

Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren? **

Von Hans-Martin Müller und Dieter Seebach *

Neben den Polyisoprenoiden, Polypeptiden, Polysacchariden und Polynucleotiden kommt in der Natur eine weitere Gruppe von Biopolymeren, die Poly(hydroxyfettsäureester), vor. Obwohl der häufigste Vertreter, Poly[(*R*)-3-hydroxybuttersäure] P(3-HB), von Lemoigne schon in den zwanziger Jahren als Speichermaterial des Mikroorganismus *Bacillus megaterium* identifiziert wurde (bis über 12000 3-HB-Einheiten), wird das allgegenwärtige Vorkommen dieser Biopolymere und ihre Bedeutung erst in allerletzter Zeit zur Kenntnis genommen. Vor allem durch die Arbeiten von Reusch wurde klar, daß niedermolekulare P(3-HB) (100–200 3-HB-Einheiten) in den Zellmembranen von prokaryotischen und eukaryotischen Organismen vorkommt, wobei ihre Funktion hier weitgehend unbekannt ist; es wurde vorgeschlagen, daß ein Komplex aus P(3-HB) und Calciumpolyphosphat als Ionenkanal durch Membranen wirkt, ja es wurde spekuliert, daß P(3-HB) am Transport von DNA durch Zellwände beteiligt ist. Im vorliegenden Artikel werden die folgenden Themen behandelt: Metabolismus von P(3-HB) und analoger Polyester beim Aufbau und Abbau der Speichermaterialien; P(3-HB) als Ausgangsmaterial für chirale Synthesebausteine; Herstellung von cyclischen Oligomeren (Oligoliden) aus bis zu zehn 3-HB-Einheiten und Kristallstrukturanalyse dieser Verbindungen; das hochpolymere Biocopolymer aus Hydroxybutter- und -valeriansäure (BIOPOL) als biologisch abbaubarer Kunststoff; nicht-biologische Herstellung von Polyhydroxyfettsäureestern aus 3-Hydroxycarbonsäuren und den zugehörigen β -Lactonen; gezielte Synthese von linearen Oligomeren mit enger Molekulargewichtsverteilung von bis zu etwa 100 (*R*)-3-Hydroxybuttersäurebausteinen nach einem exponentiellen Fragmentkupplungsverfahren; Struktur der Polyester und Vergleich mit anderen Polymeren; Befunde, die zur Postulierung eines P(3-HB)-Ionenkanals durch Zellwände führten; Modellierung von Helices unterschiedlicher Durchmesser aus P(3-HB) unter Verwendung der aus Kristallstrukturdaten von Oligoliden gewonnenen Parameter; Bildung eines Kronenesterkomplexes und Ionentransportexperimente mit dem Triolid aus 3-HB. Der Artikel ist ein Beispiel dafür, welche Beiträge organische Synthesechemiker zu wichtigen biologischen Fragestellungen im Rahmen einer interdisziplinären Zusammenarbeit leisten können.

[*] Prof. Dr. D. Seebach, Dr. H.-M. Müller
Laboratorium für Organische Chemie
der Eidgenössischen Technischen Hochschule
ETH-Zentrum
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)

[**] Dieser Übersichtsartikel enthält Teile der Dissertation von H.-M. Müller
(Dissertations-Nr. 9685, ETH Zürich, 1992).

1. Einleitung – Vorkommen und Bedeutung von Polyhydroxyfettsäureestern in der Natur

Polyhydroxysäuren (PHAs^[1]) werden von Mikroorganismen unter nährstofflimitierenden Bedingungen in Gegenwart von C-Quellen (Kohlenstoff im Überschuß) und von

