

ide aus  $\text{PdCl}_2$  in Salzsäure mit Trinatriumcitrat hergestellt werden. Fügt man Tetrachlorogoldsäure zu der kolloidalen Lösung und reduziert anschließend mit Hydroxylamin, so wird die äußere Schale aus Gold gebildet. Die Stabilisierung eines so hergestellten  $\text{Pd}/\text{Au}$ -Sols mit  $\text{P}(m\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})_3$  ergibt isolierbare Kolloide. Ihre Farbe entspricht der reiner ligandstabilisierter Goldkolloide. Mit diesen Methoden können Bimetall-Kolloide leicht hergestellt und stabilisiert werden. HRTEM und EDX sind zum Nachweis des schalenförderigen Aufbaus dieser Kolloide geeignet.

### Experimentelles

**Gold-Platin-Kolloide:** 1600 mL vollentsalztes Wasser werden in einem 2 L-Becherglas zum Sieden erhitzt. 16 mL einer 1 proz. Lösung von  $\text{HAuCl}_4$  (5.00 g  $\text{Au L}^{-1}$ ) und 80 mL einer 1 proz. Lösung von Trinatriumcitrat werden nach und nach unter heftigem Rühren zugegeben. Anschließend wird die Lösung 1 h am Sieden gehalten. Man erhält ca. 1500 mL eines rubinroten Goldsols, das Teilchen von 18–19 nm Durchmesser enthält, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben. Diese Goldkolloid-Lösung wird in eine Mischung aus 116 mL einer 1 proz. Lösung von  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  (5.00 g  $\text{Pt L}^{-1}$ ) und 100 mL einer 1 proz. Lösung von  $\text{H}_3\text{NOHCl}$  in 8 L Wasser gerührt und anschließend auf 60°C erhitzt. Im Verlaufe von 3 h wird das rote Goldsol dunkelbraun (Farbe des Platinkolloids). Um die Partikel zu stabilisieren, werden 50 mg  $p\text{-H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$  zugesetzt. Man engt im Wasserstrahlvakuum bis zur Koagulation ein (Entfärbung der Lösung). Der Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt (5000 Umdrehungen pro Minute) und im Vakuum getrocknet.

**Gold-Palladium-Kolloide:** Das Goldsol, nach der obigen Methode hergestellt, wird in einem 10 L-Becherglas auf 8 L verdünnt. Im Verlauf von 8 h werden 83 mL einer 0.037 molaren Lösung von  $\text{H}_2\text{PdCl}_4$  (6.6 g  $\text{PdCl}_2$  und 7.5 mL 1 n  $\text{HCl}$  in 1 L  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 100 mL einer 1 proz. Lösung von  $\text{H}_3\text{NOHCl}$  gleichzeitig zugetropft. Nach 48 h Rühren bei Raumtemperatur werden 2 g  $p\text{-H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$  hinzugefügt, und anschließend wie oben isoliert. Das Produkt besteht aus silbergrauen Palladiumkolloiden, welche in Wasser vollständig löslich sind.

**Mikroanalyse und Mikroskopie:** Die Kolloide werden in Methanol dispergiert und auf einem durchlöcherten Kohlenstoff-Film gebracht. Die methanolfeuchte Probe wird anschließend in das Mikroskop gebracht, wo das Hochvakuum innerhalb des Mikroskops benutzt wird, um das Lösungsmittel zu entfernen. Die die Kolloide stabilisierenden Liganden können durch den auf die beobachtete Fläche auftreffenden Elektronenstrahl entfernt werden. Die hochauflösende Elektronenmikroskopie wurde mit einem JEM-4000 EX-Gerät durchgeführt, das mit einer Beschleunigungsspannung von 400 kV betrieben wurde und das eine strukturelle Auflösung von 0.16 nm erreichte. Die EDX-Analyse erfolgte mit einem Link-AN-10000 System, das an ein JEM-2000-FX-STEM-Mikroskop mit einer Strahlfokussierung von 30 nm gekoppelt war. Die EDX-Spektren wurden mit einer Software für Dünnschichtanalyse (Link RTS 2/FLS) ausgewertet.

Eingegangen am 27. Dezember 1990 [Z4356]

- [1] R. S. Miner, Jr., S. Namba, J. Turkevich, *Proc. VII. Intern. Congr. Catal.*, Elsevier, New York 1981.
- [2] M. Hansen: *Constitutions of Binary Alloys*, McGraw Hill, New York 1958.
- [3] G. Schmid, A. Lehner, *Angew. Chem. 101* (1989) 773; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 28* (1989) 780.
- [4] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc. 11* (1951) 55.
- [5] J.-O. Bovin et al., unveröffentlicht.

