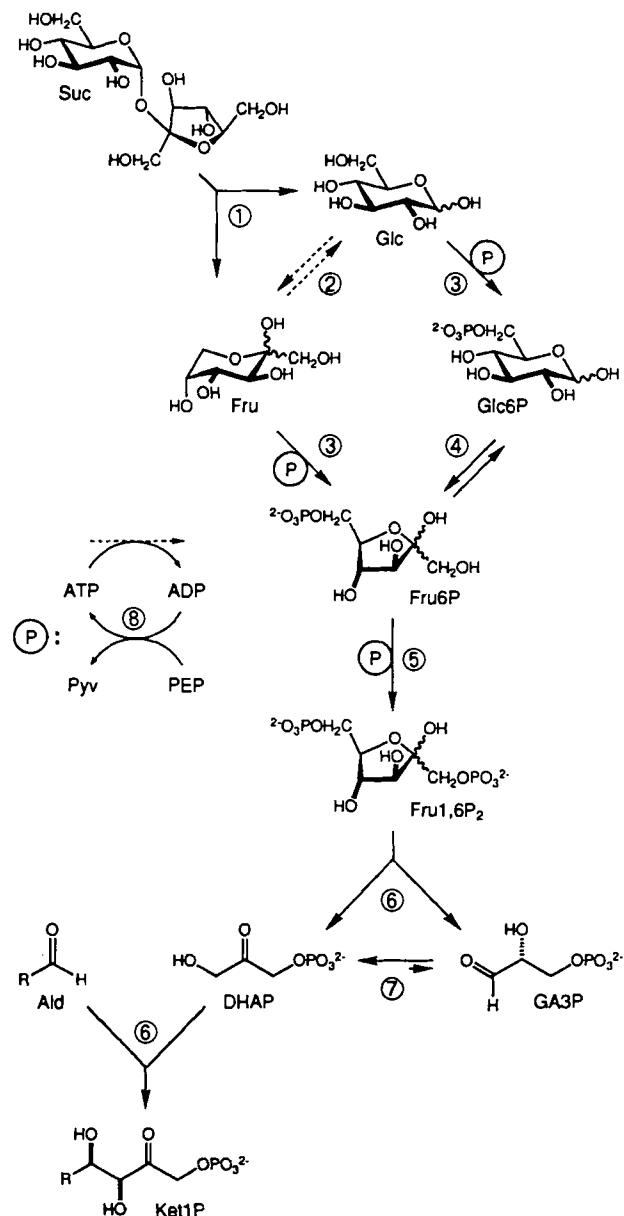


auf ψ -Scans; Strukturbestimmung mit direkten Methoden unter Verwendung von SHELEXS-86; die Positionen der C- und O-Atome wurden aus Differenzsynthesen ermittelt und die Wasserstoffatome auf berechneten Positionen nicht verfeinert. $C_{21}H_{26}CrO_9 \cdot 0.5 EtOAc$, trigonal. Raumgruppe $P\bar{3}_121$, $a = b = 11.5377(7) \text{ \AA}$, $c = 32.438(2) \text{ \AA}$, $V = 3739.6(8) \text{ \AA}^3$, $Z = 6$, $\rho_{\text{KBr}} = 1.379 \text{ g cm}^{-3}$; 2159 unabhängige Reflexe, davon 2104 mit $I > 0$ verwendet; $R = 0.057$, $R_s = 0.055$. Die Restdichte war geringer als 0.54 e \AA^{-3} . Die absolute Konfiguration ergab sich aus der anomalen Streuung des Cr-Atoms ($R = 0.095$, $R_s = 0.092$ für die enantiomorphe Struktur in Raumgruppe $P\bar{3}_121$). - Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftliche-technische Information mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-55874, der Autoren und des Zeitschriftenzitates angefordert werden.

