

Von Hideaki Yamada\* und Sakayu Shimizu\*

Die bedeutendste neuere Entwicklung auf dem Gebiet der Organischen Synthese besteht in der Nutzung biologischer Systeme für chemische Reaktionen. Durch Enzyme oder Enzymsysteme katalysierte Reaktionen verlaufen weit spezifischer als herkömmliche organisch-chemische Reaktionen. Biologische und/oder enzymatische Synthesen und Transformationen, das heißt „mikrobielle Transformationen“, bieten interessante Möglichkeiten; bei einigen dieser Reaktionen sind die Vorteile für die präparative Organische Chemie und für die Biotechnologie bereits abzusehen. Der vorliegende Beitrag gibt einen Überblick über den gegenwärtigen Stand auf dem sich schnell entwickelnden Gebiet. Methodik, technische Verfahren und Anwendungsbereiche werden mit denen herkömmlicher Synthesen verglichen.

## 1. Einleitung

Während der letzten zehn Jahre wurden biochemische Reaktionen, die von Mikroorganismen ausgeführt oder durch Enzyme katalysiert werden, umfassend unter organisch-präparativen Gesichtspunkten ausgewertet; dabei ergaben sich bedeutende Möglichkeiten dieser Reaktionen für Theorie und Praxis der Organischen Synthese. Es ist vielfach versucht worden, biologische Reaktionen für industrielle Synthesen zu nutzen, z. B. zur Produktion von Pharmazeutika, Feinchemikalien, Lebensmittelzusatzstoffen und Grundchemikalien. Eine derartige Synthese wird als „mikrobielle Transformation“ oder auch als „mikrobielle Umsetzung“, „Biotransformation“ oder „Biokonversion“ bezeichnet. Sie unterscheidet sich in mancher Hinsicht von der „Fermentation“, einer anderen wichtigen Synthesetechnik, die auf biologischen Reaktionen beruht. Die mikrobielle Transformation ist ein sich rasch entwickelndes Gebiet der präparativen Chemie, das sowohl Organische Chemie als auch Biochemie umfaßt.

Eine mikrobielle Transformation ist die Umwandlung einer Substanz (Substrat) in eine andere (Produkt) durch einen Mikroorganismus. Es ist eine chemische Reaktion, die durch ein spezielles zelluläres Enzym oder ein ursprünglich in Zellen produziertes Enzym katalysiert wird. Die meisten derartigen Enzyme sind für den normalen Ablauf des Stoffwechsels und der Reproduktion der Zellen notwendig; bei mikrobiellen Transformationen dienen die Enzyme jedoch einfach als Katalysatoren (Biokatalysatoren) für chemische Reaktionen. Viele dieser Enzyme können neben ihren natürlichen Substraten auch strukturverwandte Verbindungen umsetzen, das heißt beim Zusatz fremder Substrate zum Reaktionsmedium gelegentlich auch nicht-natürliche Reaktionen katalysieren. Somit kann man die mikrobielle Transformation als eine besondere Kategorie der chemischen Synthese ansehen.

Zahlreiche Übersichten zu diesem Thema sind sowohl von Biotechnologen<sup>[1-8]</sup> als auch von Organikern<sup>[9-15]</sup> ver-

öffentlicht worden. Wir werden im folgenden mehrere wichtige Aspekte dieses Gebietes vorstellen und neueste Entwicklungen nachzuzeichnen versuchen.

## 2. Eigenschaften von Enzymreaktionen bei mikrobiellen Transformationen

Wie in den Abschnitten 2.1 und 2.2 ausgeführt werden wird, ist die mikrobielle Transformation eine Technik zur Synthese oder Produktion wertvoller Verbindungen, der im wesentlichen sowohl die chemische Synthese als auch die Fermentation zugrunde liegen. Daher überschneiden sich die Eigenschaften der mikrobiellen Transformation in mancher Hinsicht auch mit denen der chemischen Synthese oder der Fermentation.

### 2.1. Vergleich zwischen mikrobieller Transformation und chemischer Synthese

Chemische Reaktionen, die von Mikroorganismen oder Enzymen katalysiert werden, sind im wesentlichen die gleichen wie in der herkömmlichen Anorganischen oder Organischen Chemie. Unterschiede des Reaktionsverlaufs hängen vom Katalysator ab (siehe Tabelle 1). Die für mikrobielle Transformationen eingesetzten Enzyme (oder Biokatalysatoren) erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit, indem sie wie normale Katalysatoren die Aktivierungsenergie herabsetzen. Die auffallendsten Unterschiede zwischen Enzymen und chemischen Katalysatoren liegen aber in ihrer Substratspezifität. Enzyme katalysieren spezifische Reaktionen einer einzigen oder weniger strukturverwandter Verbindungen, wobei sie nahezu perfekt zwischen Stereoisomeren oder zwischen Regioisomeren unterscheiden. Daher katalysiert ein Enzym nur eine sehr spezifische Änderung einer funktionellen Gruppe oder einer Bindung in einer Substanz. So kann ein einziges Produkt erwartet werden, sofern ein einziges Enzym die Umsetzung katalysiert.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Enzyme ist ihre hohe katalytische Wirksamkeit. Zum Beispiel wird ein Amid durch Chymotrypsin etwa 4000mal schneller hy-

[\*] Prof. Dr. H. Yamada, Dr. S. Shimizu  
Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University  
Sakyo-ku, Kyoto 606 (Japan)

drolysiert als bei der entsprechenden basenkatalysierten Reaktion<sup>[16]</sup>.

Tabelle 1. Eigenschaften enzymatischer und chemischer Reaktionen (stark verallgemeinert).

	Enzymatische Reaktion	Chemische Reaktion
Reaktionsbedingungen		
Temperatur	physiologisch	hoch
Druck	physiologisch	hoch
Herkunft der Reaktionsenergie	Änderung der Enzymkonformation (Öffnen und Schließen von van-der-Waals- und Wasserstoffbrücken-Bindungen usw.)	thermisch
Lösungsmittel	Wasser	Wasser, organische Lösungsmittel
Spezifität		
Substratspezifität	hoch	gering
Stereospezifität	hoch	gering
Regiospezifität	hoch	gering
Konzentration von Substrat und/oder Produkt	niedrig	hoch

Enzyme erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit ohne große Energiezufuhr, so daß hohe katalytische Wechselzahlen (mol Produkt pro mol Enzym pro Zeiteinheit) erreicht werden; das heißt, es ist nur eine kleine Menge des Enzyms notwendig, um die Umsetzung einer großen Substratmenge zu katalysieren. Enzyme entfalten ihre Aktivität unter milden Reaktionsbedingungen wie atmosphärischem Druck, Temperaturen um 20 bis 40°C und pH-Werten nahe dem Neutralpunkt, unter denen die üblichen chemischen Katalysatoren kaum wirksam sind. Diese einzigartigen Eigenschaften der Enzyme sind besonders wertvoll, wenn instabile Moleküle ohne Nebenreaktionen umgesetzt werden sollen.

Man muß aber auch berücksichtigen, daß diese charakteristischen Merkmale gelegentlich die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren erschweren. Zum Beispiel bedeutet die hohe katalytische Aktivität von Enzymen unter milden Reaktionsbedingungen keineswegs, daß sie auch unter drastischen Bedingungen eingesetzt werden können. Tatsächlich geht die Aktivität von Enzymen unter drastischen Bedingungen gewöhnlich verloren, während normale chemische Katalysatoren sehr wohl aktiv sind. Daher kann man davon ausgehen, daß Enzyme ihre Aktivität *ausschließlich* unter milden Reaktionsbedingungen entfalten, und zwar aufgrund ihrer empfindlichen Proteinstruktur, die durch van-der-Waals-Kräfte, ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken usw. aufrechterhalten wird. Die hohe Selektivität der Enzymkatalyse – eine der wichtigsten Eigenschaften, die Enzyme so vielversprechend als Katalysatoren in der präparativen Chemie erscheinen lassen – kann aber auch ein Nachteil sein, weil Selektivität auch Einschränkung bedeutet. Zum Beispiel ist Platin einer Reduktase weit überlegen in der Fähigkeit, ein weites Spektrum von Verbindungen zu reduzieren.

Die International Union of Biochemistry hat mehr als 2000 Enzyme zusammengestellt<sup>[17]</sup>. Sie werden nach den von ihnen katalysierten Reaktionen klassifiziert. Die Liste

umfaßt nahezu alle Typen chemischer Reaktionen, die auch von den normalen chemischen Katalysatoren beschleunigt werden. Mehr als 800 zellfreie Enzyme sind im Handel<sup>[18]</sup>. Somit läßt sich in manchen Fällen leicht ein geeignetes Enzym für eine gewünschte Umsetzung finden.

2.2. Vergleich zwischen mikrobieller Transformation und Fermentation

Es gibt zwei Möglichkeiten, Mikroorganismen zur Produktion wertvoller Verbindungen zu nutzen: durch mikrobielle Transformation und durch Fermentation. Fermentationen werden seit altersher durchgeführt<sup>[19]</sup> – ein gutes Beispiel ist die alkoholische Gärung – und sie sind immer noch eine leistungsfähige Technik zur Produktion von organischen Säuren<sup>[20]</sup>, Lösungsmitteln<sup>[21]</sup>, Antibiotica<sup>[22]</sup>, Aminosäuren<sup>[23]</sup>, Nucleinsäure-Derivaten<sup>[24]</sup> usw. Anders als die mikrobielle Transformation wird die Fermentation als überwiegend biologische Methode angesehen, weil sie Ausdruck der unmittelbaren Lebensprozesse eines Mikroorganismus ist. Mit anderen Worten: Das Produkt entsteht durch den komplexen Stoffwechsel des Mikroorganismus, wobei billige Kohlenstoff- und Stickstoffquellen eingesetzt werden. Es werden also lebende oder wachsende Zellen für eine Fermentation benötigt, und Fermentationsprodukte sind immer natürliche Produkte.

Bei mikrobiellen Transformationen ist es dagegen nicht so wichtig, ob die Zellen leben oder nicht. Die Lebensäußerungen eines Mikroorganismus werden nur zur Produktion von Enzymen benötigt, und der Mikroorganismus selbst wird einfach als „Sack mit Enzymen oder Katalysatoren“ genutzt.

Während Fermentationen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen erfordern, wird für mikrobielle Transformationen ein Substrat benötigt. Die Enzymkatalyse bewirkt eine einfache und spezifische Veränderung im Substratmolekül. Die Substrate müssen nicht notwendigerweise natürlich sein; nicht-natürliche Substrate können ebenfalls verändert werden, sofern das Enzym dieses veränderte Substrat akzeptiert. Es können also nicht nur natürliche, sondern auch nicht-natürliche Produkte durch mikrobielle Transformation hergestellt werden.

Tabelle 2. Eigenschaften von mikrobieller Transformation und Fermentation (verallgemeinert).

	Mikrobielle Transformation	Fermentation
Mikroorganismen	wachsende, ruhende oder behandelte Zellen	wachsende Zellen
Reaktion	einfache katalytische Reaktion (ein oder mehrere Schritte)	lebendes System (komplexe Reaktionskette)
Reaktionszeit	kurz	lang
Ausgangsmaterial	teure Substrate	billige Kohlen- und Stickstoffquellen
Produkt	natürlich oder nicht-natürlich	natürlich
Produktkonzentration	hoch	niedrig
Produktsolierung	einfach	aufwendig

Die Vor- und Nachteile dieser beiden mikrobiellen Prozesse sind kurz in Tabelle 2 zusammengefaßt. Abbildung 1

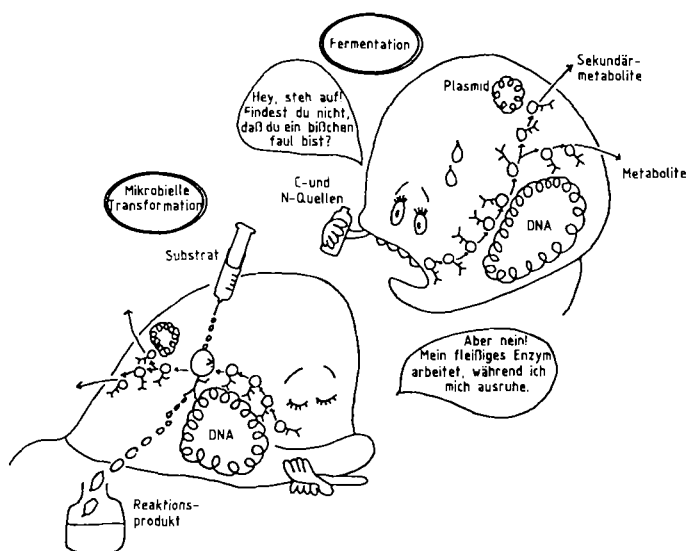
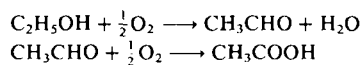


Abb. 1. Wesentliche Unterschiede zwischen den beiden mikrobiellen Verfahren der „mikrobiellen Transformation“ und der „Fermentation“.

macht die wesentlichen Unterschiede zwischen mikrobieller Transformation und Fermentation deutlich. Allerdings kann nicht immer eine scharfe Trennlinie zwischen beiden Methoden gezogen werden.

### 3. Geschichtlicher Hintergrund und gegenwärtiger Stand der mikrobiellen Transformation

Die mikrobielle Transformation ist eine traditionsreiche Kunst. Das älteste und am besten bekannte Modellbeispiel ist die Essigproduktion, die seit Beginn der Geschichtsschreibung durchgeführt wird. Der Prozeß wurde nach den herkömmlichen Grundsätzen der Fermentation weiterentwickelt, ohne daß die zugrundeliegende Biochemie bekannt war. Heute weiß man, daß die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure durch Essigsäurebakterien zwei aufeinanderfolgende Dehydrogenierungen umfaßt. Sie sind vom Cytochromsystem abhängig, das den Elektronentransport auf atmosphärischen Sauerstoff als Wasserstoff-Endakceptor bewirkt:



1921 wurde eine mikrobielle Reaktion zur stereospezifischen Präparation von D-(–)-Ephedrin beschrieben<sup>[25]</sup>. Hefezellen, die aktiv Glucose in Acetaldehyd umwandeln, konnten zugesetzten Benzaldehyd mit dem Acetaldehyd zu optisch aktivem L-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon kondensieren. Dieses Produkt wurde dann chemisch zu D-(–)-Ephedrin umgesetzt. Dies muß als erstes Beispiel einer erfolgreichen Kombination von chemischen und enzymatischen Reaktionen angesehen werden.

Erst sehr viel später bekam die mikrobielle Transformation ihre heutige Bedeutung durch die Entdeckung, daß Steroide durch Mikroorganismen spezifisch modifiziert werden können<sup>[26,27]</sup>. Viele Steroidmodifizierungen wie Hydroxylierung, Epoxidation, Dehydrogenierung, Isomerisierung und Hydrolyse werden durch verschiedenartige Mikroorganismen bewirkt. Viele dieser Umsetzungen las-

sen sich mit herkömmlichen chemischen Synthesen nicht erreichen. Durch diese mikrobiellen Reaktionen wurden zahlreiche neuartige Zwischenprodukte für die chemische Synthese neuer Steroidpharmazeutika verfügbar. Zusätzlich zu dem beträchtlichen praktischen Wert ermöglichte die erstaunliche Vielseitigkeit der Mikroorganismen bei der Steroidtransformation einen wertvollen Erkenntnisgewinn über die Anwendung mikrobieller Enzyme bei chemischen Synthesen<sup>[28]</sup>.

Während der darauffolgenden Jahre wurden Tausende von mikrobiellen Transformationen gefunden, darunter verschiedene Typen von Reaktionen mit organischen Verbindungen und Naturstoffen. Einige dieser Reaktionen haben sich als sehr wertvoll für die präparative Chemie erwiesen. Bedeutende Entwicklungen in der Biochemie, Enzymologie, Genetik, Molekularbiologie und Fermentationstechnologie haben ebenfalls zu raschen Fortschritten beigetragen.

Mittlerweile ist die technische Bedeutung mikrobieller Transformationen oder enzymatischer Verfahren auf vielen Gebieten der Biotechnologie anerkannt (siehe Abb. 2). Die Modifizierung komplexer Moleküle biologischen Ursprungs (z. B. Proteine, Polypeptide, Lipoproteine, Glycoproteine, Polysaccharide und Polynucleotide) hat große Bedeutung für die Herstellung von Pharmazeutika. Beispielsweise können Peptidhormone mit Proteasen oder Peptidasen erhalten werden<sup>[29]</sup> (siehe auch Abschnitt 5.2). Die Umwandlung von Schweine-Insulin in Human-Insulin ist bereits ein kommerzielles Verfahren<sup>[30–32]</sup> (vgl. Abb. 9). Enzymatische Verfahren sind ebenfalls unentbehrlich für die Herstellung von DNA und RNA, die in der Gentechnik benötigt werden<sup>[33]</sup>.

Enzyme sind die besten Katalysatoren für die Herstellung von Spezial- oder Feinchemikalien. Es gibt viele kommerzielle Verfahren zur Produktion von Aminosäuren, Nucleinsäure-Derivaten, Zuckern, Lipiden usw. Praktisch ausschließlich durch enzymatische Verfahren hergestellt werden z. B. L-Alanin (mit Aspartat-β-Decarboxylase)<sup>[34]</sup>, L-Asparaginsäure (mit Aspartase)<sup>[35]</sup>, Stärkesirup mit hohem Fructosegehalt (mit Glucose-Isomerase)<sup>[36]</sup> und 6-Aminopenicillansäure als Edukt für halbsynthetische Penicilline (mit Penicillin-Acylase)<sup>[37,38]</sup>. Eine Vielfalt an Chemikalien für Analytik und Forschung in der klinischen Chemie, Biochemie, Stoffwechselphysiologie und Pharmakologie werden ebenfalls unter Anwendung von Enzymen hergestellt.

Die Produktion von Grundchemikalien ist einer der Bereiche mikrobieller Transformationen, die sich zur Zeit rasch entwickeln. Die Nutzung von Enzymreaktionen für Produktionsprozesse ist umfassend unter folgenden Gesichtspunkten beurteilt worden: Herstellung von hochreinen Produkten, Energieeinsparung und die Beseitigung von Umweltschäden. Die Herstellung von Acrylamid aus Acrylonitril mit Nitril-Hydratase<sup>[39]</sup> wird heute kommerziell durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6). Oxygenase (oder Halogen-Peroxidase und Halogenhydrin-Epoxidase), Methanol-Oxidase, sec-Alkohol-Dehydrogenase und Gallat-Decarboxylase wurden als Katalysatoren für die Produktion von Alkenoxiden<sup>[40]</sup>, Formaldehyd<sup>[41]</sup>, Ketonen<sup>[42]</sup> bzw. Pyrogallol<sup>[43]</sup> vorgeschlagen.

Die Herstellung chiraler Synthone mit Enzymen als Katalysatoren ist ein Gebiet, das in der Organischen und

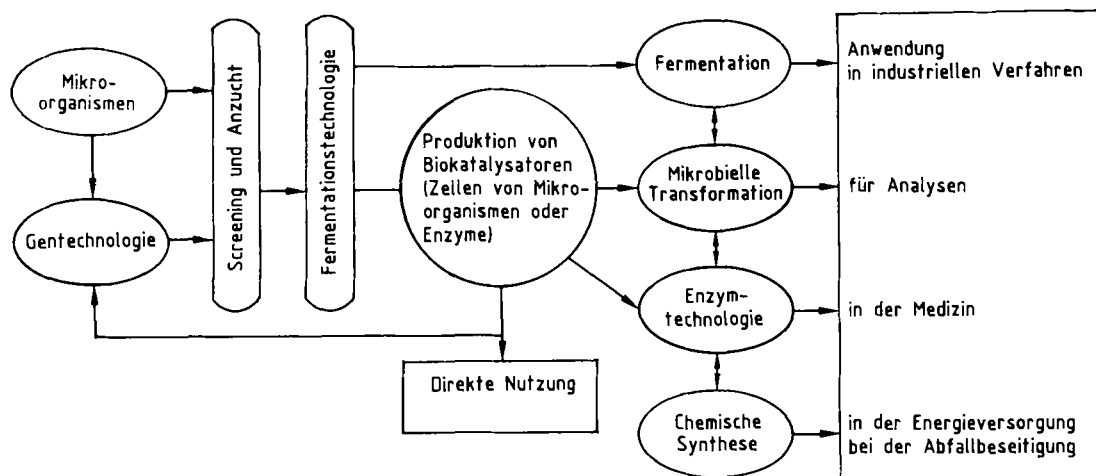


Abb. 2. Anwendungsgebiete mikrobieller Enzyme, mikrobieller Transformationen und enzymatischer Verfahren in der Biotechnologie.

Direkte Nutzung: Brauereiwesen, Verarbeitung von Lebensmitteln, Gerberei, Detergentien, Herstellung von Pharmazeutika, Industrieverfahren, Abfallbeseitigung, Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen usw.

