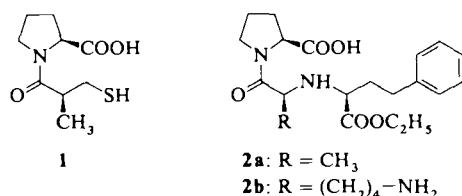


Isolierung einer L-stereospezifischen N-Acyl-L-prolin-Acylase und ihre Verwendung als Katalysator in der Organischen Synthese**

Von Ulrich Groeger*, Karlheinz Drauz und Herbert Klenk

Professor Franz Effenberger zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Bedeutung der Aminosäure L-Prolin hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Die Verwendung von L-Prolin und Derivaten in der asymmetrischen Synthese ist heute schon klassisch^[1]; darüber hinaus ist L-Prolin Bestandteil der drei wichtigsten ACE-Inhibitoren (ACE = Angiotensine Converting Enzyme) Captopril **1**, Enalapril **2a** und Lisinopril **2b**, die zu den weltweit erfolgreichsten antihypertensiven Wirkstoffen gehören. Heute wird der L-Prolin-Bedarf durch Hydrolyse von Gelatine und extraktive Gewinnung des Prolins mit Ionenaustauschern^[2] sowie durch fermentative Verfahren^[3] gedeckt.



Obwohl etliche gute Synthesen für D,L-Prolin bekannt sind^[2, 4a], konnte sich der bei vielen Aminosäuren übliche Weg der Racematspaltung (Trennung diastereomerer Salzpaa-re^[4b]) oder enzymatische Spaltung geeigneter Vorstufen^[5] bislang bei L-Prolin nicht etablieren. Auch Transformationen anderer chiraler Aminosäuren zu L-Prolin haben bislang noch keine Bedeutung als Herstellverfahren erlangt^[6]. Unsere Suche konzentrierte sich auf ein Enzymsystem, mit dem aus einer N-Acetyl-D,L-prolinvorstufe L-Prolin gewonnen werden sollte.

Anreicherungskulturen einer Klärwerksprobe führten zur Selektion des Mikroorganismus *Comamonas testosteroni* DSM 5416. Beim Wachstum in Gegenwart von N-Acetyl-L-prolin produziert dieses Bakterium ein Enzym, das N-Acetyl-L-prolin hydrolysiert. Diese N-Acyl-L-prolin-Acylase wurde aus dem zellfreien Extrakt durch Hitzebehandlung, Membranfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie mit einer Ausbeute von 50% 53fach angereichert. Das Enzym mit einem Molekulargewicht von 380000 ± 40000 Da ist aus acht identischen Untereinheiten (Molekulargewicht 45000 ± 5000 Da) aufgebaut. Neben der guten pH-Stabilität (vier Wochen bei Raumtemperatur im pH-Wert-Bereich 5–10) ist die Temperaturstabilität (30 min bei 70 °C und pH 7.5) bemerkenswert. Für die Spaltung von N-Acetyl-L-prolin wurden ein pH-Optimum von 6.8 ± 0.5, ein Temperaturoptimum von 65 °C und ein K_M-Wert von 5 mM [0.1 M 2-Amino-2(hydroxymethyl)propan-1,3-diol(Tris)-HCl, pH 7.0; 30 °C] ermittelt. Abbildung 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse von N-Acetyl-L-prolin, N-Acetyl-D,L-prolin und N-Acetyl-D-prolin.

Das Enzym hydrolysiert stereospezifisch N-Acetyl-L-prolin. Nach 2 h war der Umsatz von N-Acetyl-L-prolin quantitativ, der von N-Acetyl-D,L-prolin betrug 48% (theoretisch 50%). N-Acetyl-D-prolin wurde nicht hydrolysiert. D,L-Pro-