[12] Herstellung von **10** ($F_p = 101^\circ \text{C}$; $[\alpha]_D^{20} + 160$, $c = 0.51$ in CHCl_3): H.-G. Schmalz, B. Millies, unveröffentlicht.

hältnismäßig preisgünstig und gut charakterisiert^[7, 8]. Für diese ungewöhnliche Häufung gekoppelter Reaktionen, wobei es sich um eine Neukombination natürlicher, kataboler Prozesse mit einer unphysiologischen, anabolen Synthese in vitro unter Verwendung isolierter, reiner Enzyme handelt, schlagen wir die Bezeichnung *künstlicher Metabolismus* vor.



Schema 1. Multienzymatische Eintopfsynthese von Ketose-1-phosphaten. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind bei den Phosphorylierungsschritten die Cyclen zur Cofaktorregenerierung (eingekreistes „P“) abgekoppelt worden. Abkürzungen: Suc = α -Sucrose; Glc = α -Glucose; Fru = α -Fructose; Glc6P, Fru6P = α -Glucose(Fructose)-6-phosphat; Fru1,6P₂ = α -Fructose-1,6-bisphosphat; GA3P = α -Glycerinaldehyd-3-phosphat; DHAP = Dihydroxyacetophosphat; Ald = Aldehyd; Ket1P = Ketose-1-phosphat; ADP, ATP = Adenosindiphosphat; Pyv = Pyruvat; PEP = Phosphoenolpyruvat. Beteiligte Enzyme: ① = Invertase (EC 3.2.1.26); ② = Xylose-Isomerase (EC 5.3.1.5); ③ = Hexokinase (EC 2.7.1.1); ④ = Glucose-6-phosphate-Isomerase (EC 5.3.1.9); ⑤ = Fructose-6-phosphate-Kinase (EC 2.7.1.11); ⑥ = Fructose-1,6-bisphosphate-Aldolase (EC 4.1.2.13); ⑦ = Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1); ⑧ = Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40).

Wir haben drei Varianten zur Herstellung von Fru1,6P₂ experimentell überprüft: 1) Fructose wird sukzessive zweifach phosphoryliert; 2) Glucose wird erst phosphoryliert und darauf in die Ketoseform isomerisiert, die weiter phosphoryliert wird (für die kostengünstigere direkte Isomerisie-

„Künstliche Metabolismen“ zur asymmetrischen Eintopfsynthese verzweigter Saccharide**

Von Wolf-Dieter Fessner* und Christiane Walter

Professor George A. Olah zum 65. Geburtstag gewidmet

Der Einsatz von Biokatalysatoren - in Form ganzer Zellen oder isolierter Enzyme - in der asymmetrischen Synthese erfreut sich wachsender Beliebtheit wegen des meist sehr hohen Grades an optischer Induktion, der hohen Selektivitäten und der milden Reaktionsbedingungen^[1]. Speziell bei Umwandlungen polyfunktionalisierter Verbindungen wie Kohlenhydraten sind die Vorteile ihres Einsatzes gut belegt^[2]. Für asymmetrische de-novo-Synthesen mit C-C-verknüpfenden Aldolasen^[3] haben wir nach neuen Wegen gesucht, das essentielle Substrat Dihydroxyacetophosphat (DHAP) effizient zugänglich zu machen^[4]. Hier beschreiben wir die Entwicklung von Multienzymsystemen, mit denen nachwachsende Rohstoffe als ökonomische DHAP-Quelle für Aldoladditionen mit der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA) genutzt werden können. Die Untersuchungen zu den Enzymkaskaden wurden dabei einerseits wegen des potentiellen präparativen Nutzens unternommen und andererseits, um die kooperativen kinetischen Effekte in einem derartigen multifaktoriell regulierten Multienzymsystem qualitativ und (halb)quantitativ in vitro studieren zu können^[5].