Anwendung in industriellen Verfahren: Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln, Herstellung von Pharmazeutika, Pestiziden, Aminosäuren, Futtermitteln, Nucleotiden, biologisch aktiven Verbindungen, Duftstoffen, Industriechemikalien usw.

Anwendung für Analysen: Lebensmittelanalysen, klinische Analysen, Umweltanalysen, Qualitätskontrolle

Anwendung in der Medizin: künstliche Organe, Therapie, Diagnose

Anwendung in der Energieversorgung

Anwendung bei der Abfallbeseitigung.

Pharmazeutischen Chemie zur Zeit intensiv bearbeitet wird. Praktische Bedeutung hat bereits die Herstellung von Mevalonolacton<sup>[44]</sup>, Carbapenem-Antibiotica<sup>[45]</sup>, Nucleosid-Antibiotica<sup>[46]</sup>, Insektenhormonen<sup>[47]</sup>,  $\alpha$ -Tocopherol<sup>[48]</sup>, Muscon<sup>[49]</sup> und anderen Verbindungen auf diesem Weg.

#### 4. Verfahrensentwicklung bei mikrobiellen Transformationen

Bei der Verfahrensplanung für eine mikrobielle Transformation müssen viele wichtige Aspekte berücksichtigt werden. Sie sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Von großer Bedeutung sind vor allem die Auswahl der Zielverbindung

Tabelle 3. Kriterien für die Planung einer mikrobiellen Biotransformation.

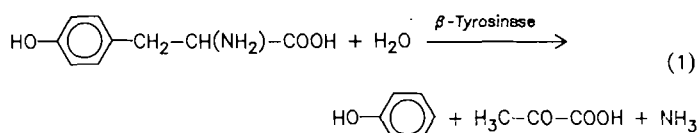
1. Physiologie des Mikroorganismus
2. Mikrobieller Stoffwechsel und Biosynthesereaktionen
  - Neue mikrobielle Reaktionen
  - Neue Synthesemöglichkeiten
3. Enzymatische Katalyse
  - Enzymeigenschaften
  - Mechanismus der Enzymreaktion
  - Beurteilung der katalytischen Möglichkeiten
4. Enzymproduktion
  - Mechanismus der Enzymbildung
  - ... Induktoren, Regulatoren usw.
  - Stammverbesserung
  - ... Screening, Mutation, Gentransfer usw.
  - Optimierung
  - ... Wachstumsparameter
5. Enzymmodifizierung
  - ... chemische und/oder biochemische Modifizierung,
  - Immobilisierung, Protein Engineering usw.
6. Mikrobielle oder enzymatische Synthese und Biotransformation
  - Optimierung
  - Prozessauslegung

und eine Zusammenstellung der verfügbaren Substrate und Reaktionswege.

##### 4.1. Beurteilung der enzymatischen Leistungsfähigkeit

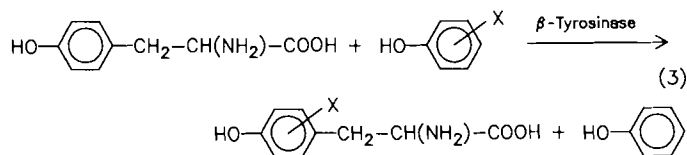
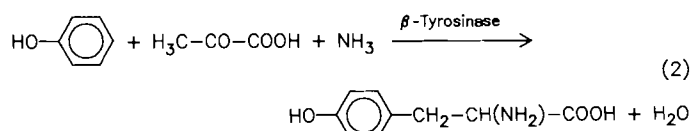
Gelegentlich ermöglicht die Entdeckung eines neuen Enzyms oder einer neuen Reaktion die Entwicklung eines neuen Verfahrens für eine mikrobielle Transformation. In einem solchen Fall müssen zuerst die Eigenschaften des neuen Enzyms im Hinblick auf die praktische Anwendung bestimmt werden. Der Syntheseweg, an dem das Enzym oder die Reaktion beteiligt ist, sollte durch sorgfältige Prüfung der Enzymeigenschaften gesichert werden. Ein typisches Beispiel ist die Anwendung von Protease I aus *Achromobacter*; dieses Enzym hydrolysiert spezifisch die Amidbindung am Carboxylende von L-Lysinresten in Polypeptiden<sup>[50]</sup>. Daher kann das Enzym eingesetzt werden, um Schweine-Insulin in Human-Insulin umzuwandeln<sup>[31]</sup> (vgl. Abb. 9).

Ein anderes interessantes Beispiel ist die Produktion von L-Tyrosin und L-Dopa mit bakterieller  $\beta$ -Tyrosinase<sup>[51]</sup>. Man hat lange angenommen, daß dieses Enzym ein einfaches hydrolytisches Enzym ist, das eine  $\alpha,\beta$ -Eliminierung von L-Tyrosin zu Phenol, Pyruvat und Ammoniak katalysiert [Gl. (1)].



Später fand man, daß das Enzym auch die Rückreaktion dieser  $\alpha,\beta$ -Eliminierung [Gl. (2)] und ebenso eine  $\beta$ -Aus-

tausch-Reaktion von L-Tyrosin mit Phenol-Derivaten katalysiert [Gl. (3)].



Bald danach wurden diese Reaktionen zur Synthese von L-Tyrosin und L-Dopa eingesetzt. Später wurden ähnliche Reaktionen gefunden, die durch Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme katalysiert werden. Mit ihnen gelang die Synthese von optisch aktiven, aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren<sup>[51-55]</sup> (siehe Abschnitt 5.1.2).

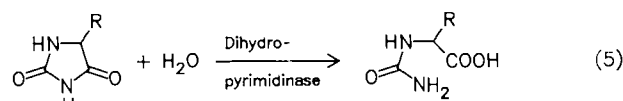
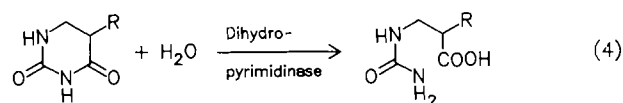
Diese erfolgreichen Beispiele zeigen, wie wichtig es sein kann, Fähigkeiten gut bekannter Enzyme oder Reaktionen neu zu bestimmen.

#### 4.2. Suche nach brauchbaren Enzymen

Gelegentlich wird ein Syntheschema entworfen, ohne daß die dazu passenden Enzyme oder Reaktionen bekannt sind. In einem solchen Fall ist es notwendig, nach geeigneten mikrobiellen Stämmen oder Enzymen für die gewünschte Synthese zu suchen. Die Herstellung von L-Lysin aus DL- $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam ist ein typisches Beispiel<sup>[56]</sup>. Dieses Verfahren wurde zur Verwertung von Cyclohexen entwickelt, einem bedeutenden Nebenprodukt der Nylonherstellung. Für diesen Prozeß (Abb. 3) wird ein Mikroorganismus oder ein Enzym benötigt, um ausschließlich das L-Isomer von  $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam zu L-Lysin zu hydrolysieren. Bei einer Durchsicht der Mikroorganismen, die diese Umsetzung katalysieren können, wurden zwei Stämme gefunden: Der eine hydrolysiert das L-Isomer des Substrates und der andere racemisiert das ver-

bleibende D-Isomer. So kann das racemische Substrat stöchiometrisch in L-Lysin umgewandelt werden, ohne daß eine Racemattrennung notwendig wird.

Ein weiteres interessantes Beispiel ist die hydrolytische Ringöffnung von DL-5-substituierten Hydantoinen durch Dihydropyrimidinase, die zu N-Carbamoyl-D-aminosäuren führt<sup>[53, 57, 58]</sup>. Dieser Syntheseweg (vgl. Abb. 6) wurde ursprünglich für die Herstellung von L-Methionin aus dem entsprechenden DL-5-monosubstituierten Hydantoin entwickelt. Der Reaktionsweg selbst ist dem üblichen chemischen Verfahren nach *Bucherer* und *Steiner*<sup>[59]</sup> zur Synthese racemischer Aminosäuren sehr ähnlich. Hier wird wiederum ein Mikroorganismus zur asymmetrischen Hydrolyse des racemischen Substrats benötigt. Überraschenderweise werden nur die D-Isomere vieler Hydantoin-Derivate hydrolysiert. Das Enzym, das diese Hydrolyse bewirkt, wurde bald als ein bekanntes Enzym identifiziert, nämlich Dihydropyrimidinase (EC 5.3.2.2); es katalysiert die hydrolytische Ringöffnung von Dihydropyrimidinen zu N-Carbamoyl- $\beta$ -aminosäuren. Diese beiden hydrolytischen Ringöffnungen unterscheiden sich nur durch die Größe des Ringes, wie aus den Gleichungen (4) und (5) hervorgeht.



Dieser Befund war ein Wendepunkt für das weitere Vorgehen. Als Zielprodukt wurde nun D-*p*-Hydroxyphenylglycin angesehen, ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Herstellung halbsynthetischer Penicilline und Cephalosporine. Für die Gewinnung des Substrats DL-5-(*p*-Hydroxyphenyl)hydantoin wurde ein neuer und leistungsfähiger Syntheseweg eingeführt. Die Ergebnisse übertrafen die anfänglichen Erwartungen bei weitem (Einzelheiten siehe Abschnitt 5.1.1).

Bei der Umsetzung nicht-natürlicher Substrate ist es manchmal ungewiß, ob die gewünschte Reaktion abläuft oder nicht. Geprüft wird dies üblicherweise, indem man das Substrat dem Anzuchtmedium oder dem Reaktionsansatz zusetzt; anschließend wird auf die gewünschte Reaktion getestet<sup>[60, 61]</sup>. Ein solcher Test sollte aus folgenden Gründen mit einer breiten Auswahl an Mikroorganismen durchgeführt werden: 1. Enzyme katalysieren eine Fülle chemischer Reaktionen, genau wie chemische Katalysatoren. Wir kennen bereits mehr als 2000 Reaktionen oder Enzyme<sup>[17]</sup>, von denen einige besser als chemische Katalysatoren sind. 2. Die Anzahl von Mikroorganismen in der Natur, die getestet werden können, ist unbeschränkt, und sie sind recht verschieden voneinander. Sie modifizieren eine Vielzahl verschiedenartiger komplizierter organischer Verbindungen oder bauen sie ab; man kann also erwarten, daß zumindest ein Mikroorganismus die gewünschte Reaktion katalysiert. Abbildung 4 zeigt die Vielfalt mikrobiel-

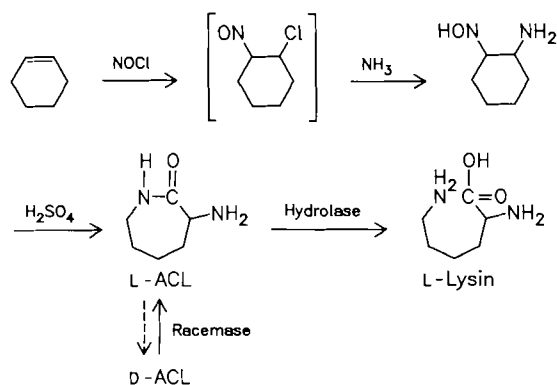


Abb. 3. Chemische und enzymatische Verfahrensschritte bei der Herstellung von L-Lysin durch stereoselektive Hydrolyse von  $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam (ACL) (siehe Text).

ler Reaktionsweisen am Beispiel der Reduktion von Ketopantolacton zu Pantolacton<sup>[61]</sup>.

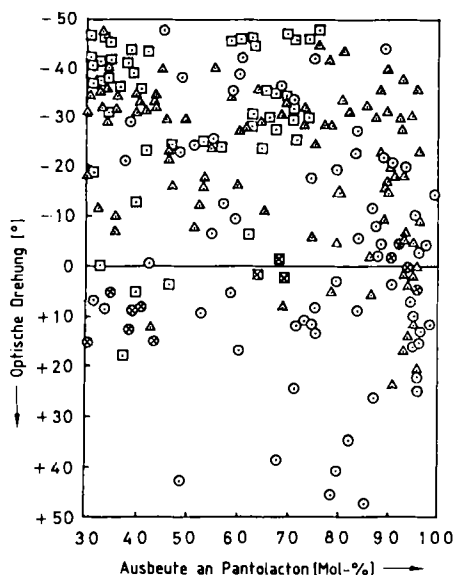
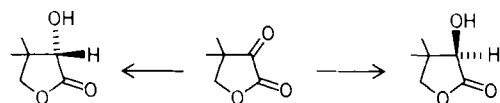


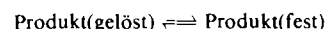
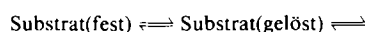
Abb. 4. Reduktion von Ketopantolacton durch verschiedenartige Mikroorganismen zu Pantolacton (Einzelheiten siehe [61]).  $\Delta$ : Hefen,  $\circ$ : Schimmelpilze,  $\square$ : Bakterien,  $\diamond$ : Actinomyceten,  $\boxtimes$ : Basidiomyceten.

Die getesteten Stämme – Bakterien, Actinomyceten, Hefen, Schimmelpilze und Basidiomyceten – haben sehr unterschiedliche Eigenschaften. Gewöhnlich produzieren sie ein Gemisch von D-(–)- und L-(+)-Isomeren; die Enantioselektivität variiert jedoch. Manche produzieren überwiegend das D-(–)-Isomer mit hohen Ausbeuten. Es gibt aber auch einige Stämme, die fast nur das L-(+)-Isomer bilden. Bei diesem Test wurde gefunden, daß *Candida parapsilosis* 100 g L<sup>–1</sup> zugesetztes Ketopantolacton mit fast quantitativer Ausbeute zu D-(–)-Pantolacton umsetzt<sup>[53]</sup> (Einzelheiten siehe Abschnitt 5.5). Ein solcher Test (Screening) kann einer der wichtigsten Schritte für eine erfolgreiche mikrobielle Umsetzung sein<sup>[62]</sup>.

### 4.3. Substrate

Theoretisch kann jedes beliebige Substrat für eine mikrobielle Transformation eingesetzt werden, sofern das Substratmolekül mit dem Enzym in Kontakt tritt. Sogar Gase wie z. B. Methan sind geeignete Substrate, wenn sie in das Reaktionsmedium eingeleitet werden<sup>[40,63]</sup>. Ein Substrat sollte im Medium löslich sein und außerdem die Zellmembran passieren können; das ist bei Anwendung zellfreier Enzyme nicht notwendig. Üblicherweise wird das Substrat dem Reaktionsmedium unverdünnt oder als konzentrierte Lösung zugegeben.

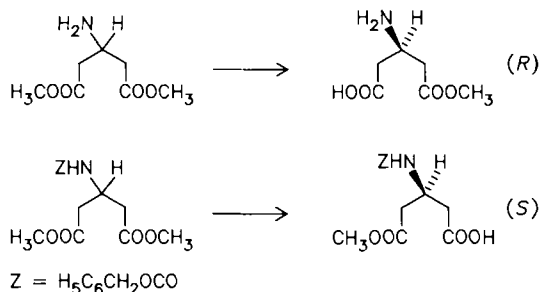
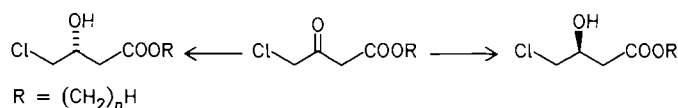
Nur gelöstes Substrat wird umgesetzt. Schlecht lösliche Substrate müssen daher zunächst gelöst werden; nach der Umsetzung können die Produkte aus der Lösung kristallisieren.



Beispielsweise wird pulverisiertes Cortison in Konzentrationen bis zu 500 g L<sup>–1</sup> von *Arthrobacter simplex* fast stöchiometrisch in kristallines Prednisolon umgewandelt<sup>[64]</sup>. Die Substrate können auch in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln gelöst werden. Geeignet sind niedere Alkohole, Aceton, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Ebenso können Detergentien eingesetzt werden, um Substrate zu dispergieren. Vorteilhaft kann auch eine Kombination aus einem wassermischbaren Lösungsmittel und einem Detergens sein. In manchen Fällen läßt sich die Löslichkeit eines Substrats durch chemische Modifizierung erhöhen.

Wenn ein Substrat die Zellmembran nicht passieren kann, muß die Permeabilität der Zellen verbessert werden. Übliche Verfahren sind das Vermahlen mit Glasperlen, Lufttrocknung, Acetontrocknung, Lyophilisieren, Autolyse, Behandlung mit Lysozym oder Detergentien, osmotischer Schock, mehrfaches Einfrieren und Auftauen sowie Ultraschall-Behandlung. Durch Verwendung zellfreier Enzympräparate oder gereinigter Enzyme läßt sich die Permeabilitätsschranke ebenfalls umgehen.

Wenn ein Substrat sich nicht für die gewünschte Umsetzung eignet, sollte man es chemisch modifizieren. Die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym kann verbessert werden, indem man eine Schutzgruppe einführt, abändert oder entfernt, oder indem man eine funktionelle Gruppe umwandelt. Darüber hinaus können diese Modifizierungen das Substrat vor Nebenreaktionen oder vor dem Abbau schützen. Ein Beispiel ist die systematische Suche nach einem geeigneten Chloracetessigsäureester für die enantioselektive Reduktion zu L-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureester – einer vielversprechenden Vorstufe für die chemische Synthese von L-Carnitin – durch Bäckerhefe<sup>[65]</sup>. Bei einem einzigen Enzym, Schweineleber-Esterase, wurde über eine Änderung der Stereoselektivität durch Substratmodifikation berichtet<sup>[45]</sup>.



In solchen Fällen werden die potentiellen Fähigkeiten eines Mikroorganismus oder eines Enzyms durch Screening nach dem besten Substrat gefunden, und nicht durch Screening nach dem besten Mikroorganismus oder Enzym.

#### 4.4. Typische Katalysatoren und Reaktionssysteme

In den meisten Fällen werden die üblichen vegetativen Zellen eingesetzt. Mehrere alternative Systeme sind umfassend im Hinblick auf z. B. erhöhte Ausbeuten, Unterdrückung von Nebenreaktionen, Vereinfachung der Verfahren und ökonomische Verbesserungen untersucht worden. Vor- und Nachteile dieser Systeme sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Biokatalysatoren und Reaktionssysteme für mikrobielle Biotransformationen.

##### Transformationen mit wachsenden Kulturen:

Das Substrat wird dem Wachstumsmedium beim Animpfen oder in einer geeigneten Wachstumsphase zugefügt. Mediumsvorbereitung, Animpfen, Substratzusatz und Inkubation werden nacheinander im gleichen Kolben durchgeführt, bis die Reaktion beendet ist. Wegen ihrer Einfachheit wird diese Methode nicht nur beim Screening, sondern auch für die Großproduktion verwendet. Wenn hohe Zelldichten erforderlich sind, ist die Methode nicht empfehlenswert.

##### Transformationen mit ruhenden Zellen:

Der Mikroorganismus wird unter geeigneten Bedingungen angezogen, und die Zellen werden durch Zentrifugieren oder Filtrieren geerntet. Danach werden sie in einem einfachen Reaktionsmedium resuspendiert (z. B. in einer Pufferlösung oder in Wasser unter Zusatz des Substrates und gegebenenfalls weiterer Stoffe). Die Reaktion wird anschließend unmittelbar oder nach Vorbehandlung der Zellen durchgeführt (z. B. Waschen, Verbesserung der Permeabilität, Trocknen). Wachstum und Umsetzung werden unabhängig voneinander optimiert.

##### Transformationen mit Sporen [66]:

Viele Pilzsporen enthalten ebenso viele wertvolle Enzyme wie vegetative oder ruhende Zellen. Vom Mycel abgetrennte Sporen können in gleicher Weise wie oben beschrieben als Katalysator eingesetzt werden. Gewöhnlich sind Sporen lange Zeit lagerfähig.

##### Transformationen mit immobilisierten Zellen [7, 8, 66–72]:

Immobilisierte Zellen sind Zellen, die an einer Oberfläche fixiert oder daran gebunden sind oder die in einer Gelmatrix eingebettet sind. Alle oben erwähnten Zelltypen können immobilisiert werden. Erfolgreich immobilisierte Zellen bleiben mehrere Monate aktiv und weisen größere Stabilität bei der Handhabung auf als ungeschützte Zellen. Weitere Vorteile sind: 1. die einfache Abtrennung der Zellen aus dem Reaktionsgemisch, 2. die Möglichkeit, Zellen mehrfach zu verwenden, 3. der kontinuierliche Ablauf der Reaktion, 4. die Regenerierung der Zellen durch Eintauchen in ein geeignetes Nährmedium und 5. die einfache Isolierung des Produktes. Es müssen aber auch Nachteile in Betracht gezogen werden: 1. die üblicherweise zu beobachtende Abnahme der katalytischen Aktivität der Zellen während des Immobilisierungsvorganges, 2. die erforderliche spezielle Ausrüstung für den Immobilisierungsschritt. Für den Transformationsschritt braucht man ebenfalls spezielle technische Anlagen, vor allem bei kontinuierlichem Betrieb.