### Enzymatische zweistufige Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membranreaktor

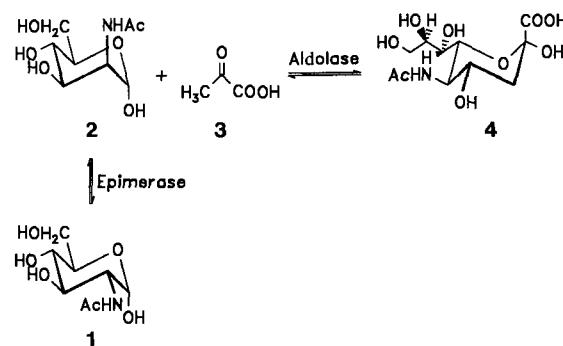
Von *Udo Kragl, Daniel Gygax, Oreste Ghisalba* und *Christian Wandrey\**

*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) 4 ist die bekannteste Verbindung unter den Sialinsäuren, einer speziellen Klasse

[\*] Prof. Dr. C. Wandrey, Dipl.-Chem. U. Kragl  
Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie  
Postfach 1913, D-5170 Jülich  
Dr. D. Gygax, Dr. O. Ghisalba  
Ciba Geigy AG, Zentrale Forschungslaboratorien  
Basel (Schweiz)

von Aminozuckern. Diese sind in endständigen Positionen von Glycoproteinen und Glykolipiden zu finden, die eine wesentliche Rolle bei biologischen Erkennungsprozessen spielen<sup>[1, 2]</sup>. Derivate von Neu5Ac finden Verwendung als Inhibitoren von Sialidasen<sup>[3]</sup>. Die mit Cytidin-5'-monophosphat aktivierte Neu5Ac wird zur in-vitro-Synthese von Sialyloligosacchariden verwendet<sup>[4]</sup>. Da diese Substanzklassen wegen ihrer biologischen Funktion zunehmend an Interesse gewinnen, werden steigende Mengen an Neu5Ac benötigt. Diese wird zur Zeit aus natürlichen Quellen isoliert, wodurch die Verfügbarkeit limitiert und der Preis relativ hoch ist.

In den letzten Jahren wurden mehrere enzymatische Synthesen von Neu5Ac 4 ausgehend von *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) 2 und Brenztraubensäure 3 beschrieben, wobei als Katalysator *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (E.C. 4.1.3.3) dient<sup>[5]</sup>. Dabei wurde in der Regel ein sieben- bis zehnfacher Überschuss an 3 verwendet, um hohe Umsätze zu erzielen. 2 wurde durch basenkatalysierte Epimerisierung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) 1 chemisch hergestellt<sup>[6]</sup>. Das Reaktionsprodukt enthält die beiden Epimere im Verhältnis von etwa 1:1. 1 ist kein Substrat für die Aldolase<sup>[5]</sup>.



Wir beschreiben hier ein Verfahren, bei dem die Epimerisierung ebenfalls enzymatisch mit *N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8) durchgeführt wird<sup>[7]</sup>. Durch Kopplung dieser mit der oben genannten Enzymreaktion wird 2 ohne Isolierung direkt weiter zu 4 umgesetzt. Durch Einsatz der beiden Enzyme in gelöster Form im Enzym-Membranreaktor (EMR) gelingt die Synthese von Neu5Ac 4 besonders ökonomisch.

Der EMR ist für den Einsatz gereinigter Enzyme erprobt<sup>[8]</sup>. Das Prinzip des EMR-Verfahrens ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Substrate werden mit konstantem

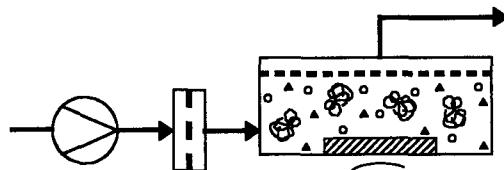


Abb. 1. Prinzip des Enzym-Membranreaktors mit Pumpe und Sterilfilter.

Fluß entsprechend einer konstanten Verweilzeit durch ein Sterilfilter in den Reaktor gepumpt. Die homogen gelösten Enzyme werden durch eine Ultrafiltrationsmembran im Reaktor zurückgehalten, die jedoch für die Substrat- und Produktmoleküle durchlässig ist. Die Anordnung wird vor dem

Einsatz sterilisiert, so daß man während der Synthese den Zusatz antibakterieller Mittel vermeidet, die später vom Produkt abgetrennt werden müßten.