Da die meisten gängigen Enzyme um den pH-Wert 7.0 hinreichende Aktivität aufweisen, lassen sich Enzymensembles kombinieren, die seriell oder parallel bestimmte Umsetzungen gemeinsamer Substrate spezifisch katalysieren, wodurch strukturell tiefgreifende Umwandlungen als Eintopfsynthese realisierbar werden. Aufbauend auf der zentralen Funktion der FruA in der Glycolyse zur Spaltung und - in Kombination mit der Triosephosphat-Isomerase - Symmetrisierung von Fructose-1,6-bisphosphat (Fru1,6P₂) in C₃-Fragmente (einer Reaktion, die präparativ DHAP in situ liefert^[6]), haben wir weitere Schritte so kombiniert (Schema 1), daß wahlweise auch Glucose, Fructose oder Sucrose als Vorstufen eingeschlossen werden. Alle beteiligten Enzyme (vgl. Legende zu Schema 1) sind kommerziell erhältlich, ver-

[*] Dr. W.-D. Fessner, C. Walter
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Albertstraße 21, W-7800 Freiburg

[**] Enzyme in der Organischen Synthese, 3. Mitteilung. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fe 244/2-1), die Wissenschaftliche Gesellschaft Freiburg und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. D. G. Fraenkel, Harvard Medical School, Boston, für rekombinante Bakterienstämme, Dipl.-Chem. O. Eyrich für gereinigte PFK-2 aus *E. coli* und Dipl.-Chem. G. Sinerius für eine Probe von 7. – 2. Mitteilung [3b].

rung von Glucose in Fructose, Weg ②, stand uns keine adäquate Enzympräparation zur Verfügung^[9]); 3) Sucrose wird durch Invertase zu den Monosacchariden hydrolysiert, die dann über die beiden zuerst genannten Wege konvergent abreagieren, wobei vorteilhaft die Akzeptanz der Hexokinase für beide freien Zucker ausgeschöpft wird. In toto werden so aus Glucose oder Fructose je zwei, aus Sucrose vier DHAP-Äquivalente gewonnen. Zwei weitere Variationen, nämlich die wegen Verminderung der erforderlichen Phosphatdonoräquivalente noch attraktivere Verwendung der Sucrose- ($\text{Suc} + \text{P}_i \rightarrow \text{Fru} + \text{Glc}1\text{P}$) oder α -Glucan-Phosphorylase ($\text{Glc}_n + \text{P}_i \rightarrow \text{Glc}_{n-1} + \text{Glc}1\text{P}$), müssten wegen hoher Enzympreise und rheologischer Komplikationen als unpraktikabel verworfen werden.

Die kinetische Verfolgung der von Sucrose ausgehend längsten Sequenz mit sechs enzymkatalysierten Reaktionsschritten (Abb. 1) zeigt folgende Effekte auf: 1) Fructose und Glucose werden mit nahezu gleicher Geschwindigkeit durch Hexokinase phosphoryliert; 2) der Zuwachs an Fru6P ist wegen Äquilibrierung zum thermodynamisch stabileren Glc6P verzögert; 3) v_{max} der Fructose-6-phosphat-Kinase (Phosphofructokinase, PFK) bleibt trotz zweifach höherer Dosierung limitierend; 4) erst mit Erreichen einer relativ hohen Grenzkonzentration an Fru6P ($\geq 10 \text{ mM}$ ^[10]) beginnt eine Phase annähernd linearer Produktion von Fru1,6P₂ (ca. 20–35 h). Die beiden zuletzt genannten Umstände sind mit