##### Transformationen mit zellfreien Enzymen oder gereinigten Enzymen [73–75]:

Im allgemeinen ist die Verwendung zellfreier Enzyme oder gereinigter Enzyme teuer, weil die Reinigung der Enzyme häufig schwierig und langwierig ist. Daher sind sie für die Großproduktion weniger geeignet. Es gibt allerdings Fälle, in denen sie Vorteile gegenüber Systemen mit Zellen aufweisen: 1. wenn die Permeabilität der Zellwand für das Substrat oder das Produkt gering ist, 2. wenn Probleme durch Nebenreaktionen auftreten, 3. wenn das gewünschte Enzym zu einem annehmbaren Preis verfügbar ist. Bei Verwendung eines extrazellulären Enzyms sind die Zellen selbst überhaupt nicht beteiligt. Zellfreie Enzyme können auch als immobilisierte Katalysatoren eingesetzt werden.

Für mikrobielle Transformationen eignen sich mehrere Typen von Biokatalysatoren. Dazu gehören ganze oder behandelte Zellen, Organellen, zellfreie Multienzym-Systeme und einzelne zellfreie Enzyme.

Mehrschritt-Reaktionen mit verschiedenen Katalysatoren sind ebenfalls möglich. Jede beliebige Kombination von Katalysatoren kann gleichzeitig oder nacheinander eingesetzt werden, wenn mehr als zwei Reaktionen aufeinanderfolgen. Bis jetzt lassen sich allerdings nur Katalysatoren des gleichen Typs mit Erfolg kombinieren. Die kontinuierliche Produktion von L-Alanin aus Ammoniumfu-

marat über L-Asparaginsäure als Zwischenprodukt mit immobilisierten *Escherichia coli*- (Aspartase) und *Pseudomonas-dacunhae*-Zellen (Aspartat- $\beta$ -Decarboxylase)<sup>[76]</sup>, die vollständige Kondensation von racemischem Homocystein und Adenosin mit *Alcaligenes-faecalis*- (S-Adenosylhomocystein-Hydrolase) und *Pseudomonas-putida*-Zellen (Racemase)<sup>[77]</sup>, die Produktion von L-Tryptophan aus DL-Serin und Indol (Tryptophan-Synthase und Aminosäure-Racemase)<sup>[78]</sup>, die vollständige Hydrolyse von racemischem  $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam (siehe Abb. 3)<sup>[56]</sup>, die kontinuierliche Reduktion von Benzoylformiat zu (R)-(-)-Mandelsäure durch zwei Arten zellfreier Enzyme<sup>[75]</sup> und die kontinuierliche oder diskontinuierliche Aminierung von  $\alpha$ -Ketosäuren zu L-Aminosäuren durch zwei Arten zellfreier Enzyme sind erfolgreich durchgeführte Mehrschritt-Reaktionen<sup>[74, 79, 80]</sup>. Die gegenwärtige Technik der DNA-Rekombination ermöglicht die Kombination solcher getrennter Katalysatoren in einem einzigen Mikroorganismus<sup>[81]</sup>.

Die Synthese von Coenzym A aus Pantothersäure, L-Cystein und ATP (oder AMP), die fünf aufeinanderfolgende Schritte umfaßt, wird dagegen kommerziell allein mit *Brevibacterium ammoniagenes* durchgeführt – eine Möglichkeit, die durch ein Screening-Programm gefunden wurde<sup>[82]</sup> (Einzelheiten siehe Abschnitt 5.4.2).

#### 4.5. Nebenreaktionen

Hohe Selektivität ist eine der wichtigsten Eigenschaften von Enzymkatalysatoren. Das bedeutet, daß keine Nebenreaktionen eintreten, sofern ein einziges, gereinigtes Enzym verwendet wird. Gereinigte Enzyme einzusetzen ist allerdings oft schwierig, da sie nur begrenzt verfügbar und instabil sind und auch ökonomische Gründe dagegen sprechen. Daher gehören zu den üblicherweise verwendeten Katalysatoren (also Zellen und zellfreien Enzymen) auch Enzymgemische oder komplexe Enzymsysteme, von denen einige zu Nebenreaktionen führen können. Physikalische oder chemische Behandlung wie Erhitzen, pH-Änderungen und Zusatz von Detergentien, organischen Lösungsmitteln oder spezifischen Inhibitoren eines Katalysators können das unerwünschte Enzym spezifisch inaktivieren. Zum Beispiel läuft die *trans-N*-Arabinosylierung von Adenin mit synthetisch hergestelltem Arabinosyluracil zu Arabinosyladenin (einem antiviralen Wirkstoff) durch *Enterobacter-aerogenes*-Zellen nur oberhalb von 60°C ab. Unterhalb von 50°C findet diese Reaktion nicht statt, weil durch die Adenin-Desaminase Hypoxanthin gebildet wird, bevor die *trans-N*-Arabinosylierung durch zwei Arten von Nucleosid-Phosphorylasen zum Zuge kommt. Glücklicherweise sind diese Phosphorylasen bei 60°C noch aktiv, während die Desaminase bei dieser Temperatur vollständig inaktiviert ist (Abb. 5)<sup>[83]</sup>. Andere Beispiele sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

In manchen Fällen können Nebenreaktionen auch durch Screening nach geeigneten Mikroorganismen und durch strukturelle Modifizierungen des Substrats (siehe Abschnitt 4.4) vermieden werden.

Durch die Verbesserung der selektionierten Mikroorganismen lassen sich solche Probleme ebenfalls erfolgreich bewältigen. Zu den Standardmethoden der Stammverbesserung gehören die Isolierung von Einzelkolonien, eventuell im Anschluß an eine Mutagenese, mit nachfolgendem

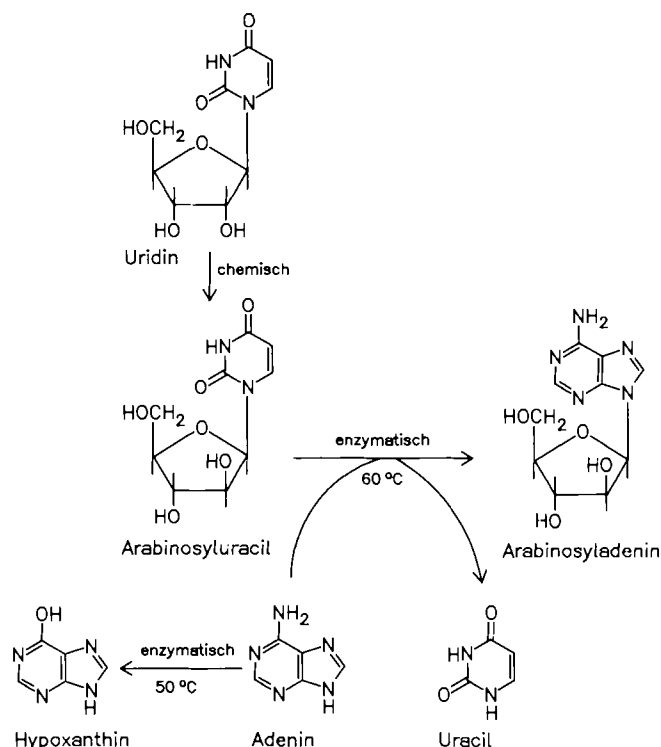


Abb 5. Chemische und enzymatische Verfahrensschritte bei der Synthese von Arabinosyladenin durch *trans-N*-Arabinosylierung mit Pyrophosphorylasen bei 60 °C.

Tabelle 5. Eliminierung von Nebenreaktionen durch physikalische oder chemische Behandlung.

Gewünschte Reaktion	Nebenreaktion	Behandlung	Lit.
Ammoniumfumarat → L-Asparaginsäure ( <i>Escherichia coli</i> -Asparatase)	Fumarsäure → L-Äpfelsäure	Einstündige Inkubation der Kulturbühe bei pH 5 und 45 °C	[76]
Fumarsäure → L-Äpfelsäure ( <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> -Fumarase)	Fumarsäure → Bernsteinsäure	Behandlung der immobilisierten Zellen mit 0,6% Gallenextrakt	[84]
L-Asparaginsäure → L-Alanin ( <i>Pseudomonas dacunhae</i> -Asparat-β-Decarboxylase)	L-Alanin → D-Alanin	Einstündige Inkubation der Kulturbühe bei pH 4,75 und 30 °C	[76]
Cholesterin → 1,4-Ancrosteradien-3,17-dion ( <i>Arthrobacter simplex</i> -Mehrschritt-Umsetzung)	Weiterer Abbau des Ringsystems	Zusatz von α,α'-Bipyridyl (1 mM) zur Kulturbühe während der Umsetzung	[85]
β-Sitosterin → 17-Oxosterone ( <i>Nocardia</i> -sp.-Mehrschritt-Umsetzung)	Weiterer Abbau des Ringsystems	Zusatz von α,α'-Bipyridyl (0,3 mM) zum Reaktionsgemisch	[86]
DL-2-Amino-4,5-dihydrothiazol-4-carboxylat → L-Cystein ( <i>Pseudomonas thiazolinophilum</i> -Mehrschritt-Umsetzung)	Weiterer Abbau von L-Cystein	Zusatz von Hydroxylamin oder Semicarbazid zum Reaktionsgemisch	[87]

Screening nach den besten Isolaten. Derartige herkömmliche genetische Arbeitsweisen sind in den letzten 35 bis 40 Jahren zur Verbesserung wichtiger Stämme entwickelt worden. Heute eröffnet die Technik der DNA-Rekombination

neue Aussichten für die Stammverbesserung (siehe Abschnitt 4.6).

#### 4.6. Anwendung neuer biotechnologischer Methoden

Gegenwärtig wird die Anwendung mehrerer neuer biotechnologischer Methoden bei der mikrobiellen Transformation zügig weiterentwickelt. Eine Methode ist die DNA-Rekombination. Plasmide oder Phagenvektoren können DNA-Abschnitte mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder sogar synthetischen Ursprungs in einen geeigneten Mikroorganismus übertragen. Diese Technik ist sehr nützlich, vor allem zur Konstruktion neuer Mikroorganismen<sup>[81]</sup>, zur Steigerung der Enzymaktivität<sup>[88,89]</sup> und zur Verbesserung von Enzeimeigenschaften wie Stabilität und Substratspezifität. Allerdings muß man berücksichtigen, daß diese Technik weniger geeignet ist, um neue Enzyme (d. h. neue Gene) oder neue Reaktionen zu finden. Zur Zeit bietet die DNA-Rekombinationstechnik nur bei wenigen Mikroorganismen Vorteile, z. B. bei *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae*, deren Genetik und zugehörige Wirt-Vektor-Systeme gut bekannt sind. Für die mikrobielle Transformation wurde diese Technik bisher nur selten genutzt<sup>[81]</sup>; zweifellos wird sie aber einer der wichtigsten Schlüssel für die weitere Entwicklung dieses Gebietes sein.

Seit ihrer Entdeckung hat man Enzyme als Katalysatoren betrachtet, die in organischen Lösungsmitteln inert sind. Das ist grundsätzlich richtig, aber dank neuester Fortschritte stehen Enzyme zur Verfügung, die in wasser-mischbaren organischen Lösungsmitteln als Katalysatoren wirken. So ist z. B. chemisch modifizierte Peroxidase in Benzol und *n*-Hexan aktiv<sup>[90]</sup>. Polyphenol-Oxidase setzt Phenol praktisch quantitativ zu Brenzcatechin um, wenn die Reaktion in Chloroform mit nur 1-2% Wasser durchgeführt wird<sup>[91]</sup>. Derartige Flüssig-Flüssig-Mehrphasen-Systeme mit niedrigem Wassergehalt können auch eingesetzt werden, um das hydrolytische Gleichgewicht in Richtung der Eliminierung von Wasser zu verschieben. Die Synthese von Estern, Amiden und Peptiden mit dieser Methode dürfte große praktische Bedeutung erlangen<sup>[92]</sup>. Auch die Umsetzung lipophiler Verbindungen mit diesem System ist umfassend bearbeitet worden<sup>[93]</sup>.

Mikroorganismen sind zweifellos die überragenden Enzymquellen unter den Lebewesen. Sie passen sich bestens an neue Umgebungen an und wachsen schnell. Diese Eigenschaften sind vor allem für die leichte Handhabung und preisgünstige Kultivierung in großem Maßstab wichtig. Allerdings gibt es auch viele charakteristische Enzyme und Reaktionen in Tieren und Pflanzen. Durch die neuen Zellkulturtechniken ist der Einsatz dieser Organismen vielversprechend geworden<sup>[94,95]</sup>. Darüber hinaus werden Protein Engineering und Zelltechnologie – z. B. die Zellfusion – in naher Zukunft wichtige Methoden für mikrobielle Transformationen werden.

#### 5. Spezielle Anwendungen

Eine große Zahl von biologisch und chemisch wichtigen Verbindungen wird durch mikrobielle Transformationen



hergestellt. In Tabelle 6 sind sie mit den wichtigsten Literaturzitaten zusammengestellt. Hier folgt eine Übersicht über einige Anwendungen.

Tabelle 6. Neuere Fortschritte bei mikrobiellen Transformationen.

<b>Transformationen von Steroiden und Sterolen</b> [28, 96]: Hydroxylierung (Oxygenasen), Dehydrogenierung (Dehydrogenasen), Seitenkettenabbau (Oxygenasen), Hydrolyse (Hydrolasen), Peroxidation, Reduktion (Dehydrogenasen), Isomerisierung (Isomerasen), Konjugation usw.
<b>Transformationen von Terpenoiden</b> [97]
<b>Transformationen von Alkaloiden</b> [98]
<b>Synthese halbsynthetischer Antibiotica</b> [99] (siehe auch Abschnitt 5.3): Synthese halbsynthetischer Penicilline und Cephalosporine (Acylasen) [100, 101], Hydrolyse von Penicillinen zu 6-Aminopenicillansäure (Penicillin-Acylase) [102], Modifizierung von Carbapenem-Seitenketten (Acylasen) [103]
<b>Synthese organischer Säuren</b> (siehe auch Abschnitt 5.5): Hydratisierung von Fumarsäure (Fumarase) [104], $\alpha,\omega$ -Oxidation von Alkenen (Oxygenase) [105], asymmetrische Hydrolyse von Epoxybernsteinsäure (Hydrolase) [106], stereoselektive Oxidation von Isobuttersäure (Dehydrogenase) [107], stereoselektive Reduktion von Ketopantolacton (Reduktase) [53, 108], stereoselektive Reduktion von 3-Chloracetessigsäureester (Reduktase) [65], Ammoniakabspaltung aus L-Histidin (L-Histidin-Ammoniak-Lyase) [109]
<b>Transformationen von Zuckern</b> [110]: Isomerisierung von Glucose (Glucose-Isomerase), Hydrolyse von Stärke (Amylasen), Hydrolyse von Cellulose (Cellulase), Hydrolyse von Saccharose (Invertase)
<b>Synthese von Peptiden und Proteinen</b> [29, 111, 112] (siehe auch Abschnitt 5.2 und Tabelle 8): Synthese von Plastin (Proteasen) [113], Teilsynthese von Human-Insulin (Proteasen) [30, 31, 114], Synthese von Aspartam (Protease) [115]
<b>Synthese von Aminosäuren</b> [23, 116–118]: siehe Abschnitt 5.1 und Tabelle 7
<b>Synthese von Nucleinsäure-Derivaten</b> [24, 119] (siehe auch Abschnitt 5.4 und Tabelle 9): <i>trans</i> -N-Ribosylierung und <i>trans</i> -N-Arabinosylierung (Phosphorylase) [83], Phosphorylierung von Nucleosiden (Phosphotransferasen) [120], Pyrophosphorylierung von Nucleotiden (Pyrophosphorylase) [121], Synthese von Zuckernucleotiden (Pyrophosphorylasen) [122], Nucleosylierung von L-Methionin (S-Homocystein (S-Adenosylhomocystein-Hydrolase) [77], Synthese von Coenzymen [119]
<b>Synthese von Aminen:</b> Decarboxylierung von Aminosäuren (Aminosäure-Decarboxylasen)
<b>Synthese von Grundchemikalien</b> (siehe auch Abschnitt 5.6): Synthese von Alkenoxiden (Oxygenasen) [40], Synthese von Ketonen (Dehydrogenasen, die sekundäre Alkohole umsetzen) [42], Synthese von Aldehyden (Alkohol-Oxidasen) [41], Synthese von Pyrogallol (Decarboxylase) [43], Synthese von Amidinen (Nitril-Hydratase) [39]

## 5.1. Optisch aktive Aminosäuren

Zur Präparation von enantiomeren reinen Aminosäuren können zahlreiche Enzymreaktionen eingesetzt werden (Tabelle 7). Sie lassen sich in vier Gruppen einteilen: 1. enantioselective Hydrolyse synthetisch hergestellter racemischer Vorstufen (z. B. DL-Aminosäureester, N-Acyl-DL-aminosäuren, 5-substituierte DL-Hydantoine), 2. stereospezifische Kondensation achiraler Verbindungen (z. B. Addition von Ammoniak an Fumarsäure, Umkehrung der  $\alpha,\beta$ -Eliminierung), 3. Modifizierung chiraler Vorstufen (z. B.  $\beta$ -Austausch) und 4. reduktive Aminierung oder Transaminierung von  $\alpha$ -Ketosäuren.

### 5.1.1. Verwendung hydrolytischer Enzyme

Den üblichen enzymatischen Racemattrennungen liegt eine stereospezifische Hydrolyse von racemischen Aminosäure-Derivaten zu einem Enantiomer der Aminosäure zugrunde, gefolgt von einer Racemisierung des verbleiben-

den Isomers. Sehr häufig wird Aminoacylase für diesen Zweck verwendet<sup>[139]</sup>. Auch Esterase, Amidase und Nitrilase können eingesetzt werden. Mehrere andere hydrolytische Enzyme mit engerer Substratspezifität werden zur Herstellung von L-Lysin (L- $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam-Hydrolase, siehe Abb. 3)<sup>[56]</sup>, L-Cystein (1,2-Amino-4,5-dihydrothiazol-4-carboxylat-Hydrolase)<sup>[87]</sup>, L-Tryptophan und L-Phenylalanin (Hydantoinase)<sup>[130, 138]</sup> sowie von D-p-Hydroxyphenylglycin (Dihydropyrimidinase/Hydantoinase, siehe Abb. 6)<sup>[53, 57, 58]</sup> eingesetzt. Anders als bei der Acylase-Methode ist die asymmetrische Hydrolyse in diesen Fällen von einer Racemisierung durch eine spezifische Racemase oder unter Basenkatalyse begleitet.

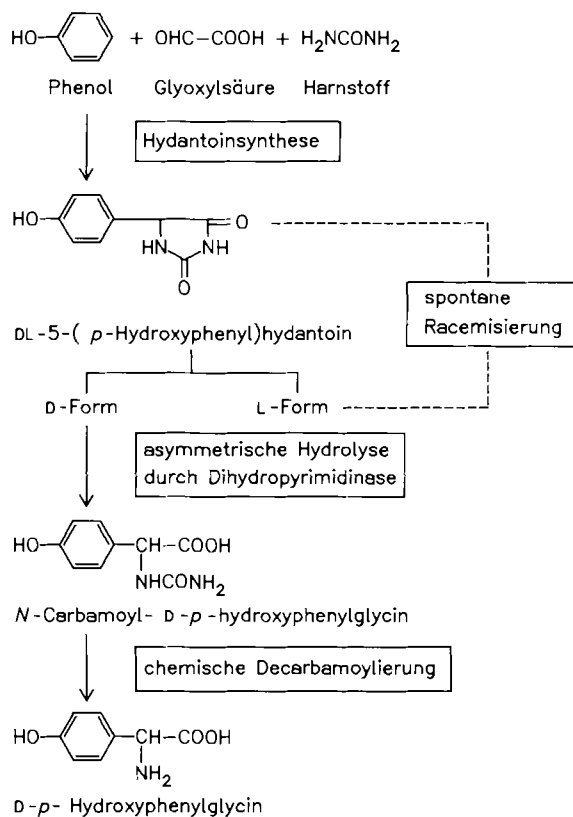


Abb. 6. Chemische und enzymatische Verfahrensschritte bei der Herstellung von D-p-Hydroxyphenylglycin durch stereoselektive Hydrolyse von DL-5-(p-Hydroxyphenyl)hydantoin.

D-p-Hydroxyphenylglycin<sup>[57, 58]</sup> und seine Derivate sind wichtige Vorstufen für die Seitenketten von halbsynthetischen Penicillinen und Cephalosporinen. Wir stellten fest, daß diese Aminosäuren gut mit bakterieller Dihydropyrimidinase aus den entsprechenden 5-substituierten Hydantoinen hergestellt werden können. Dieses Enzym kommt mit hoher Aktivität in vielen Bakterien vor, besonders in *Aerobacter*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Streptomyces*<sup>[140]</sup>. Aus Zellen von *Pseudomonas putida* ist das bakterielle Enzym in kristalliner Form isoliert worden. Das Enzym zeigt die höchste Aktivität und Affinität gegenüber Dihydrouracil, greift aber auch eine Fülle von aliphatisch und aromatisch 5-monosubstituierten D-Hydantoinen an und setzt sie zu den entsprechenden D-Formen der N-Carbamoyl- $\alpha$ -aminosäuren um<sup>[141]</sup>. Daher eignet sich das Enzym als Katalysator für die Herstellung

Tabelle 7. Produktion von Aminosäuren durch mikrobielle Transformationen [a].

