}} \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{C(=O)NH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C(=O)OH} \end{array} \quad [10]$$

$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C(=O)H} \end{array} \xrightarrow{\text{Caprolactam-Hydrolase}} \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{N} \\ | \\ \text{C(=O)H} \end{array} + \text{L-Lysin} \quad [105]$$

(DL) (D)

$$\text{H}_2\text{N---CH(Ph)---CO}_2\text{CH}_3 + \text{HO}_2\text{C---CH(Ph)---CO}_2\text{H} \xrightarrow{\text{Thermolysin}} \begin{array}{c} \text{HO}_2\text{C} \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{C(=O)NH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{C(=O)NH} \end{array} \quad [23]$$

623

den als Substrate, und es hat sich bei der Darstellung seltener, unnatürlicher oder isotopenmarkierter Zucker bewährt^[109, 110]. Ein Beispiel ist die Herstellung von 6-Desoxyfructose-1-phosphat (einer Vorstufe des Aromastoffes Furaneol)^[109].

Obwohl Kaninchenmuskel-Aldolase das einzige Enzym dieser Klasse ist, das in Synthesen Anwendung gefunden hat, so gibt es doch eine recht große Zahl einfach zugänglicher Enzyme, die Aldol- und Retroaldolreaktionen katalysieren können (Tabelle 5)^[111-121]. Beim aktuellen Interesse an gezielten Aldolreaktionen^[122-126] und an der Synthese von Kohlenhydraten^[127-130] ist zu erwarten, daß Aldolasen in diesem Zusammenhang in den nächsten Jahren mehr und mehr Beachtung finden werden.

6.1.4. Isomerasen und Lyasen

Enzyme dieses Typs haben wichtige kommerzielle Anwendungen gefunden. Glucosidasen beispielsweise werden in großen Mengen bei der Umwandlung von Maisstärke in Glucose verwendet^[131-134], und Glucose-Isomerase katalysiert die Gleichgewichtseinstellung zwischen Glucose und Fructose^[135-141]. Asparaginsäure kann durch Aspartase-katalysierte Addition von Ammoniak an Fumarsäure gewonnen werden^[142] und Äpfelsäure durch Fumarase-katalysierte Hydratisierung von Fumarsäure^[143]. An sich sind diese Reaktionen für den Synthetiker nicht besonders interessant, da jedoch die Enzyme leicht zugänglich sind und die Variationsbreite der Substrate, die sie akzeptieren,

Tabelle 5. Beispiele für die Anwendung von Enzymen, die Aldolreaktionen katalysieren.

Donor	Acceptor	Enzym [a]	Produkt	Lit.
		FDP-Aldolase		[108-111]
		Fuc-1-P-Aldolase		[112]
		Rha-1-P-Aldolase		[113]
		Sialinsäure-Aldolase		[114]
		KDO-Aldolase		[115]
		KDPG-Aldolase		[116]
		KDF-Aldolase		[116]
		KDG-Aldolase		[116]
		KHG-Aldolase		[117]
		MHKG-Aldolase		[116]
		KDHA-Aldolase		[118]
		KDO-8-P-Synthase		[119]
		Desoxyribose-Aldolase		[120, 121]

[a] Abkürzungen: FDP = D-Fructose-1,6-diphosphat; Fuc-1-P = L-Fuculose-1-phosphat; Rha-1-P = L-Rhamnulose-1-phosphat; KDO = 3-Desoxy-D-mannooctulose-6-phosphat; KDPG = 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat; KDF = 2-Keto-3-desoxy-D-fuconat; KDG = 2-Keto-3-desoxy-D-glucarat; KHG = 2-Keto-4-hydroxyglutarat; MHKG = 4-Methyl-4-hydroxy-2-ketoglutarat; KDHA = 2-Keto-3-desoxyheptanate.

noch nicht im Detail erforscht ist, könnte eine Beschäftigung mit ihnen lohnend sein.

6.1.5. Andere Enzyme

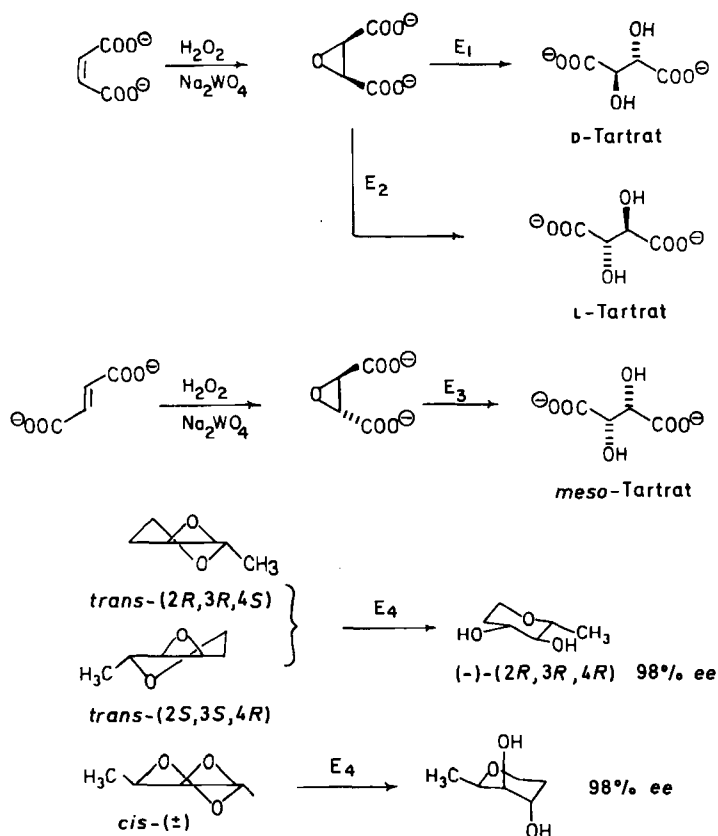
Cyanohydrolasen aus verschiedenen Quellen katalysieren die enantioselektive Kondensation von HCN mit Aldehyden^[144]. S-Adenosylhomocystein-Hydrolase katalysiert die Synthese von S-Adenosylhomocystein und Analoga aus Homocystein und Adenosin bzw. dessen Derivaten^[145-149]. NADase katalysiert den Austausch des Nicotinamidrestes gegen Nicotinamid-Analoga bei NAD. Dieser Syntheseweg bietet einen guten Zugang zu NAD-Analoga^[150-152]. Für die selektive Hydrolyse von Phospholipiden stehen mehrere Phospholipasen zur Verfügung. Die Phospholipasen A₁ und A₂ zum Beispiel katalysieren die Hydrolyse der Estergruppen in den Positionen *sn*-1 bzw. *sn*-2 von Glycerinestern^[153-155]; Phospholipase D bewirkt die Transphosphatidierung mit Phosphatidylcholin und anderen Aminoalkoholen als Substrat^[153-155]. Diese drei Enzyme sind zur Herstellung verschiedener Arten von Phospholipiden verwendet worden^[156]. Glycosidasen (z. B. β -Galactosidasen) sind zur Darstellung von Glycosiden und Oligosacchariden nützlich^[157-158]. 1-Desoxy-1-fluorsucose, eine Verbindung, die gegen Invertase-katalysierte Hydrolyse stabil ist und die vom Sucrose-Carrierprotein erkannt wird, ist aus UDP-Glucose und 1-Desoxy-1-fluor-D-fructose in einer durch Sucrose-Synthetase katalysierten Reaktion hergestellt worden^[159].

Auch für Enzyme, die die Addition von Ammoniak oder die hydrolytische Abspaltung von Aminogruppen kataly-

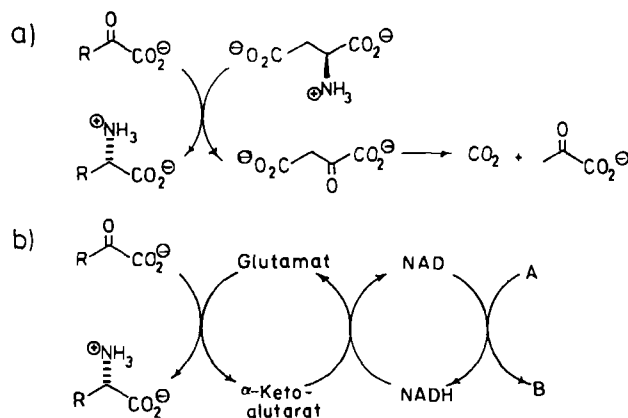
sieren, gibt es Anwendungsmöglichkeiten. L-Phenylalanin ist durch Phenylalanin-Ammonium-Lyase-katalysierte Addition von isotonenmarkiertem Ammoniak an Zimtsäure dargestellt worden^[4]. Für die hydrolytische Desaminierung findet sich in der technischen Produktion von L-Citrullin aus L-Arginin ein repräsentatives Beispiel^[35]. Die regiospezifische Öffnung von Epoxiden durch Epoxid-Hydrolasen könnte bei der Darstellung von Polyhydroxyverbindungen Anwendung finden^[160]. Schema 2 veranschaulicht die Verwendung dieser Klasse von Enzymen bei der Synthese von D-,^[161] L-^[162] und *meso*-Weinsäure^[163] sowie von Hydroxypyraninderivaten^[164-166]. Auch Nitril-Hydratasen^[166] könnten Anwendung in der organischen Synthese finden; ein Enzym dieser Gruppe katalysiert die Hydrolyse von Acrylonitril zu Acrylamid^[167].

6.2. Enzyme, die Cofaktoren benötigen und diese (Flavine, Pyridoxalphosphat, Porphyrine und Metallionen) schon enthalten

In diesen Fällen sind die Cofaktoren entweder kovalent oder durch starke nicht-kovalente Bindungen an das Enzym gebunden; sie werden während des Katalysezyklus regeneriert. Die Pyridoxalphosphat-abhängigen Transaminasen katalysieren die Synthese von Aminosäuren durch eine Übertragung der Aminogruppe von einer Aminosäure auf eine α -Ketosäure. In den meisten Fällen stammt die Aminogruppe von L-Glutamat, das in α -Ketoglutarat umgewandelt wird. Eine Strategie zur Synthese von α -Aminosäuren nutzt die Transaminase-katalysierte Übertragung einer Aminogruppe von L-Glutamat auf eine α -Ketosäure und die damit gekoppelte in-situ-Regenerierung des Glutamins durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat in einer Glutamat-Dehydrogenase-katalysierten Reaktion. Eine andere Gruppe von Transaminierungen mit L-Asparaginsäure als Aminogruppendonor hat für die Synthese möglicherweise den Vorteil, daß die gebildete Ketosäure (Oxallessigsäure) in situ spontan zu Pyruvat decarboxyliert; diese Decarboxylierung ist die treibende Kraft der Transaminierungen (Schema 3)^[168]. Diese Methoden sind besonders zur Darstellung hochreiner isotonenmarkierter Verbindungen geeignet, die Isotope mit kurzer Halbwertszeit, z. B. ¹¹C (20 min) oder ¹³N (10 min), enthalten^[169, 170].



Schema 2. Reaktionen mit Epoxid-Hydrolasen. Abkürzungen: E₁ = D-Tartrat-Epoxidase; E₂ = L-Tartrat-Epoxidase; E₃ = *meso*-Tartrat-Epoxidase; E₄ = Epoxid-Hydroxylase aus Kaninchenleber-Mikrosomen.



Schema 3. Verfahren zur enzymkatalysierten Transaminierung mit einer α -Ketosäure und a) Asparaginsäure oder b) Glutaminsäure als Quelle für Aminogruppen. A steht für einen Hydriddonor (Beispiele in Tabelle 7), der für die in-situ-Regenerierung von NADH aus NAD benötigt wird.

Die Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme Tyrosinase und Tryptophanase katalysieren die Synthese von L-Tyrosin bzw. L-Tryptophan aus Phenol (bzw. Indol), Pyruvat und Ammoniak. Mit Phenolderivaten können neue Aminosäuren dargestellt werden; so erhält man mit Brenzcatechin L-DOPA. Ein ähnliches Verfahren ist zur Herstellung von Tryptophan-Analoga verwendet worden^[171, 172]. Eine leistungsfähige Synthese von Porphobilinogen aus δ -Aminolävulininsäure nutzt die Pyridoxalphosphat-haltige δ -Aminolävulinat-Dehydratase^[173, 174]. Das Flavoenzym Glucose-Oxidase findet in der Lebensmittelindustrie breite Anwendung als Antioxidans^[175]. Unter anaeroben Bedingungen katalysiert Glucose-Oxidase auch den Elektronentransfer von Glucose auf Acceptoren wie Benzochinon^[176]. Außer zur Bestimmung der optischen Reinheit von Aminosäuren^[177] sind L- und D-Aminosäure-Oxidasen auch zur Darstellung von α -Ketosäuren verwendet worden^[35].

Das Cu²⁺-haltige Enzym Galactose-Oxidase katalysiert die Oxidation von D-Galactose zu D-Galactaldehyd und die stereospezifische Oxidation von Glycerin und 3-Halogen-1,2-propandiol zu L-Glycerinaldehyd bzw. L-3-Haloglycerinaldehyden^[178]. Die Untersuchung der Substratspezifität dieses Enzyms anhand zahlreicher Polyole erlaubte die Entwicklung eines Modells des aktiven Zentrums, das die stereospezifische Umwandlung von Polyhydroxyverbindungen in Aldehyde erklärt^[179]. Einige ungewöhnliche L-Zucker sind mit dieser Methode dargestellt worden^[179]. Dopamin- β -Monooxygenase, ein weiteres Cu²⁺-enthaltendes Enzym, katalysiert den stereospezifischen Austausch des *pro-R*-Benzylwasserstoffatoms von Dopamin gegen eine OH-Gruppe zu Norepinephrin (Noradrenalin). Dies Enzym katalysiert auch die stereoselektive Oxidation von Heteroatomen wie S und Se und von bestimmten Olefinen^[180].