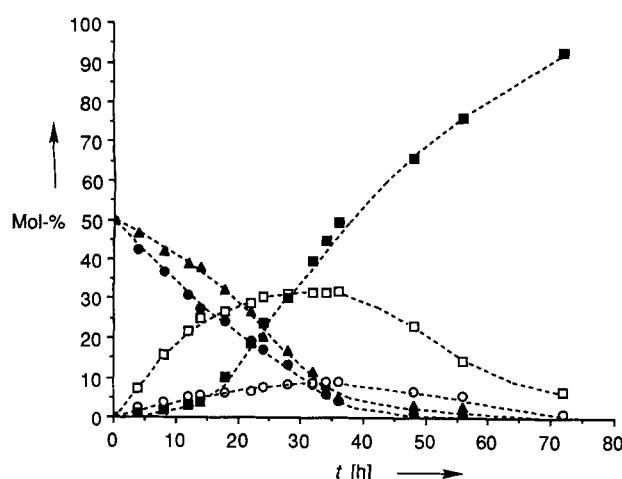


Abb. 1. Verlauf der multienzymatischen Synthese von Fructose-1,6-bisphosphat aus Sucrose entsprechend Schema 1 (100 mM Suc, 500 mM PEP, 10 mM MgCl₂, 1 U HK, 3 U PK, 2 U PFK, 0.25 U PGI; 0.5 mL pH 6.8; 25 °C), bestimmt anhand von Assays nach [7 b]. Aus analytischen Gründen wurden die Folgereaktionen erst nach vollständiger Hydrolyse durch Invertase (100 U) gestartet. ● = D-Glucose; ▲ = D-Fructose; ■ = D-Glucose-6-phosphat; ○ = D-Fructose-6-phosphat; ▨ = D-Fructose-1,6-bisphosphat.

den Ergebnissen von Inhibitionsstudien in Einklang, nach denen die PFK als das zentrale regulatorische Element der Glykolyse durch zahlreiche Effektoren gehemmt wird (z.B. ATP, PEP, Pyruvat). Konsequenzen der vielschichtigen Inhibition machen sich nachdrücklich bei höheren Konzentrationen aller Reaktanten bemerkbar. In der Tat können diese Komplikationen reduziert werden, indem das allosterisch weniger regulierte Isoenzym aus *E. coli*, die PFK-2^[11], eingesetzt wird (Abb. 2). Während z.B. $\geq 150 \text{ mM}$ PEP die Aktivität des Säugerenzysms nahezu vollständig unterdrückt (<5%), fällt die des mikrobiellen Enzyms auch bei noch höheren Konzentrationen (>300 mM) nicht unter 30%, was auf eine nicht-kompetitive Hemmung zurückzuführen ist.

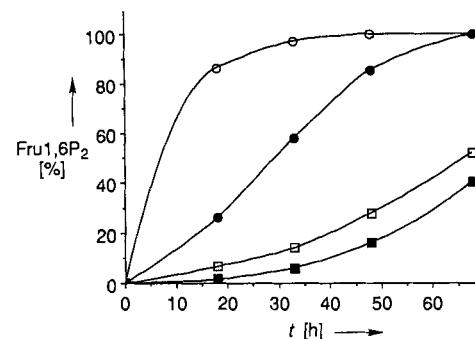
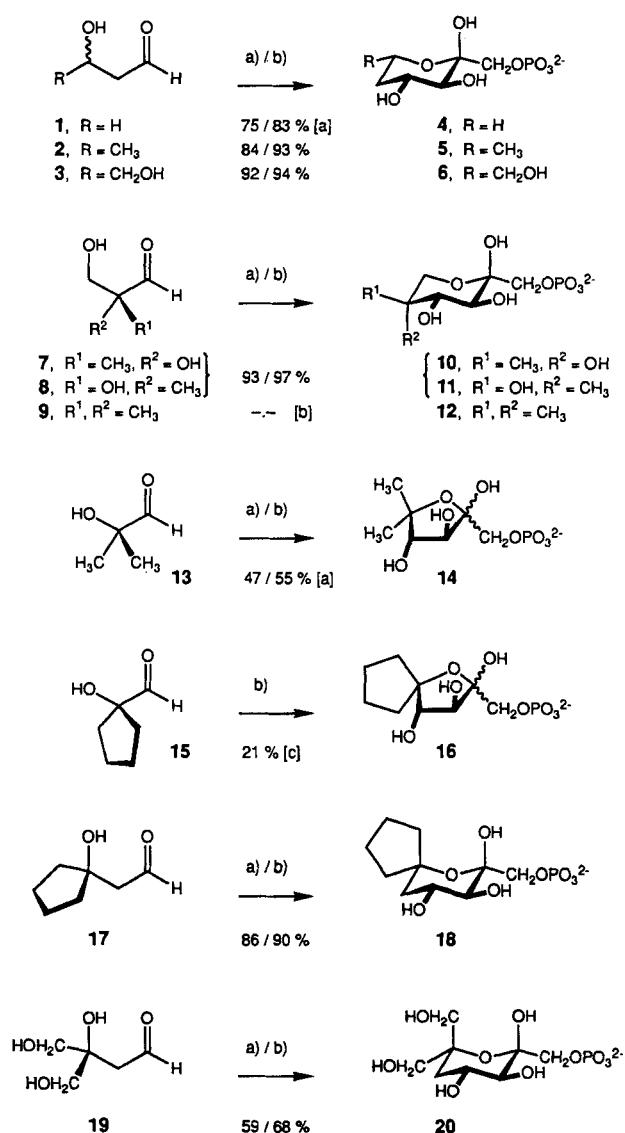