Aminosäure	Reaktion	Mikroorganismus und Enzym	Lit.
L-Aminosäuren	$N\text{-Acyl-L-Aminosäure} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Aminosäure} + \text{Essigsäure}$	Aminoacylase	[123]
S-Adenosylhomocystein (AdoHcy)	$\text{L-Hcy} + \text{Adenosin} \rightarrow \text{AdoHcy} + \text{H}_2\text{O}$	<i>Alcaligenes faecalis</i> (S-Adenosylhomocystein-Hydrolase)	[77]
L-Alanin	$\text{L-Asp} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Ala} + \text{CO}_2$	<i>Pseudomonas dacunhae</i> (Asp- $\beta$ -Decarboxylase)	[76]
L-Asparaginsäure	$\text{Fumarsäure} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Asp}$ $\text{Maleinsäure} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Asp}$	<i>Escherichia coli</i> (Aspartase) <i>A. faecalis</i> (Maleat-Isomerase und Aspartase)	[60, 76] [124]
L-Citrullin (L-Cit)	$\text{L-Arg} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Cit} + \text{NH}_3$	<i>P. putida</i> (Arg-Desiminase)	[125]
L-Cystein	$\text{DL-ATC} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Cys} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$  $3\text{-Chlor-L-Ala} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{L-Cys} + \text{HCl}$	<i>P. thiazolinophilum</i> (ATC-Racemase, ATC-Hydrolase und S-Carbamoyl-L-cystein-Hydrolase)  <i>Enterobacter cloacae</i> (Cys-Desulhydrase) oder <i>Bacillus sphaericus</i> (Cys-Synthase)	[87]  [52, 55]
L-Cystathionin	$\text{L-Cys} + O\text{-Succinyl-L-homoserin} \rightarrow \text{L-Cystathionin} + \text{Bernsteinsäure}$	Cystathionin- $\gamma$ -Lyase oder Cystathionin- $\gamma$ -Synthase	[127, 128]
L-Dopa	$\text{Brenzcatechin} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Dopa} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Brenzcatechin} + \text{DL-Serin} \rightarrow \text{L-Dopa} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{L-Tyr} + \text{O}_2 \rightarrow \text{L-Dopa} + \text{H}_2\text{O}$	<i>Erwinia herbicola</i> ( $\beta$ -Tyrosinase)  <i>Aspergillus oryzae</i> (Tyr-Hydroxylase)	[51, 52]  [128]
L-Glutaminsäure	$\text{DL-5-Carboxymethylhydantoin} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Glu} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	<i>B. brevis</i> (Hydantoinase und N-Carbamoyl-L-Glu-Hydrolase)	[129]
5-Hydroxy-L-tryptophan	$5\text{-Hydroxyindol} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 \rightarrow 5\text{-Hydroxy-L-tryptophan}$	<i>Proteus rettgeri</i> (Tryptophanase)	[52]
L-Lysin	$\text{DL-ACL} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Lys}$	<i>Achromobacter obae</i> und <i>Cryptococcus laurentii</i> (ACL-Racemase und -Hydrolase)	[56]
L-Phenylalanin	$\text{DL-5-Benzylhydantoin} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Phe} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$  $\text{trans-Zimtsäure} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Phe}$  $\text{Acetamidozimtsäure} + \text{Aminosäure (als Amin-Donor)} \rightarrow \text{L-Phe} + \text{Ketosäure}$ $\text{Phenylpyruvat} + \text{L-Asp} \rightarrow \text{L-Phe} + \text{Oxalessigsäure}$ $\text{Phenylpyruvat} + \text{NH}_3 + \text{NADH} \rightarrow \text{L-Phe} + \text{NAD}$	<i>Flavobacterium aminogenes</i> (Hydantoinase und N-Carbamoyl-L-Phe-Hydrolase)  <i>Rhodotorula glutinis</i> (Phe-Ammoniak-Lyase) <i>A. faecalis</i> (Acylyase und Transaminase) <i>E. coli</i> (Phe-Transaminase) Phe-Dehydrogenase	[130]  [131] [132] [133]
S- oder Se-substituiertes L-Homocystein	$\text{L-Met} + \text{RSH (oder RSeH)} \rightarrow \text{S- (oder Se-)substituiertes L-Hcy} + \text{MeSH}$	Met- $\gamma$ -Lyase	[79, 80] [134]
L-Serin	$\text{Gly} + \text{HCHO} \rightarrow \text{L-Ser}$  $\text{DL-OOC} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Ser} + \text{CO}_2$	<i>Pseudomonas 3ab, Sarcina albida, Hyphomicrobium methylovorum</i> , u. a. (Ser-Hydroxymethyl-Transferase)  <i>P. testosteroni</i> und <i>B. subtilis</i> (L-OOC-Hydrolase und OOC-Racemase)	[135]  [136]
L-Tryptophan	$\text{Indol} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Trp} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Indol} + \text{L-Ser} \rightarrow \text{L-Trp}$ $\text{DL-IMH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-Trp} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	<i>Proteus rettgeri</i> (Tryptophanase) <i>E. coli</i> (Trp-Synthase) <i>F. aminogenes</i> (Hydantoinase, N-Carbamoyl-L-Trp-Hydrolase)	[52] [78, 137] [138]
L-Tyrosin	$\text{Phenol} + \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{L-Tyr} + \text{H}_2\text{O}$	<i>Erwinia herbicola</i> ( $\beta$ -Tyrosinase)	[51, 52]
D-Aminosäuren	$\text{DL-S-substituiertes Hydantoin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-Carbamoyl-D-Aminosäure}$	<i>P. putida</i> (Dihydropyrimidinase)	[57, 58]
D-Cystein	$3\text{-Chlor-D-Ala} + \text{NaHS} \rightarrow \text{D-Cys} + \text{NaCl}$	<i>P. putida</i> (3-Chlor-D-Ala-Dehydrochlorinase)	[55]
D-p-Hydroxyphenylglycin	$\text{DL-5-(p-Hydroxyphenyl)hydantoin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-Carbamoyl-D-p-Hydroxyphenylglycin} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	<i>P. putida</i> (Dihydropyrimidinase)	[57, 58]
D-Phenylglycin	$\text{DL-5-Phenylhydantoin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-Carbamoyl-D-phenylglycin}$	<i>P. putida</i> (Dihydropyrimidinase)	[57, 58]
D-Valin	$\text{DL-5-Isopropylhydantoin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-Carbamoyl-D-Val} + \text{NH}_3 + \text{CO}_2$	<i>P. putida</i> (Dihydropyrimidinase)	[57, 58]

[a] Abkürzungen: ATC: 2-Amino-4,5-dihydrothiazol-4-carbonsäure; Dopa: 3,4-Dihydroxyphenylalanin; ACL:  $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -caprolactam; OOC: 2-Oxooxazolidin-4-carbonsäure; IMH: 5-Indolylmethylhydantoin.

von D-Aminosäuren. Das Syntheseverfahren umfaßt zwei chemische und einen enzymatischen Schritt<sup>[142]</sup>. Die als Substrat benötigten Hydantoine werden allgemein nach der Methode von Bucherer und Steiner aus Aldehyden synthetisiert<sup>[59]</sup>. Anschließend werden die D-Hydantoine enzymatisch zu N-Carbamoyl-D-aminosäuren hydrolysiert. In der Praxis können Bakterienzellen mit hoher Enzymaktivität unmittelbar als Katalysatoren eingesetzt werden. Diese

Zellen werden hergestellt, indem der ausgewählte Stamm in einem Medium unter Zusatz von Hydantoin oder Uracil als Induktor kultiviert wird. Unter den Bedingungen für die Enzymreaktion (bei pH 8–10) werden die L-Isomere des verbleibenden Hydantoins rasch und spontan durch Basenkatalyse racemisiert. Daher können die racemischen Hydantoine in diesem Schritt quantitativ zu N-Carbamoyl-D-aminosäuren umgesetzt werden. Die Carbamoylabspal-

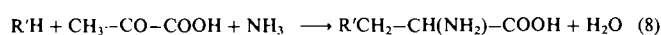
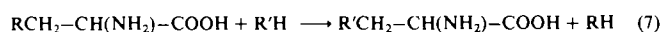
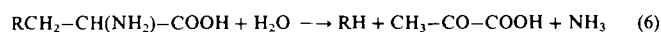
tung zu den D-Aminosäuren gelingt durch Behandlung mit äquimolaren Mengen Nitrit unter sauren Bedingungen<sup>[143]</sup>. Die Konfiguration bleibt bei diesem Schritt vollständig erhalten; die Ausbeute ist fast quantitativ. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist ein neues kommerzielles Verfahren zur Herstellung von D-*p*-Hydroxyphenylglycin entwickelt worden. Die Verwendung des teuren *p*-Hydroxybenzaldehyds für die Herstellung des Substrates DL-5-(*p*-Hydroxyphenyl)hydantoin wurde durch eine neue, effiziente chemische Methode umgangen, bei der Phenol mit Glyoxylsäure und Harnstoff in saurer Lösung aminoalkyliert wird<sup>[144]</sup>. Abbildung 6 zeigt den Gesamtablauf der Herstellung von D-*p*-Hydroxyphenylglycin. Mit diesem Verfahren läßt sich die Aminosäure vielleicht am ökonomischsten in großem Maßstab produzieren. Auf ähnliche Weise werden D-Phenylglycin und D-Valin kommerziell hergestellt; sie sind wichtige Zwischenprodukte bei der Gewinnung halbsynthetischer Penicilline bzw. Pestizide.

Die Carbamoylabsplattung kann auch enzymatisch durchgeführt werden<sup>[145]</sup>. So wurde z.B. berichtet, daß *Pseudomonas* sp. eine Decarbamoylase zusammen mit Hydantoinase produziert. Damit sind zwei sequentielle enzymkatalysierte Reaktionen möglich: die stereospezifische Hydrolyse von DL-5-(*p*-Hydroxyphenyl)hydantoin und die anschließende Hydrolyse des D-Carbamoyl-Derivats zu D-*p*-Hydroxyphenylglycin<sup>[146]</sup>. Für eine praktische Anwendung ist es allerdings noch notwendig, die Aktivität des zweiten Enzyms zu erhöhen. Kürzlich ist eine solche Decarbamoylase im Detail charakterisiert worden<sup>[147]</sup>.

### 5.1.2. Verwendung von Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen

Die meisten Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyme sind am Aminosäurestoffwechsel beteiligt. Diese Enzyme katalysieren sehr unterschiedliche Reaktionen, darunter Transaminierung, Racemisierung, Eliminierung, Austausch, Decarboxylierung und Aldol-Kondensationen sowie Retrokondensationen. Deswegen werden die Enzyme gelegentlich zur Produktion von Aminosäuren genutzt. Aspartat-β-Decarboxylase<sup>[76]</sup>, β-Tyrosinase<sup>[51,52]</sup> und Phenylalanin-Transaminase<sup>[133]</sup> werden zur kommerziellen Herstellung von L-Alanin, L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin eingesetzt.

**Aromatische Aminosäuren und schwefelhaltige Aminosäuren**<sup>[51,52,55]</sup>: β-Tyrosinase (EC 4.1.99.2) und Tryptophanase (EC 4.1.99.1) sind Enzyme, die den Abbau von L-Tyrosin zu Phenol, Pyruvat und Ammoniak bzw. den Abbau von L-Tryptophan zu Indol, Pyruvat und Ammoniak katalysieren. Die Eigenschaften der kristallinen Enzyme aus *Citrobacter intermedius* bzw. *Proteus rettgeri* sind recht eingehend beschrieben worden<sup>[51,52,148]</sup>. Sie katalysieren viele Reaktionen, z.B. die α,β-Eliminierung [Gl. (6)], den β-Austausch [Gl. (7)] und die Rückreaktion der α,β-Eliminierung [Gl. (8)].



Für β-Tyrosinase gilt R=Hydroxyphenyl, OH, SH, Cl; R'=Hydroxyphenyl; für Tryptophanase gilt R=Indolyl, OH, Cl; R'=Indolyl.

Substrate der β-Tyrosinase für die α,β-Eliminierung [Gl. (6)] und den β-Austausch [Gl. (7)] sind L-Tyrosin, L-Serin, S-Methyl-L-cystein und 3-Chlor-L-alanin. Beim β-Austausch ist Phenol das zweite Substrat für die L-Tyrosin-Synthese. Wenn statt Phenol entweder Brenzcatechin, Resorcin, Pyrogallol oder Hydroxyhydrochinon als zweites Substrat eingesetzt wird, kann L-Dopa, 2-Hydroxy-L-tyrosin, 2,3-Dihydroxy-L-tyrosin bzw. 2,5-Dihydroxy-L-tyrosin synthetisiert werden. L-Tyrosin wird auch nach Gleichung (8) aus Phenol, Pyruvat und Ammoniak gebildet. Brenzcatechin, Resorcin und mehrere *o*- und *m*-halogenierte Phenole sowie alkylierte Phenole sind für diese Rückreaktion ebenso gute Substrate wie Phenol<sup>[51,52,149]</sup>. Diese Tyrosin-Derivate kristallisieren unter den Reaktionsbedingungen leicht aus; dadurch verläuft die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz. Der Mechanismus der Tyrosinase-katalysierten Reaktionen läßt sich auf der Grundlage des allgemeinen Mechanismus für Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Reaktionen verstehen, wie er aus Abbildung 7 hervorgeht. Für alle drei Reaktionen ist der Enzym-α-Aminoacrylat-Komplex (in Abb. 7 als EA bezeichnet) die Schlüsselsubstanz<sup>[51]</sup>.

Wie bei den Reaktionen mit β-Tyrosinase können L-Tryptophan und einige seiner Derivate, z.B. 5-Hydroxy-, 5-Amino- und 5-Methyl-L-tryptophan, gut mit Tryptophanase als Katalysator synthetisiert werden<sup>[150]</sup>.

Ausgehend von den Ergebnissen mit den kristallinen Enzymen sind einfache und leistungsfähige enzymatische Verfahren zur Herstellung dieser aromatischen L-Aminosäuren entwickelt worden. In diesen Verfahren werden Bakterienzellen mit hoher Enzymaktivität unmittelbar als Katalysatoren eingesetzt. L-Tyrosin, L-Dopa, L-Tryptophan und 5-Hydroxy-L-tryptophan können mit hervorragender Ausbeute synthetisiert werden<sup>[51,52,151]</sup>.

Cystein-Desulphydrase (EC 4.1.1.1), *O*-Acetylserin-Sulphydrolase (EC 4.2.99.8) und 3-Chlor-D-alanin-Dehydrochlorinase (EC 4.5.1.2) katalysieren ähnliche Reaktionen. Diese Enzyme sind für die Herstellung von L- und D-Cystein und ihren Derivaten von Bedeutung<sup>[52,55,152]</sup>. Darüber hinaus wurde die Anwendung von γ-Austausch-Reaktionen für die Synthese von L-Cystathionin<sup>[126,127]</sup> und S- oder Se-substituierten L-Homocysteinen vorgeschlagen, die von Cystathionin-γ-Lyase (EC 4.4.1.1) und Cystathionin-γ-Synthase (EC 4.2.99.9) bzw. von Methionin-γ-Lyase (EC 4.4.1.11) katalysiert werden<sup>[134]</sup>.

**L-Phenylalanin** ist ein wichtiger Baustein des künstlichen Süßstoffs Aspartam. Zu dieser Aminosäure führen viele Synthesewege (siehe Tabelle 7). Ein kürzlich entwickeltes Verfahren zur Großproduktion schließt die alkalische Hydrolyse von Benzylidenhydantoin zu Phenylbrenztraubensäure ein, das seinerseits enzymatisch aminiert wird (Abb. 8). Die enzymatische Umsetzung von Phenylbrenztraubensäure wird mit L-Asparaginsäure als Amin-Donor und L-Phenylalanin-Transaminase als Katalysator durchgeführt<sup>[133,153]</sup>. Werden *Escherichia coli*-Zellen als Katalysator eingesetzt, die an Polyazetidin immobilisiert wurden, können 30 g L<sup>-1</sup> Phenylalanin bei einer Ausbeute von 90 Mol-% produziert werden. Die Aktivität der immobilisierten Zellen läßt nur sehr langsam nach; die Halbwertszeit

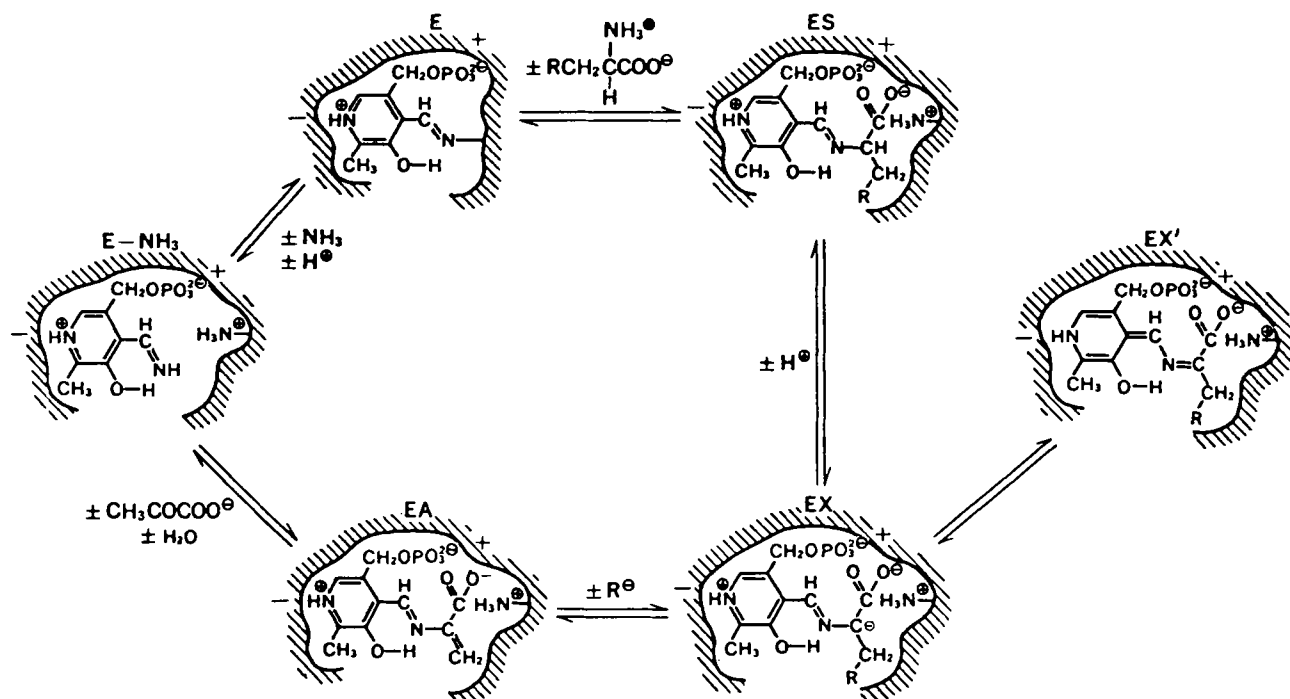


Abb. 7. Mechanismus  $\beta$ -Tyrosinase-katalysierter Reaktionen. E: Enzym; S: Substrat; ES, EX, EX': Enzym-Substrat-Komplexe; EA: Enzym- $\alpha$ -Aminoacrylat-Komplex; E-NH<sub>3</sub>: Enzym-Ammoniak-Komplex.

wurde auf mehr als acht Monate geschätzt. Obwohl die Gleichgewichtskonstante für diese Reaktion etwa 1 beträgt, läßt sich die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz weitertreiben, indem das Produkt Oxalessigsäure durch rasche Decarboxylierung zu Brenztraubensäure entfernt wird.

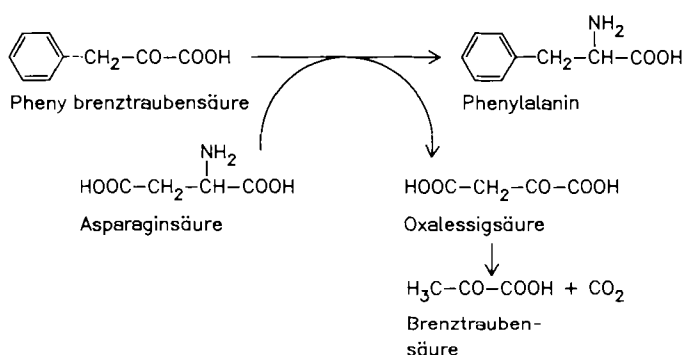


Abb. 8. Chemische und enzymatische Verfahrensschritte bei der Herstellung von L-Phenylalanin durch enzymatische Transaminierung.