Energie gebildet. Infolge ihrer Schwerlöslichkeit und der hohen Molekulargewichte erzeugen Polyhydroxysäuren keinen osmotischen Druck und sind darum ideale Speicherstoffe^[2]. In dieser Funktion kommen sie bei Mikroorganismen weit häufiger als beispielsweise Glycogen, Polyphosphate oder Fette vor^[3, 4]. Die bekannteste PHA ist Poly-(*R*)-3-Hydroxybuttersäure [P(3-HB)], ein lineares, unverzweigtes Homopolymer, das aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-Einheiten aufgebaut ist. Die in der Literatur angegebenen Molekulargewichte schwanken beträchtlich; sie hängen vom Mikroorganismus, den Kultivierungsbedingungen und der Isolierungsmethode ab und liegen typischerweise zwischen $1 \times 10^5 - 7.5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ($n = 2500 - 9000$, Polydispersität (M_w/M_n) = 1.7–2.9^[5]), können aber auch über eine Million g mol^{-1} betragen. Das Copolymer aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure und (*R*)-3-Hydroxyvaleriansäure P(3-HB/3-HV) hat wegen seiner Polypropylen-ähnlichen Materialeigenschaften eine gewisse kommerzielle Bedeutung erlangt und wird von ICI unter dem Namen BIOPOL vertrieben. P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) sind biologisch abbaubar, und ihre Herstellung basiert auf nachwachsenden Rohstoffen^[6]. Aufgrund dieser Eigenschaften werden in diese Polymere hohe Erwartungen gesetzt, was sich unter anderem an deren häufiger Erwähnung in der Presse^[7], den in immer kürzeren Abständen erscheinenden Übersichten^[1b, 4, 5, 8–13] und der steigenden Anzahl von Patenten^[14] bemerkbar macht.

P(3-HB) wurde erstmals 1925 von Lemoigne beschrieben^[15], der dieses Polymer später aus *Bacillus megaterium* isolierte und identifizierte^[16]. Seither wurde P(3-HB) in einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Mikroorganismen gefunden^[11], beispielsweise in Archaeobakterien, Gram-negativen wie Gram-positiven Eubakterien und Cyanobakterien. Neben einigen phototrophen Mikroorganismen sind *Clostridium* und *Syntrophomonas* die einzigen strikten Anaerobier, in denen P(3-HB) nachgewiesen wurde. Interessanterweise

bilden Enterobakterien (Darmbakterien) wie *Escherichia coli* normalerweise keine P(3-HB) als Speichermaterial^[11, 17, 18].

Außer als Speicherstoff kommt – niedriger molekulare – P(3-HB) auch in Bakterienmembranen und in Gewebe von Pflanzen und Tieren vor, wo sie mutmaßlich Teil eines Ionenkanals ist (siehe Abschnitt 7)^[19–23]. Neuerdings wurde sie auch im Plasma von Menschenblut in relativ großen Mengen nachgewiesen (zwischen 0.6 und 18.2 mg pro Liter), und zwar hauptsächlich an die sogenannten Low-Density-Lipoproteine (20–30 %) und an Albumin (70–80 %) gebunden^[24].

Schulz und Toft zeigten, daß das (*R,R*)-Hydroxybuttersäure-Dimer bei gewissen Spinnenspezies der Linyphia-Familie als Pheromon wirkt. Es veranlaßt die Männchen, das Netz unbegatteter Weibchen einzurollen, möglicherweise um so anzuzeigen, daß das Weibchen nun „besetzt“ ist. Dieses Verhalten wird an Netzen bereits begatteter Weibchen nicht beobachtet^[25].

Auch wurde P(3-HB) als mögliche Energiequelle für die Stickstoff-Fixierung der *Rhizobien* diskutiert^[12, 17a, 26].

2. Polyhydroxysäuren als zelluläre Speichermaterialien

Das quantitativ wichtigste Vorkommen von Poly(3-hydroxyalkansäureestern) wird zum Speichern von kohlenstoffhaltigem Material und von Reduktaseäquivalenten in den Zellen von prokaryotischen Mikroorganismen (bis zu 90 % des Zelltrockengewichtes!) eingesetzt. Die Biochemie des Aufbaus und des Abbaus von hochmolekularer P(3-HB) ist intensiv untersucht worden. Dabei wurde auch geklärt, welche anderen Hydroxysäuren in natürlichen oder nicht-natürlichen Nährmedien in die Polymere eingebaut werden können. Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme wurden



Dieter Seebach, 1937 in Karlsruhe geboren, studierte an der dortigen Universität Chemie. 1964 wurde er mit einer Arbeit über kleine Ringe und Peroxide bei R. Criegee promoviert. Nach einem fast zweijährigen Aufenthalt an der Harvard University als Postdoktorand (bei E. J. Corey) und Lecturer kehrte er nach Karlsruhe zurück und habilitierte sich 1969 mit einer Arbeit über S- und Se-stabilisierte Carbanion- und Carbenderivate. 1971 folgte er einem Ruf an die Universität Gießen und 1977 einem an die Eidgenössische Technische Hochschule in Zürich. Er hatte Gastprofessuren an den Universitäten in Madison (Wisconsin), Straßburg, München (TU), Kaiserslautern sowie am Caltech (Pasadena) und am Max-Planck-Institut in Mülheim. Sein Hauptarbeitsgebiet ist die Entwicklung neuer Synthesemethoden; daneben werden mechanistische Untersuchungen, Strukturbestimmungen und Naturstoffsynthesen durchgeführt. Neuerdings nimmt das in dieser Übersicht besprochene Thema einen immer größeren Raum ein.