Fe²⁺-haltige Peroxidasen katalysieren die Addition der Gruppierung HOX an olefinische Substrate ausgehend von H₂O₂ und X⁺^[181–184]; sie katalysieren auch die Oxidation von primären Alkoholen und Heteroatomen^[185–187]. Gemischte organische Dihalogenide entstehen in der Reaktion zwischen Olefinen, H₂O₂ und einem Gemisch anorganischer Halogenide; dabei werden auch C–F-Bindungen gebildet^[188]. Meerrettich-Peroxidase katalysiert die selektive Hydroxylierung aromatischer Verbindungen schon bei 0°C in Gegenwart von Dihydroxyfumarat, und einige Pharmaka, darunter auch L-DOPA, sind mit diesem Enzym im mmol-Maßstab dargestellt worden^[189]. Peroxidasen scheinen während des Reaktionsverlaufs hochreaktive und unselektive Spezies wie Singulett-Sauerstoff oder Hydroxyradikale zu erzeugen^[190, 191]. Ob enzymatische Hydroxylierungen mit fermentativen^[192] oder organometallkatalysierten Prozessen^[194] konkurrieren können, bleibt abzuwarten. Meerrettich-Peroxidase, die mit 2-Chlor-4,6-bis[ω -methoxypoly(oxyethylen)]-s-triazin^[193] modifiziert worden ist, ist in Benzol löslich und auch aktiv. Damit stehen praktisch homogene Lösungen eines Enzyms in organischen Solventien für Reaktionen zur Verfügung. Das gleiche Verfahren ist auch zur Herstellung hydrophober Lipase für Synthesen in organischen Medien angewendet worden^[62].

Mit Lipoxygenase wurde ein Hydroperoxyderivat für eine Prostaglandinsynthese dargestellt^[194, 195]. Das Fe²⁺-haltige Enzym Isopenicillin-Cyclase wurde isoliert und zur

Herstellung mehrerer Analoga von Isopenicillin N verwendet^[196–199]. Solche enzymatische Reaktionen könnten bei der Gewinnung neuer β -Lactam-Antibiotica nützlich sein.

Andere eisen- und kupferhaltige Monooxygenasen, die Sauerstoffatome aus O₂ in organische Substanzen einbauen, zeigen zwar auch interessante Eigenschaften, doch sind sie bisher ohne praktische Bedeutung. Diese Enzyme wandeln gesättigte Kohlenwasserstoffe in Alkohole und Olefine in Epoxide um, und Heteroatome wie N und S werden oxidiert; sie spalten auch aromatische Ringe und Steroidderivate und desalkylieren *N*- und *O*-Alkoxyverbindungen^[180]. Von den heute bekannten sauerstoffeinbauenden Enzymen sind im Prinzip die bakterielle Methan-Monooxygenase^[200–202], die die Hydroxylierung gesättigter Kohlenwasserstoffe katalysiert, die ω -Hydroxylase^[203–206], die die selektive Epoxidierung von Olefinen katalysiert, die Leber-Hydroxylase^[207, 208], die die Oxidation von Heteroatomen bei der Metabolisierung von Pharmaka bewirkt, und die Steroid-Hydroxylasen^[209, 210] für Anwendungen in der Synthese von Interesse. In der Praxis bereiten diese Enzyme allerdings schwerwiegende technische Probleme: Sie sind instabil und wenig selektiv; mehrere Enzyme müssen zusammenwirken, damit die Reduktion von O₂ mit einer NAD(P)H-Oxidation gekoppelt werden kann; außerdem ist die Kopplung der NAD(P)H-Oxidation mit der Sauerstoffaktivierung durch die damit verbundene Bildung von Wasserstoffperoxid und Superoxid als unerwünschte Nebenreaktionen nicht sehr effektiv, und schließlich ist es erforderlich, NAD(P)H zu regenerieren. Einige dieser Probleme werden nicht einfach zu lösen sein. Deshalb werden Monooxygenasen, die potentiell als Katalysatoren von Interesse sind, gegenwärtig noch nicht angewandt, da Fermentationen oder andere Prozesse mit intakten Zellen^[211] einfacher zu handhaben sind. Die Schwierigkeiten, die mit solchen Systemen verbunden sind, werden in Abschnitt 8 im Detail diskutiert. Andere oxidierende Enzyme, insbesondere Cyclohexanon-Monooxygenase^[212], die die Baeyer-Villiger-Oxidation katalysiert, und Lipoxygenase^[213], sind bereits in der Synthese angewendet worden.

6.3. Enzyme, die Cofaktoren benötigen, die zugesetzt werden müssen

6.3.1. Enzyme, die Nucleosidtriphosphate, insbesondere ATP, benötigen

Ein großer Teil der Enzyme, die an komplizierten Biosynthesen beteiligt sind, benötigt – im Gegensatz zu den abbauenden Enzymen – als Cofaktoren Nucleosidtriphosphate, insbesondere ATP, oder ein Nicotinamid (NAD(P)H). In größerem Maßstab sind diese Enzyme hauptsächlich wegen der Kosten der Cofaktoren bisher noch nicht verwendet worden. Der Preis für ATP liegt bei etwa US-\$ 800.— pro mol. Die Verbindung ist recht stabil; die wichtigste Abbaureaktion in Lösung ist meist die Hydrolyse der Ribosetriphosphatgruppe zu einem Di- oder Monophosphat (wahrscheinlich durch Spuren von ATPasen in der Lösung^[214]). Eine leistungsfähige Strategie zur Regenerierung von ATP aus ADP oder AMP würde auch enzymatische Systeme, die diesen Cofaktor benötigen, für die praktische Anwendung interessant werden lassen. Inzwischen ist das Problem der ATP-Regenerierung

zufriedenstellend gelöst^[215–221]. Mit einem Phosphatdonor wird ATP aus ADP oder AMP enzymatisch in situ regeneriert^[222–224]. Tabelle 6 faßt die gebräuchlichsten Methoden zur Regenerierung von ATP zusammen. Verfahren, die andere Phosphatquellen (z. B. Carbamoylphosphat) oder andere Techniken wie Fermentation verwenden, sind gegenwärtig nicht praktikabel^[225].

Tabelle 6. Reaktionen zur Regenerierung von ATP [a].

Reaktionen	$\Delta G'^{\circ}_{hyd}$ [kcal/mol]	Lit.
$\text{CH}_3\text{COP}_3^{2-} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{AcK}} \text{ATP} + \text{CH}_3\text{CO}^-$	-10.1	[218]
$\text{CH}_3\text{COP}_3^{2-} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{CH}_3\text{CCO}_2^-$	-12.8	[220]
$\text{CH}_3\text{OCOP}_3^{2-} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{AcK}} \text{ATP} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{CO}_2$	-12.4	[221]

[a] Abkürzungen: AcK = Acetat-Kinase; PK = Pyruvat-Kinase.

Das Verfahren mit dem größten Anwendungspotential verwendet Acetylphosphat als energiereichen Phosphatdonor. Diese Substanz ist leicht zugänglich^[218,221], und zwei Acetat-Kinasen sind im Handel erhältlich. Obwohl meistens mit Acetat-Kinase aus *E. coli* gearbeitet wird, könnte das Enzym aus *Bacillus stearothermophilus* überlegen sein; das Enzym aus *E. coli* enthält eine SH-Gruppe in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum und ist gegen Autoxidation empfindlich, während das Enzym aus *B. stearothermophilus* thiofrei ist^[219]. Acetylphosphat hat zwei Nachteile: es ist ein nur mäßig stark phosphorylierendes Reagens (gemessen an der Freien Energie $\Delta G'^{\circ}$ seiner Hydrolyse bei pH 7, siehe Tabelle 6), und es ist in wäßriger Lösung nicht hydrolysebeständig. Dies hat zwei Konsequenzen: Acetylphosphat wird nicht nur zerstört, es setzt auch Phosphationen frei, die dann Mg^{2+} komplexieren, die für die Wirkung der Kinase notwendig sind. Langsame Reaktionen sind deshalb mit diesem System problematisch.

Regenerationssysteme auf der Grundlage von Phosphoenolpyruvat (PEP) sind stabil gegen Hydrolyse, und außerdem ist PEP ein sehr starkes Phosphorylierungsreagens. Seine Synthese ist jedoch komplizierter als die des Acetylphosphats^[220]. Methoxycarbonylphosphat, ein neu entwickeltes Reagens, ist so einfach darzustellen wie Acetylphosphat und etwa so stark phosphorylierend wie PEP; es ist aber noch weniger stabil als Acetylphosphat^[221]. Auch andere Systeme zur Regenerierung von ATP sind vorgeschlagen worden^[35,225], doch scheinen sie nicht praktikabel zu sein.

Für Anwendungen im großen Maßstab kann selbst bei einem wirkungsvollen System zur Regenerierung von ATP aus AD(M)P der Preis für die am Beginn einzusetzende Menge ATP ausschlaggebend sein. AMP ist in Kilogramm-mengen preiswert käuflich und kann entweder in situ oder in einem gesonderten Schritt in ATP umgewandelt werden^[226]. Daneben ist ein leistungsfähiges Verfahren zur Gewinnung von rohem ATP aus RNA entwickelt worden^[226–228].

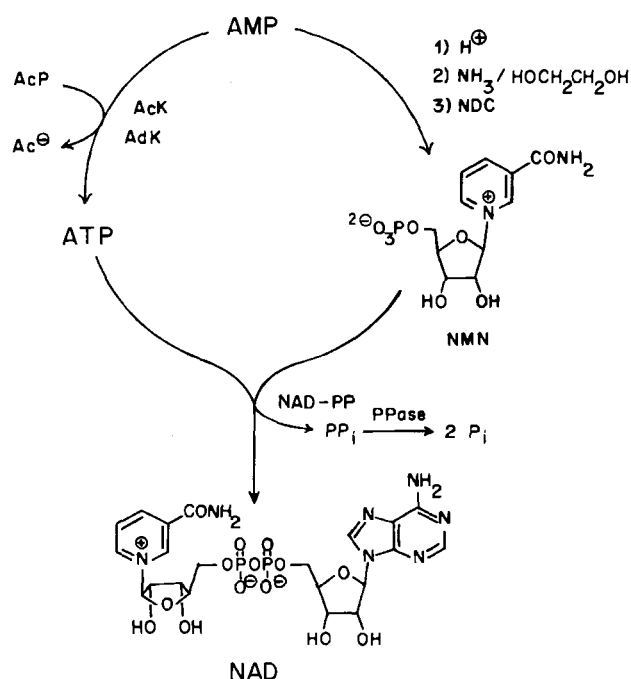
Die anderen Nucleosidtriphosphate (GTP, UTP, CTP) und die Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dGTP,

dUTP, TTP) sollten für Synthesen weniger bedeutsam sein als ATP. Zum Glück akzeptieren Acetat-Kinase und Pyruvat-Kinase jede dieser Spezies als Cofaktor^[218,229], und deshalb regenerieren die Systeme Acetylphosphat (oder Methoxycarbonylphosphat)/Acetat-Kinase und PEP/Pyruvat-Kinase alle diese Nucleosid- und Desoxynucleosidtriphosphate aus den entsprechenden Diphosphaten.

ATP-regenerierende Systeme wurden vor allem bei der Darstellung von Zuckerphosphaten mit Kinasen verwendet. Glucose-6-phosphat ist ein nützliches Reagens zur Regenerierung reduzierter Nicotinamid-Cofaktoren^[230]. Mit Dihydroxyacetonphosphat lassen sich Aldolkondensationen mit Kaninchenmuskel-Aldolase durchführen^[108,109]; *sn*-Glycerin-3-phosphat^[223] hat die richtige absolute Konfiguration für die Synthese von Phospholipiden; Arginin^[221,231] und Kreatinphosphat^[224] können ihrerseits als Phosphatdonoren fungieren, sie sind aber deshalb auch schwierig darstellbar. Diese Kinasen erlauben auch die Herstellung modifizierter Nucleosidtriphosphate (z. B. ATP- γ -S^[232] und ATP- α -S^[233]).

Das vielseitigste dieser einfachen, auf Kinasen beruhenden Systeme verwendet Glycerin-Kinase. Dieses Enzym akzeptiert verschiedene Substrate mit drei oder vier Kohlenstoffatomen und führt zu Produkten, die ein Enantiomer im Überschuß enthalten^[234]. Mit ihm sind kinetische Racematspaltungen möglich.