### 5.1.3. Verwendung von Aminosäure-Dehydrogenase

Ein kürzlich entwickelter Syntheseweg für L-Aminosäuren mit hoher optischer Reinheit verläuft über die reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Ketosäuren mit Aminosäure-Dehydrogenasen. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, benötigen NAD(P)H als Cofaktor. Um den äquimolaren Verbrauch des teuren Cofaktors zu verhindern, wurde seine kontinuierliche Regenerierung vorgeschlagen. Das erfolgreichste Beispiel ist die kontinuierliche Produktion von L-Leucin mit Leucin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.9), die zusammen mit Formiat-Dehydrogenase und polymergebundene

nem NAD in einem Membranreaktor eingeschlossen ist<sup>[74]</sup>.

L-Alanin-Dehydrogenase (EC 1.4.1.1) und Phenylalanin-Dehydrogenase haben sich als brauchbar für die Produktion von L-Alanin<sup>[74]</sup> bzw. L-Phenylalanin<sup>[79,80]</sup> erwiesen. Reaktionen dieses Typs sind allgemein für die Aminosäure-Produktion anwendbar, wenn geeignete Dehydrogenasen und  $\alpha$ -Ketosäuren verfügbar sind.

### 5.2. Peptide

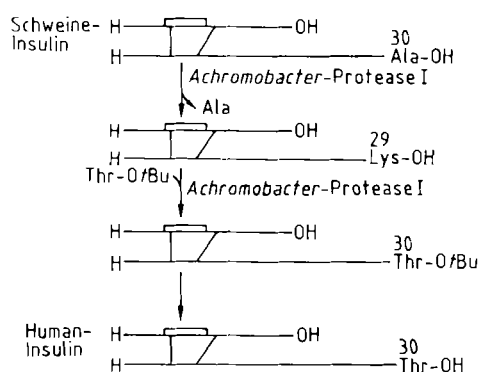
In bahnbrechenden Arbeiten der siebziger Jahre wurde die große praktische Bedeutung proteolytischer Enzyme für Peptidumwandlungen erkannt, z.B. für die Modifizierung des Trypsin-Inhibitors aus Sojabohnen<sup>[154,155]</sup>, die Steigerung des Nährwertes von Proteinen<sup>[113]</sup> und die Synthese einiger biologisch aktiver kleiner Peptide<sup>[156]</sup>. Die erfolgreiche Teilsynthese von Insulin<sup>[30-32,114]</sup> verdeutlichte darüber hinaus den Wert proteolytischer Enzyme als leistungsfähige Katalysatoren. Seitdem sind viele biologisch aktive kleine Peptide, darunter Hormone und Neuropeptide, mit proteolytischen Enzymen hergestellt worden (Tabelle 8). Die Anwendung proteolytischer Enzyme ist in letzter Zeit auf die Herstellung oder Modifizierung hochmolekularer Peptide (z.B. Enzyme, Antikörper, Proteinhormone) ausgedehnt worden.

Weitere wichtige Enzyme für die Peptidherstellung sind die Nucleosidtriphosphat-abhängigen Synthetasen. Synthesen von Gramicidin S<sup>[166]</sup>, Glutathion und verwandten Peptiden<sup>[167]</sup> sowie Kyotorphin<sup>[164]</sup> sind ebenfalls beschrieben worden.

**Human-Insulin:** Schweine-Insulin und Human-Insulin unterscheiden sich nur in der C-terminalen Aminosäure der B-Kette. Wie Abbildung 9 zeigt, katalysiert eine Serin-

Tabelle 8. Enzymatische Transformationen biologisch wichtiger Peptide.

Peptid	Enzyme	Lit.
Aspartam	Thermolysin	[115]
(Val <sup>5</sup> )-Angiotensin II (1-8)	Papain	[155]
mit P-Substanz verwandte Peptide (1-6)-NH <sub>2</sub>	Pepsin	[156]
Enkephalin	Papain und Chymotrypsin oder Carboxypeptidase Y	[157] [158]
Cuerulein	Chymotrypsin, Papain, Subti- lisin, Metalloprotease und Asp-Protease	[159]
mit Eledoisin verwandte Peptide (1-6)-NH <sub>2</sub>	Pepsin	[156]
Lachs-Calcitonin I (1-32)	Trypsin	[160]
Human-Insulin	<i>Achromobacter</i> -Protease I oder Trypsin	[31] [30]
Dynorphin (1-8)	Chymotrypsin, Papain und Trypsin	[161]
(Lys <sup>63</sup> )- und (Trp <sup>63</sup> )-Sojabohnen- Trypsin-Inhibitor	Chymotrypsin und Carboxy- peptidase A	[162]
(Arg <sup>15</sup> )- und (Trp <sup>17</sup> )-Ringer-Trypsin- Kallikrein-Inhibitor	Trypsin und Carboxypepti- dase A bzw. Chymotrypsin und Carb- oxypeptidase A	[163]
Kyotorphin	Leucyl-tRNA-Synthetase oder Chymotrypsin	[164] [165]
Gramicidin S	Gramicidin-S-Synthetase	[166]
Glutathion	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase	[167]
$\gamma$ -Glutamylpeptide	$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase oder $\gamma$ -Glutamylcystein-Syn- thetase	[167, 168] [167, 169]
Rinderpankreas- Ribonuclease A	Subtilisin	[170]
(Gly <sup>48</sup> )- <i>Staphylococcus</i> - Nuclease (6-149)	Trypsin	[171]
Plastein	mehrere Proteasen	[113]

Abb. 9. Enzymatische Transformation von Schweine-Insulin zu Human-Insulin mit *Achromobacter*-Protease I.

Protease, *Achromobacter*-Protease I, die selektive Hydrolyse des C-terminalen Alaninrestes der B-Kette von Schweine-Insulin und anschließend die Kondensation des Des(AlaB30)-Insulins mit einem Threoninester-Derivat. Das Enzym spaltet spezifisch am Carboxylende von Lysin-Resten. Obwohl das Verfahren Reaktionen bei pH 8.3 (Hydrolyse) und pH 6.5 (Kondensation) mit zwischenzeitlicher Isolierung und Lyophilisierung von Des(AlaB30)-Insulin

umfaßt, sind Gesamtausbeuten von 52% für Schweine-Insulin und 58% für Rinder-Insulin erreicht worden<sup>[31]</sup>. Nicht umgesetztes Des(AlaB30)-Insulin kann wiederverwendet werden. Zur Zeit wird Human-Insulin kommerziell durch derartige enzymatische Transformationen aus Schweine-Insulin sowie durch direkte Fermentation mit einer gentechnologisch gewonnenen *Escherichia-coli*-Mutante hergestellt.

### 5.3. Antibiotica

Sehr viele Antibiotica wurden unter Verwendung von Mikroorganismen oder Enzymen modifiziert. Viele dieser Modifizierungen beruhen auf einfachen und chemisch definierten Reaktionen (z. B. Hydrolyse, Acylierung und Desacylierung, Nucleotidylierung, Phosphorylierung, Glycosylierung, Methylierung und Desmethylierung, Aminierung und Desaminierung, Oxidation und Reduktion, Isomerisierung, Hydratisierung, Halogenierung). Einige dieser Reaktionen haben beträchtliche Bedeutung für die Herstellung neuer halbsynthetischer Antibiotica.

Die  $\beta$ -Lactam-Antibiotica wurden eingehend untersucht. Für die Praxis besonders wichtig sind die Desacylierung von Penicillinen und die Acylierung von 6-Aminopenicillansäure (6-APA), 7-Aminocephalosporinsäure und 7-Amino-3-desacetoxycephalosporinsäure. Im allgemeinen katalysiert ein einziges Enzym, Penicillin-Acylase (EC 3.5.1.11), die Acylierung und die Desacylierung von Penicillin, wobei die Lage des Gleichgewichtes vom pH-Wert abhängt. Daher kann das Enzym sowohl zur Herstellung von 6-APA als auch von halbsynthetischen Penicillinen eingesetzt werden. Die industriellen Verfahren für die Herstellung von 6-APA aus Penicillin G werden entweder mit immobilisierter Penicillin-Acylase<sup>[172, 173]</sup> oder mit immobilisierten *Escherichia-coli*-Zellen durchgeführt, die dieses Enzym enthalten<sup>[102]</sup>. 6-APA wiederum dient als Substrat zur Herstellung neuartiger halbsynthetischer Penicilline mit verbesserten therapeutischen Eigenschaften. Üblich für diesen Zweck ist eine chemische Acylierung; es sind aber auch gute enzymatische Reaktionen für die Herstellung von Ampicillin und Amoxicillin aus 6-APA und D-Phenylglycin-methylester bzw. D-p-Hydroxyphenylglycin-ethylester<sup>[173]</sup> bekannt.

Bei einem leistungsfähigen enzymatischen Zwei-Stufen-Verfahren wird Benzylpenicillin durch *Kluyvera citrophila* bei pH 7.5 zu 6-APA desacyliert; 6-APA läßt sich anschließend durch *Pseudomonas melagogenum* mit DL-Phenylglycin-methylester bei pH 5.5 zu Ampicillin acylieren<sup>[174]</sup>. Die *Pseudomonas*-Acylase greift hierbei das Benzylpenicillin nicht an.

### 5.4. Coenzyme

Einige Coenzyme werden in industriellem Maßstab hergestellt und als Pharmazeutika eingesetzt. Für ihre Herstellung sind viele Methoden einschließlich mikrobieller Transformation, Fermentation und chemischer Synthese bekannt. Über ihre Bedeutung als Pharmazeutika hinaus haben Coenzyme als Cofaktoren bei vielen Enzymreaktionen Bedeutung, die bei mikrobiellen Transformationen eine Rolle spielen. Um den stöchiometrischen Verbrauch

der teuren Coenzyme zu umgehen, sind mehrere Verfahren zu ihrer Generierung oder Regenerierung entwickelt worden, vor allem für ATP und NAD(P)H.

#### 5.4.1. Regenerierungssysteme für Coenzyme und ihre Anwendung

**ATP:** Da ATP nicht nur als Energiequelle, sondern bei mehreren Enzymreaktionen auch als Substrat dient, müssen sowohl seine Regenerierung (Recycling) als auch seine Generierung (Herstellung) berücksichtigt werden. Allgemein anwendbare Methoden zur Generierung oder Regenerierung von ATP sind im folgenden zusammengestellt.

1. Glycolyse mit Hefe: Zugewaschtes Adenosin (oder AMP) wird von gemahlenen oder getrockneten Bäckerhefe- oder Bierhefe-Zellen rasch zu ADP und ATP phosphoryliert, wenn sie mit hohen Konzentrationen von Glucose und anorganischem Phosphat inkubiert werden<sup>[175]</sup>. Unter geeigneten Bedingungen konnten mit Bierhefe 190  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  ATP bei einer Ausbeute von 63 Mol-% produziert werden<sup>[176]</sup>. Für den gleichen Zweck werden auch andere Hefen und Bakterien eingesetzt. Insbesondere führen *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen, in denen Hexokinase oder Glucokinase durch gentechnologische Methoden angereichert sind, zu einem fast stöchiometrischen Umsatz von Adenosin (130 mM) zu ATP<sup>[177]</sup>. Man geht davon aus, daß ATP – wie in Abbildung 10a gezeigt – durch Substratket-

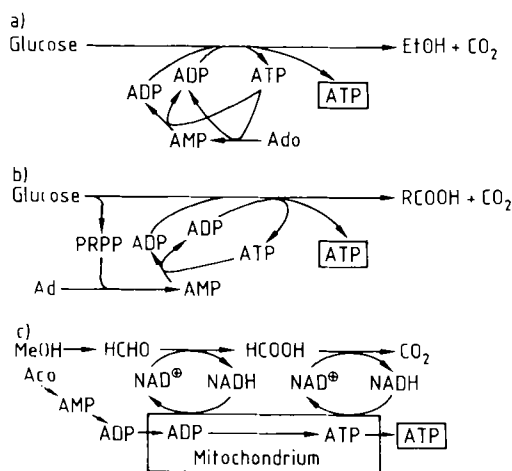


Abb. 10. Schematische Übersicht über die Reaktionssysteme zur ATP-Herstellung durch a) Hefefermentation, b) Verknüpfung von Adenin mit Ribosephosphat und c) oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien. Ad: Adenin; Ado: Adenosin; PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat.

ten-Phosphorylierung von AMP oder Adenosin über ADP unter Ausnutzung der Energie aus der Glycolyse gebildet wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die leicht verfügbare Bäckerhefe als Katalysator eingesetzt werden kann.

2. Bakterielle Verknüpfung von Ribosephosphat mit Adenin: Aufgrund des Befundes, daß mehrere coryneforme Bakterien zugesetzte Basen in befriedigenden Ausbeuten mit Ribosephosphat verknüpfen<sup>[178]</sup>, wurde eine für die Praxis geeignete Produktionsmethode für ATP entwickelt. Einer drei Tage alten Kultur von *Brevibacterium ammoniagenes* wurde Adenin ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) zugesetzt, das

während weiterer 24stündiger Inkubation zu ATP ( $1.57 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ADP ( $1.59 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und AMP ( $2.16 \text{ mg mL}^{-1}$ ) umgesetzt wurde<sup>[179]</sup>. Gewaschene Zellen des gleichen Stammes produzieren ebenfalls über  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  ATP bei einer Ausbeute von 83 Mol-%<sup>[180]</sup>. Da Adenin eines der billigsten Substrate ist, wird dieses System häufig zur Herstellung wichtiger Verbindungen angewendet. Als Schlüsselreaktionen dieses Systems werden die Bildung von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) aus Glucose, die anschließende Kondensation mit Adenin zu AMP und die Phosphorylierung von AMP zu ATP durch Adenylat-Kinase angenommen (Abb. 10b).

3. Oxidative Phosphorylierung: Die Zellen der methylo-trophen Hefe *Kloeckera* sp. katalysieren nach Vorbehandlung mit dem lytischen Enzym Zymolase oder nach Zusatz von Sorbit zum Reaktionsgemisch die Phosphorylierung von Adenosin in Gegenwart von Methanol als Energiequelle<sup>[181]</sup>. Die vorgeschlagene Reaktionsfolge umfaßt die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien und die damit gekoppelte Oxidation von Methanol zu  $\text{CO}_2$  sowie die Phosphorylierung von Adenosin durch Adenosin-Kinase und von AMP durch Adenylat-Kinase (Abb. 10c)<sup>[181]</sup>. Dieses System ist für viele Transformationsreaktionen interessant, weil die Energie des billigen Rohstoffs Methanol genutzt werden kann.

4. Photophosphorylierung: Chromatophore aus photosynthetischen Bakterien, die unter Belichtung kultiviert wurden, konnten ADP zu ATP phosphorylieren<sup>[182]</sup>. Über eine ATP-Generierung mit isolierten Thylakoiden<sup>[183]</sup> oder Chloroplasten<sup>[184]</sup> wurde ebenfalls berichtet. Zur Zeit sind diese Systeme allerdings nur von akademischem Interesse.

5. Verwendung zellfreier Enzyme: Phosphotransferasen (Kinasen) sind Enzyme, die die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf ihr Substrat katalysieren, wobei ATP zu ADP umgesetzt wird. Einige dieser Enzyme katalysieren auch die Rückreaktion und lassen sich zur Regenerierung von ATP nutzen. Solche Enzyme sind Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40), Carbamoyl-Kinase (EC 2.7.2.2), Creatin-Kinase (EC 2.7.3.2), Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) und Aspartat-Kinase (EC 2.7.2.4). Die drei erstgenannten Enzyme, insbesondere aber Acetat-Kinase (EC 2.7.2.1) werden häufig für diesen Zweck eingesetzt<sup>[185]</sup>. Erfordert die in Frage kommende Transformation ein zellfreies Enzym, so ist eine Kopplung dieser Enzymsysteme sehr zu empfehlen.

Anwendungen der oben beschriebenen Systeme sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Vor- und Nachteile der Methoden 1, 2 und 5 wurden von Langer et al.<sup>[206]</sup> diskutiert.

**NADH und NADPH:** Die lebende Zelle mit ihrem komplexen und sorgfältig regulierten Stoffwechsel enthält mehrere Regenerierungssysteme für NAD(P)H. Beispielsweise finden bei der Oxidation von Glucose über Glucose-6-phosphat zwei wichtige Reaktionen statt, bei denen NADPH freigesetzt wird: die Oxidation von Glucose-6-phosphat durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die anschließende Oxidation von 6-Phosphogluconat durch 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Mit diesem System kann endogenes NADPH oder eine katalytische Menge zugesetztes NADPH wirkungsvoll regeneriert werden, indem man einfach Zellen eines Mikroorganismus und Glucose in einem geeigneten Reaktionsansatz ver-

Tabelle 9. Anwendung ATP-regenerierender Systeme bei Synthesen biotechnologisch wichtiger Verbindungen.

Produkt	ATP-regenerierendes System	Mikroorganismus oder Enzym	Lit.
Nucleosid-5'-triphosphate	Glycolyse [a]	Bäckerhefe u. a.	[186]
GTP	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b]	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	[179]
5'-Guanylsäure	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b]	<i>B. ammoniagenes</i>	[187]
ppGpp [c] und pppGpp [d]	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b]	<i>B. ammoniagenes</i>	[188]
AppppA [e]	Zellfreie Enzyme	Acetat-Kinase, Adenylat-Kinase und Leucyl-tRNA-Synthetase	[189]
Nucleosiddiphosphat-Zucker	Glycolyse [a]	Bäckerhefe u. a.	[122, 186]
CDP-Cholin	Glycolyse [a]	Bierhefe u. a.	[190]
NAD	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b] Zellfreie Enzyme	<i>B. ammoniagenes</i> Acetat-Kinase, Adenylat-Kinase und NAD-Pyrophosphorylase	[191] [192]
NADP	Glycolyse [a] Zellfreie Enzyme	Bäckerhefe und <i>B. ammoniagenes</i> Acetat-Kinase, Adenylat-Kinase, NAD-Pyrophosphorylase und NAD-Kinase	[193] [192]
FAD	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b] Glycolyse [a]	<i>B. ammoniagenes</i> oder <i>Sarcina lutea</i> Bäckerhefe und <i>Arthrobacter globiformis</i>	[194] [195]
Coenzym A	Verknüpfung mit Ribosephosphat [b] Glycolyse [a]	<i>B. ammoniagenes</i> oder <i>S. lutea</i> Bäckerhefe und <i>B. ammoniagenes</i>	[196] [197]
S-Adenosylmethionin	Glycolyse [a] Zellfreie Enzyme	<i>Saccharomyces sake</i> Pyruvat-Kinase, Adenylat-Kinase, anorg. Pyrophosphatase und Methionin-Adenosyl-Transferase	[198] [199]
Glutamin	Glycolyse [a]	Bäckerhefe und Glutamin-Synthetase	[200]
Theanin ( <i>N</i> <sup>5</sup> -Ethylglutamin)	Glycolyse [a]	Bäckerhefe und Glutamin-Synthetase	[201]
Glutathion	Glycolyse [a] Glycolyse [a]	Bäckerhefe Bäckerhefe, $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase	[202] [167]
	Zellfreie Enzyme	Acetat-Kinase und <i>Escherichia coli</i>	[203]
Gramicidin S	Zellfreie Enzyme	Acetat-Kinase und Gramicidin-S-Synthetase	[166]
Glucose-6-phosphat	Zellfreie Enzyme	Acetat-Kinase und Hexokinase	[204]
Galactose-1-phosphat	Glycolyse [a]	Bäckerhefe und Galactokinase	[205]

[a] Zum allgemeinen Reaktionsablauf siehe Abb. 10a. [b] Dieses Verfahren schließt die direkte Verknüpfung von Basen mit Ribosephosphat oder ihre Modifizierung ein. Zum allgemeinen Reaktionsablauf siehe Abb. 10b. [c] Guanosin-3',5'-bis(diphosphat). [d] Guanosin-3'-diphosphat-5'-triphosphat. [e] Diadenosintetraphosphat.

mischt. Die Reduktion von Carbonylverbindungen durch Hefen, die gelegentlich in der präparativen Chemie durchgeführt wird<sup>[15, 61, 65]</sup>, basiert in erster Linie auf diesem System. In gleicher Weise werden die Reaktionen, die die Oxidation von Methanol zu CO<sub>2</sub> durch methylo trope Mikroorganismen bewirken, als leistungsfähige Systeme zur NADH-Regenerierung angesehen (siehe Abb. 10c).

Werden zellfreie Enzyme eingesetzt, die reduzierte Nicotinamid-Cofaktoren erfordern, wird zusätzlich ein Regenerierungssystem benötigt. Allgemein anwendbare Systeme haben Whitesides und Wong<sup>[14]</sup> beschrieben. Am häufigsten eingesetzt werden die Systeme Formiat/Formiat-Dehydrogenase<sup>[74]</sup>, Glucose/Glucose-Dehydrogenase und Glucose-6-phosphat/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, da die Substrate (Wasserstoff-Donoren) und die jeweiligen Enzyme leicht verfügbar sind. Vor allem das Formiat/Formiat-Dehydrogenase-System bietet Vorteile, denn Formiat geht in CO<sub>2</sub> über, das keine Probleme bei der Aufarbeitung der Produkte verursacht. Die Anwendbarkeit dieses Systems ist von Kula und Wandrey et al.<sup>[74, 79]</sup> umfassend untersucht worden.