Hans-Martin Müller wurde 1962 in Herisau/Appenzell Ausserrhoden, Schweiz, geboren. Nach einer Lehre als Chemielaborant studierte er an der Ingenieurschule beider Städte Basel Chemie (Diplom 1985). Anschließend folgte ein Chemiestudium an der ETH Zürich (Diplom 1988). Er wurde 1992 bei D. Seebach mit einer Dissertation über Polyhydroxybuttersäuren promoviert und trat im selben Jahr in die Firma Sandoz ein.

identifiziert und die entsprechenden Gene in andere Mikroorganismen gentechnologisch implantiert und dort exprimiert.

2.1. Intrazelluläres Vorkommen von Polyhydroxysäureestern

PHAs kommen im Cytoplasma der Zelle in Form von Einschlüssen, den sogenannten Granulen, mit einem typischen Durchmesser von 100–800 nm vor. Man konnte zeigen, daß diese Einschlüsse von einer Art Micelle (Monolayer) umschlossen sind, aber nicht von einer Einheit, die aus zwei Schichten wie eine typische Membran aufgebaut ist (Lipoprotein-Doppelschicht oder Bilayer)^[27]. Je nach Bakterium kann auch das PHA-Synthase- und Depolymerase-System an diese Hülle gebunden sein. Gereinigte Granulen aus *B. megaterium* bestehen aus 97.7% P(3-HB), 1.8% Protein und 0.5% Lipiden^[5, 28].

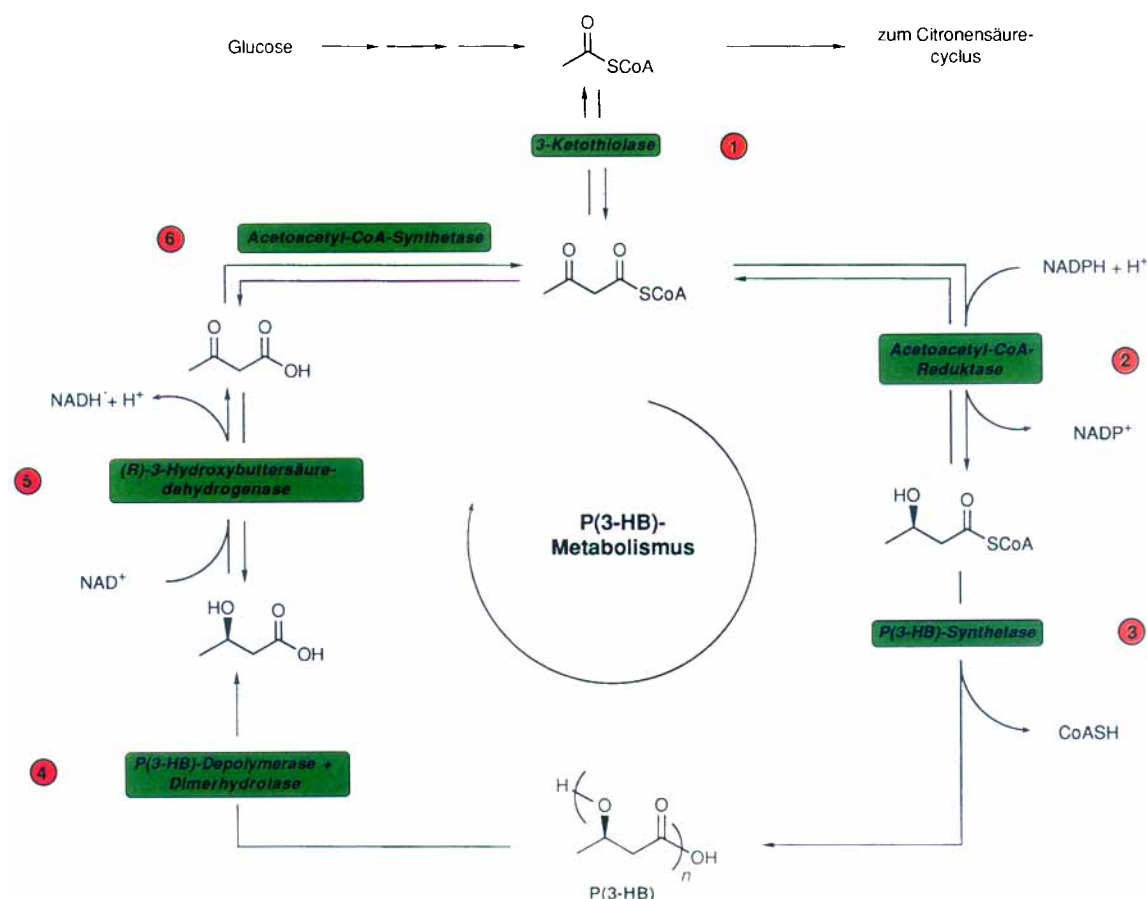
Die Struktur von P(3-HB) innerhalb dieser Einschlüsse war bis vor kurzem umstritten. Es stand lediglich fest, daß die Behandlung mit Lösungsmitteln, Basen oder Säuren sowie Kühlen oder Heizen deren enzymatischen Abbau hemmt^[29]. Kürzlich konnten Doi et al.^[30] mit Röntgenbeugung und Sanders et al. (Lit.^[31a], aber auch^[31b]) mit hochauflösender ¹³C-NMR-Spektroskopie zeigen, daß P(3-HB) innerhalb der nativen Einschlüsse amorph vorliegt. Dies ist besonders überraschend, da isolierte P(3-HB) normalerweise eine Kristallinität zwischen 60–70% aufweist^[32]. Über die Ursachen ist man sich noch nicht im klaren; so postulierten