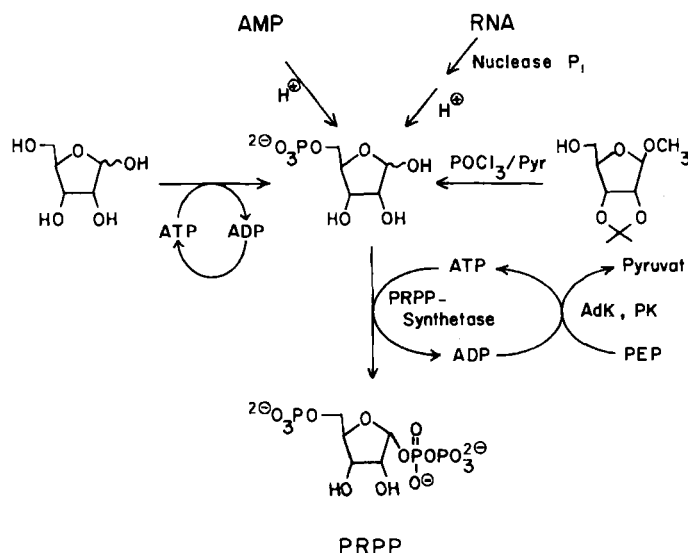
Mit den Synthesen von NAD(P) und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) werden kompliziertere Prozesse veranschaulicht, die eine Regeneration von ATP erfordern. Bei der Synthese von NAD(P) (Schema 4)^[235,236] wurden klassische organische und enzymatische Methoden erfolgreich kombiniert. Die Reaktionssequenz vermeidet Schutzgruppen, chromatographische Trennungen und komplizierte Reinigungsschritte. Mit der Isolierung von NAD aus natürlichen Quellen kann diese Darstellung dennoch nicht



Schema 4. Synthese von NAD aus AMP. Abkürzungen: AcP = Acetylphosphat; AcK = Acetat-Kinase; AdK = Adenylat-Kinase; NAD-PP = NAD-Phosphorylase; PP_i = Pyrophosphat; PPase = Pyrophosphorylase; NMN = Nicotinamidmononucleotid; NDC = *N*-(2,4-Dinitrophenyl)-3-carbamoylpyridiniumchlorid.

konkurrieren^[237–239]; sie ist aber chemisch so flexibel, daß strukturell modifizierte oder isotope markierte NAD(P)-Derivate hergestellt werden können.

Die Synthese von 5-Phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) (Schema 5) – einem zentralen Zwischenprodukt bei der Biosynthese der Nucleotide – ist ein weiteres Beispiel, in dem ein ATP-regenerierendes System in großem Maßstab zur Synthese einer Substanz verwendet wird, die auf klassischem Wege schwierig darzustellen wäre^[240]. Dieses Verfahren sollte neue Wege zu Nucleotiden und deren Analoga eröffnen.



Schema 5. Synthese von 5-Phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphat (PRPP). Abkürzungen: Py = Pyridin; PK = Pyruvat-Kinase; PEP = Phosphoenolpyruvat.

Eine Eigenschaft der Synthesen in Schema 4 und 5 verdient einen besonderen Kommentar: Die Selektivität der Enzyme erübrigt die normalerweise notwendige Reinigung von Zwischenstufen. In klassischen Mehrstufigensynthesen ist es wichtig, die Zwischenprodukte zu reinigen, da Verunreinigungen in den nachfolgenden Stufen weiterreagieren, so daß schließlich Produktgemische entstehen, die nur schwierig getrennt werden können. In enzymkatalysierten Synthesen sind die Anforderungen an die Reinheit von Zwischenstufen geringer, weil das Enzym nur sein Substrat umsetzt. Die Behandlung eines rohen Reaktionsgemisches mit einem Enzym ist deshalb zugleich eine Form der Reinigung. Die Umwandlung von AMP in NAD wurde im wesentlichen ohne Reinigung irgendeines Zwischenproduktes durchgeführt; das rohe NAD wurde von Enzymen als Substrat erkannt. Da die Reinigung von derartigen Verbindungen oft sehr schwierig ist, ist die Möglichkeit, rohe Reaktionsgemische direkt in enzymatischen Synthesen zu verwenden, von großer Bedeutung für die Praxis.

6.3.2. Enzyme, die reduzierte Nicotinamid-Cofaktoren (NADH oder NADPH) benötigen

Die Regenerierung der Nicotinamid-Cofaktoren wirft größere Probleme auf als die der Nucleosidtriphosphate: die Nicotinamid-Cofaktoren sind teurer als ATP (am billigsten ist NAD mit einem Preis von ca. US-\$ 1000.—/mol)

und, was noch wichtiger ist, in Lösung instabil. Die reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren werden durch verschiedene Prozesse zerstört; der wichtigste ist die durch Lewis-Säuren katalysierte Protonierung des Dihydronicotinamids, an die sich eine Addition von Wasser an das entstehende Iminiumsalz und irreversible Folgereaktionen anschließen^[230, 241]. So ist es selbst bei einem guten Regenerierungssystem wichtig, für eine hohe Geschwindigkeit der gewünschten Enzymreaktion zu sorgen, denn von dieser Geschwindigkeit hängt das Verhältnis von produktiver Ausnutzung des Nicotinamid-Cofaktors zu unproduktiver hydrolytischer Zerstörung ab. In die Entwicklung und Erprobung reduzierender Systeme mit NAD(P)H ist sehr viel Arbeit investiert worden^[36, 230, 242–255]. Beispiele sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Darunter sind drei, die heute für Anwendungen in der Synthese brauchbar erscheinen.

Tabelle 7. Reaktionen zur Regenerierung von NAD(P)H aus NAD(P) [a].

Reaktionen	Lit.
$\text{HCOO}^- + \text{NAD} \xrightarrow{\text{FDH}} \text{CO}_2 + \text{NADH}$	[36, 244]
$\text{G-6-P} + \text{NAD(P)} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-PG} + \text{NAD(P)H}$	[230]
$\text{Glucose} + \text{NAD(P)} \xrightarrow{\text{GDH}} \text{Gluconat} + \text{NAD(P)H}$	[255]
$\text{H}_2 + \text{NAD(P)} \xrightarrow[\text{MV, LipDH}]{\text{H}_2\text{ase}} \text{H}^+ + \text{NAD(P)H}$	[247]
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD(P)} \xrightarrow{\text{ADH/AldDH}} \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{NAD(P)H}$	[251]
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{ADH/AldDH/FDH}} \text{CO}_2 + \text{NADH}$	[251]
$\text{H}_2 + \text{NAD} \xrightarrow[\text{MV}]{\text{Proteus mirabilis}} \text{H}^+ + \text{NADH}$	[252]

[a] Abkürzungen: FDH = Formiat-Dehydrogenase; G-6-P = Glucose-6-phosphat; G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (*L. mesenteroides*); 6-PG = 6-Phosphogluconat; GDH = Glucose-Dehydrogenase (*B. cereus*); H₂ase = Hydrogenase; MV = Methylviologen; LipDH = Lipoamid-Dehydrogenase; ADH = Alkohol-Dehydrogenase; AldDH = Aldehyd-Dehydrogenase.

Formiat/Formiat-Dehydrogenase hat zwei wichtige Vorteile: Formiat ist ein starkes Reduktionsmittel, und das Reaktionsprodukt CO₂ bewirkt keine Komplikationen bei der Aufarbeitung. Formiat-Dehydrogenase (aus Hefe) ist zwar kommerziell erhältlich, aber doch noch immer recht teuer; ein gutes Verfahren zur Gewinnung ist von Kula et al. beschrieben worden^[36].

Glucose/Glucose-Dehydrogenase ist ebenfalls ein attraktives System^[255]. Das Enzym (aus *B. cereus*) ist im Handel erhältlich, thermisch stabil und kann mit NAD und NADP angewendet werden. Die wesentlichen Nachteile sind der Preis des Enzyms und die Notwendigkeit, das Produkt von Glucose und Gluconsäure abzutrennen.

Glucose-6-phosphat/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist ein System, bei dem das Enzym sehr billig und stabil ist, und das NAD und NADP als Substrat akzeptiert^[230]. Allerdings muß Glucose-6-phosphat in einer durch Hexokinase katalysierten Phosphorylierung von Glucose mit gleichzeitiger in-situ-Regenerierung von ATP dargestellt werden; ferner muß das Produkt von 6-Phosphogluconsäure abgetrennt werden.

Ein Verfahren, das Methanol zusammen mit Methanol-, Formaldehyd- und Formiat-Dehydrogenase verwendet, ist,

zumindest bezüglich des Hydrid donors, das wirtschaftlichste^[251]. Für Reaktionen im kleinen Maßstab ist dieses System nicht sinnvoll, da es drei Enzyme erfordert. Für Arbeiten im großen Maßstab könnte es sich hingegen lohnen, einen Mikroorganismus zu entwickeln, der alle drei Enzyme enthält, und diesen dann in Form ganzer Zellen zu verwenden. Die übrigen Systeme zur Regenerierung reduzierter Nicotinamid-Cofaktoren sind gegenwärtig nur von akademischem Interesse; eine Ausnahme sind vielleicht elektrochemische Verfahren, die zur Zeit auch intensiv bearbeitet werden^[252]. Die Anstrengungen, billigere Reduktionsmittel (H_2 , Elektronen) zu verwenden, setzen am falschen Punkt an, denn die Kosten des Cofaktors und des Enzyms sind viel höher als die des Reduktionsmittels. Trotzdem sollte man auch Systeme dieser Art weiter untersuchen, denn in einem späteren Entwicklungsstadium könnten sie sich als nützlich erweisen. Aktuell haben sie in der organischen Synthese kaum eine Bedeutung.

Enzyme, die reduzierte Nicotinamid-Cofaktoren benötigen, sind bei Synthesen bis heute nur in der Forschung angewendet worden. Am weitesten entwickelt ist das von Kula et al. beschriebene Verfahren zur Gewinnung von Aminosäuren^[36]. Die enantioselektive Reduktion von Carbonylverbindungen und die Synthese isotoopenmarkierter Spezies sind zwei weitere Anwendungsbeispiele (Tabelle 8)^[256–259]. Ein auf deuteriertem Formiat und Formiat-Dehydrogenase basierendes System ist derzeit die beste Methode zur Einführung von Deuterium durch einen Nicotinamid-katalysierten Prozeß^[259]. Es muß jedoch betont werden, daß die Regenerierung von Cofaktoren nur eines von mehreren Problemen ist, die gelöst werden müssen, wenn

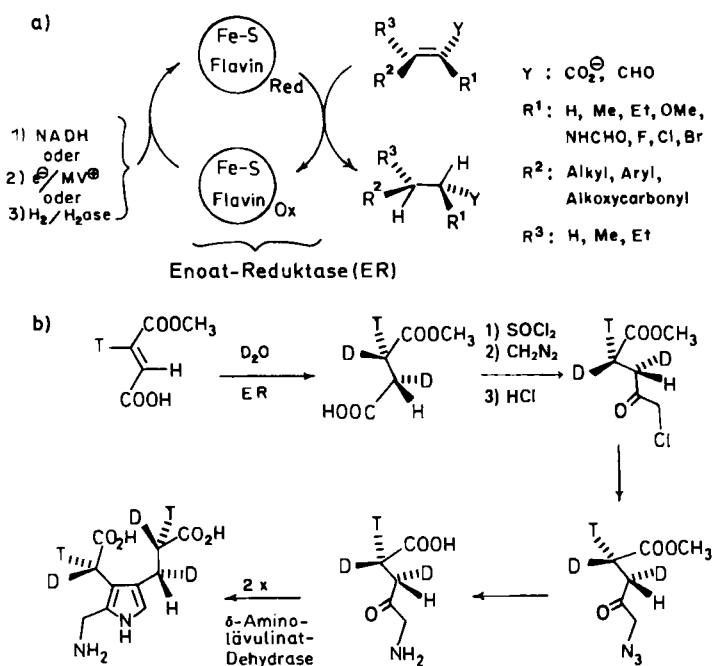
Tabelle 8. Reduktion von Carbonylverbindungen unter Alkohol-Dehydrogenase-Katalyse mit NAD(P)H als Hydrid donor.

Substrat	Enzym [a] (Cofaktor)	Produkt (ee [%])	Lit.
	HLADH (NADH)	 (100)	[256]
	HLADH (NADH)	 (100)	[261]
	HLADH (NADH)	 (100) (100)	[261]
	HLADH (NADH)	 (>97)	[259]
	L-LDH (NADH)	 (>97)	[262]
	HLADH (NADH)	 (98)	[255]
	TADH (NADPH)	 (91)	[255]

[a] Abkürzungen: HLADH = Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase; L-LDH = L-Lactat-Dehydrogenase; TADH = Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii*.

NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen bei Synthesen erfolgreich eingesetzt werden sollen. Wenigstens ebenso wichtig sind die Probleme der Enzymkosten, der Enzymstabilität und der Produkthemmung, wobei das zuletzt genannte die erreichbaren Produktkonzentrationen und die Reaktionsgeschwindigkeiten begrenzt. Eine generelle Lösung hierfür ist nur schwer zu finden^[260].

Ein vielversprechendes Enzym ist die Enoat-Reduktase aus *Clostridium kluyveri*^[252, 263]. Dies Enzym reduziert mit NADH als Cofaktor α,β -ungesättigte Carboxylat-Ionen stereospezifisch zu den gesättigten Carboxylat-Ionen (Schema 6a). Eine vorläufige Untersuchung zum Reaktionsmechanismus deutet darauf hin, daß das Reduktionsäquivalent von NADH über den mit dem Enzym assoziierten Eisen-Schwefel-Flavin-Komplex auf das Substrat übertragen wird; zwischen dem reduzierten Komplex und Wasser findet ein Protonenaustausch statt. Mit elektrochemisch reduziertem Methylviologen kann der Eisen-Schwefel-Komplex reduziert werden, und in einem Reaktor für elektroenzymatische Reduktionen ist auch eine Synthese in großem Maßstab durchgeführt worden^[264]. Zur Regenerierung von NADH ist ein System aus H_2 und einem Hydrogenase-enthaltenden anaeroben Mikroorganismus entwickelt worden^[252, 265]. Mit Enoat-Reduktase hat man auch isotoopenmarkierte, chirale δ -Aminolävulinsäure enantioselektiv dargestellt (Schema 6b)^[4].