#### 5.4.2. Coenzym-Produktion

In diesem Beitrag werden nur drei Coenzyme beschrieben, für die wir Produktionsverfahren entwickelt haben (andere Coenzyme siehe <sup>[119]</sup>).

**Coenzym A<sup>[207]</sup>:** Die Biosynthese von Coenzym A (CoA) aus Pantothersäure, L-Cystein und ATP umfaßt fünf sequentielle Enzymreaktionen (Abb. 11)<sup>[208]</sup>. In *Brevibacteri-*

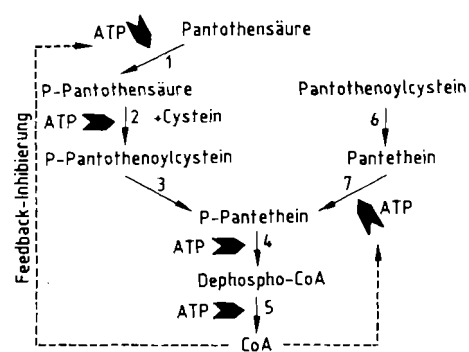


Abb. 11. Der Biosyntheseweg von Coenzym A (siehe Text).

*um-ammoniagenes*-Zellen fanden wir alle fünf für die Synthese von CoA erforderlichen Enzyme (Abb. 11, Weg 1-2-3-4-5 oder Weg 7-4-5), und zwar alle mit hohen Aktivitäten<sup>[82, 196, 209]</sup>. Werden Zellen dieses Stammes als Katalysator eingesetzt, kann CoA (2–5 g L<sup>-1</sup>) effizient aus den oben genannten drei Substraten synthetisiert werden<sup>[82, 196, 207, 210]</sup>. Die Biosynthese von CoA aus den drei Substraten oder aus Pantethein und ATP wird in diesem Stamm hauptsächlich durch eine Feedback-Inhibierung

der Pantothenat-Kinase (EC 2.7.1.33) durch das Endprodukt CoA reguliert; dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Pantothenat oder Pantethein. Beim Versuch, die CoA-Ausbeute in diesem System zu erhöhen, traten Probleme auf, weil Überproduktion von CoA die CoA-Synthese hemmt. Um die Feedback-Inhibierung zu umgehen, wurde die enzymatische Phosphorylierung von Pantothenat durch eine chemische Phosphorylierung ersetzt. Unter geeigneten Bedingungen wurden in 50 mL Reaktionsansatz 1.65 g CoA aus P-Pantothenat, L-Cystein und ATP synthetisiert (64 Mol-% Ausbeute, bezogen auf ATP)<sup>[211]</sup>. In gleicher Weise wurde CoA (115 g L<sup>-1</sup>) aus P-Pantethein und ATP synthetisiert (quantitative Ausbeute)<sup>[211]</sup>.

Einen anderen Weg zur Verbesserung der CoA-Ausbeute bietet die Verwendung von Mutanten, denen die Repression durch Feedback-Inhibierung fehlt, oder von Mutanten mit erhöhter Pantothenat-Kinase-Aktivität. Ein mutierter Stamm von *B. ammoniagenes* mit einer Resistenz gegen Oxypantethein (einem Sauerstoff-Analogen von Pantethein) hat eine dreifach höhere Pantothenat-Kinase-Aktivität als der Elternstamm. Mit dem in Abbildung 10b gezeigten ATP-generierenden System bildet dieser Stamm 9.3 g L<sup>-1</sup> CoA aus Pantothenat (3.6 g L<sup>-1</sup>), L-Cystein (1.8 g L<sup>-1</sup>) und AMP (6 g L<sup>-1</sup>) oder 11.5 g L<sup>-1</sup> CoA aus Pantethein (5 g L<sup>-1</sup>) und AMP (6 g L<sup>-1</sup>) (70–100 Mol-% Ausbeute, bezogen auf AMP)<sup>[212]</sup>. Diese Werte sind etwa dreimal höher als beim Elternstamm.

Reaktionsbedingungen für die gezielte Synthese von P-Pantothenat, P-Pantethein oder 3'-Dephospho-CoA wurden ebenfalls ermittelt<sup>[207, 213]</sup>.

*S*-Adenosylmethionin (*AdoMet*) und *S*-Adenosylhomocystein (*AdoHcy*)<sup>[77, 214]</sup> sowie verwandte Nucleoside haben in letzter Zeit großes Interesse als Schlüsselregulatoren für viele biologische Transmethylierungen gefunden (Abb. 12). Obwohl sich für diese Nucleoside auf pharmazeutischem

und chemotherapeutischem Gebiet bedeutende Möglichkeiten abzeichnen<sup>[215]</sup>, ist vor unseren Arbeiten kein Verfahren für die Produktion dieser Nucleoside in die Praxis eingeführt worden.

Wir haben eine Fülle von Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, *AdoMet* aus L-Methionin zu produzieren. Wir fanden, daß eine Gruppe von Sake-Hefen (Stämme von *Saccharomyces sake*) zugesetztes Methionin spezifisch in *AdoMet* umwandelt<sup>[198]</sup>, das sich akkumuliert. *S. sake* Kyokai Nr. 6 wurde als aussichtsreichster Produzent selektioniert. Er setzt etwa 25% des zugesetzten Methionins (10 g L<sup>-1</sup>) zu *AdoMet* um, wenn er mit Saccharose und Harnstoff als überwiegender C- bzw. N-Quelle kultiviert wird. Unter geeigneten Bedingungen werden 11 g L<sup>-1</sup> *AdoMet* in Zellvakuolen angereichert. Das entspricht mehr als 25% der gesamten Zelltrockenmasse. Somit hebt sich *S. sake* vorteilhaft von der handelsüblichen *AdoMet*-reichen Hefe ab, die nur etwa 20 mg g<sup>-1</sup> Festschubstanz enthält. Als hauptsächliche Ursache dieser ungewöhnlichen *AdoMet*-Produktion wird die ausgesprochen hohe Aktivität der Methionin-Adenosyl-Transferase (EC 2.5.1.6) in dieser Hefe vermutet.

*AdoHcy* ist das Produkt biologischer Transmethylierungen, die *AdoMet* als Methyl-Donor nutzen. Vor unseren Untersuchungen vermutete man lange Zeit, daß zwei charakteristische Reaktionen, die Spaltung von *AdoHcy* an der Glycosylbindung in Adenin und *S*-Ribosylhomocystein und die anschließende Hydrolyse des *S*-Ribosylhomocysteins zu L-Homocystein und Ribose, die einzigen Reaktionen beim Stoffwechsel von *AdoHcy* in prokaryontischen Zellen seien, während *AdoHcy* in eukaryontischen Zellen durch die *AdoHcy*-Hydrolase unmittelbar zu L-Homocystein und Adenosin hydrolysiert wird (siehe Abb. 12 und <sup>[215]</sup>). Unsere Screening-Untersuchungen nach geeigneten Enzymen für die *AdoHcy*-Synthese ergaben, daß viele prokaryontische Zellen beträchtliche Anteile an *AdoHcy*-

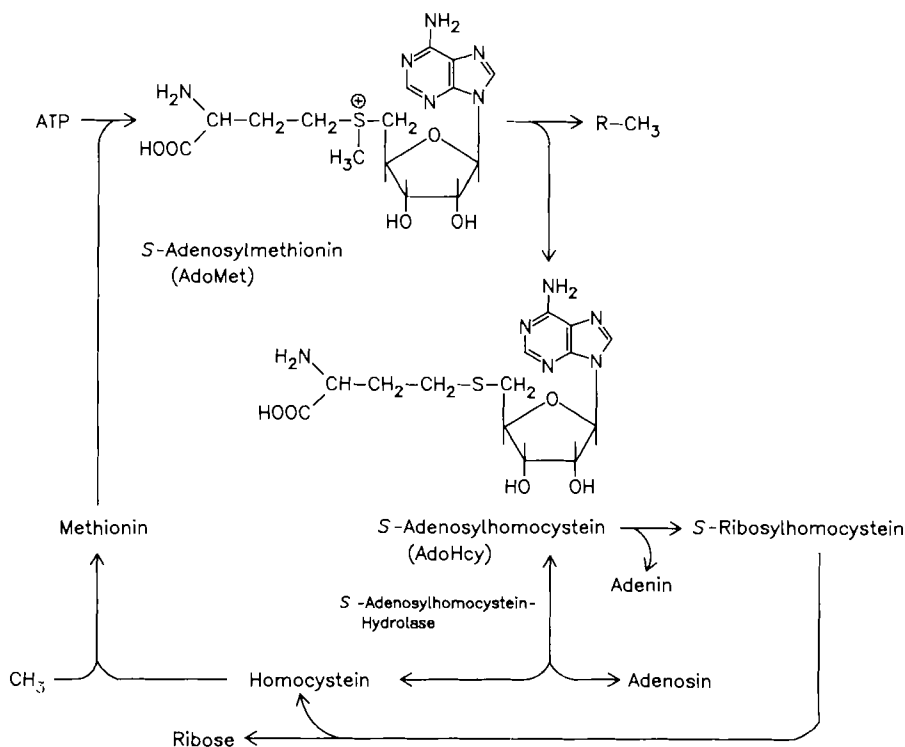


Abb. 12. Der Cyclus des „aktiven Methyls“ (*S*-Adenosylmethionins).



Hydrolase enthalten<sup>[216]</sup>. Prokaryonten-AdoHcy kann leicht aus *Alcaligenes-faecalis*-Zellen gereinigt und kristallisiert werden. In diesem Stamm besteht das extrahierbare Protein der Zellen zu etwa 2.5% aus dem Enzym<sup>[216]</sup>. Dieser Wert ist etwa 100mal höher als bei eukaryontischen Zellen.

Bei der in-vitro-Hydrolyse von AdoHcy durch AdoHcy-Hydrolase liegt das Gleichgewicht weit auf der Seite von AdoHcy; deshalb wird das Enzym als nützlicher Katalysator für die Synthese von AdoHcy aus L-Homocystein und Adenosin angesehen. Diese Synthese gelingt durch Inkubation von Adenosin und L-Homocystein mit *A. faecalis*-Zellen (Ausbeute 70–80 g L<sup>-1</sup>)<sup>[217]</sup>. Ein Problem bei der Synthese nach dieser Methode war es, daß das D-Isomer von Homocystein vom Enzym nicht erkannt wird. Um das zu umgehen, wurde nach Stämmen gesucht, die AdoHcy aus D-Homocystein synthetisieren können. Ein solcher Stamm ist *Pseudomonas putida*. Die Hydrolase aus *P. putida* setzt zwar – wie das Enzym aus *A. faecalis* – ausschließlich L-Homocystein um, doch bildet das Bakterium zusätzlich eine Racemase, die die gegenseitige Umwandlung von D- und L-Homocystein katalysiert. In einer Mischung von Adenosin und DL-Homocystein mit *A. faecalis* (36 g L<sup>-1</sup>) und *P. putida*-Zellen (4 g L<sup>-1</sup>) in Kaliumphosphat-Puffer wurden mehr als 70 g L<sup>-1</sup> AdoHcy mit praktisch quantitativer Ausbeute erhalten<sup>[218]</sup>.

In gleicher Weise kann eine Anzahl anderer neuartiger S-Nucleosidylhomocysteine wirkungsvoll aus den entsprechenden Adenosin-Analoga synthetisiert werden, z. B. Formycin A, Neburalin und Adenosin-N<sup>1</sup>-Oxid<sup>[219]</sup>. Diese Verbindungen könnten pharmazeutische und chemotherapeutische Bedeutung haben<sup>[215]</sup>.

## 5.5. Organische Säuren und Lactone

Optisch aktive  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hydroxycarbonsäuren und ihre Derivate sind wichtige chirale Bausteine. Es gibt mehrere Wege zu ihrer Synthese, besonders mit organisch-präparativen Methoden. In neuerer Zeit sind durch Screening-Untersuchungen mehrere geeignete Mikroorganismen gefunden worden (siehe unten). Andere mikrobielle Transformationen von praktischer Bedeutung, die zu organischen Säuren führen, sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

**D-(–)- $\beta$ -Hydroxyisobuttersäure:** Optisch aktive  $\beta$ -Hydroxyisobuttersäure wird als vielseitiger chiraler Baustein eingesetzt. Das L-(+)-Enantiomer ist für die Synthese von  $\alpha$ -Tocopherol<sup>[148]</sup>, Muscon<sup>[49]</sup>, Lasalocid A<sup>[220]</sup>, Calcimycin<sup>[221]</sup> und anderer Verbindungen verwendet worden, während das D-(–)-Enantiomer zur Synthese von Captopril dient, einem Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms<sup>[222]</sup>. Für die optisch aktive  $\beta$ -Hydroxyisobuttersäure wurden mehrere Synthesewege beschrieben:  $\beta$ -Hydroxylierung von Isobuttersäure<sup>[107, 222]</sup>, Hydratisierung von Methacrylsäure<sup>[107]</sup>, enantioselektive Oxidation von prochiralem 2-Methyl-1,3-propandiol<sup>[223]</sup>, stereoselektive Reduktion von Ethyl- $\alpha$ -formylpropionat<sup>[224]</sup>. Die  $\beta$ -Hydroxylierung von Isobuttersäure durch *Pseudomonas putida* und die meisten anderen Mikroorganismen ergibt das L-(+)-Enantiomer<sup>[107, 222]</sup>. Nur wenige Mikroorganismen, darunter *Candida rugosa*, produzieren spezifisch das D-(–)-Enantiomer<sup>[107]</sup>. Es gibt eine *C. rugosa*-Mutante, der die  $\beta$ -Hydro-

xyisobutyrate-Dehydrogenase fehlt und die daher die weitere Oxidation der gebildeten  $\beta$ -Hydroxyisobuttersäure zu Isobutyraldehyd nicht katalysieren kann. Der Stamm produziert 36.6 g L<sup>-1</sup> D-(–)- $\beta$ -Hydroxyisobuttersäure in nahezu quantitativer Ausbeute<sup>[225]</sup>. Diese Reaktion wird zur kommerziellen Produktion von Captopril eingesetzt (Abb. 13)<sup>[222]</sup>.

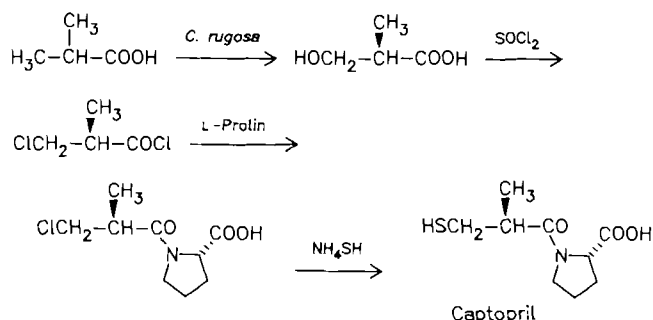


Abb. 13. Synthese von Captopril durch enzymatische Oxidation von Isobuttersäure.

**D-(–)-Pantolacton,** das  $\gamma$ -Lacton der D-(–)-Pantoinsäure, ist ein wichtiges chirales Edukt für die Synthese eines Vitamins, der D-(+)-Pantothenensäure. Die herkömmliche Synthese erfordert die langwierige chemische Trennung des racemischen Pantolactons. Wir haben vor kurzem zwei vorteilhafte mikrobielle Verfahren beschrieben, die dieses Problem umgehen. *Rhodococcus erythropolis* wandelt von racemischem Pantolacton nur das L-(+)-Enantiomer in das D-(–)-Enantiomer um, ohne das vorhandene D-(–)-Enantiomer zu verändern. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen erhält man mit gewaschenen Zellen als Katalysator 18.2 g L<sup>-1</sup> D-(–)-Pantolacton mit einer Enantiomerenreinheit von 94.4% (90.5 Mol-% chemische Ausbeute)<sup>[226]</sup>. Diese ungewöhnliche Umsetzung verläuft über die in Abbildung 14 gezeigte Reaktionskette: 1. enzymatische Oxidation von L-(+)-Pantolacton zu Ketopantolacton, 2. rasche und spontane Hydrolyse zu Ketopantoinsäure, 3. enzymatische Reduktion zu D-(–)-Pantoinsäure. Das Verfahren ist einfach und erfordert keine Racemisierung, wie sie bei der herkömmlichen chemischen Synthese notwendig ist.

Einen anderen Zugang bietet die enantioselektive Reduktion von Ketopantolacton zu D-(–)-Pantolacton.

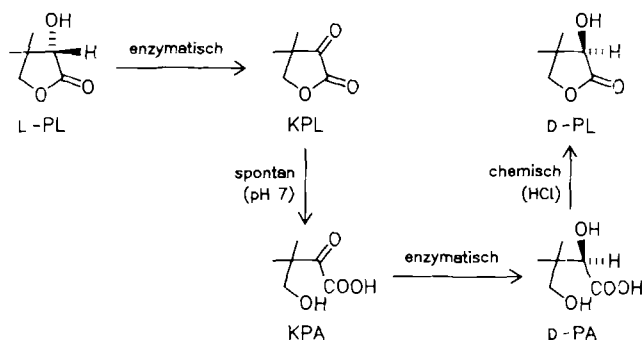


Abb. 14. Reaktionssystem für die stereoselektive Oxidation und Reduktion bei der Umsetzung von L-(+)-Pantolacton zum D-(–)-Enantiomer mit *Rhodococcus-erythropolis*-Zellen. D-PL: D-(–)-Pantolacton; L-PL: L-(+)-Pantolacton; D-PA: D-(–)-Pantoinsäure; KPL: Ketopantolacton; KPA: Ketopantoinsäure.

ton<sup>[53, 61, 108, 227]</sup>. Werden *Candida-parapsilosis*- oder *Rhodotorula-minuta*-Zellen mit Ketopantolacton und Glucose inkubiert, so produzieren sie etwa 100 g L<sup>-1</sup> bzw. 50 g L<sup>-1</sup> D-(-)-Pantolacton mit hervorragender chemischer (95–100%) und optischer (90–95% *e.e.*) Ausbeute<sup>[53, 108, 227]</sup>. Bei dieser Reaktion wird die asymmetrische Reduktion durch eine kürzlich entdeckte Carbonyl-Reduktase katalysiert, die spezifisch für konjugierte Polyketone ist und NADPH als Cofaktor erfordert<sup>[53]</sup>. Als Energiequelle für die Regenerierung von NADPH wird Glucose vermutet.

## 5.6. Grundchemikalien

Wie bereits in Abschnitt 3 beschrieben, gewinnen mikrobielle Transformationen für die industrielle Herstellung von Grundchemikalien unter mehreren Gesichtspunkten rasch an praktischer Bedeutung. Die Produktion von Acrylamid durch die bakterielle Nitril-Hydratase, das erste erfolgreiche Beispiel, sei hier etwas eingehender beschrieben. Ebenfalls diskutiert werden andere mögliche Transformationen von Nitrilen.

Acrylamid wird für viele Zwecke verwendet, z.B. als Flockungsmittel und als Bestandteil synthetischer Fasern. Das herkömmliche Syntheseverfahren verläuft über die Hydratisierung des Nitrils mit Schwefelsäure oder mit Kupfersalzen oder Palladium-Komplexen als Katalysatoren. Ausgehend von den Ergebnissen unserer umfangreichen Arbeiten über den mikrobiellen Abbau von Nitrilen haben wir ein neues Verfahren entwickelt, bei dem Nitril-Hydratase, ein mikrobielles Enzym, als Katalysator für die Hydratisierung des Nitrils eingesetzt wird<sup>[228]</sup>.

Aus Zellen eines Acetonitril-abbauenden *Arthrobacter* sp. wurde ein neuartiges Enzym hoch gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich um eine aliphatische Nitril-Hydratase, die Acetonitril zu Acetamid hydratisiert<sup>[229]</sup> [siehe Gl. (9)]. Das Enzym ist anders als Nitrilase (EC 3.5.5.1), die die Bildung von Säuren durch hydrolytische Eliminierung des Stickstoffs unter Bildung von Ammoniumsalzen katalysiert [Gl. (10)].