Abb. 2. Vergleich multienzymatischer Synthesen von Fructose-1,6-bisphosphat aus Sucrose in Abhängigkeit von der Art der Fructose-6-phosphat-Kinase (PFK) und der PEP-Konzentration. a) PFK aus Kaninchenmuskel (● 25 mM, ■ 100 mM PEP); b) PFK-2 aus *E. coli* (○ 25 mM, ▨ 100 mM PEP). Assays nach [7 b].

Als problemlos erwies sich die Anknüpfung der Spaltungs- und Syntheseschritte mit der FruA (aus Kaninchenmuskel), womit insgesamt sieben Enzyme kooperativ tätig



Schema 2. Enzymatische Aldoladditionen. a) Multienzymatische Eintopfsynthese nach Schema 1 ausgehend von Sucrose, Glucose oder Fructose. b) Synthese ausgehend von reinem Fructose-1,6-bisphosphat unter FruA-TPI-Katalyse. [a] Aldehydzugabe erfolgte nach quantitatativem Umsatz von PEP. [b] Keine Bildung von Aldoladdukt nachweisbar. [c] Die Reaktion wurde vorzeitig abgebrochen (umsatzbezogene Ausbeute $\geq 50\%$).

sind. Während die Bildung von Fru1,6P₂ durch Verbrauch des Enolesters PEP irreversibel ist, sind die FruA-katalysierten Synthesen reversibel; das Gleichgewicht liegt jedoch aus Gründen der Ladungsentropie auf der Seite einfacher phosphorylierter Produkte, und deren Bildung wird durch einen geringen Überschuß an Aldehyd weiter begünstigt. Durch die geringere Geschwindigkeit der Aldolasereaktion mit nicht-natürlichen Substrataanaloga ist die Aldoladdition der limitierende Schritt im Gesamtsystem. Um dies zu kompensieren, ist eine umgekehrte proportional der Substratqualität höhere Dosierung der FruA erforderlich. Die Leistungsfähigkeit der Methode haben wir in präparativen Ansätzen (0.1–5 mmol Suc \approx 0.4–20 mmol DHAP) mit einer Reihe von Aldehyden getestet, die speziell auch unter dem Gesichtspunkt zunehmender sterischer Hinderung ausgewählt waren, um die Substratazeptanz der Kaninchenmuskel-FruA^[6] weiter zu kartieren (Schema 2).