Sanders et al. Wasser als Weichmacher, während Doi et al. einer bisher noch unbekannten Lipidkomponente eine kristallisationshemmende Wirkung zuschreibt. Amorphe P(3-HB) ist wahrscheinlich aufgrund des thermodynamisch ungünstigeren Zustands leichter enzymatisch abbaubar als solche mit einem hohem Anteil an kristallinen Domänen.

2.2. Poly[(R)-3-hydroxybuttersäure]-Metabolismus

Der intrazelluläre P(3-HB)-Stoffwechsel ist ein cyclischer Prozeß, an dem gemäß Schema 1 sieben Enzyme beteiligt sind. Er wurde bisher vor allem durch Schlegel et al. und Dawes et al. in *Alcaligenes eutrophus*^[33–40], von Dawes et al. in *Azotobacter beijerinckii*^[41–43], von Fukui et al. und Tomita et al. in *Zoologea ramigera*^[44–49] und etwas weniger detailliert von Merrick et al. und Doudoroff et al. in *Rhodospirillum rubrum* und *Bacillus megaterium*^[29, 50–56] untersucht, ist aber auch in anderen Mikroorganismen erforscht worden^[1b, 12].

Mit Buttersäure als Substrat (gilt wahrscheinlich auch für die höheren Carbonsäuren) wurde von Doi et al. für *A. eutrophus* ein gegenüber Schema 1 geringfügig veränderter Stoffwechselweg gefunden^[57]: Buttersäure wird dabei zuerst mit Coenzym A (CoA) verestert und dann über Crotonsäure-CoA und (S)-3-Hydroxybuttersäure-CoA schrittweise in Acetoacetyl-CoA umgewandelt. Anschließend verläuft der Metabolismus gemäß Schema 1. In anderen Bakterien wurden auch noch weitere Metabolismusvarianten gefunden (siehe^[58] und Abschnitt 2.3.1).



Schema 1. Bekanntester und wahrscheinlich am weitesten verbreiteter P(3-HB)-Stoffwechselweg, der auch in *A. eutrophus*, *Z. ramigera* und *A. beijerinckii* vorkommt.

2.2.1. Biosynthese

Im folgenden wird hauptsächlich die P(3-HB)-Biosynthese von *A. eutrophus* besprochen, da diesem Mikroorganismus, aufgrund der Herstellung von BIPOLE durch ICI, die größte kommerzielle Bedeutung zukommt^[59]. Die *A. eutrophus*-Stämme NCIB 11599^[5] und N9A^[60] produzieren mit Glucose bzw. Fructose als C-Quellen P(3-HB), das mehr als 90 % ihres Trockengewichts ausmacht. Im Gegensatz zu *Pseudomonas oleovorans* und anderen Bakterien werden aus einer Vielzahl von Substraten^[61] immer nur Polyester mit C₃- bis C₅-Monomereinheiten gebildet.