Abbildung 15 zeigt einen Vorschlag für den Reaktionsmechanismus von Nitrilase und Nitril-Hydratase. Ein nucleophiler Angriff am Nitril-Kohlenstoff durch eine reaktive Thiolgruppe des betreffenden Enzyms führt zur Bildung eines enzymgebundenen Imins, das anschließend zu einem Zwischenprodukt mit tetraedrischem Kohlenstoff hydratisiert wird (Abb. 15a). Dieser Prozeß ist für beide Enzyme gleich. In Gegenwart von Nitrilase wird das Zwischenprodukt in Ammoniak und einen Acyl-Enzym-Komplex zerlegt, der anschließend zu einer Carbonsäure hydrolysiert (Abb. 15b). Im Fall der Nitril-Hydratase fungiert das Enzym selbst als Abgangsgruppe; daher entsteht ein Amid (Abb. 15c). Die Hydratase katalysiert die Hydratisierung unterschiedlicher aliphatischer Nitrile, darunter Acrylonitril und Methacrylonitril. Werden allerdings die *Arthrobacter*-sp.-Zellen direkt als Katalysator für die Amidproduktion verwendet, so reagieren die Nitrile fast vollständig zu den Säuren. Ursache ist die gleichzeitige Induktion einer Amidase (EC 3.5.1.4), die in den Zellen mit

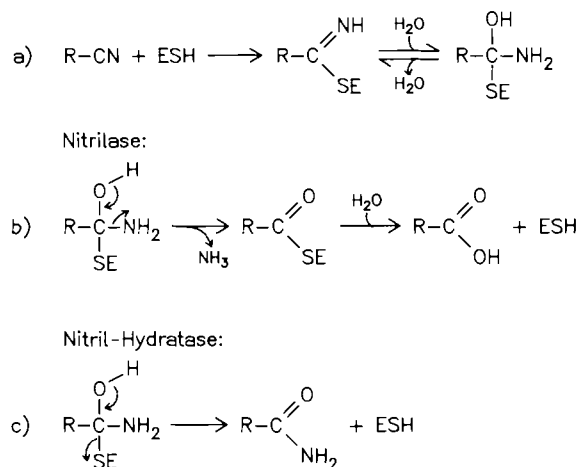


Abb. 15. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für Nitrilase und Nitril-Hydratase. ESH: Enzym mit Thiolgruppe (siehe Text).

hoher Aktivität auftritt<sup>[39]</sup>. Aus diesem Grund wurde ein Screening nach Mikroorganismen mit hoher Nitril-Hydratase- und niedriger Amidase-Aktivität durchgeführt; dabei dienten mehrere Nitrile als Wachstumssubstrate. Bei der Kultivierung mit Isobutyronitril als überwiegende Stickstoffquelle wurde *Pseudomonas chlororaphis* B23 als ein solcher Stamm erkannt. Obwohl in diesem Bakterium die Bildung einer Amidase induziert werden kann, die zusammen mit der Hydratase während des Wachstums eine gewisse Aktivität gegenüber Isobutyronitril zeigt, ist diese Amidase glücklicherweise gegenüber Acrylamid fast völlig inaktiv<sup>[39]</sup>. Man kann daher vermuten, daß eine stöchiometrische Umsetzung von Acrylonitril zu Acrylamid möglich sein sollte, selbst wenn das Hydratase-Präparat mit Amidase verunreinigt ist.

In der Praxis wird die Reaktion durchgeführt, indem Acrylonitril bei niedrigen Temperaturen (üblicherweise 5 bis 10°C) mit den *Pseudomonas*-Zellen inkubiert wird. Da Acrylonitril die Thiolgruppen von Proteinen spezifisch modifiziert, könnte es das aktive Zentrum der Nitril-Hydratase bei höheren Temperaturen maskieren. Unter geeigneten Bedingungen können mehr als 400 g L<sup>-1</sup> Acrylamid mit nahezu quantitativer Ausbeute produziert werden. Auf gleiche Weise lassen sich Methacrylamid (200 g L<sup>-1</sup>), Acetamid (150 g L<sup>-1</sup>), Propionamid (560 g L<sup>-1</sup>), *n*-Butyramid (160 g L<sup>-1</sup>), Crotonamid (200 g L<sup>-1</sup>) und Isobutyramid (100 g L<sup>-1</sup>) gewinnen<sup>[39]</sup>.

Nach der Optimierung der Kultivierungsbedingungen für die Produktion von Nitril-Hydratase aus *Pseudomonas* lag die Enzymaktivität in der Kulturbrühe 900mal höher als der ursprünglich beschriebene Wert<sup>[230]</sup>. Die Nitril-Hydratase aus *Pseudomonas* ist kürzlich ausführlich charakterisiert worden<sup>[231]</sup>. Dieses Verfahren ist einfach, sauber und schnell, erfordert keine spezielle Ausrüstung zur Energieversorgung und ergibt ein hochreines Produkt. 1987 wurde *P. chlororaphis* B23 für die kommerzielle Herstellung von Acrylamid eingesetzt.

Wie dieses Beispiel nahelegt, bilden nitrilumsetzende Enzyme wie Nitril-Hydratase, Amidase und Nitrilase eine Enzymgruppe, der zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten als Katalysatoren für organisch-chemische Verfahren offenstehen dürften. Hydratasen und Amidasen sind in Mikroorganismen weit verbreitet. Meistens werden beide vom

gleichen Mikroorganismus gebildet, und meistens weisen sie eine breite Substratspezifität auf. Daher können die Enzyme nicht nur für die Herstellung von Amiden verwendet werden, sondern auch für weiterreichende und variable Zwecke, z. B. für die Synthese optisch reiner Aminosäuren und Hydroxysäuren aus den entsprechenden Aminonitrilen bzw. Cyanhydrinen. So kann die enzymatische Hydrolyse eines Dinitrils fünf Produkte ergeben, nämlich Monoamid-Mononitril, Monocarbonsäure-Mononitril, Diamid, Monoamid-Monocarbonsäure und Dicarbonsäure, während eine säure- oder basekatalysierte Hydrolyse nur das Diamid und die Dicarbonsäure liefert. Ausgehend von einem Nitril können darüber hinaus in Verbindung mit anderen chemischen oder enzymatischen Reaktionen viele andere wichtige Verbindungen gewonnen werden (siehe Abb. 16)<sup>[232]</sup>.

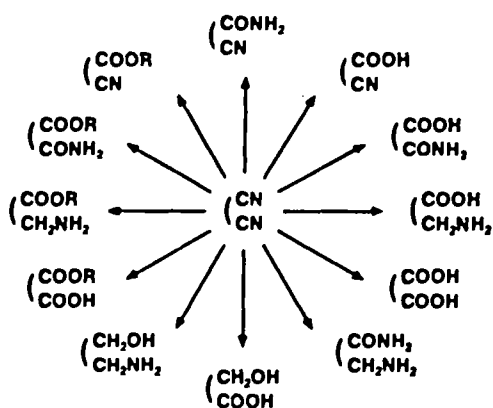


Abb. 16. Möglichkeiten der mikrobiellen Transformation von Dinitrilen.

werden mikrobielle Transformationen für Einschnitt-Reaktionen genutzt, bei denen sie auch am leistungsfähigsten sind.

Wie bei herkömmlichen chemischen Synthesen wird für eine mikrobielle Transformation ein Substrat benötigt, das dem Produkt ähnelt. Das ist ein Nachteil der mikrobiellen Transformation, weil zur Bereitstellung der Substrate Verfahren wie chemische Synthese oder Fermentation notwendig werden können.

Bei der Produktion wichtiger Verbindungen scheinen mikrobielle Transformationen, Fermentationsverfahren und chemische Synthesen miteinander zu konkurrieren. Wie die Beispiele in diesem Beitrag gezeigt haben, werden die besten Ergebnisse jedoch durch Kombinationen dieser Methoden erreicht.

Mikroorganismen passen sich besser an unterschiedliche Lebensbedingungen an als höhere Zellen. Daraus folgt, daß Mikroorganismen bemerkenswerte Fähigkeiten zur Induktion neuer oder neuartiger Enzymsysteme haben, die fremde Substrate umsetzen können. Es ist möglich, Mikroorganismen zu finden und zu kultivieren, die in außergewöhnlichen Umgebungen überleben oder wachsen können, z. B. Psychrophile, Thermophile, Acidophile und Alkalophile. Diese Mikroorganismen bilden einzigartige Enzyme, die Hitze, Alkali oder Säuren vertragen. Darüber hinaus haben die Techniken der Fermentation und Enzymreinigung sowie die Gen- und Enzymtechnologie große Fortschritte erzielt. Zieht man alle diese Tatsachen in Betracht, muß es bei der Nutzung von Mikroorganismen zur Produktion wichtiger Verbindungen viel mehr Möglichkeiten geben, als wir uns derzeit vorstellen können.

Eingegangen am 16. April 1987 [A 667]  
Übersetzt von Dr. Gisela Hummel, Jülich

## 5.7. Lipide

Die Herstellung von ölartigen Zwischenprodukten wie Fettsäuren, Fettsäureestern und Fettalkoholen umfaßt Schritte, die ebenfalls enzymatisch durchgeführt werden können. Schlüsselenzyme für solche Transformationen sind Lipasen<sup>[233]</sup>. Sie können für die selektive oder partielle Fettsäurespaltung, die Hydrolyse von Wachsestern zu Fettalkoholen und zur Estersynthese sowie zur Umesterung eingesetzt werden.

Je nach ihrer Regioselektivität führen spezifische Lipasen zu wertvollen Triacylglycerin-Mischungen, die durch herkömmliche chemische Veresterung nicht hergestellt werden können. Interessante Beispiele sind die Umesterung von Palmöl mit Fettsäuremethylestern zu Kakaobutter-Ersatz und das Härten von Pflanzenölen durch Umesterung mit höher schmelzenden Triacylglycerinen<sup>[234]</sup>.

Andere bemerkenswerte Beispiele sind die Oxidation von Fettsäuren oder *n*-Alkanen zu Dicarbonsäuren<sup>[105]</sup>, die Herstellung von Prostaglandin-Synthonen sowie die Modifizierung von Prostaglandinen<sup>[235]</sup>.

## 6. Schlußbemerkungen

Im Prinzip ist es möglich, mikrobielle Transformationen für Mehrschritt-Reaktionen einzusetzen, wie das Beispiel der CoA-Synthese zeigt. In den meisten Fällen allerdings

- [1] H. Rehm, H. Reed (Hrsg.): a) *Biotechnology*, Vol. 64, Verlag Chemie, Weinheim 1984; b) *Biotechnology*, Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim 1983; c) *Biotechnology*, Vol. 4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1986.
- [2] H. Yamada, S. Shimizu in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985, S. 150.
- [3] J. Tramper, H. C. van der Plas, P. Linko (Hrsg.): *Biocatalysts in Organic Syntheses (Studies in Organic Chemistry. 22)*, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [4] J. P. Rosazza (Hrsg.): *Microbial Transformations of Bioactive Compounds*, Vol. 1 und 2, CRC Press, Boca Raton, FL (USA) 1982.
- [5] G. K. Skryabin, L. A. M. Goloveleva: *Microorganisms in Organic Chemistry*, Nauka, Moskau 1976 (Russisch); Japanische Ausgabe (übersetzt von S. Fukui), Gakkai-Shuppan Center, Tokyo 1980.
- [6] A. L. Demain, *Science (Washington D.C.)* 214 (1981) 987.
- [7] I. Chibata (Hrsg.): *Immobilized Enzymes - Research and Development*, Kodansha, Tokyo 1978.
- [8] A. M. Klivanov, *Science (Washington D.C.)* 219 (1983) 722.
- [9] P. Dunnill, A. Wisman, N. Blakebrough (Hrsg.): *Enzymic and Non-enzymic Catalysis*, Ellis Horwood, Chichester 1980.
- [10] C. J. Suckling in C. J. Suckling (Hrsg.): *Enzyme Chemistry, Impact and Applications*, Chapman and Hall, London 1984, S. 78; C. J. Suckling, K. E. Suckling, *Chem. Soc. Rev.* 3 (1974) 387; C. J. Suckling, H. C. S. Wood, *Chem. Br.* 15 (1979) 243; C. J. Suckling, *Chem. Soc. Rev.* 13 (1984) 97; *Angew. Chem.* 100 (1988) 555; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 537.
- [11] J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Wiley, New York 1976.
- [12] A. R. Battersby, *Chem. Br.* 20 (1984) 611.
- [13] *Enzymes in Organic Synthesis (Ciba Foundation Symposium 111)*, Pitman, London 1985.
- [14] G. M. Whitesides, C. H. Wong, *Aldrichimica Acta* 16 (1983) 27; *Angew. Chem.* 97 (1985) 617; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 617.
- [15] C. J. Sih, C. S. Chen, *Angew. Chem.* 96 (1984) 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 570.

- [16] D. R. Storm, D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66 (1970) 445.
- [17] International Union of Biochemistry: *Enzyme Nomenclature 1984*, Academic Press, New York 1984.
- [18] Katalog der Firma Sigma (1988).
- [19] N. Kosaric, A. Wiczorek, G. P. Cosentino, R. J. Magee, J. E. Prenosil in [1b], S. 257.
- [20] H. Ebner, H. Follmann in [1b], S. 387; K. Buchta in [1b], S. 409, 467; M. Röhr, C. P. Kubicek, J. Kominek in [1b], S. 419, 455.
- [21] J. G. Zeikus, *Annu. Rev. Microbiol.* 34 (1980) 423; T. K. Ng, R. M. Busche, C. C. McDonald, R. W. F. Hardy, *Science (Washington, D.C.)* 219 (1983) 733.
- [22] J. O'Sullivan, R. B. Sykes in [1c], S. 247; H. Kleinkauf, H. von Döhren in [1c], S. 283; S. Umezawa, S. Kondo, Y. Ito in [1c], S. 309; S. Ōmura, Y. Tanaka in [1c], S. 359; Z. Hošťálek, Z. Vaněk in [1c], S. 393; G. Lancini in [1c], S. 431; J. Bérdy in [1c], S. 465; S. Tsukagoshi, T. Takeuchi, H. Umezawa in [1c], S. 509.
- [23] K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, H. Yamada (Hrsg.): *Biotechnology of Amino Acid Production*. Kodansha, Tokyo/Elsevier, Amsterdam 1986.
- [24] a) K. Ogata, S. Kinoshita, T. Tsunoda, K. Aida (Hrsg.): *Microbial Production of Nucleic Acid-Related Substances*. Kodansha, Tokyo 1976; b) K. Ogata, *Adv. Appl. Microbiol.* 19 (1975) 209; c) A. Kuninaka in [1c], S. 71.
- [25] C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* 115 (1921) 282.
- [26] D. H. Peterson, M. C. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1871.
- [27] D. Perlman, E. Titus, J. Fried, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2126.
- [28] D. H. Peterson in C. Rainbow, A. H. Rose (Hrsg.): *Biochemistry of Industrial Micro-organisms*, Academic Press, London 1963, S. 537; Iizuka, A. Naito, *Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids*, University of Tokyo Press, Tokyo/University Park Press, State College, PA (USA) 1967; K. Kieslich, O. K. Sebek, *Annu. Rep. Ferment. Processes* 3 (1979) 275.
- [29] W. Kullmann, *J. Protein Chem.* 4 (1985) 1.
- [30] K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, *Nature (London)* 280 (1979).
- [31] K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, Y. Tochino, T. Kanaya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 (1980) 396.
- [32] Jap. Pat.-Anm. 56-135452.
- [33] Nach Katalogen von *Takara Reagents for Genetic Engineering Research (1987)* und *New England BioLabs Inc. (1986-1987)* sind mehr als 150 Enzyme im Handel erhältlich.
- [34] K. Yamamoto, T. Tosa, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 22 (1980) 2045.
- [35] T. Sato, Y. Nishida, T. Tosa, I. Chibata, *Biochim. Biophys. Acta* 570 (1979) 179; Y. Nishida, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 95.
- [36] Y.-Y. Linko, L. Pohjola, P. Linko, *Process Biochem.* 12 (1977) 14.
- [37] N. B. Havewala, W. H. Pitcher, *Enzyme Eng.* 2 (1974) 315.
- [38] T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2 (1976) 153.
- [39] Y. Asano, T. Yasuda, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1183.
- [40] H. Dalton in D. E. F. Harrison, I. J. Higgins, R. Watkinson (Hrsg.): *Transformations by Methane Monooxygenase*, Heyden, London 1980, S. 85; *Chem. Week*, Okt. 1979.
- [41] Y. Sakai, Y. Tani, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 2615.
- [42] C. T. Hou, R. N. Patel, A. I. Laskin, N. Barnabe, I. Maarczak, *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979) 135.
- [43] H. Yoshida, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 2539.
- [44] F. C. Huang, L. F. H. Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Chan, C. S. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1976) 4144.
- [45] M. Ohno, S. Kobayashi, T. Iimori, Y.-F. Wang, T. Izawa, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2405; K. Okano, T. Izawa, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 217; T. Iimori, Y. Takahashi, T. Izawa, S. Kobayashi, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4049.
- [46] Y. Ito, T. Shibata, M. Arita, H. Sawai, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6739; M. Arita, K. Adachi, Y. Ito, H. Sawai, M. Ohno, *ibid.* 105 (1983) 4049.
- [47] K. Mori, *Tetrahedron* 37 (1981) 1341; K. Mori, M. Matsunaga, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 157.
- [48] N. Cohen, W. F. Eichel, R. J. Lopersti, G. Neukom, G. Sauey, *J. Org. Chem.* 41 (1976) 3505.
- [49] Q. Branca, A. Fischli, *Helv. Chim. Acta* 60 (1977) 925.
- [50] T. Masaki, T. Fujihashi, K. Nakamura, M. Soejima, *Biochim. Biophys. Acta* 660 (1981) 51.
- [51] H. Yamada, H. Kumagai, *Adv. Appl. Microbiol.* 19 (1975) 249.
- [52] H. Yamada, H. Kumagai, *Pure Appl. Chem.* 50 (1978) 1117.
- [53] H. Yamada, S. Shimizu in [3], S. 19.
- [54] H. Yamada, *Enzyme Eng.* 6 (1982) 97.
- [55] T. Nagasawa, H. Yamada, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 13 (1986) 147.
- [56] T. Fukumura, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 1687; 41 (1977) 1327.
- [57] H. Yamada, S. Shimizu, K. Yoneda, *Hakko to Kogyo* 38 (1980) 937.
- [58] S. Takahashi in [23], S. 269.
- [59] H. T. Bucherer, W. Steiner, *J. Prakt. Chem.* 140 (1934) 291.
- [60] K. Kitahara, S. Fukui, M. Misawa, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 34 (1960) 44.
- [61] S. Shimizu, H. Hata, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 2285.
- [62] C. T. Goodhue in [4], Vol. 1, S. 9.
- [63] C. T. Hou, *Annu. Rep. Ferment. Processes* 7 (1984) 21.
- [64] E. Kondo, E. Masuo, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 7 (1961) 113.
- [65] B. Zhou, A. S. Gopalan, F. Van Middlesworth, W.-R. Shieh, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5925; W. Shieh, A. S. Gopalan, C. J. Sih, *ibid.* 107 (1985) 2993.
- [66] C. Vezina, K. Singh in J. E. Smith, D. R. Berry (Hrsg.): *The Filamentous Fungi. Vol. 1*. Kap. 9, Edward Arnold, London 1975.
- [67] K. Venkatsubramanian (Hrsg.): *Immobilized Microbial Cells*, American Chemical Society, Washington, D.C. 1979.
- [68] A. Laskin (Hrsg.): *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, Addison-Wesley, Reading, MA (USA) 1985.
- [69] S. Fukui, A. Tanaka, *Annu. Rev. Microbiol.* 26 (1982) 145.
- [70] K. Mosbach (Bandherausgeber), *Methods Enzymol.* 44 (1976).
- [71] M. D. Trevan: *Immobilized Enzymes: Introduction and Applications in Biotechnology*, Wiley, New York 1980.
- [72] I. Chibata (Hrsg.): *Immobilized Biocatalysts*. Kodansha, Tokyo 1986 (Japanisch).
- [73] G. M. Whitesides in [13], S. 76.
- [74] a) *Third European Congress on Biotechnology, Vol. 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1984; b) C. Wandrey, R. Wichmann, W. Berke, M. Morr, M.-R. Kula in [74a], S. 239; C. Wandrey, A. F. Buckmann, M.-R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 1789.
- [75] Y. Yamazaki, H. Maeda, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 2621, 3213.
- [76] S. Takamatsu, I. Umemura, K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 (1982) 147.
- [77] S. Shimizu, H. Yamada, *Trends Biotechnol.* 2 (1984) 137.
- [78] IDB 3017861.
- [79] W. Hummel, E. Schmid, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1986) 175.
- [80] Y. Asano, A. Nakazawa, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 3631; 51 (1987) 2035.
- [81] *Newsweek* 2 (1986) 17.
- [82] K. Ogata, S. Shimizu, Y. Tani, *Agric. Biol. Chem.* 34 (1970) 1757; S. Shimizu, Y. Tani, K. Ogata, *ibid.* 36 (1972) 370.
- [83] T. Utagawa, H. Morisawa, T. Nakamatsu, A. Yamazaki, S. Yamanaka, *FEBS Lett.* 119 (1980) 101.
- [84] I. Takata, K. Yamamoto, T. Tosa, I. Chibata, *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 30.
- [85] K. Arima, M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* 33 (1969) 1636; M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, K. Arima, *ibid.* 33 (1969) 1644.
- [86] C. K. A. Martin, F. Wagner, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2 (1976) 243.
- [87] K. Sano, K. Mitsugi, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 2315.
- [88] H. Mayer, J. Collins, F. Wagner, *Enzyme Eng.* 5 (1980) 61; U. Schorner, A. Segner, F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 307.
- [89] Y. Asano, K. Endo, A. Nakazawa, Y. Hibino, N. Okazaki, M. Ohmori, N. Numao, K. Kondo, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2621.
- [90] K. Takahashi, H. Nishimura, T. Yoshimoto, Y. Saito, Y. Inada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1984) 261.
- [91] *Bioprocessing Technology*, Feb. 1985, S. 6.
- [92] K. Oyama, K.-I. Kihara, *CHEMTECH* 14 (1984) 100; K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, T. Hashimoto, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 5241.
- [93] K. Yokozeki, S. Yamanaka, K. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, S. Fukui, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1982) 1; K. Yokozeki, S. Yamanaka, T. Utagawa, T. Takinami, Y. Hirose, A. Tanaka, K. Sonomoto, S. Fukui, *ibid.* 14 (1982) 225; P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* 6 (1984) 513.
- [94] N. K. Harakas, *Annu. Rep. Ferment. Processes* 7 (1984) 159.
- [95] M. Misawa, T. Suzuki, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 7 (1982) 205; D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada (Hrsg.): *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1*. MacMillan, New York 1983; A. W. Alfermann in [3], S. 225.
- [96] W. D. Maxon, *Annu. Rep. Ferment. Processes* 8 (1985) 171; L. L. Smith in [1a], S. 31.
- [97] K. Krasnobajew in [1a], S. 96.
- [98] P. J. Davis in [4], Vol. 2, S. 67; in [1a], S. 207.
- [99] V. P. Marshall, P. E. Wiley in [4], Vol. 1, S. 45; O. K. Sebek in [1a], S. 239.
- [100] T. Nara, R. Okachi, M. Misawa, *J. Antibiot.* 24 (1971) 321.
- [101] T. Takahashi, Y. Yamazaki, K. Kato, M. Isono, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 4035.
- [102] T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2 (1976) 153.
- [103] K. Kubo, T. Ishikura, Y. Fukagawa, *J. Antibiot.* 37 (1984) 1394.
- [104] K. Kitahara, K. Uchiyama, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 31 (1967) 200.
- [105] R. Uchio, I. Shiio, *Agric. Biol. Chem.* 36 (1972) 426, 1169, 1389.
- [106] US-Pat. 4092220; Jap. Pat.-Anm. 54-14191.
- [107] J. Hasegawa, M. Ogura, H. Kanema, N. Noda, H. Kawaharada, K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.* 60 (1982) 501; J. Hasegawa, M. Ogura, S.