Schema 6. Enantioselektive Reduktion von CC-Doppelbindungen durch Enoat-Reduktase (ER). a) Allgemeines Reaktionsschema; b) Synthese isotoopenmarkierter, chiraler δ -Aminolävulinsäure.

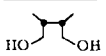

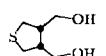

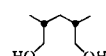

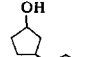

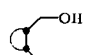

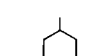

Mit Hefe gelingt eine ähnliche enantioselektive Reduktion von CC-Doppelbindungen α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen; das verantwortliche Enzym ist aber noch nicht isoliert worden^[266]. Die Reaktion verläuft formal über eine *trans*-Addition von H_2 an die Doppelbindung, wobei ein *pro-R*-Wasserstoff in α -Position zum elektrophilen Substituenten eingeführt wird. Da Hefe aerob ist, ist es unwahrscheinlich, daß das Hefeenzym einen Eisen-Schwefel-Komplex enthält.

6.3.3. Enzyme, die oxidierte Nicotinamid-Cofaktoren (NAD oder NADP) benötigen

Oxidierte Nicotinamid-Cofaktoren zu regenerieren, ist noch immer ein Problem. Es gelten die gleichen einschränkenden Bedingungen wie bei der Verwendung reduzierter Nicotinamid-Cofaktoren, wobei hier das Problem der Produkthemmung (besonders der unkompetitiven Hemmung^[20]) oft noch größer ist^[260, 267]. Auch die oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren hydrolysieren in Lösung und können durch enzymatische Prozesse zerstört werden. Bisher am weitesten verbreitet ist das von Jones et al. entwickelte Verfahren zur in-situ-Regenerierung von NAD aus NADH^[268], das auf einer nicht-enzymatischen Oxidation von NADH durch oxidiertes Flavin beruht; das reduzierte Flavin seinerseits wird durch molekularen Sauerstoff oxidiert. Nachteilig ist, daß für ausreichend hohe Reaktionsgeschwindigkeiten große Mengen Flavin benötigt werden, und daß die Abtrennung des Produktes von Flavin unpraktisch ist. Mehrere andere Systeme sind für diese Regenerierung vorgeschlagen worden^[2, 242, 243, 269, 270]; das wahrscheinlich am breitesten verwendbare ist eine mit der Oxidation von NADH zu NAD gekoppelte enzymatische Reduktion von α -Ketoglutarat und Ammoniak zu Glutaminsäure^[267, 269]. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß es einen Kontakt des Enzymsystems mit molekularem Sauerstoff und das damit verbundene Risiko der Oxidation von Enzymen oder Substraten vermeidet; allerdings müssen nach der Reaktion Glutaminsäure und Produkt getrennt werden. Wenn molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel vom Reaktionssystem toleriert wird, kann NADH auch enzymatisch mit Diaphorase und Methyleneblau zu NAD oxidiert werden^[243, 267, 270, 271]. Die Flavinmononucleotid(FMN)-Reduktase (E.C. 1.6.8.1) aus Photobakterien katalysiert die Reaktion von NAD(P)H mit O₂ und FMN^[271]; dieses Enzym besitzt eine ausreichende spezifische Aktivität (100 U/mg) und verbessert die Leistungsfähigkeit des von Jones et al. entwickelten Systems beträchtlich.

Für die Anwendung von Enzymen, die oxidierte Nicotinamid-Cofaktoren benötigen, in der Synthese sind die Untersuchungen von Jones et al. und von anderen Arbeitsgruppen^[272–277] an Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase am wichtigsten (siehe Tabelle 9). Obwohl die Reaktionen im g-Maßstab sehr praktikabel sind, wurden größere Versuche bisher noch nicht durchgeführt, denn bis vor kurzem waren die verfügbaren Regenerierungssysteme im großen Maßstab nicht wirklich brauchbar; außerdem ist bei Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase die Produkthemmung besonders ausgeprägt. Die meisten Beispiele von Jones et al. betreffen die Oxidation von *meso*-Diole zu optisch aktiven Lactonen. Bei diesen Systemen tritt Produkthemmung kaum auf. Versuche zur kinetischen Racematspaltung einfacher Alkohole durch Oxidation eines Enantiomers sind in großem Maßstab im allgemeinen nicht sehr erfolgreich gewesen. Das aktive Zentrum der Alkohol-Dehydrogenase ist hydrophob, so daß das gebildete Keton besser gebunden wird als der umzusetzende Alkohol^[274, 278, 279]. Trotz eingehender Untersuchung ist keine andere Lösung des Problems Produkthemmung gefunden worden als die Entfernung des Produktes durch Extraktion oder auf anderem Wege^[21, 30].

Tabelle 9. HLADH-katalysierte Oxidation von Diolen mit NAD als Cofaktor.

Substrat	Produkt	ee [%]	Lit.
		100	[272]
		100	[272]
		100	[272]
		100	[274]
		100	[275]
		96	[276]

6.3.4. Enzyme, die S-Adenosylmethionin, Acetyl-CoA, PAPS oder andere Cofaktoren benötigen

S-Adenosylmethionin (SAM) ist eine wichtige C₁-Quelle in vielen enzymkatalysierten Reaktionen^[280–282]. Für die enzymatische Synthese von SAM aus ATP und Methionin ist die Verfügbarkeit der SAM-Synthetase wichtig^[282]. Größere Mengen einheitlicher SAM-Synthetase lassen sich mit einem genetisch veränderten E.-coli-Stamm erhalten^[283]; dieses Enzym wird jedoch durch das Produkt stark gehemmt. Die Hemmkonstante K_i für die Konkurrenz zwischen SAM und ATP (einem kompetitiven Inhibitor) beträgt 0.01 mM^[282] (der entsprechende Wert für das aus Hefe isolierte Enzym ist 6 mM^[284]). Das Enzym aus *E. coli* müßte durch ortsspezifische Mutagenese und Rekombination von DNA so modifiziert werden, daß der K_i-Wert deutlich steigt; dann könnte diese Methode zur Gewinnung von SAM eine stöchiometrische Anwendung in der enzymatischen Synthese ermöglichen. Für die in-situ-Regenerierung von SAM ist heute noch keine Strategie erkennbar. In der Transmethylierung mit SAM als Methylquelle entsteht aus SAM S-Adenosylhomocystein (SAH). Es ist kein Enzym bekannt, das die selektive Methylierung von SAH zu SAM katalysiert. Zwar gibt es chemische Verfahren für diese Umwandlung^[285], sie ergeben aber Racemate; SAM-abhängige Enzyme akzeptieren aber nur das (–)-Isomer^[280, 286]. (±)-SAM kann auch ohne ATP aus L-Homocystein und Adenosin via chemische^[287] oder enzymatische^[145–149] Synthese von SAH und anschließende chemische Methylierung hergestellt werden. Stünde eine bequeme Methode zur Racematspaltung von SAM zur Verfügung, könnte dieses Verfahren nützlich werden.

Enzyme, die Acetyl-CoA (CoASH) oder dessen Analoga als Cofaktoren benötigen, wurden bisher wenig im Hinblick auf eine mögliche Verwendung in der organischen Synthese untersucht. Acetyl-CoA nimmt eine zentrale Position in der Biogenese von Fettsäuren, Polyketiden und verwandten Spezies ein^[288]. Dies sind aber gerade die Sub-

stanzklassen, bei denen die klassische organische Synthese besonders erfolgreich ist. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Verbindungen enzymatisch besser synthetisiert werden können als chemisch oder fermentativ.

3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) ist eine Sulfatquelle, die in der Biochemie allgemein zur Sulfatierung von Polysacchariden und zur Aktivierung von Sulfat verwendet wird. In vivo wird es durch eine komplexe Folge von Reaktionen regeneriert, an denen die Enzyme ATP-Sulfonylase und Adenylsulfat-Kinase beteiligt sind^[289,290]. Zwar ist die Sulfatierung von Polysacchariden ein interessantes und möglicherweise wichtiges Ziel für enzymkatalysierte Synthesen (z. B. für die Modifizierung von Heparin^[291] oder zur Synthese von Chondroitinsulfat^[292]), es gibt aber noch keine einfache Methode zur Synthese oder zur Regenerierung von PAPS.

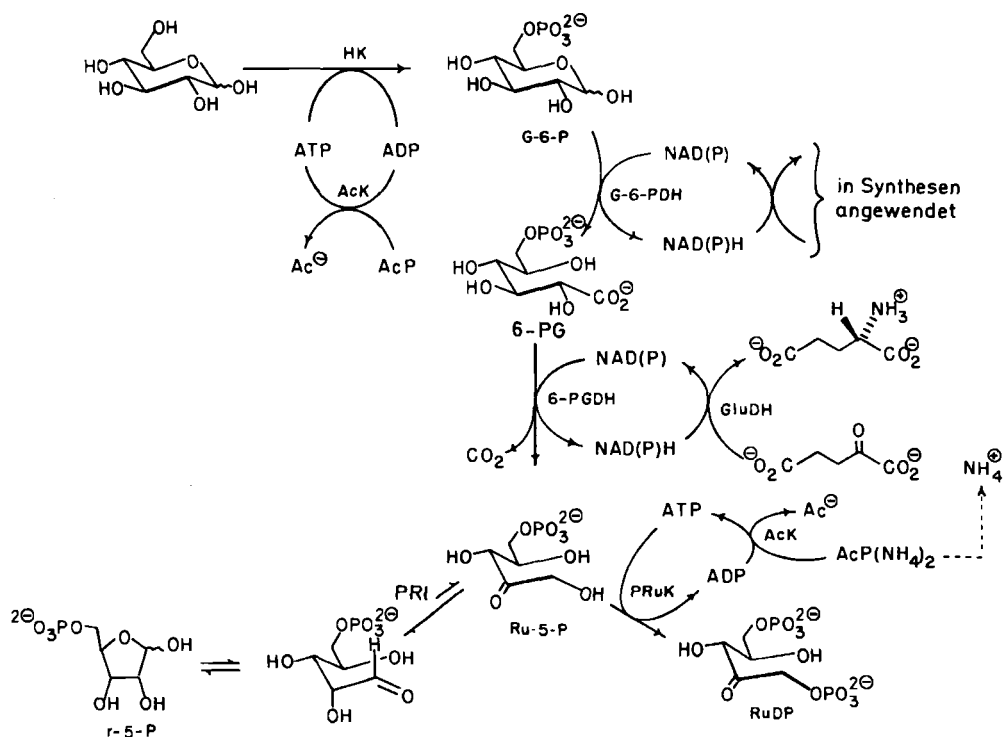
7. Synthesen mit Multienzymsystemen

Für die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Synthese ist wichtig, daß sie bei pH-Werten zwischen 6.5 und 8.5 und bei Raumtemperatur gute Umsatzzahlen zeigen; deshalb können oft mehrere Enzyme kombiniert werden, die nacheinander oder gleichzeitig mehrere Reaktionsschritte am Substrat bewerkstelligen. Ein Beispiel für eine Synthese, bei der das enzymatische Verfahren die beste Lösung bietet, ist die Darstellung von Ribulose-1,5-diphosphat (RuDP), einem wichtigen Substrat in der Biochemie der Pflanzen (siehe Schema 7)^[217]. Die auf den ersten Blick komplizierte Synthese ist in Wirklichkeit recht einfach, und schon in den Versuchen zu ihrer Ausarbeitung sind mehrere hundert Gramm RuDP herge-

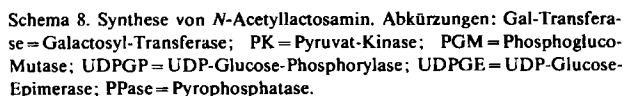
stellt worden. Der technisch interessanteste Aspekt dieser Synthese ist die Umwandlung von 6-Phosphogluconat in RuDP. Da die Kinase, die Ribulose-5-phosphat in RuDP umwandelt, sauerstoffempfindlich ist, muß die in-situ-Regenerierung von NAD aus NADH, die bei der Umwandlung von 6-Phosphogluconat in Ribulose-5-phosphat notwendig ist, mit einem sauerstofffreien System durchgeführt werden; dies gelingt mit dem System α -Ketoglutarat-/Glutamat-Dehydrogenase. Dieser Teil der Synthese erfordert das Zusammenspiel von vier Enzymen: 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und 5-Phosphoribulo-Kinase für die eigentliche Transformation des Substrates sowie Glutamat-Dehydrogenase und Acetat-Kinase zur in-situ-Regenerierung der Cofaktoren.

Die Umwandlung von Glucose-6-phosphat und *N*-Acetylglucosamin in Lactosamin ist komplizierter^[293]. Lactosamin ist ein Core-Disaccharid in Glycoproteinen. Die in Schema 8 präsentierte Synthese verdeutlicht das Zusammenspiel von sechs Enzymen, und sie bestätigt – auch wenn sie bisher nur in kleinem Maßstab durchgeführt wurde – die Bedeutung des Leloir-Syntheseweges für Oligosaccharide. Das Verfahren ist auch auf Trisaccharide angewendet worden^[294].

Ein letztes Beispiel für ein System mehrerer miteinander gekoppelter Enzyme ist die Umwandlung von Glucose in Ethanol (Schema 9; einige Enzyme, die zur Regulation der ATP-Konzentration dienen, sind der Einfachheit halber nicht wiedergegeben). Diese Kaskade enzymatischer Reaktionen ist nicht entwickelt worden, um Ethanol zu synthetisieren – hierfür gibt es einfachere Methoden –, sondern um die Toxizität von Ethanol in Hefe und die kinetischen Eigenschaften eines regulierten Multienzymsystems zu unter-



Schema 7. Enzymatische Synthesen von RuDP. Abkürzungen: G-6-P = Glucose-6-phosphat; 6-PG = 6-Phosphogluconat; Ru-5-P = Ribulose-5-phosphat; AcP = Acetylphosphat; Ac^o = Acetat; 6-PGDH = 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; GluDH = Glutaminsäure-Dehydrogenase; PRuK = 5-Phosphoribulo-Kinase; PRI = Phosphoribo-Isomerase; AcK = Acetat-Kinase; HK = Hexokinase; r-5-P = Ribose-5-phosphat.