Hierbei zeigte sich, daß geminale Dialkylsubstitution an C-2 durchaus noch toleriert wird; allerdings ist bei Derivaten des Glykolaldehyds (dritter Substituent OH; 7/8 > 13 > 15) die Grenze bereits erreicht, während höhere Homologe (z.B. 9) ähnlich wie Pivalaldehyd nicht mehr akzeptiert werden. In Einzelfällen war die Inhibition der Enzyme durch hohe Konzentrationen an Aldehyd problematisch (z.B. erforderte die allmäßliche Freisetzung von Acrolein aus 1^[12] eine verzögerte Zugabe). Relativ zu parallel durchgeföhrten Synthesen ausgehend von reinem Fru1,6P₂ (vgl. Schema 2, Sequenzen b) werden in den Multienzymreaktionen vergleichbare Ausbeuten erreicht. Einschränkungen betreffen sehr schlechte Substrataanaloga ($v_{rel} \leq 1\%$ ^[6]) wie 15, da die Isolierung der Produkte neben anderen phosphorylierten Komponenten stark erschwert wird.

Mit der hier vorgestellten Methode werden alkylierte (10/11, 14), spiro-anellierte (16, 18) und verzweigtkettige Saccharide (20) sowie Desoxyzucker (4^[12], 5^[6], 6) zugänglich (Tabelle 1), die mit chemischen Verfahren nur schwer herstellbar sind. Die Erweiterung dieses Produktspektrums

Tabelle 1. NMR-Daten der Aldoladdukte [a].

6:	¹ H-NMR: $\delta = 4.06$ (m, 6-H), 3.96 (ddd, 4-H), 3.87 (dd, 1 _a -H), 3.79 (dd, 1 _b -H), 3.66 (dd, 7 _a -H), 3.58 (dd, 7 _b -H), 3.49 (d, 3-H), 1.97 (ddd, 5 _{ax} -H), 1.47 (quart, 5 _{ax} -H), $J_{1a,1b} = 11.1$, $J_{1a,p} = 7.7$, $J_{1b,p} = 5.7$, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{4,5ax} = 11.5$, $J_{4,5ax} = 5.1$, $J_{5ax,5ax} = 12.6$, $J_{5ax,6} = 12.2$, $J_{5ax,6} = 2.1$, $J_{6,7a} = 3.3$, $J_{6,7b} = 6.1$, $J_{7a,7b} = 12.1$; ¹³ C-NMR: $\delta = 98.3$ (C-2), 73.2 (C-3), 69.7 (C-6), 68.2 (C-4), 67.1 (C-1), 64.3 (C-7), 34.7 (C-5), $J_{C-1,p} = 4.9$, $J_{C-2,p} = 7.2$.
10 (74%):	¹ H-NMR: $\delta = 3.93$ (dd, 1 _a -H), 3.88 (d, 6 _{ax} -H), 3.83 (dd, 1 _b -H), 3.77 (d, 4-H), 3.65 (d, 3-H), 3.51 (d, 6 _{ax} -H), 1.20 (s, CH ₃), $J_{3,4} = 10.0$, $J_{6ax,6ax} = 12.5$; ¹³ C-NMR: $\delta = 98.3$ (C-2), 75.8 (C-5), 73.4 (C-4), 68.8 (C-3), 67.7 (C-1), 66.8 (C-6), 20.8 (CH ₃).
11 (26%):	¹ H-NMR: $\delta = 3.90$ (m, 1-H), 3.85 (d, 4-H), 3.80 (d, 6 _{ax} -H), 3.57 (d, 3-H), 3.39 (d, 6 _{ax} -H), 1.27 (s, CH ₃), $J_{3,4} = 10.0$, $J_{6ax,6ax} = 11.7$.
14:	¹ H-NMR: δ (β -Anomer; 86%) = 4.14 (d, 3-H), 4.01 (d, 4-H), 3.74 (d, 1-H), 1.36 (s, CH ₃), 1.18 (s, CH ₃), $J_{1,p} = 6.8$, $J_{3,4} = 9.0$; δ (α -Anomer; 14%) = 4.11 (d, 3-H), 4.01 (d, 4-H), 3.83 (d, 1-H), 1.32 (s, CH ₃), 1.27 (s, CH ₃), $J_{3,4} = 7.5$; ¹³ C-NMR: $\delta = 99.2$ (C-2), 80.6 (C-5), 80.4, 75.8 (C-3, -4), 67.0 (C-1), 28.4, 23.3 (2CH ₃), $J_{C-1,p} = 4.3$, $J_{C-2,p} = 7.8$.
18:	¹ H-NMR: $\delta = 4.07$ (ddd, 4-H), 3.82 (dd, 1 _a -H), 3.68 (dd, 1 _b -H), 3.55 (d, 3-H), 2.10 (dd, 5 _{ax} -H), 1.70 (t, 5 _{ax} -H), 1.86–1.47 (m, Cyclopentan-H), $J_{1a,1b} = 10.8$, $J_{1a,p} = 6.8$, $J_{1b,p} = 5.3$, $J_{3,4} = 9.8$, $J_{4,5ax} = 11.7$, $J_{4,5ax} = 4.5$, $J_{5ax,5ax} = 12.7$; ¹³ C-NMR: $\delta = 99.6$ (C-2), 73.2 (C-3), 72.8 (C-6), 67.3 (C-1), 66.5 (C-4), 42.5, 41.1 (C-1', -4'), 37.7 (C-5), 24.1, 21.6 (C-2', -3'), $J_{C-1,p} = 3.2$, $J_{C-2,p} = 8.1$.
20:	¹ H-NMR: $\delta = 4.12$ (ddd, 4-H), 3.93–3.49 (m, 7-, 8-H), 3.43 (d, 3-H), 2.05 (5 _{ax} -H), 1.73 (t, 5 _{ax} -H), $J_{3,4} = 11.8$, $J_{4,5ax} = 11.3$, $J_{4,5ax} = 6.8$, $J_{5ax,5ax} = 13.5$; ¹³ C-NMR: $\delta = 99.1$ (C-2), 78.9 (C-6), 72.7 (C-3), 68.4 (C-1), 65.2 (C-4), 65.1, 63.4 (C-7, -8), 34.1 (C-5), $J_{C-1,p} = 4.1$, $J_{C-2,p} = 7.3$.