- Hamaguchi, M. Shimazaki, H. Kawaharada, K. Watanabe, *ibid.* 59 (1981) 203.
- [108] S. Shimizu, S. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Enzyme Microb. Technol.* (1987), im Druck.
- [109] T. Shibatani, N. Nishimura, K. Nabe, T. Kakimoto, I. Chibata, *Appl. Microbiol.* 27 (1974) 688.
- [110] A. Crueger, W. Crueger in [1a], S. 421.
- [111] I. M. Chaiken, A. Komoriya, M. Ohno, F. Widmer, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 7 (1982) 385.
- [112] K. Morihara in E. Ichishima (Hrsg.): *Proteases*, Gakkai Shuppan Center, Tokyo 1983, S. 237 (Japanisch).
- [113] M. Fujimaki, S. Arai, M. Yamashita, *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 20 (1975) 927.
- [114] K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Tochino, T. Kanaya, J. Emura, S. Sakakibara, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 751.
- [115] Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, *Tetrahedron Lett.* 1979, 2611.
- [116] K. Soda, H. Tanaka, N. Esaki in [1b], S. 479.
- [117] K. Soda, H. Tanaka, N. Esaki, H. Kumagai, H. Yamada, *Biotechnol. Bioeng.* 22 Suppl. 1 (1980) 127.
- [118] S. Shimizu, H. Yamada, *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi* 41 (1983) 1064.
- [119] S. Shimizu, H. Yamada in [1c], S. 159.
- [120] K. Mitsugi, K. Komagata, M. Takahashi, H. Izuka, H. Katagiri, *Agric. Biol. Chem.* 8 (1964) 586.
- [121] T. Nishino, S. Murao, *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 1827.
- [122] K. Kawaguchi, H. Kawai, T. Tochikura, *Methods Carbohydr. Chem.* 8 (1980) 261.
- [123] I. Chibata, T. Ishikawa, S. Yamada, *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 21 (1957) 300.
- [124] Y. Takamura, I. Kitamura, M. Ikura, K. Kono, A. Ozaki, *Agric. Biol. Chem.* 30 (1966) 345.
- [125] T. Kakimoto, T. Shibatani, N. Nishimura, I. Chibata, *Appl. Microbiol.* 22 (1971) 992.
- [126] H. Kanzaki, T. Nagasawa, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1986) 97.
- [127] H. Kanzaki, M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 (1987) 322.
- [128] K. Haneda, S. Watanabe, I. Takeda, *Appl. Microbiol.* 22 (1971) 721.
- [129] R. Tsugawa, S. Okumura, T. Ito, N. Katsuya, *Agric. Biol. Chem.* 30 (1966) 27.
- [130] K. Yokozeki, K. Sano, C. Eguchi, H. Iwagami, K. Mitsugi, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 729; K. Yokozeki, Y. Hirose, K. Kubota, *ibid.* 51 (1987) 737.
- [131] S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamichi, I. Chibata, *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 773.
- [132] K. Nakamichi, K. Nabe, S. Yamada, T. Tosa, I. Chibata, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1984) 100.
- [133] G. J. Calton, L. L. Wood, M. H. Updike, L. Lantz II, J. P. Hamman, *Bio/Technology* 4 (1986) 317.
- [134] H. Tanaka, N. Esaki, K. Soda, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11 (1985) 71.
- [135] H. Kune, H. Sahm, F. Wagner, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2 (1976) 175; M. Ema, T. Kakimoto, I. Chibata, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 1053; Y. Izumi, H. Takizawa, Y. Tani, H. Yamada, *J. Ferment. Technol.* 60 (1982) 269; B. K. Hamilton, H.-Y. Hsiao, W. E. Swann, D. M. Anderson, J. J. Delente, *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 64.
- [136] K. Yokozeki, E. Maejima, K. Izawa, K. Kubota, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 963.
- [137] W. Marconi, F. Bartoli, F. Cecere, F. Morisi, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 1343; U. Behrendt, W. G. Bang, F. Wagner, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 308.
- [138] K. Sano, K. Yokozeki, C. Eguchi, T. Kagawa, I. Noda, K. Mitsugi, *Agric. Biol. Chem.* 41 (1977) 819.
- [139] a) G. Terui (Hrsg.): *Fermentation Technology Today (Proc. 4th Int. Fermentation Symp.)*, Soc. Fermentation Technology Jpn., Osaka 1972; b) I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matsuo in [139a], S. 138.
- [140] H. Yamada, S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai, *J. Ferment. Technol.* 56 (1978) 484.
- [141] S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai, H. Yamada, *J. Ferment. Technol.* 56 (1978) 492.
- [142] S. Takahashi, Y. Kii, H. Kumagai, H. Yamada, *J. Ferment. Technol.* 57 (1979) 328.
- [143] H. Yamada, S. Shimizu, H. Shimada, Y. Tani, S. Takahashi, T. Ohashi, *Biochimie* 62 (1980) 395; S. Shimizu, H. Shimada, S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 2233.
- [144] T. Ohashi, S. Takahashi, T. Nagamachi, K. Yoneda, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 45 (1981) 831.
- [145] R. Olivier, E. Fascetti, L. Angelini, L. Degen, *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 201.
- [146] K. Yokozeki, S. Nakamori, S. Yamanaka, C. Eguchi, K. Mitsugi, F. Yoshinaga, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 715; K. Yokozeki, K. Kubota, *ibid.* 51 (1987) 721.
- [147] J. M. Kim, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 11832.
- [148] H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1767, 1773.
- [149] T. Nagasawa, T. Utagawa, J. Goto, C.-J. Kim, Y. Tani, H. Kumagai, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 33.
- [150] H. Yoshida, H. Kumagai, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 463; *FEBS Lett.* 52 (1975) 157.
- [151] H. Enei, H. Matsui, K. Yamashita, S. Okumura, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 36 (1972) 1861; H. Enei, K. Yamashita, S. Okumura, H. Yamada, *ibid.* 37 (1973) 485; H. Enei, H. Matsui, H. Nakazawa, S. Okumura, H. Yamada, *ibid.* 37 (1973) 493; H. Enei, H. Nakazawa, S. Okumura, H. Yamada, *ibid.* 37 (1973) 725; H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yamada, *ibid.* 36 (1972) 2523; H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura, H. Yoshida, H. Yamada, *FEBS Lett.* 25 (1972) 43.
- [152] H. Kumagai, S. Sejima, Y. Choi, H. Tanaka, H. Yamada, *FEBS Lett.* 52 (1975) 304; H. Kumagai, H. Tanaka, S. Sejima, Y. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 41 (1977) 2071; H. Kumagai, Y. Choi, S. Sejima, H. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 (1974) 789; G. S. Dhillon, T. Nagasawa, H. Yamada, *J. Biotechnol.* 1 (1984) 47; H. Yamada, T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami, Y. Tani, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100 (1981) 1104; T. Nagasawa, H. Ohkishi, B. Kawakami, Y. Yamano, H. Hosono, Y. Tani, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13749; T. Nagasawa, H. Hosono, H. Ohkishi, Y. Tani, H. Yamada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111 (1983) 809; H. Ohkishi, D. Nishikawa, H. Kumagai, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 45 (1981) 2397.
- [153] H. Ziehr, W. Hummel, H. Reichenbach, M.-R. Kula in [74a], S. 345.
- [154] R. W. Sealock, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 8 (1969) 3703.
- [155] Y. Isowa, M. Ohmori, M. Satao, K. Mori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50 (1977) 2766.
- [156] Y. Isowa, *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi* 36 (1978) 195; siehe auch H.-D. Jakubke, P. Kuhl, A. Könnecke, *Angew. Chem.* 97 (1985) 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 85.
- [157] W. Kuhlmann, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8234.
- [158] F. Widmer, K. Breddam, J. T. Johansen, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 16th 1980 (1981) 46.
- [159] H. Takai, K. Sakato, N. Nakamizo, Y. Isowa in K. Okawa (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1980*, Protein Research Foundation, Osaka 1981, S. 213.
- [160] M. Gondo, H. Yamashita, K. Sakakibara, Y. Isowa in T. Shioiri (Hrsg.): *Peptide Chemistry 1981*, Protein Research Foundation, Osaka 1982, S. 93.
- [161] W. Kullmann, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5300.
- [162] M. Laskowski, Jr. in R. E. Offord, C. DiBello (Hrsg.): *Semisynthetic Peptides and Proteins*, Academic Press, London 1978, S. 255.
- [163] H. Jering, H. Tschesche, *Angew. Chem.* 86 (1974) 704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 662.
- [164] S. Kitabatake, R. Tsurutani, H. Nakajima, K. Tomita, Y. Yoshihara, H. Ueda, H. Takagi, K. Imahori, *Pharm. Res.* 4 (1987) 154.
- [165] H. Kumagai, T. Tochikura, S. Kondo, *Abstr. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 1983, S. 515.
- [166] K. J. Skinner, *Chem. Eng. News* 53 (1975) Nr. 33, S. 22.
- [167] H. Kumagai in [24a], S. 259.
- [168] R. Nakayama, H. Kumagai, T. Tochikura, *J. Bacteriol.* 160 (1984) 341; R. Nakayama, H. Kumagai, S. Akashi, H. Sugiura, T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 1041.
- [169] R. Nakayama, H. Kumagai, T. Maruyama, T. Tochikura, T. Ueno, H. Fukami, *Agric. Biol. Chem.* 45 (1981) 2839.
- [170] G. A. Homandberg, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* 18 (1979) 586; G. A. Homandberg, A. Komoriya, M. Juillerat, I. M. Chaiken in E. Gross, J. Meienhofer (Hrsg.): *Peptides. Structure and Biological Function*, Pierce Chem. Co., Rockford, IL (USA) 1979, S. 597.
- [171] G. A. Homandberg, I. M. Chaiken, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4903.
- [172] E. Lagerlof, L. Nathorst-Weltfelt, B. Ekstrom, B. Sjöberg, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 759.
- [173] W. Marconi, F. Cecere, F. Morisi, G. Della Penna, B. Rappuoli, *J. Antibiot.* 26 (1973) 228.
- [174] R. Okachi, T. Nara, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 2797.
- [175] T. Tochikura, M. Kuwahara, S. Yagi, H. Okamoto, Y. Tominaga, T. Kano, K. Ogata, *J. Ferment. Technol.* 46 (1967) 511.
- [176] T. Tochikura, Y. Kariya, T. Yano, T. Tachiki, A. Kimura, *Abstr. 5th Int. Congr. Ferment. Symp.*, Berlin 1976, S. 441.
- [177] Y. Fukuda, S. Yamaguchi, H. Hashimoto, M. Shimosaka, A. Kimura, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 2877.
- [178] T. Nara, M. Misawa, S. Kinoshita, *Biotechnol. Bioeng.* 10 (1968) 277.
- [179] H. Tanaka, Z. Sato, K. Nakayama, S. Kinoshita, *Agric. Biol. Chem.* 32 (1968) 721.
- [180] T. Fujio, A. Furuya, *J. Ferment. Technol.* 61 (1983) 261.
- [181] Y. Tani, Y. Mitani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 46 (1982) 1097; 48 (1984) 431; Y. Tani, T. Yonehara, Y. Mitani, H. Yamada, *J. Biotechnol.* 1 (1984) 119; Y. Tani, T. Yonehara, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 637.
- [182] G. W. Pace, H. S. Yang, S. R. Tannenbaum, M. C. Archer, *Biotechnol. Bioeng.* 18 (1976) 281; H. S. Yang, K. H. Leung, M. C. Archer, *ibid.* 18 (1976) 1425; F. Paul, P. M. Vignais, *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 281; V. Larreta Garde, G. Gelf, D. Thomas, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1982) 232.
- [183] M. F. Cocquempot, D. Thomas, M. L. Champigny, A. Moyse, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8 (1979) 37.
- [184] Y. Sawa, K. Kanayama, H. Ochiai, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 1967.

- [185] C. R. Gardner, C. K. Colton, R. S. Langer, B. K. Hamilton, M. C. Archer, G. M. Whitesides, *Enzyme Eng.* 2 (1974) 209; D. L. Marshall, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 447; K. Sakata, H. Kitano, N. Ise, *J. Appl. Biochem.* 3 (1981) 518; H. Kondo, I. Tomioka, H. Nakajima, K. Imahori, *ibid.* 6 (1984) 29.
- [186] T. Tochikura, H. Kawai, K. Kawaguchi, K. Mugibayashi, K. Ogata in [139a], S. 463.
- [187] T. Fujio, Y. Kotani, A. Furuya, *J. Ferment. Technol.* 62 (1984) 131.
- [188] A. Sato, A. Furuya, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 465.
- [189] S. Kitabatake, M. Dombou, I. Tomioka, H. Nakajima, K. Tomita, *Abstr. Annu. Meet. Soc. Ferment. Technol. Jpn.* 1986, S. 61.
- [190] A. Kimura, M. Morita, *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 1469.
- [191] K. Nakayama, Z. Sato, H. Tanaka, S. Kinoshita, *Agric. Biol. Chem.* 32 (1968) 1311.
- [192] D. R. Walt, V. M. Rios-Mercadillo, J. Auge, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7805.
- [193] K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 233.
- [194] A. Maruyama, A. Ozaki, T. Fujio, *Abstr. Annu. Meet. Soc. Ferment. Technol. Jpn.* 1985, S. 121; T. Sakai, T. Watanabe, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 849.
- [195] S. Shimizu, K. Yamane, Y. Tani, H. Yamada, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8 (1983) 237.
- [196] S. Shimizu, K. Miyata, Y. Tani, K. Ogata, *Biochim. Biophys. Acta* 279 (1972) 583; N. Nishimura, T. Shibata, T. Kakimoto, I. Chibata, *Appl. Microbiol.* 28 (1974) 117.
- [197] K. Ogata, Y. Tani, S. Shimizu, K. Uno, *Agric. Biol. Chem.* 36 (1972) 93; H. Samejima, A. Kimura, Y. Ado, Y. Suzuki, T. Tadokoro, *Enzyme Eng.* 4 (1978) 237.
- [198] S. Shiozaki, S. Shimizu, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 2293; *J. Biotechnol.* 4 (1986) 345.
- [199] A. Gross, S. Geresh, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 8 (1983) 415.
- [200] T. Tachiki, H. Suzuki, T. Yano, H. Kumagai, T. Tochikura in [74a], S. 313.
- [201] T. Tachiki, H. Suzuki, S. Wakisaka, T. Yano, T. Tochikura, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32 (1986) 545.
- [202] K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11 (1981) 72.
- [203] K. Murata, K. Tani, J. Kato, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10 (1980) 11.
- [204] A. Pollaak, R. L. Baughn, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2366.
- [205] Y. Kariya, Y. Owada, A. Kimura, T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 1689.
- [206] R. S. Langer, B. K. Hamilton, C. R. Gardner, M. C. Archer, C. K. Colton, *AIChE J.* 22 (1976) 1079.
- [207] S. Shimizu, Y. Tani, K. Ogata, *Methods Enzymol.* 62 (1979) 236; S. Shimizu, Y. Tani, H. Yamada in [67], S. 87; H. Yamada, S. Shimizu, Y. Tani, *Enzyme Eng.* 5 (1980) 405; S. Shimizu, H. Yamada in [74a], S. 401.
- [208] G. M. Brown, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 370.
- [209] S. Shimizu, K. Kubo, Y. Tani, K. Ogata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 2863; S. Shimizu, K. Kubo, H. Morioka, Y. Tani, K. Ogata, *ibid.* 38 (1974) 1015.
- [210] S. Shimizu, K. Miyata, Y. Tani, K. Ogata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 607, 615.
- [211] S. Shimizu, R. Komaki, Y. Tani, H. Yamada, *FEBS Lett.* 151 (1983) 303.
- [212] S. Shimizu, A. Esumi, R. Komaki, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 1118.
- [213] S. Shimizu, S. Satsuma, S. Kubo, Y. Tani, K. Ogata, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 857; S. Shimizu, K. Kubo, K. Satsuma, Y. Tani, K. Ogata, *J. Ferment. Technol.* 52 (1974) 114.
- [214] H. Yamada, S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro in [74a], S. 249.
- [215] P. M. Ueland, *Pharmacol. Rev.* 34 (1982) 223.
- [216] S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 385.
- [217] S. Shimizu, S. Shiozaki, H. Yamada, *J. Biotechnol.* 4 (1986) 81.
- [218] S. Shimizu, T. Ohshiro, S. Shiozaki, H. Yamada, *J. Biotechnol.* 4 (1986) 91.
- [219] S. Shimizu, S. Shiozaki, T. Ohshiro, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 1383.
- [220] T. Nakata, T. Kishi, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2745.
- [221] D. A. Evans, C. E. Sacks, W. A. Kleschick, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6789.
- [222] M. Shimazaki, J. Hasegawa, K. Kan, K. Nomura, Y. Nose, H. Kondo, T. Ohashi, K. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 3139.
- [223] H. Ohta, H. Tetsukawa, N. Noto, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2400.
- [224] P. K. Matzinger, H. G. W. Leuenberger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22 (1985) 208.
- [225] J. Hasegawa, M. Ogura, H. Kanema, N. Noda, H. Kawaharada, K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.* 60 (1983) 501.
- [226] S. Shimizu, H. Hattori, H. Hata, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 519.
- [227] S. Shimizu, H. Yamada, H. Hata, T. Morishita, S. Akutsu, M. Kawamura, *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 289.
- [228] H. Yamada, Y. Asano, Y. Tani, *Chemistry and Industry* (Japanese name?) 36 (1983) 101; Y. Tani, Y. Asano, H. Yamada, *Hakko to Kogyo* 41 (1983) 382; T. Nagasawa, H. Yamada, *Chemistry and Industry* 39 (1986) 666.
- [229] Y. Asano, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 2251.
- [230] H. Yamada, K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto, I. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 2859.
- [231] T. Nagasawa, H. Nanba, K. Ryuno, K. Takeuchi, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* 162 (1987) 691.
- [232] S. E. Godtfredsen, K. Ingvorsen, B. Yde, O. Andresen in [3], S. 3.
- [233] B. Borgstrom, H. L. Brockman (Hrsg.): *Lipases*. Elsevier, Amsterdam 1984.
- [234] A. R. Macrae in [3], S. 195.
- [235] G. P. Peruzzotti in [4], Vol. 1. S. 109.