Ausgehend von Batch-Experimenten und kinetischen Untersuchungen wurden die Bedingungen für den kontinuierlichen Einsatz der beiden Enzyme abgeleitet. Beide Enzyme können in einem pH-Bereich zwischen 7.0 und 8.0 ohne Aktivitäts- und Stabilitätsverlust eingesetzt werden. Da der EMR als kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor unter Auslaufbedingungen arbeitet, kann über den pH-Wert der Substratlösung der pH-Wert im Reaktor konstant bei 7.5 gehalten werden. Auf Puffersubstanzen kann vollständig verzichtet werden, so daß die spätere Aufarbeitung vereinfacht wird. Die Temperatur wurde aufgrund der Gleichgewichtslage der Reaktion von **2** und **3** zu **4** auf 25°C festgelegt ( $K_{25} = 28.7 \text{ L mol}^{-1}$ )<sup>[19]</sup>. Niedrigere Temperaturen verschieben die Gleichgewichtslage auf die Produktseite; für 10°C wurde  $K_{10}$  zu 83.1  $\text{L mol}^{-1}$  bestimmt. Allerdings fällt bei dieser Temperatur die Aktivität der Aldolase auf 20% derjenigen bei 25°C ab, so daß der höhere Umsatz nur mit einer großen Verweilzeit erzielt werden kann. Die Enzymkonzentration kann zum Ausgleich der niedrigeren Aktivität nicht beliebig vergrößert werden, da bei hohen Konzentrationen nur ein Teil des Proteins in der aktiven Konformation vorliegt.

Die Epimerase benötigt zur Aktivierung ATP und  $\text{Mg}^{2+}$ , so daß diese Substanzen der Substratlösung zugesetzt werden müssen<sup>[7]</sup>. Die Aldolase wird durch  $\text{MgCl}_2$  und ATP nicht und durch **1** nur schwach inhibiert (19% Aktivitätsrückgang für die Synthese bei Zusatz von 200 mM **1**). Da die Epimerase durch **3** inhibiert wird, kann kein mehrfacher Überschuß davon eingesetzt werden. Hohe Konzentrationen von **1** dagegen führen zu höheren intermediären Konzentrationen von **2**, die das Gleichgewicht der zweiten Reaktion in Richtung auf Neu5Ac verschieben. Dies ist auch im Hinblick auf die chromatographische Produktisolierung mit Anio-

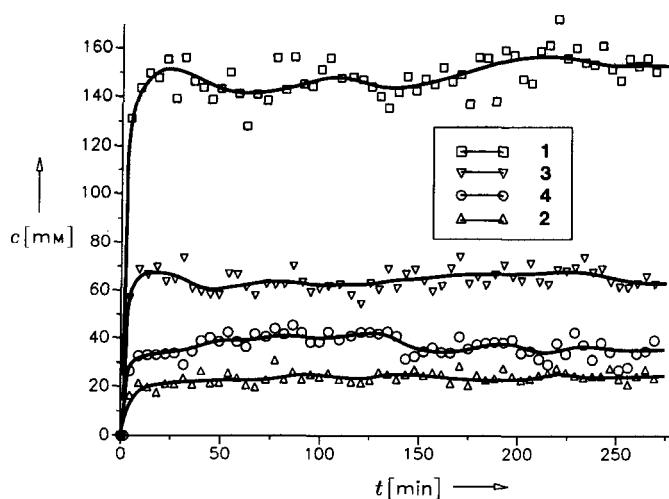


Abb. 2. Konzentrations-Zeit-Verlauf der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure **4** im Enzym-Membranreaktor. Ausgangskonzentrationen: **1** 200 mM, **3** 100 mM, ATP 5 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 mM, pH 7.5; 25°C; Epimerase 11.9  $\text{mg mL}^{-1}$ ; Aldolase 4.0  $\text{mg mL}^{-1}$ ; Verweilzeit 171 min.

nenaustauschern günstig, da **3** und **4** ähnliche  $\text{p}K_a$ -Werte im Bereich um etwa 2.2 zeigen. **1** und **2** werden nicht gebunden und können leicht wiedergewonnen werden. In Abbildung 2 ist der Konzentrations-Zeit-Verlauf für die kontinuierliche Synthese von **4** dargestellt. Nach einer Anfangsphase stellen sich für alle Komponenten konstante Konzentrationen ein.

Auf diese Weise gelang die Synthese und Isolierung von 15 g Neu5Ac mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 109 g  $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$  (bezogen auf das Reaktorvolumen). Ein Umsatzrückgang, der auf eine Desaktivierung der Enzyme hindeutet, wurde nicht beobachtet, und Nebenprodukte, die mangelnde Selektivität der Enzyme anzeigen, wurden nicht gefunden. **1** wird dabei zu 28% und **3** zu 35% umgesetzt; intermediär entstehendes **2** wird zu 64% umgesetzt. Für den Einsatz des Epimerengemisches von **1** und **2** wurden Umsätze zwischen 80 und 90% in 4–5 Tagen beschrieben, wobei **4** in bis zu 67% Ausbeute isoliert wurde<sup>[5]</sup>. Zur Erzielung des hohen Umsatzes wurde ein achtfacher Überschuß an **3** verwendet. Das Verhältnis von überschüssigem **3** zum entstehenden Produkt **4** hat jedoch einen großen Einfluß auf die Produktisolierung. Bei uns beträgt dieser Wert etwa 1.9, während er bei früheren Arbeiten bei etwa 8 liegt<sup>[5]</sup>. Je kleiner dieser Wert ist, desto einfacher gelingt die chromatographische Produktisolierung. Ebenso wird das notwendige Austauschervolumen reduziert, was zu einer Zeit- und Kostenersparnis führt.