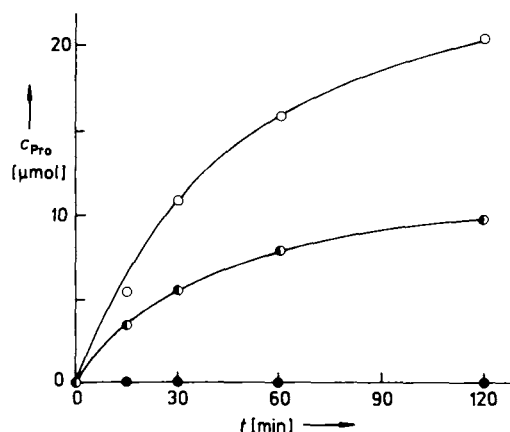


Abb. 1. Reaktionskinetik der Hydrolyse von N-Acetyl-L-prolin (○), N-Acetyl-D,L-prolin (○) und N-Acetyl-D-prolin (●). Der Reaktionsansatz (2 mL) enthielt 0.2 mmol Tris-HCl pH 7.0, 20 μmol Substrat und 0.4 U gereinigte N-Acyl-L-prolin-Acylase aus *Comamonas testosteroni* DSM 5416. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzymes betrug 85.2 U mg⁻¹ bei 30 °C und pH 7.0 mit N-Acetyl-L-prolin als Substrat (eine Einheit (U) der Enzymaktivität entspricht der Enzymmenge, die die Bildung von 1 μmol Prolin pro Minute katalysiert). Die Reaktionsansätze wurden bei 30 °C inkubiert und zu den angegebenen Zeiten mit einem Aliquot 10% (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Das präzipitierte Protein wurde 10 min bei 11000 upm abzentrifugiert, der Überstand 1:5 oder 1:50 mit einem 0.1 M Citratpuffer, 0.1% (v/v) Phenol, 0.5% (v/v) Thiodiethanol, pH 2.2, verdünnt und das entstandene Prolin mit einem Aminosäureanalysator LC 5001 der Firma Biotronic quantifiziert. Üblicherweise wurde die Enzymaktivität durch Ninhydrin-Detektion des Reaktionsproduktes L-Prolin nach Yaron und Mlynar [7] nachgewiesen.

lin kann also via N-Acetyl-D,L-prolin enzymkatalysiert getrennt werden. Diese Technik wird bereits bei der industriellen Produktion von L-Aminosäuren unter Verwendung einer Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae* angewendet^[8], konnte jedoch für die Gewinnung von L-Prolin nicht genutzt werden, weil die bislang bekannten Aminoacylasen aufgrund ihrer Substratspezifität N-Acyl-L-prolin nicht hydrolysieren^[9].

Folgende N-Acetyl- und N-Chloracetylaminosäuren werden von der N-Acyl-L-prolin-Acylase umgesetzt: N-Acetyl-L-prolin (relative Aktivität ≡ 100), N-Acetyl-L-alanin (9), N-Chloracetyl-L-prolin (362), N-Chloracetyl-L-thiazolidin-4-carbonsäure (462), N-Chloracetyl-L-methionin (17), N-Chloracetyl-L-valin (14), N-Chloracetyl-L-leucin (2), N-Chloracetyl-L-phenylalanin (1), N-Chloracetyl-L-tyrosin (1). Mit folgenden N-Acetyl- und N-Chloracetylaminosäuren lagen die relativen Aktivitäten unter 1: N-Acetyl-L-valin, N-Acetyl-D,L-serin, N-Acetyl-L-cystein, N-Acetyl-L-tyrosin und N-Chloracetyl-L-isoleucin.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Substratspezifität des Enzyms zu acyliertem L-Prolin und Derivaten. Neben den Acyl-D,L-prolinverbindungen wird auch die aus Cystein und Formaldehyd leicht zugängliche N-Acylthiazolidin-4-carbonsäure gespalten. Damit eröffnet sich ein neuer Zugang zu L-Cystein und L-Cysteinderivaten durch enzymatische Racematspaltung.

Die Chloracetylverbindungen von L-Prolin und der L-Thiazolidin-4-carbonsäure werden 3.6mal bzw. 4.6mal so schnell hydrolysiert wie N-Acetyl-L-prolin. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Aminoacylasen und beruht auf der Elektronegativität der Chloracetylgruppe^[9]. Tabelle 1 zeigt weitere Daten zur Substrat- und Stereospezifität des Enzyms.

Die Derivatisierung der Carboxygruppe des N-Acetyl-L-prolins hat einen vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität zur Folge, was vermuten läßt, daß diese Gruppe zur Bindung des Substrates an das Enzym essentiell ist. Bei Einführung einer OH-Gruppe in 4-Position des Prolins

[*] Dr. U. Groeger, Dr. K. Drauz, Dr. H. Klenk
Degussa AG, Fachbereich Forschung Chemie Organisch
Postfach 1345, D-6450 Hanau 1

[**] Aminosäuretransformation, 4. Mitteilung. – 3. Mitteilung: H.-P. Krimmer, K. Drauz, A. Kleemann, *Chem.-Ztg.* 111 (1987) 357.