[a] NMR-Spektren wurden nach Ionenaustausch zur Na⁺-Form in D₂O bei pH 7.0 gemessen. ¹H-NMR-Werte (400.1 MHz) relativ gegen Standard Natrium-3-trimethylsilyl-[²H₄]propionat (TSPNa) ($\delta = 0.00$), ¹³C-NMR (100.6 MHz) gegen CH₃CN ($\delta = 1.30$); Kopplungskonstanten in Hz.

durch Verwendung von Aldolasen anderer Stereopräferenz^[3] sollte ein systematisches Studium dieser ungewöhnlichen Zuckerderivate ermöglichen. Wir haben damit demonstriert, daß auf Aldoladditionen aufbauende Multienzymsynthesen praktikable und leistungsfähige Verfahren für komplexe Umwandlungen von Sacchariden und verwandten Verbindungen sind und daß diese Verfahren vorteilhaft zur Wertschöpfung aus nachwachsenden Rohstoffen eingesetzt werden können, wobei den Aldolasen als Katalysatoren zur breit anwendbaren, hoch diastereoselektiven C-C-Kernverknüpfung eine besondere Rolle zukommt.

Arbeitsvorschrift

Eine wässrige Lösung von Sucrose (1.71 g, 5 mmol), PEP-K (5.10 g, 25 mmol), MgCl₂ (100 mg, 0.5 mmol) und einer katalytischen Menge ATP (60 mg, 100 µmol) wurde auf pH 6.8 eingestellt. Nach Zugabe einer wässrigen Lösung von 3 (50 mmol; Gesamtvolume 200 mL) wurden Invertase (Hefe; 1000 U), Pyruvat-Kinase (Kaninchenmuskel; 300 U), Hexokinase (Hefe; 100 U), Glucose-6-phosphat-Isomerase (Hefe; 25 U^[7a]), Fructose-6-phosphat-Kinase (Kaninchenmuskel; 200 U), Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Kaninchenmuskel; 500 U) und Triosephosphat-Isomerase (Hefe; 500 U) zupipettiert und der Ansatz bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Umsatz wurde dünnenschichtchromatographisch (gesättigte Ammoniaklösung/EtOH 1:1) sowie anhand enzymatischer Assays auf PEP/Pyruvat und Fru1,6P₂^[7a] verfolgt und das Zuckerkomplex 6 mit Ionenaustauschverfahren^[3a] isoliert.