A. eutrophus besitzt zwei 3-Ketothiolasen^[36], die die Claisen-Reaktion zweier Carbonsäurethioester zur entsprechenden 3-Ketocarbonsäure katalysieren. Der Mechanismus dieser reversiblen Reaktion wurde eingehend von Masamune et al.^[62] untersucht. Enzym A ist überwiegend mit Acetoacetyl- und etwas weniger mit 3-Ketopentanoyl-CoA aktiv und somit entscheidend für den P(3-HB)-Stoffwechsel. Enzym B bevorzugt höhere 3-Ketoacetyl-CoA-Substrate (C₄- bis C₁₀) und dürfte daher eher am Fettsäuremetabolismus beteiligt sein. Als einziges der Enzyme in Schema 1 ist es sowohl am Aufbau als auch am Abbau der Polyester beteiligt.

Für den zweiten Schritt, die Reduktion von Acetoacetyl-CoA, sind in *A. eutrophus* wiederum zwei Enzyme verantwortlich^[37], eine NADH und NADPH-abhängige Reduktase. Das NADH-abhängige Enzym kann (R)- und (S)-3-Hydroxybuttersäure-CoA oxidieren, während bei der Reduktion nur (S)-3-Hydroxybuttersäure-CoA gebildet wird. Die NADPH-Reduktase wirkt stereoselektiv in der Oxidations- und Reduktionsreaktion und ist nur mit (R)-3-Hydroxybuttersäure aktiv, die auch ausschließlich bei der Reduktion entsteht. Nur diese Reduktase ist darum direkt am P(3-HB)-Stoffwechsel beteiligt.

Die P(3-HB)-Synthase, das letzte am Aufbau beteiligte Enzym, kommt in einer löslichen und einer Granula-assoziierten Form vor^[39]. Unter normalen Wachstumsbedingungen findet man nur die lösliche Synthase, die bei Stickstofflimitierung in die Granula-assoziierte Form übergeht. Sie kann nur bestimmte Hydroxysäuren polymerisieren und regelt somit die Polymerzusammensetzung^[40].

2.2.2. Klonierung und Exprimierung der Poly[(R)-3-hydroxybuttersäure]-Biosynthese von *Alcaligenes eutrophus*

Die Übertragung einer ganzen Biosynthese in einen Fremdoorganismus lohnt sich immer dann, wenn man an einem industriell nutzbaren, robusten Stamm, anderen (billigeren) Rohprodukten oder auch an mechanistischen Fragen interessiert ist^[63]. Häufig liegen die codierenden Gene eines Biosynthesewegs nahe beieinander, so daß dessen Übertragung auf einen anderen Organismus vereinfacht wird. Im Hinblick auf die großen Erwartungen, die man in PHAs setzt, ist es nicht erstaunlich, daß gleich drei Arbeitsgruppen die P(3-HB)-Biosynthesegene (Schritt 1–3 in Schema 1) aus *A. eutrophus* in *E. coli* kloniert und exprimiert haben^[17b, 64–66]. *E. coli*, das normalerweise keine PHAs produziert, kann so ca. 50 % seines Trockengewichts (spezielle Stämme bis zu 80 %) an P(3-HB) produzieren. Es liegt auch dort in Form intrazellulärer Granulen vor. Die drei für die

Synthese verantwortlichen Enzyme sind nebeneinander in einem P(3-HB)-Syntheseoperon organisiert, das von einem Promotor gesteuert wird^[66]. Falls nur das P(3-HB)-Synthasegen in *E. coli* eingebaut wird, kann kein Polyester produziert werden. Offensichtlich ist *E. coli* unfähig, selbst (R)-3-Hydroxybuttersäure-CoA herzustellen^[17b].

Lubitz et al.^[67] bauten zusätzlich zum P(3-HB)-Operon auch noch ein Lysegen ein, das bei höheren Temperaturen in Gegenwart von zweiwertigen Kationen exprimiert wird. Die P(3-HB)-Granulen werden so durch Öffnungen in der Zellwand ins umgebende Medium abgegeben und können von den Zellhüllen getrennt werden. Diese elegante Isolierungsvariante ist auch auf *Alcaligenes*-Spezies anwendbar und wurde kürzlich patentiert^[68].

Andere Projekte sind zur Zeit wahrscheinlich eher noch Visionen als Realität. So planen Somerville et al.^[69a] den Einbau der P(3-HB)-Synthesegene aus *A. eutrophus* in Kartoffeln oder andere Pflanzen, um nach Expression der Gene den Polyester gewissermaßen in Form einer „Plastik-Kartoffel“ zu ernten; eine erste Realisierung dieser Idee wurde soeben beschrieben, wobei die transgene Pflanze aber nur winzige Mengen P(3-HB) zu produzieren vermochte^[69b]. Neben der 3-Ketothiolase, die in höheren Pflanzen vorhanden ist, sind auch hier zur P(3-HB)-Produktion sowohl die Reduktase- als auch die P(3-HB)-Synthasegen erforderlich.