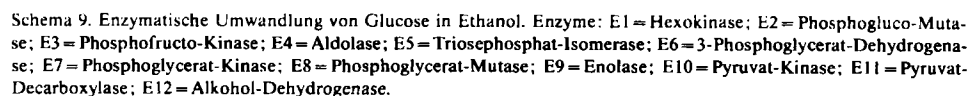


suchen^[295]. Es zeigt sich aber an diesem Beispiel, daß es möglich ist, Verfahren zu entwickeln, in denen viele kooperierende Enzyme nacheinander wirken.

Seit einigen Jahren wird über mögliche Anwendungen von Monooxygenasen spekuliert. Einige Enzymsysteme erreichen in vivo bei Hydroxylierungen, Epoxidationen und verwandten Oxidationen Selektivitäten, die mit klassischen

Synthesen unerreichbar sind. Diese Systeme sind in vivo wichtig bei der Funktionalisierung von Steroiden und anderen Kohlenwasserstoffen (in Pilzen), und sie sind vereinzelt bei Fermentationen eingesetzt worden^[211, 296–299]. Ein wichtiges jüngerer Beispiel ist die fermentative Umwandlung von Benzol in *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol^[300]. Viele dieser Transformationen werden von Cytochrom P450 oder nicht-Häm-Eisen-Schwefel-Enzymen bewirkt^[301, 302]. Der Mechanismus der Reaktionen von Cytochrom-P450-Enzymen ist wegen deren Bedeutung im Steroidmetabolismus und bei der Bildung von Carcinogenen intensiv untersucht worden; der Wirkungsmechanismus der nicht-Häm-Eisen-Schwefel-Enzyme wird hingegen weniger gut verstanden.

Für die Praxis sind mikrobielle Systeme mit nicht-Häm-Eisen-Schwefel- und -Kupfer-Schwefel-Enzymen die interessantesten^[200–202,303]. Trotz eingehender Studien dieser Systeme ist für die nahe Zukunft nicht zu erwarten, daß sie für enzymatische in-vitro-Transformationen genutzt werden können. Mehrere Nachteile sind die Ursache: Die Standzeiten in vitro sind kurz. Da viele der Cytochrom-P450-Enzyme membrangebunden oder -assoziiert sind, könnten geeignete oberflächenaktive Substanzen oder Modellmembranen eine Stabilisierung bewirken. Die Lebensdauern einfacher mikrobieller Monooxygenasen in vitro sind kaum untersucht, sie scheinen aber ebenfalls kurz zu sein. Noch wichtiger ist die Tatsache, daß diese Enzymsysteme Hilfsenzyme als Quelle für Reduktionsäquivalente benötigen, um letztlich molekularen Sauerstoff in eine reaktivere Spezies auf der Oxidationsstufe des Wasserstoffperoxids umzuwandeln. Diese Hilfsenzyme brauchen NADH oder NADPH als Reduktionsmittel. Insgesamt enthält das System also mehrere empfindliche Enzyme. Die Kupplung der Oxidation von NADH mit der Reduktion molekularen Sauerstoffs verläuft in vitro nur mit geringer Effizienz; der Großteil NAD(P)H wird für die Bildung von Wasserstoffperoxid oder Superoxid „verschwendet“, die beide Enzyme durch chemische Reaktionen desaktivieren können. Auch wenn die Probleme, die mit der Anwendung dieser prinzipiell wertvollen Monooxygenasen verbunden sind, einmal gelöst werden können –, für



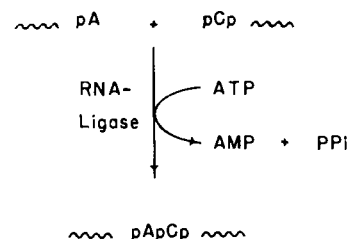
die nahe Zukunft sind solche Systeme für die oxidative Funktionalisierung von Kohlenwasserstoffen nicht verwendbar.

Auch die Enzyme, die an der Synthese von Polysacchariden, Oligosacchariden und Proteinen beteiligt sind, finden mehr und mehr Aufmerksamkeit^[304–306]. Oligosaccharide der Zelloberfläche sind unter anderem von großem Interesse als krankheitspezifische Antigene und als Histokompatibilitätsmarker sowie möglicherweise für die Entwicklung eines gezielteren Arzneimitteltransports^[304,307]. In den meisten Fällen werden die Oligosaccharide von Enzymen, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind, auf dem Leloir-Weg synthetisiert^[308]. Diese membrangebundenen Enzyme sind normalerweise nur in geringen Mengen erhältlich. Es ist offen, welcher Weg für die Zukunft den besten Zugang zu Oligosacchariden bieten wird: die Synthese mit isolierten Enzymen, die Isolierung aus natürlichen Quellen oder die Fermentation (nach einer systematischen Suche nach Hochleistungstämmen). Einfacher sind die Enzymsysteme, die an der Synthese vieler Polysaccharide (insbesondere mikrobiellen Ursprungs) beteiligt sind. Da Polysaccharide rein chemisch nicht dargestellt werden können, und da diese Substanzen wertvolle Eigenschaften haben, z. B. modifizieren sie die Fließeigenschaften wässriger Lösungen, und auch für pharmakologische Anwendungen sind sie interessant^[304–306], könnten Enzyme zur Synthese von Polysacchariden einmal nützlich werden. Aber auch hier ist bisher an keinem Beispiel die Brauchbarkeit solcher Systeme demonstriert worden.

In bestimmten Fällen könnten die enzymatischen Proteinsynthesen der DNA-Rekombinationstechnik überlegen sein^[309,310]. Die notwendigen Enzymsysteme sind jedoch so komplex, daß nur Synthesen im µg-Maßstab möglich sind.

Die Gentechnologie hat auch zu einer Belebung des Interesses an enzymatischen Synthesen geführt. Die DNA-Rekombinationstechnik nutzt eine Reihe von Enzymen, um bestimmte Gene in das Genom eines fremden Organismus zu implantieren; dies ermöglicht dann die effiziente Synthese erwünschter Proteine^[311,312]. Zu den wichtigsten Enzymen gehören die DNA-Ligase und die Restriktionsendonucleasen. DNA-Moleküle können mit Restriktionsendonucleasen gezielt gespalten, und die DNA-Bruchstücke können in einer durch DNA-Ligase katalysierten Reaktion mit anderen, ebenfalls durch Restriktionsenzyme modifizierten DNA-Fragmenten kombiniert werden. Mit klassischen Synthesen ist derartiges unmöglich. Die hier verwendeten Enzyme sind allerdings teuer. Damit sie dennoch in der präparativen Chemie eingesetzt werden können, müssen Anstrengungen zu ihrer Stabilisierung und Produktion im großen Maßstab unternommen werden (in der Gentechnologie werden nur geringe Mengen dieser Enzyme benötigt, da die Fermentation einen hohen „Verstärkungsfaktor“ liefert). Bei Reaktionen im großen Maßstab müssen die Cofaktoren regeneriert werden, denn bei der Bildung von Phosphodiesterbindungen wird entweder NAD oder ATP benötigt^[310]; NAD-Ligase aus Bakterien katalysiert die NAD-abhängige Reaktion, wobei AMP und NMN entstehen, und T₄-DNA-Lipase aus Phagen-infizierten Bakterien oder aus Eukaryonten katalysiert die ATP-abhängige Reaktion, bei der AMP und Pyrophosphat entstehen^[310].

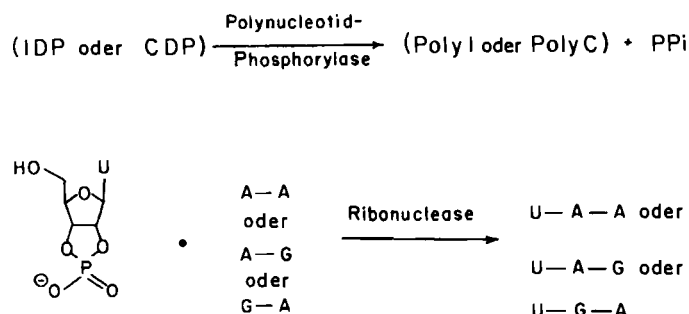
Eine andere Ligase, die zunehmend verwendet wird, ist RNA-Ligase^[311,313–315]. T₄-RNA-Ligase katalysiert die Synthese von Einzelstrang-Oligonucleotiden unterschiedlicher Größe aus Edukten mit 3'-terminaler Hydroxygruppe und 5'-terminalem Phosphatrest durch Knüpfung einer 3'→5'-Phosphodiester-Bindung unter Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat. Die Phosphate für die Verknüpfungsreaktion können Nucleotide bis herab zu Monomeren sein, und bei den Hydroxyderivaten kann es sich um Dimere, Trimere oder Oligomere handeln^[311]. Das Enzym akzeptiert auch Einzelstrang-DNA als Substrat (Schema



Schema 10. RNA-Ligase-katalysierte Bildung einer 3'→5'-Phosphodiester-Bindung zwischen Oligonucleotiden mit terminalen A und pC.

10). Mit diesem Enzym wurden kurze, chemisch synthetisierte Oligonucleotide an längere Oligomere gekuppelt^[313]. Es ist auch dazu verwendet worden, Nucleinsäuren durch Einführung radioaktiver „Sonden“ und durch Austauschen von Nucleotidresten zu modifizieren^[311–316]. Da die Bedeutung rekombinierter RNA wahrscheinlich noch zunehmen wird, und weil chemische Methoden für die Synthese von RNA nicht so gut entwickelt sind wie für die von DNA, könnte RNA-Ligase besonders wichtig werden.

Zwei andere Beispiele zur Synthese von Polynucleotiden seien noch erwähnt: die Polynucleotid-Phosphorylase-katalysierte Synthese von PolyI:C^[317], einem Induktor für Interferon, und die Ribonuclease-katalysierte Synthese von Trinucleotid-Codons^[318] (Schema 11). Beide Enzyme haben einen großen Spezifitätsbereich und können deshalb auch bei der Synthese anderer Polynucleotide nützlich sein.



Schema 11. Polynucleotid-Phosphorylase-katalysierte Synthese von Polynucleotiden und Ribonuclease-katalysierte Synthese von Trinucleotiden.

9. Zusammenfassung und Ausblick

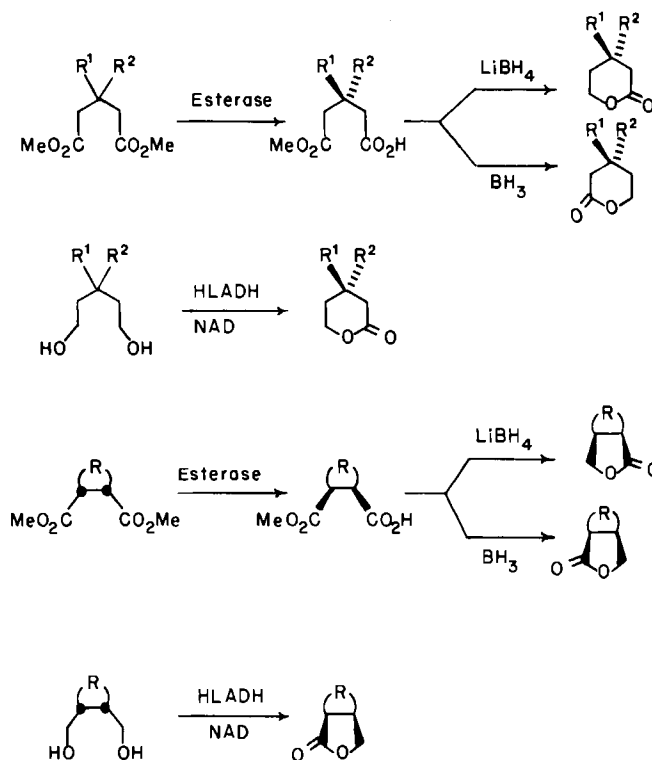
Enzyme sind Katalysatoren mit einer Reihe von Anwendungsmöglichkeiten in der organischen Synthese. Sie können hilfreich sein bei der Synthese chiraler Bausteine, bei

der Transformation von Zuckern, Nucleotiden und verwandten Spezies, bei der Synthese von Verbindungen, die im Metabolismus wichtig sind, und bei der von Analoga solcher Verbindungen (Aminosäuren, Zuckerphosphaten etc.), bei der Umwandlung von Peptiden und Proteinen, bei der Modifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen und in Fällen, in denen die Anwendung klassischer chemischer Verfahren durch Vorschriften, z. B. vom Gesetzgeber, eingeschränkt ist. Welches sind die technischen Probleme, die gelöst werden müssen, damit die schon bestehenden Anwendungsmöglichkeiten noch mehr genutzt und neue Anwendungsgebiete erschlossen werden? Welche Hindernisse muß ein Organiker überwinden, um Enzyme in seinen Synthesen einsetzen zu können?