Eingegangen am 18. Dezember 1991 [Z 5078]

CAS-Registry-Nummern:

ATP, 56-65-5; Fructose, 57-48-7; Sucrose, 57-50-1; Glucose, 50-99-7; Fructose-1,6-bisphosphat, 488-69-7; Invertase, 9001-57-4; Pyruvat-Kinase, 9001-59-6; Hexokinase, 9001-51-8; Glucose-6-phosphat-Isomerase, 9001-41-6; Fructose-6-phosphat-Kinase, 9001-80-3; Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, 9024-52-6; Triosephosphat-Isomerase, 9023-78-3.

- [1] a) G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617–638; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617–638; b) J. B. Jones, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351–3403; c) D. H. G. Crout, M. Christen in *Modern Synthetic Methods* (Hrsg.: R. Scheffold), Springer, Berlin, **1989**, S. 1–114; d) S. Servi, *Synthesis* **1990**, 1–25; e) R. Csuk, B. I. Gläntzer, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49–97.
- [2] a) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5365–5422; b) D. G. Druckhammer, W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, C. M. Gautheron, T. Krach, C.-H. Wong, *Synthesis* **1991**, *499*–525.
- [3] a) W.-D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badia, J. Aguilar, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 596–599; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555–558; b) W.-D. Fessner, O. Eyrisch, *ibid.* **1992**, *104*, 76–78 bzw. **1992**, *31*, 56–58.
- [4] Chemische Synthese: R. L. Pederson, J. Esker, C.-H. Wong, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2643–2648. Enzymatische Synthese: D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7019–7027.
- [5] a) M. de Luca, L. J. Kricka, *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *226*, 285–291; b) G. F. Betts, D. K. Srivastava, *J. Theor. Biol.* **1991**, *151*, 155–167.
- [6] M. D. Bednarski, E. S. Simon, N. Bischofberger, W.-D. Fessner, M.-J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 627–635.
- [7] a) Kommerzielle Enzyme waren von Sigma. Aktivitäten wurden photometrisch nach Standardverfahren gemessen; vgl. A. U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1984**. Die Präparationen von Hexo- und Pyruvakinase enthielten nennenswerte Mengen an Glucose-6-phosphat-Isomerase. b) Die Konzentrationen der Zucker und Zuckerderivate wurden enzymatisch nach Schema 1 über ihre DHAP-Äquivalente bestimmt, wobei dem photometrischen Standardassay (Glycerophosphat-Dehydrogenase/NADH) sukzessive die retrograden Enzyme/Cosubstrate zugesetzt wurden.
- [8] Phosphoenolpyruvat ist gut im Molmaßstab zugänglich: B. L. Hirschtein, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3765–3766.
- [9] Die technisch zur Herstellung von HFC (Glc/Fru-Sirup) bedeutsame Xylose/Glucose-Isomerase wird nur in immobilisierter Form angeboten.
- [10] K_m der Kaninchenmuskel-PFK für Fru6P \approx 43 µM; T. A. W. Koerner, R. J. Voll, A.-L. E. Ashour, E. S. Younathan, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 2983–2986.
- [11] Das Enzym wurde nach bekannten Verfahren aus einem überexprimierten den Rekombinanten-Stamm isoliert: a) J. Babul, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 4350–4355; b) F. Daldal, J. Babul, V. Guixé, D. F. Fraenkel, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *126*, 373–379; c) F. Daldal, *J. Mol. Biol.* **1983**, *168*, 285–305.
- [12] J. R. Durrwachter, D. G. Druckammer, K. Nozaki, H. M. Sweers, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7812–7818.