Mit dem hier beschriebenen Verfahren, das in einen größeren Maßstab übertragen werden kann, ist es möglich, Neu5Ac **4** in größeren Mengen direkt aus preiswertem GlcNac **1** herzustellen.

### Experimentelles

Der EMR (Volumen 14.3 mL) wird mit 0.1proz. Peressigsäure sterilisiert. Die Ultrafiltrationsmembran (YM-5, Amicon, Witten) wird mit 1  $\text{mg mL}^{-1}$  Rinderserumalbumin vorbelegt. Nach Einspülern von 11.9  $\text{mg mL}^{-1}$  Epimerase (0.1  $\text{U mg}^{-1}$ ) und 4.0  $\text{mg mL}^{-1}$  Aldolase (8.5  $\text{U mg}^{-1}$ ) (beide Enzyme Toyobo, Osaka, Japan) wird die Substratlösung (1400 mL, 1 200 mM, 3 100 mM, ATP 5 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 mM, pH 7.5, kein Puffer) mit einer Verweilzeit von 171 min durch den Reaktor gepumpt. Durch Probenahme am Reaktorauslauf wird der pH-Wert kontrolliert und mit HPLC der Gehalt an den verschiedenen Komponenten bestimmt. HPLC-Bedingungen: Säule BioRad Aminex HPX-87H; Eluent 6 mM Schwefelsäure; Flow 0.9  $\text{mL min}^{-1}$  bei 65°C; Detektion photometrisch bei 205 nm. Die Produktisolierung erfolgt analog zu beschriebenen Verfahren durch Anionenaustauschchromatographie an Dowex 1X2, 200–400 mesh, Formiat-Form, durch Gradientenelution mit Ameisensäure (0 bis 0.5 M) [2]. Die Neuraminsäurefraktionen werden lyophilisiert. Ausbeute 15 g (35%). Das 200 MHz  $^1\text{H-NMR}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  stimmt mit Literaturdaten überein [5, 10]; Reinheit gemäß HPLC > 99%;  $[\alpha]_{D}^{25} = -28.8^\circ$  ( $c = 1$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ), identisch mit kommerziell erhältlicher **4**; korrekte Elementaranalyse.

Eingegangen am 30. Januar 1991 [Z 4412]

### CAS-Registry-Nummern:

**1**, 10036-64-3; **2**, 14131-64-7; **3**, 127-17-3; **4**, 21646-00-4; *N*-Acylglucosamin-2-epimerase [E.C.5.1.3.8], 37318-34-6; Aldolase, 9027-60-5.

- [1] R. Schauer: *Sialic Acids—Chemistry, Metabolism and Function*, Springer, Wien 1982, zit. Lit.
- [2] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **40** (1982) 131–234; *Methods Enzymol.* **138** (1987) 132–161.
- [3] P. Meindl, G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, *Virology* **58** (1974) 457; E. Zbiral, H. Brandstetter, R. Christian, R. Schauer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 781–786.
- [4] K. G. Nilsson, *Carbohydr. Res.* **188** (1989) 9–17; C. Augé, R. Fernandez-Fernandez, C. Gautheron, *ibid.* **200** (1990) 257–268, zit. Lit.
- [5] C. Augé, C. Gautheron, S. David, A. Malleron, B. Cavayé, B. Bouxom, *Tetrahedron* **46** (1990) 201–214; D. Comb, S. Roseman, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 497–499; M.-J. Kim, W.J. Hennen, M. Sweers, C.-H. Wong, *ibid.* **110** (1988) 6481–6486; E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *ibid.* **110** (1988) 7159–7163, zit. Lit.
- [6] C. T. Spivak, S. Roseman, *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 2403–2404.
- [7] A. Datta, *Biochemistry* **9** (1970) 3363–3370; S. Gosh, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **240** (1965) 1531–1536.
- [8] M.-R. Kula, C. Wandrey, *Methods Enzymol.* **136** (1987) 9–21; D. Vasic-Racki, M. Jonas, C. Wandrey, W. Hummel, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31** (1989) 215–222.
- [9]  $K = [\text{N-Acetylneuraminsäure}] \times [\text{N-Acetylmannosamin}]^{-1} \times [\text{Pyruvat}]^{-1}$ .
- [10] E. B. Brown, W.S. Brey, W. Weltner, *Biochim. Biophys. Acta* **399** (1975) 124–130.