Zuerst sind die grundlegenden Arbeitstechniken der Enzymologie und der Biochemie zu erlernen, insbesondere wie man Enzyme analysiert und isoliert. Beides ist nicht schwierig, aber beides sind Fertigkeiten, mit denen die meisten Organiker von ihrer Ausbildung her nicht vertraut sind. Lehrbücher der Biochemie sind zum Erlernen dieser Techniken hilfreich, und der „Bergmeyer“^[319] bietet ein unverzichtbares Handbuch für Enzymassays. Ein kurzes Praktikum in einem biochemischen Laboratorium ist sicherlich von großem Nutzen. Ein zweites, ernsteres Problem besteht darin, herauszufinden, ob ein Enzym für eine gewünschte Umwandlung bekannt oder gar bereits im Handel ist. Es gibt gegenwärtig noch kein Nachschlagewerk, das die Enzymologie aus dem Blickwinkel des präparativ arbeitenden Chemikers beschreibt und die für Synthesen nützlichen Reaktionen nennt, die von einer bestimmten Klasse von Enzymen erwartet werden können, oder das die Enzyme aufzählt, die einen bestimmten Typ von Umwandlungen bewerkstelligen. Die meisten Enzyme sind noch nicht auf ihre Eignung in der Synthese untersucht worden, und auch die Enzymnomenklatur bietet keine Hilfe. In diesem Aufsatz sind einige Enzymsysteme erwähnt, die gut genug untersucht worden sind, um bei organischen Synthesen von Nutzen zu sein. In der Buchserie *Methods in Enzymology* und im „Bergmeyer“ finden sich Beschreibungen von Versuchen mit Enzymen (meist im analytischen Maßstab), die zu neuen Anwendungen anregen können. Ist man in diesen beiden Quellen nicht fündig geworden, so hilft nur noch der Gang zu Biochemikern und das Testen von Enzymen, von denen bekannt ist, daß sie Substrate akzeptieren, die denen verwandt sind, die man selbst umsetzen möchte.

Ist ein Enzym für die in Frage stehende Transformation gefunden, was bestimmt dann die Praktikabilität seines Einsatzes? Zuvorderst natürlich technische Aspekte wie Verfügbarkeit, Spezifität, spezifische Aktivität, Stabilität und Cofaktor-Abhängigkeit. Der präparativ arbeitende Organiker sieht Enzyme nur als einen Katalysator unter vielen. Die beste Synthese ist für ihn die, die von allen verfügbaren Synthesemethoden den optimalen Gebrauch macht, egal, ob es sich dabei um Verfahren der klassischen organischen Synthese, um homogene oder heterogene Katalyse mit Metallen, um Katalyse durch Enzyme, um Fermentation, um elektrochemische Methoden oder um konventionelle Racematspaltung und andere Methoden handelt. In bestimmten Fällen – zum Beispiel beim Spalten und Verknüpfen von DNA mit DNA-Ligase und Restriktionsendonuclease – sind Enzyme konkurrenzlos. Bei der Syn-

these chiraler Bausteine für die Herstellung von Arzneimitteln hat der Synthetiker viel mehr Möglichkeiten. Optimale Strategien für den Einsatz von Enzymen sind noch in der Entwicklung. Ist es beispielsweise günstiger, mit Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (unter Inkaufnahme der damit verbundenen Probleme durch Cofaktorregenerierung und Produkthemmung) ein *meso*-Diol zum Lacton zu oxidieren, oder sollte man eine Esterase in Verbindung mit einer chemischen Oxidation verwenden (Schema 12)? Ist zur



Schema 12. Wege zu optisch aktiven Lactonen unter Verwendung von Enzymen.

Synthese eines neuen enantiomerenreinen Epoxyalkohols eine enantioselective Epoxidation^[17] besser geeignet als eine Racematspaltung mit einer Esterase? Sollten große Mengen kurzketziger Oligopeptide eher aus kaum geschützten Aminosäuren mit ausgewählten Amidasen in einem dehydratisierenden Medium dargestellt werden, oder sind chemische Kupplungsverfahren überlegen? Auf keine dieser Fragen gibt es bisher eine allgemeingültige Antwort. Man kann jedoch pauschal feststellen, daß der Bereich möglicher Anwendungen wesentlich größer ist, als man aufgrund des heutigen Anwendungsbereichs annehmen kann. Die Erkenntnisse, die man mittlerweile aus Experimenten gewonnen hat, reichen aus, um viele der Probleme, die mit der Anwendung von Enzymen verbunden sind, zu lösen.

Generell wird die organische Synthese zweifellos von der Anwendung von Enzymen profitieren. Präparativ arbeitende Chemiker, die Enzyme zu nutzen wissen, werden bei der Bearbeitung aktueller Probleme an der Nahtstelle zwischen Chemie und Biologie sicherlich Vorteile haben. Diejenigen, die diese und andere aus der Biologie stammenden Synthesemethoden nicht anwenden wollen, werden feststellen müssen, daß sie an einer faszinierenden Entwicklung nicht teilhaben können.

Unsere Arbeiten an der Harvard University wurden durch die National Institutes of Health (Grant GM 30367) gefördert; an der Texas A & M University unterstützte uns die National Science Foundation (Grant CHE-8318217). Wir danken unseren zahlreichen Mitarbeitern, die wesentlich zur Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente beigetragen haben; ihre Namen sind im Literaturverzeichnis genannt.

Eingegangen am 19. Februar 1985 [A 542]
Übersetzt von Dr. Karl Röser, Hirschberg

- [1] C. J. Suckling, K. E. Suckling, *Chem. Soc. Rev.* 1974, 387; C. J. Suckling, H. C. S. Wood, *Chem. Br.* 15 (1979) 243.
- [2] J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Wiley, New York 1976.
- [3] A. M. Klibanov, *Science* 219 (1983) 722.
- [4] A. R. Battersby, *Chem. Br.* 20 (1984) 611.
- [5] J. B. Jones in J. D. Morrison (Hrsg.): *Asymmetric Synthesis*, Vol. 5, Academic Press, New York, im Druck.
- [6] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Aldrichimica Acta* 16 (1983) 27.
- [7] M. A. Findeis, G. M. Whitesides, *Annu. Rep. Med. Chem.* 18 (1984) 263; G. M. Whitesides in *Enzymes in Organic Synthesis (Ciba Found. Symp. 111)*, Pitman, London 1985, S. 76.
- [8] M. G. Halpern (Hrsg.): *Industrial Enzymes from Microbial Sources*, Noyes Data Corporation, Park Ridge, NJ, USA 1981.
- [9] *Commercial Biotechnology: An International Analysis*, Office of Technology Assessment, U. S. Congress, OTA-BA-218, Washington, DC, USA 1984.
- [10] *Impacts of Applied Genetics: Microorganisms, Plants, and Animals*, Office of Technology Assessment, U. S. Congress, OTA-HA-132, Washington, DC, USA 1981.
- [11] C. J. Sih, C. S. Chen, *Angew. Chem.* 96 (1984) 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 570.
- [12] D. Tarquis, P. Monsan, G. Durand, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2 (1980) 76.
- [13] H. S. Mosher, J. D. Morrison, *Science* 221 (1982) 1013.
- [14] W. S. Knowles, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 106.
- [15] J. Halpern, *Science* 217 (1982) 401.
- [16] B. M. Trost, *Science* 219 (1983) 245; B. Bosnich, *Chem. Br.* 20 (1984) 808.
- [17] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5974.
- [18] *Chem. Week* 1983, 30; P.-J. Raugel, *Biofutur* 1984, 29.
- [19] T. E. Creighton: *Proteins: Structure and Molecular Properties*, Freeman, San Francisco 1983, Kap. 6; C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979.
- [20] I. H. Segel: *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York 1975; M. Dixon, E. C. Webb: *Enzymes*, 3. Aufl., Academic Press, New York 1978, Kap. 8.
- [21] K. Martinek, A. N. Semenov, *J. Appl. Biochem.* 3 (1981) 93.
- [22] M.-J. de Smet, B. Witholt, H. Wynberg, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 3128.
- [23] K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, T. Hashimo, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 5241.
- [24] G. Carrea, *Trends Biotechnol.* 2 (1984) 102.
- [25] E. Antonini, G. Carrea, P. Cremonesi, *Enzyme Microbiol. Technol.* 3 (1981) 291.
- [26] M. D. Lilly, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32 (1982) 162.
- [27] K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, I. V. Berezin, *Science* 218 (1982) 889.
- [28] C. B. Anfinsen, H. A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* 29 (1975) 205.
- [29] A. M. Klibanov, *Adv. Appl. Microbiol.* 29 (1983) 1.
- [30] V. V. Mozhaev, K. Martinek, *Enzyme Microbiol. Technol.* 6 (1984) 50.
- [31] R. D. Schmid, *Adv. Biochem. Eng.* 12 (1979) 41.
- [32] Z. Shaked, R. P. Szajewski, G. M. Whitesides, *Biochemistry* 19 (1980) 4156.
- [33] R. P. Szajewski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 2011.
- [34] K. Mosbach (Hrsg.): *Methods Enzymol.* 44 (1976); G. Mattiasson: *Immobilized Cells and Organelles*, CRC Press, Cleveland, OH, USA 1982.
- [35] I. Chibata: *Immobilized Enzymes - Research and Development*, Halsted Press, New York 1978; Y. Izumi, I. Chibata, T. Itoh, *Angew. Chem.* 90 (1978) 187; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 176.
- [36] C. Wandrey, A. F. Buckmann, M. R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 1789.
- [37] O. R. Zaborsky: *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland, OH, USA 1978; R. P. Rohrbach, US-Pat. 4 268 419 (1979).
- [38] L. L. Wood, F. J. Hartdegen, P. A. Hahn, US-Pat. 4 312 946 (1982).
- [39] A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R. L. Baughn, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6324.
- [40] a) L. J. Perry, R. Wetzel, *Science* 226 (1984) 555; b) A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 467; G. P. Winter, A. R. Fersht, *Trends Biotechnol.* 2 (1984) 115.
- [41] E. T. Kaiser, *Science* 226 (1984) 505; R. Breslow, *ibid.* 218 (1982) 532; M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 306.
- [42] F. C. Huang, L. F. H. Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Chan, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 4144; C. H. Chervenka, P. E. Wilson, *J. Biol. Chem.* 222 (1956) 635.
- [43] Y. Ito, T. Shibata, M. Arita, H. Sawai, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6739.
- [44] M. Ohno, S. Kobayashi, T. Limori, Y. F. Wang, T. Izawa, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2405.
- [45] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294.
- [46] S. Iriuchijima, K. Hasegawa, G. I. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1907.
- [47] Y. F. Wang, T. Izawa, S. Kobayashi, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6465.
- [48] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294.
- [49] C. J. Francis, J. B. Jones, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 579.
- [50] M. Schneider, N. Engel, P. Hönicke, G. Heinemann, H. Görlich, *Angew. Chem.* 96 (1984) 55; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 67.
- [51] H. J. Gais, K. L. Lukas, *Angew. Chem.* 96 (1984) 140; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 142.
- [52] S. Kobayashi, K. Kamiyama, T. Limori, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 2557.
- [53] Y. F. Wang, C. S. Chen, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3695.
- [54] S. Iriuchijima, N. Kojima, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 185.
- [55] J. Lavayre, J. Verrier, J. Baratti, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 2175.
- [56] S. Iriuchijima, N. Kojima, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1153, 1593; T. Ouchi, T. Azuma, *J. Macromol. Sci. Chem.* A21 (1984) 583.
- [57] H. Brockerhoff, R. G. Jensen: *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, New York 1974.
- [58] W. K. Wilson, S. B. Baca, Y. J. Barber, T. J. Scallen, C. J. Morrow, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 3960.
- [59] M. Arita, K. Adachi, Y. Ito, H. Sawai, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4049.
- [60] J. M. H. Coleman, A. R. McCrae, Br. Pat. 1 577 933 (1980); J. B. M. Ratray, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 1701; L. H. Posorske, *ibid.* 61 (1984) 1758.
- [61] M. M. Hoq, T. Yamane, S. Shimizu, T. Funada, S. Ishida, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 776.
- [62] Y. Inada, H. Nishimura, K. Takahashi, T. Yoshimoto, A. Ranjan, Y. Saito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1984) 845.
- [63] M. Schneider, N. Engel, H. Boensman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 (1984) 64.
- [64] M. Schneider, N. Engel, H. Boensman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 (1984) 66.
- [65] T. Oritani, K. Yamachita, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 2637.
- [66] P. Mohr, N. Waespe-Sarcevic, C. Tamm, K. Gawronski, J. K. Gawronski, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 2501.
- [67] E. P. Dropsy, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 912.
- [68] B. Cambou, A. M. Klibanov, *Appl. Biochem. Biotech.* 9 (1984) 255.
- [69] B. Cambou, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2687; A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science* 224 (1984) 1249.
- [70] K. Soda, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 428.
- [71] W. E. Ladner, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 7250.
- [72] I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 746.
- [73] R. Koelsch, *Enzymologia* 42 (1972) 257.
- [74] N. Grubhofer, L. Schleith, *Naturwissenschaften* 40 (1953) 508.
- [75] V. Daffe, J. Fastrez, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 3601.
- [76] A. Berger, M. Smolarsky, N. Kurm, H. R. Bosshard, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 457.
- [77] J. M. Roper, D. P. Bauer, *Synthesis* 1983, 1041.
- [78] C.-H. Wong, M. F. Ho, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 3604.
- [79] J. B. Jones, J. F. Beck in [2], S. 107.
- [80] Y. Nishida, H. Ohrai, H. Meguro, *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 2123.
- [81] K. Martinek, A. N. Semenov, I. V. Berezin, *Biochim. Biophys. Acta* 658 (1981) 76; Yu. L. Khmel'nitski, F. Khyn Dieu, A. N. Semenov, K. Martinek, *Tetrahedron* 40 (1984) 4425.
- [82] A. Kapune, V. Kasche, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 955.
- [83] H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnicke, *Angew. Chem.* 97 (1985) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85.
- [84] a) J. D. Glass, *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 2; b) J. S. Fruton, *Adv. Enzymol.* 53 (1982) 239.
- [85] I. M. Chaiken, A. Komoriya, M. Ohno, F. Widmer, *Appl. Biochem. Biotech.* 7 (1982) 385.
- [86] G. A. Homandberg, J. A. Mattis, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 17 (1978) 5220.