Tabelle 1. Substrat- und Stereospezifität der *N*-Acyl-L-prolin-Acylase gegenüber etlichen Prolinverbindungen. Die Reaktionen wurden unter den in der Legende von Abbildung 1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. *N*-Ac-L-Pro-OH: relative Aktivität $\equiv 100$.

Substrat	relative Aktivität
<i>N</i> -Ac-L-Pro-OH	100
<i>N</i> -Ac-D-Pro-OH	0
<i>N</i> -Ac-L-Pro-NH ₂	0
<i>N</i> -Ac-L-Pro-OMe	0
<i>N</i> -Ac-L-Pro(4-OH)-OH	10
<i>N</i> -ClAc-L-Pro-OH	362
<i>N</i> -ClAc-L-thiazolidin-4-carbonsäure	462
<i>N</i> -Z-L-Pro-OH	0
<i>N</i> -Z-D-Pro-OH	0
<i>N</i> -Z-L-Pro-NH ₂	0
<i>N</i> -Boc-L-Pro-OH	0
H-L-Pro-NH ₂	0
<i>N</i> -Ac-L-Ala-L-Pro-OH	0
<i>N</i> -Z-L-Pro-L-Ala-OH	0
<i>N</i> -Z-Gly-L-Pro-OH	11
H-L-Ala-L-Pro-OH	0
H-Gly-L-Pro-OH	4
H-L-Pro-Gly-OH	0

nimmt die Aktivität um den Faktor 10 ab. *N*-Schutzgruppen vom Urethan-Typ werden nicht hydrolysiert. Das Enzym hat keine Amidase-Aktivität und nur eine minimale Peptidase-Aktivität.

Das Enzym wird vor allem durch Phosphat, 1,10-Phenanthrolin, 2-Mercaptoethanol, 4-(Chlormercurio)benzoat, 4-(Hydroxymercurio)benzoat, Hg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Sn²⁺ und Zn²⁺-Ionen gehemmt. Eine Aktivierung des nativen Enzyms durch zweiwertige Metall-Ionen wurde nicht beobachtet, jedoch konnte das durch 1,10-Phenanthrolin inaktivierte Enzym durch Zugabe von Co²⁺- und Zn²⁺-Ionen auf 80% bzw. 54% der Ausgangsaktivität reaktiviert werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß es sich bei der *N*-Acyl-L-prolin-Acylase aus *Comamonas testosteroni* DSM 5416 um eine Cobalt- oder Zink-abhängige Amidohydrolase handelt, die nach der EC-Klassifizierung der Untergruppe EC 3.5.1. zuzuordnen ist^[10].

Die neue, thermostabile *N*-Acyl-L-prolin-Acylase aus *Comamonas testosteroni* DSM 5416 ist ein hochspezifisches und robustes Enzym, mit dem L-Prolin aus Acyl-D,L-Vorstufen gewonnen werden kann. Ein ähnliches Enzym aus *Pseudomonas spec.* wurde von Kikuchi et al. beschrieben^[11]. Dieses Enzym ist jedoch wesentlich temperaturlabiler (rasche Inaktivierung bei 50 °C) sowie erheblich größer (597000–623000 Da, zehn bis zwölf identische Untereinheiten von 55000 Da), und es hat eine wesentlich höhere Peptidase-Aktivität (*N*-Z-Gly-L-Pro-OH wird 2.7mal und H-Gly-L-Pro-OH 1.2mal so schnell hydrolysiert wie *N*-Ac-L-Pro-OH).

Eingegangen am 20. Dezember 1989 [Z 3693]