- [87] W. Kullmann, *Biochem. J.* 220 (1984) 405; W. Kullmann, *J. Org. Chem.* 57 (1982) 5300.
- [88] P. L. Luisi, R. Saltman, *J. Mol. Catal.* 2 (1977) 133.
- [89] K. Nilsson, K. Mosbach, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 1146.
- [90] K. Morihara, T. Oka, *Biochem. J.* 163 (1977) 531.
- [91] Y. Isowa, M. Ohmori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50 (1977) 2762.
- [92] V. S. Ganu, J. D. Glass in K. Blaha, P. Malon (Hrsg.): *Peptides*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 403.
- [93] P. Hermann, L. Salewski in K. Blaha, P. Malon (Hrsg.): *Peptides*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 399.
- [94] J. Markussen, K. Schaumburg in K. Blaha, P. Malon (Hrsg.): *Peptides*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 387; J. Markussen, UK-Pat. Appl. 2069 502 (1980).
- [95] G. P. Royer, H. Y. Hsiao, G. M. Anantharamaiah, *Biochimie* 62 (1980) 537.
- [96] K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Yochino, T. Kanaya, J. Emura, S. Sakakabara, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 751.
- [97] K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, *Nature (London)* 280 (1979) 412.
- [98] H. G. Gattner, W. Danho, V. K. Naithani in D. Brandenburg, A. Wollmer (Hrsg.): *Proc. 2nd Int. Insulin Symp.*, de Gruyter, Berlin 1980, S. 117.
- [99] D. D. Petkov, I. B. Stoineva, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 3751.
- [100] Y. V. Mitin, N. P. Zapevalova, E. Y. Gorbunova, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 528.
- [101] Übersicht: P. L. Luisi, *Angew. Chem.* 97 (1985) 449; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 439; siehe auch P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 7285.
- [102] B. J. Abbott, *Adv. Appl. Microbiol.* 20 (1976) 203.
- [103] E. Lagerlöf, L. Nathorst-Westfeld, B. Ekström, B. Sjöberg, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 759.
- [104] D. L. Regan, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 333.
- [105] T. Fukumura, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 1687.
- [106] F. Wold, K. Moldave (Hrsg.), *Methods Enzymol.* 106 (1984).
- [107] H. F. Lodish, *Enzyme Microbiol. Technol.* 3 (1981) 178.
- [108] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 3199.
- [109] C.-H. Wong, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 3493.
- [110] A. S. Serianni, E. Cadman, J. Pierce, M. L. Hayes, R. Barker, *Methods Enzymol.* 89 (1982) 83.
- [111] I. A. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 5835.
- [112] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 2427.
- [113] T. H. Chin, D. S. Feingold, *Biochemistry* 8 (1969) 98.
- [114] D. G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2529; C. Augé, S. David, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 4663.
- [115] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 3222.
- [116] W. A. Wood in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York 1970, S. 281.
- [117] E. E. Dekker, R. D. Kobes, S. R. Grady in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York 1970, S. 280; J. M. Scholtz, S. M. Schuster, *Bioorg. Chem.* 12 (1984) 229.
- [118] A. Weissbach, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 705.
- [119] P. H. Ray, *J. Bacteriol.* 141 (1980) 635.
- [120] E. Racker, *J. Biol. Chem.* 196 (1952) 347.
- [121] W. E. Price, Jr., B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 1292.
- [122] S. Masamune, W. Choy, J. S. Petersen, L. R. Sita, *Angew. Chem.* 97 (1985) 1; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 1.
- [123] R. Noyori, I. Nishida, J. Sakata, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2106.
- [124] D. A. Evans, J. V. Nelson, T. R. Taber, *Top. Stereochem.* 13 (1982) 1.
- [125] C. H. Heathcock, *Science* 214 (1981) 395.
- [126] P. A. Bartlett, *Tetrahedron* 36 (1980) 36.
- [127] S. Y. Ko, A. W. M. Lee, S. Masamune, L. A. Reed, III, K. B. Sharpless, F. J. Walker, *Science* 220 (1983) 949.
- [128] W. R. Roush, R. J. Brown, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 5093.
- [129] S. Danishefsky, J. F. Kerwin, Jr., *J. Org. Chem.* 47 (1982) 1597.
- [130] H. Paulsen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 187; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 155.
- [131] H. M. Walton, J. E. Eastman, A. E. Staley, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 447.
- [132] J. H. Wilson, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* 11 (1969) 349.
- [133] J. J. Marshall, W. J. Whelan, *Chem. Ind. London* 25 (1971) 701.
- [134] C. Gruesbeck, H. F. Rase, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 11 (1972) 74.
- [135] H. H. Weetall, *Process Biochem.* 10 (1975) 3.
- [136] H. H. Weetall, W. P. Vann, W. H. Pitcher, Jr., D. D. Lee, Y. Y. Lee, G. T. Tsao, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 776.
- [137] G. W. Strandberg, K. L. Smiley, *Appl. Microbiol.* 21 (1971) 588.
- [138] N. B. Havewala, W. H. Pitcher, Jr., *Enzyme Eng.* 2 (1974) 315.
- [139] N. H. Mermelstein, *Food Technol. Chicago* 29 (1975) 20.
- [140] P. Fulbrook, B. Vabo, *J. Chem. E. Symp. Ser.* 51 (1977) 31.
- [141] C. Bucke in A. Wiseman (Hrsg.): *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Vol. 1, Ellis Horwood, Chichester, England 1977, S. 147.
- [142] T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matuo, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 69.
- [143] K. Yamamoto, T. Tosa, K. Yamashita, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3 (1976) 169.
- [144] W. Becker, E. Pfeil, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 4299.
- [145] B. Chabannes, A. Gharib, L. Cronenberger, H. Pacheco, *Prep. Biochem.* 12 (1983) 395.
- [146] R. C. Knudsen, I. Yall, *J. Bacteriol.* 112 (1972) 569.
- [147] S. K. Shapiro, D. J. Ehninger, *Anal. Biochem.* 15 (1966) 323.
- [148] G. de la Itaba, G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 603.
- [149] S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Oshiro, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 1383.
- [150] M. Oberfrank, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* 140 (1984) 157.
- [151] S. Tono-Oka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55 (1982) 1531.
- [152] S. Tono-Oka, Y. Sasahara, A. Sasaki, H. Shirahama, T. Matsumoto, S. Kakimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 212.
- [153] H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 405.
- [154] W. Nieuwenhuizen, H. Kunze, G. H. DeHaas, *Methods Enzymol.* 33 (1974) 147.
- [155] G. Rao, H. H. O. Schmid, K. R. Reddy, J. G. White, *Biochim. Biophys. Acta* 715 (1982) 205.
- [156] Übersicht: H. Eibl, *Angew. Chem.* 96 (1984) 247; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 257; siehe auch H. Eibl, S. Kovatchev, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 632.
- [157] Y. Ooi, T. Hashimoto, N. Mitsuo, T. Satoh, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 2241.
- [158] L. Hedbys, P. O. Larsson, K. Mosbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1984) 8.
- [159] P. J. Card, W. D. Hitz, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5348.
- [160] P. Bentley, F. Oesch, *Spec. Period. Rep. Foreign Comp. Metab. Mamm.* 6 (1981) 103; G. Bellucci, G. Berti, G. Catelani, E. Mastroiilli, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 5148; G. Bellucci, G. Berti, R. Bianchini, P. Cetera, E. Mastroiilli, *ibid.* 47 (1982) 3105.
- [161] M. Ohno, *Ferment. Ind. Tokyo* 37 (1979) 836.
- [162] H. Sato, Japan Kokai 75140684 (1975); *Chem. Abstr.* 84 (1975) 149212.
- [163] R. H. Allen, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2078.
- [164] G. Catelani, E. Mastroiilli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1983, 2717.
- [165] D. M. Jerina, H. Ziffer, J. W. Daly, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 1056.
- [166] P. Chamberlin, R. M. Mackenzie in B. Vennesland, E. E. Cronn, C. J. Knowles (Hrsg.): *Cyanide Biology*, Academic Press, New York 1981, S. 335; K. Bui, A. Arnaud, P. Gralzy, *Enzyme Microb. Technol.* 4 (1982) 195.
- [167] Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1183.
- [168] J. D. Rozzell: *Abstr. 188th Am. Chem. Soc. Natl. Meeting*, Philadelphia 1984.
- [169] M. B. Cohen, L. Spolter, C. C. Chang, N. S. MacDonald, J. Takahashi, D. D. Robinet, *J. Nucl. Med.* 15 (1974) 1192.
- [170] J. R. Barrio, J. E. Egbert, E. Henze, H. R. Schelbert, F. J. Baumgartner, *J. Med. Chem.* 25 (1982) 93.
- [171] H. Yamada, H. Kumagai, *Pure Appl. Chem.* 50 (1978) 1117.
- [172] S. Fukui, S. I. Ikeda, M. Fujimura, H. Yamada, H. Kumagai, *Eur. J. Biochem.* 51 (1975) 155.
- [173] D. Gurne, D. Shemin, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 844.
- [174] A. R. Battersby, E. Hunt, E. McDonald, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 442.
- [175] G. Richter in T. Godfrey, J. Reichelt (Hrsg.): *Industrial Enzymology*, Nature Press, New York 1983.
- [176] B. N. Alberti, A. M. Klibanov, *Enzyme Microbiol. Technol.* 4 (1982) 47.
- [177] R. Bentley in [2], S. 403.
- [178] A. M. Klibanov, B. N. Alberti, M. A. Marletta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 804.
- [179] R. L. Root, J. R. Durrwachter, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [180] S. W. May, S. R. Padgett, *Biotechnology* 1 (1983) 677.
- [181] M. Morrison, G. R. Schonbaum, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 861.
- [182] J. Geigert, S. L. Needleman, D. J. Dalietos, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2273.
- [183] R. D. Libby, J. A. Thomas, L. W. Kaiser, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5030.
- [184] D. E. Eveleigh, *Sci. Am.* 245 (1981) 155.
- [185] J. Geigert, S. K. Dewitt, S. L. Needleman, G. Lee, D. J. Dalietos, M. Moreland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116 (1983) 82.
- [186] J. Geigert, D. J. Dalietos, S. L. Needleman, T. D. Lee, J. Wadsworth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 (1983) 1104.
- [187] M. D. Corbett, B. R. Corbett, *Experientia* 39 (1983) 487.
- [188] S. L. Needleman, J. Geigert, *Trends Biotechnol.* 1 (1983) 21.
- [189] A. M. Klibanov, Z. Berman, B. N. Alberti, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6263.
- [190] A. U. Khan, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7195.
- [191] B. Halliwell, *Planta* 140 (1978) 81.
- [192] J. P. Rosazza, P. Foss, M. Lemberger, C. J. Sih, *J. Pharm. Sci.* 63 (1974) 544.
- [193] K. Takahashi, H. Nishimura, T. Yoshimoto, Y. Saito, Y. Inada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1984) 261.

- [194] E. J. Corey, J. O. Albright, A. E. Barton, S. I. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 1435.
- [195] E. J. Corey, P. T. Lansbury, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4093.
- [196] S. Wolfe, I. J. Hollander, A. L. Demain, *Biotechnology* 2 (1984) 635.
- [197] I. J. Hollander, Y. Q. Shen, J. Heim, S. Wolfe, A. L. Demain, *Science* 224 (1984) 610; S. Wolfe, A. L. Demain, S. E. Jensen, D. W. S. Westlake, *ibid.* 226 (1984) 1386.
- [198] R. J. Bowers, S. E. Jensen, L. Lynbechansky, D. W. S. Westlake, S. Wolfe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 607.
- [199] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, N. J. Turner, B. P. Domayne-Hayman, H. H. Ting, A. E. Derome, J. A. Murphy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 1167.
- [200] R. N. Patel, C. T. Hou, A. I. Laskin, A. Felix, *J. Appl. Biochem.* 4 (1982) 175.
- [201] H. Dalton, *Adv. Appl. Microbiol.* 26 (1980) 71.
- [202] I. J. Higgins, D. J. Best, R. C. Hammond, *Nature (London)* 286 (1980) 561.
- [203] J. A. Peterson, D. Basu, M. J. Coon, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5162.
- [204] S. W. May, S. L. Gordon, M. S. Steltenkamp, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2017; A. G. Katopodis, K. Wimalasena, J. Lee, S. W. May, *ibid.* 106 (1984) 7928.
- [205] S. W. May, M. S. Steltenkamp, R. D. Schwartz, C. J. McCoy, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7856.
- [206] S. W. May, R. D. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 4031.
- [207] L. L. Poulsen, S. S. Sofer, D. M. Ziegler, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 849.
- [208] Y. Watanabe, T. Numata, T. Lyanagi, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 1163.
- [209] K. Schubert, H. Groh, C. Horhold, *J. Steroid Biochem.* 2 (1971) 281.
- [210] Y. Fujimoto, C. S. Chen, Z. Szeleczky, D. D. Tullio, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4718.
- [211] D. H. Peterson, H. C. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1871; K. Kieslich: *Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds*, Wiley, New York 1976.
- [212] C. Walsh, F. Jacobson, C. C. Ryerson, *Adv. Chem. Ser.* 191 (1980) 119; J. M. Schwab, W.-B. Li, L. P. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4800.
- [213] H. W. S. Chan, G. Levett, *Lipids* 12 (1977) 99; C. P. A. Van Os, M. Vente, J. F. G. Vliegthart, *Biochim. Biophys. Acta* 574 (1979) 103; C. P. A. Van Os, G. P. M. Rijke-Schilder, J. F. G. Vliegthart, *ibid.* 575 (1979) 479; G. W. Taylor, H. R. Morris, *Br. Med. Bull.* 39 (1983) 219; H. W. Hardner in M. G. Simic, M. Karel (Hrsg.): *Autoxidation in Food and Biological Systems*, Plenum Press, New York 1980, S. 447.
- [214] S. Meyerson, E. S. Kuhn, F. Ramirez, J. F. Marecek, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7231.
- [215] G. M. Whitesides, M. Siegel, P. Garrett, *J. Org. Chem.* 40 (1975) 2516.
- [216] J. M. Lewis, S. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 44 (1979) 864.
- [217] C.-H. Wong, A. Pollak, S. D. McCurry, J. M. Sue, J. R. Knowles, G. M. Whitesides, *Methods Enzymol.* 89 (1982) 108.
- [218] D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 3130; D. C. Crans, R. J. Kazlauskas, B. L. Hirschbein, C.-H. Wong, O. Abril, G. M. Whitesides, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [219] H. Kondo, I. Tomioka, H. Nakajima, K. Imahori, *J. Appl. Biochem.* 6 (1984) 29; H. Nakajima, K. Nagata, H. Kondo, K. Imahori, *ibid.* 6 (1984) 19.
- [220] B. L. Hirschbein, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 3765.
- [221] R. J. Kazlauskas, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, im Druck.
- [222] A. Pollak, R. L. Baughn, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2366.
- [223] V. M. Rios-Mercadillo, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5828.
- [224] Y. S. Shih, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 42 (1977) 4165.
- [225] D. L. Marshall, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 447; K. Marata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11 (1981) 72.
- [226] R. L. Baughn, Ö. Adalsteinsson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 306.
- [227] H. J. Leuchs, J. M. Lewis, V. M. Rios-Mercadillo, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5829.
- [228] C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 115.
- [229] K. M. Plowman, A. R. Krall, *Biochemistry* 4 (1965) 2809; H. U. Bergmeyer (Hrsg.): *Methods in Enzymatic Analysis*, 2. Aufl., Academic Press, New York/Verlag Chemie, Weinheim 1974, S. 2081.
- [230] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4890; C.-H. Wong, J. Gordon, C. L. Cooney, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4676.
- [231] J. Bolte, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* 12 (1984) 170.
- [232] O. Abril, D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 1360.
- [233] J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 704.
- [234] D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [235] D. R. Walt, V. M. Rios-Mercadillo, J. Augé, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7805.
- [236] D. R. Walt, M. A. Findeis, V. M. Rios-Mercadillo, J. Augé, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 234.
- [237] T. Sakai, *Biotechnol. Bioeng.* 22 (1980) 143.
- [238] T. Uchida, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 1049.
- [239] T. Sakai, T. Uchida, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 1041.
- [240] A. Gross, O. Abril, J. M. Lewis, S. Geresh, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7428.
- [241] S. L. Johnson, P. T. Tazon, *Biochemistry* 16 (1977) 1175.
- [242] C. R. Lowe, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 300 (1983) 335.
- [243] S. S. Wang, C.-K. King, *Adv. Biochem. Eng.* 12 (1979) 119.
- [244] Z. Shaked, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7104.
- [245] R. J. Lamed, E. Keinan, J. G. Zeikus, *Enzyme Microbiol. Technol.* 3 (1981) 144.
- [246] C.-H. Wong, J. Gordon, C. L. Cooney, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4676.
- [247] C.-H. Wong, L. Daniels, W. H. Orme-Johnson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6227.
- [248] R. DiCosimo, C.-H. Wong, L. Daniels, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4622.
- [249] Z. Shaked, J. Barber, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4100.
- [250] O. Abril, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1552.
- [251] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2816.
- [252] Übersicht: H. Simon, J. Bader, H. Günther, S. Neumann, J. Thanos, *Angew. Chem.* 97 (1985) 541; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 539; H. Simon, H. Günther: *Biomimetic Chemistry (Proc. 2. Kyoto Conf. New Aspects Org. Chem.)*, Kodansha, Tokyo 1983, S. 207.
- [253] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3542.
- [254] A. M. Klivanov, A. V. Pauglis, *Biotechnol. Lett.* 2 (1980) 445.
- [255] C.-H. Wong, H. M. Sweers, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [256] A. R. Battersby, P. W. Sheldrake, J. Staunton, D. C. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1976, 1056.
- [257] J. W. Cornforth, F. P. Ross, C. Wakselman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1975, 429.
- [258] H. R. Levy, F. A. Loewus, B. Vennesland, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 2949.
- [259] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5012.
- [260] L. Lee, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [261] D. R. Dodds, J. B. Jones, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 1080; J. Davies, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5405.
- [262] B. L. Hirschbein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4458.
- [263] W. Tischer, J. Bader, H. Simon, *Eur. J. Biochem.* 97 (1979) 103.
- [264] H. Simon, H. Günther, J. Bader, W. Tischer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 897; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 861; H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, W. Widmer, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1832; H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, R. Barner, M. Schmid, R. Zell, *ibid.* 62 (1979) 455.
- [265] H. Simon, J. Bader, B. Rambeck, E. Krezdorn, W. Tischer in H. W. Dellweg (Hrsg.): *4th Symp. Techn. Microbiol.*, Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie im Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Berlin 1979, S. 325.
- [266] C. Fuganti, P. Grasselli, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 205; C. Fuganti, D. Ghiringhelli, P. Grasselli, *ibid.* 1975, 846; H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, R. Parmer, M. Schmid, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* 62 (1979) 455; H. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, R. Zell, *ibid.* 59 (1976) 1832.
- [267] L. G. Lee, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [268] J. B. Jones, K. E. Taylor, *Can. J. Chem.* 55 (1976) 2969.
- [269] C.-H. Wong, S. D. McCurry, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7938.
- [270] M. Julliard, J. Le Petit, *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 283.
- [271] H. Watanabe, J. W. Hastings, *Mol. Cell. Biochem.* 44 (1982) 181; D. Drueckhammer, C.-H. Wong, unveröffentlicht.
- [272] G. S. Y. Ng, L. C. Yuan, I. J. Jakovac, J. B. Jones, *Tetrahedron* 40 (1984) 1235.
- [273] A. J. Bridges, P. S. Raman, G. S. Y. Ng, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1461.
- [274] J. B. Jones, I. J. Jakovac, *Can. J. Chem.* 60 (1982) 19.
- [275] I. J. Jakovac, H. B. Goodbrand, K. P. Lok, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4659.
- [276] J. B. Jones, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 831.
- [277] J. B. Jones, *Enzyme Eng.* 6 (1982) 107.
- [278] H. Dutler, C. I. Bränden, *Bioorg. Chem.* 10 (1981) 1.
- [279] H. Eklund, B. V. Plapp, J. P. Samama, C. I. Bränden, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14349.
- [280] E. Usdin, R. T. Borchardt, C. R. Creveling: *Biochemistry of S-Adenosylmethionine and Related Compounds*, McMillan Press, London 1982; F. Salvatore, A. Borek, V. Zappa, H. G. Williams-Ashma: *The Biochemistry of Adenosylmethionine*, Columbia University Press, New York 1977.

- [281] H. G. Floss, *Methods Enzymol.* 87 (1982) 126.
- [282] A. Gross, S. Geresh, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8 (1982) 415.
- [283] G. D. Markham, E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9082.
- [284] R. C. Greene, *Biochemistry* 8 (1969) 2255.
- [285] G. de la Haba, G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 603.
- [286] S. Khani-Oskouee, J. P. Jones, R. W. Woodard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1984) 181.
- [287] R. Ramalingam, R. W. Woodard, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 1291.
- [288] J. M. Lowenstein, *Methods Enzymol.* 35 (1975); P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*. Academic Press, New York 1983, S. 16.
- [289] R. S. Bandurski, L. G. Wilson, C. L. Squires, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 6408.
- [290] E. Stadtman in P. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 8, Academic Press, New York 1973, S. 1; R. H. De Meio in D. M. Greenberg (Hrsg.): *Metabolic Pathways*, 3. Aufl., Academic Press, New York 1975, S. 287; G. J. Mulder: *Sulfation of Drugs and Related Compounds*, CRC Press, Cleveland, OH, USA 1981, S. 53.
- [291] R. L. Lindblad, W. V. Brown, K. G. Mann, H. R. Roberts: *Chemistry and Biology of Heparin*, Elsevier, New York 1981, S. 157.
- [292] S. Deluca, M. E. Richmond, J. E. Silbert, *Biochemistry* 12 (1973) 3911.
- [293] C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5416.
- [294] P. R. Rosevear, H. A. Nunez, R. Barker, *Biochemistry* 21 (1982) 1421; C. Auge, S. David, C. Mathieu, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 1467.
- [295] L. Perez, G. M. Whitesides, unveröffentlicht; M. DeLuca, L. J. Cricka, *Arch. Biochem. Biophys.* 226 (1983) 285.
- [296] G. S. Fonken, R. A. Johnson: *Chemical Oxidations with Microorganisms*, Marcel Dekker, New York 1972; F. G. Fischer, *Newer Methods Prep. Org. Chem.* 1 (1948) 159; A. Ciegler: *Microbial Transformations of Terpenes in CRC Handb. Microbiol.* 4 (1979) 449.
- [297] M. G. Woucha, F. J. Antosz, J. C. Knight, L. A. Kaminek, T. R. Pyke, *Biochim. Biophys. Acta* 531 (1978) 308.
- [298] M. Shikita, P. F. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1441; J. M. Wyatt, *Trends Biochem. Sci.* 9 (1984) 20.
- [299] O. Hayaishi, M. Nozaki, M. Abbott in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 12, 3. Aufl., Academic Press, New York 1975, S. 120; C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979, S. 309.
- [300] D. G. H. Ballard, A. Courtis, I. M. Shirley, S. G. Taylor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 954.
- [301] F. S. Sariaslani, J. P. N. Rosazza, *Enzyme Microbiol. Technol.* 6 (1984) 242; G. H. Hamilton in [2], S. 875.
- [302] M. J. Coon, R. E. White in T. E. Spiro (Hrsg.): *Metal Ion Activation of Dioxygen*, Wiley, New York 1980, S. 73.
- [303] J. Colby, H. Dalton, R. Whittenbury, *Annu. Rev. Microbiol.* 33 (1979) 481.
- [304] J. F. Kennedy, C. A. White: *Bioactive Carbohydrates*, Wiley, New York 1983.
- [305] R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday, D. C. Ellwood: *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*, Academic Press, New York 1979.
- [306] G. A. Aspinall: *The Polysaccharides*, Academic Press, New York 1982.
- [307] J. C. Venter, *Pharmacol. Rev.* 34 (1979) 481.
- [308] T. A. Beyer, J. E. Sadler, J. I. Rearick, J. C. Paulson, R. L. Hill, *Adv. Enzymol.* 52 (1981) 23; J. E. Sadler, T. A. Beyer, C. L. Oppenheimer, J. C. Paulson, J. P. Prieels, J. I. Rearick, R. L. Hill, *Methods Enzymol.* 83 (1982) 458; M. R. Rosner, S. C. Hubbard, R. J. Ivatt, P. W. Ribbons, *ibid.* 83 (1982) 399; J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37 (1980) 157; N. Sharon, H. Lis, *Chem. Eng. News* 59 (1981) Nr. 13, S. 21.
- [309] R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, *Methods Enzymol.* 101 (1983); G. M. Walton, G. N. Gill, *Methods Enzymol.* 60 (1979) 587.
- [310] G. D. Hanes, S. J. Higgins (Hrsg.): *Transcription and Translation. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1984.
- [311] R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, *Methods Enzymol.* 65 (1979); 68 (1980); 100 (1983); 101 (1983); V. S. Malik, *Adv. Appl. Microbiol.* 27 (1981) 1.
- [312] H. G. Gassen, A. Lang (Hrsg.): *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [313] N. K. Gupta, E. Ohtsuka, H. Webber, S. H. Chang, H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60 (1968) 285; M. J. Engler, C. C. Richardson in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 15, Academic Press, New York 1982, S. 3.
- [314] P. C. Uhlenbeck, R. I. Gumpert in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 15, Academic Press, New York 1982, S. 31.
- [315] D. M. Hinton, C. A. Brennan, R. I. Gumpert, *Nucl. Acid Res.* 10 (1982) 1877; M. M. McCoy, R. I. Gumpert, *Biochemistry* 19 (1980) 635; C. A. Brennan, A. E. Manthey, R. I. Gumpert, *Methods Enzymol.* 100 (1983) 38.
- [316] P. J. Romaniuk, O. C. Uhlenbeck, *Methods Enzymol.* 100 (1983) 52.
- [317] C. H. Hoffman, E. Harris, S. Chodroff, S. Micholson, J. W. Rothrock, E. Peterson, W. Reuter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41 (1970) 710.
- [318] H. G. Gassen, R. Nolte, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44 (1971) 1410.
- [319] H. U. Bergmeyer (Hrsg.): *Methods of Enzymatic Analysis* (12 Vols.), Verlag Chemie und VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1983–1987.