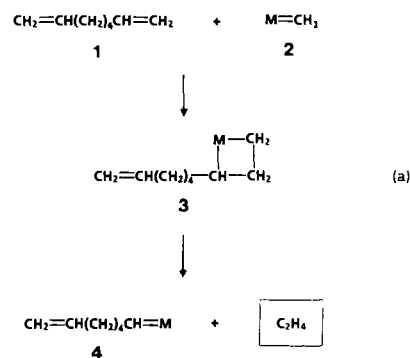
- [1] K. Drauz, A. Kleemann, J. Martens, *Angew. Chem.* 94 (1982) 590; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 584; J. Martens, *Top. Curr. Chem.* 125 (1984) 165, zit. Lit.; E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5551.
- [2] a) J. P. Greenstein, M. Winitz: *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 3, R. E. Krieger Publishing Company 1961; b) [2a], Kap. 35, S. 2178.
- [3] Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., EPS 98 122 vom 31.5.1989, zit. Lit.
- [4] a) Beispiele für Synthesen, die nach unserer Ansicht auch im technischen Maßstab durchgeführt werden können: K. Hasse, A. Wieland, *Chem. Ber.* 93 (1960) 1686; U. Schmidt, H. Poisel, *Angew. Chem.* 89 (1977) 824; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 777; K. Drauz, A. Kleemann, M. Samson, *Chem.-Ztg.* 108 (1984) 391; b) T. Shiraiwa, K. Shinjo, H. Kurokawa, *Chem. Lett.* 1989, 1413; C. Hongo, M. Sibasaki, S. Yamada, I. Chibata, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 903; S. Yamada, C. Hongo, I. Chibata, *Agric. Biol. Chem.* 41 (1977) 2413.

- [5] J. Peisach, H. J. Strecker, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 2255; [2a], Kap. 35, S. 2195, zit. Lit.
- [6] K. Drauz, A. Kleemann, J. Martens, P. Scherberich, F. Effenberger, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 3494, zit. Lit.; S. Lafquih Tizonani, J.-P. Lavergue, P. Viallefont, R. Jaquier, *Tetrahedron* 36 (1980) 2961.
- [7] A. Yaron, D. Mlynar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32 (1968) 658.
- [8] W. Leuchtenberger, U. Plöcker, *Chem. Ing. Tech.* 60 (1988) 16.
- [9] S. Kang, Y. Minematsu, Y. Shimohigashi, M. Waki, N. Izumiya, *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. C* 16 (1987) 61.
- [10] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry: *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, New York 1984, S. 366.
- [11] M. Kikuchi, I. Koshiyama, D. Fukushima, *Biochim. Biophys. Acta* 744 (1983) 180.

Übergangsmetall-vermittelte Erzeugung von C₂H₄ aus 1,7-Octadien: regiospezifische Aktivierung innerer C-C-Bindungen anstelle Metathese-analoger Kupplung terminaler CH₂-Gruppen**

Von Norbert Steinrück, Oliver Dange, Detlef Stöckigt und Helmut Schwarz*

Der Mechanismus kaum einer Metathese-Reaktion^[1] von Olefinen ist so genau studiert worden wie der der Reaktion von 1,7-Octadien 1. Grubbs et al.^[2] konnten zeigen, daß Ethylen in einer Kettenreaktion aus 1 und Metallcarbenkomplexen 2 erzeugt wird; als Intermediate treten Metallacyclobutane 3 auf, als zweites Produkt sind Carbenkomplexe 4 anzunehmen [Gl. (a)]. Metathese-Reaktionen sind auch wiederholt bei bimolekularen und unimolekularen Reaktionen von Übergangsmetall-Ionen in der Gasphase beobachtet worden^[3, 4].



Wir berichten nun über eine Reaktion „nackter“ Übergangsmetall-Ionen M⁰ (M = Fe, Ni, Cr) mit 1, die mit dem in Lösung vorherrschenden Typ von Metathese-Reaktionen nicht zu erklären ist. Vielmehr ist die Reaktion für M⁰ = Fe⁰ vermutlich ein weiteres der seltenen Beispiele für eine *gerichtete* Aktivierung von C-C-Bindungen *ohne* vorhergehende C-H-Bindungsaktivierung^[5].

Elektronenstoßionisation (100 eV) einer 10:1-Mischung von 1 und einem geeigneten Substrat zur Erzeugung von M⁰ (wie Fe(CO)₅, Ni(acac)₂ oder Cr(acac)₃) in der Ionenquelle eines modifizierten ZAB-HF-3F-Massenspektrometers mit

[*] Prof. Dr. H. Schwarz, Dipl.-Chem. N. Steinrück, Dipl.-Chem. O. Dange, D. Stöckigt
Institut für Organische Chemie der Technischen Universität
Straße des 17. Juni 135, D-1000 Berlin 12

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Gesellschaft von Freunden der Technischen Universität Berlin gefördert. Prof. H. Lehmkuhl, Max-Planck-Institut Mülheim, und Dr. K. Weiss, Universität Bayreuth, danken wir für anregende Diskussionsbeiträge.