Neben den PHA-Strukturgenen von *A. eutrophus* sind zum Teil auch schon jene anderer Mikroorganismen wie *Z. ramigera*^[70] und *P. oleovorans*^[71] identifiziert und deren Nucleotidsequenz bestimmt worden.

2.2.3. Depolymerisation

Die Depolymerisation (Schritt 4 in Schema 1) der granulären, amorphen P(3-HB) zu (R)-3-Hydroxybuttersäure wird durch eine Depolymerase katalysiert, die P(3-HB) hauptsächlich zum Dimer abbaut; nur in *A. eutrophus* ist das direkte Endprodukt (R)-3-Hydroxybuttersäure^[72]. In den anderen Mikroorganismen wird das Dimer anschließend von einer Dimerhydrolase zum Monomer gespalten.

Die Depolymerase konnte aus *A. eutrophus*^[33], *B. megaterium*^[53] und *R. rubrum*^[29] isoliert werden, allerdings ist ihre Wirkungsweise zur Zeit noch weitgehend unverstanden. Im Gegensatz dazu kennt man den Abbaumechanismus der Dimerhydrolase-Reaktion ziemlich genau. Dieses Enzym wurde aus *Z. ramigera*^[47] und *R. rubrum*^[52] isoliert und hydrolysiert je nach Bakterium neben dem (R,R)-Dimer auch das (R,S)-Dimer^[73] (*R. rubrum*, *Z. ramigera*) oder das (S,R)-Dimer (*Z. ramigera*), allerdings mit verminderter Geschwindigkeit. Die anderen Enantiomere werden vom jeweiligen Mikroorganismus nicht verseift. Neben den Dimeren können auch höhere Oligomere (zum Beispiel das Pentamer) angegriffen werden. Wie Tomita et al. zeigen konnten, werden sie in *Z. ramigera* exoartig^[74] vom Alkoholende her abgebaut, und zwar umso schneller, je größer die Kettenlänge ist. Selbst die entsprechenden Methylester (außer der dimeren und monomeren Verbindung) werden hydrolysiert^[47].

Die Oxidation von (R)-3-Hydroxybuttersäure zur Acetylacessigsäure (Schritt 5 in Schema 1) wird durch eine Dehydrogenase katalysiert. Die Enzyme wurden aus *A. eutrophus*^[33], *A. beijerinckii*^[43] und *Z. ramigera*^[48] isoliert und sind bezüg-

lich optimalem pH-Wert, Inhibitoren und dem K_m -Wert mit (*R*)-3-Hydroxybuttersäure sehr ähnlich. Als Cofaktor wirkt in allen Fällen NAD^+ .

Für die Veresterung von Acetylessigsäure mit Coenzym A (Schritt 6 in Schema 1) hat man zwei unterschiedliche Mechanismen gefunden: In *A. eutrophus* und *A. beijerinckii* ist eine 3-Ketosäure-CoA-Transferase wirksam, wobei die CoA-Einheit jeweils von Succinyl-CoA übertragen wird^[43]. In *Z. ramigera* wird derselbe Schritt von einer Acetoacetyl-CoA-Synthase unter Beteiligung von ATP katalysiert^[49].

2.2.4. Regulierung des Kreislaufs

Die Steuerung des PHA-Metabolismus in Schema 1 wurde vor allem von Dawes et al. für *A. beijerinckii* untersucht und verläuft analog für *A. eutrophus* und *B. megaterium*, ist aber nicht generell auf Bakterien übertragbar^[12].

3-Ketothiolase, das einzige Enzym, das sowohl am Aufbau (Claisen-Reaktion von zwei Acetyl-CoA-Einheiten) als auch am Abbau (Retro-Claisen-Reaktion von Acetoacetyl-CoA) beteiligt ist, kommt eine zentrale Funktion bei der Steuerung des Kreislaufs zu. Die Claisen-Reaktion wird durch hohe CoASH-Konzentrationen und die Retro-Claisen-Reaktion durch Acetoacetyl-CoA inhibiert. Letztere Hemmung kann wiederum durch eine hohe CoASH-Konzentration aufgehoben werden.

Normalerweise wird Acetyl-CoA hauptsächlich im Citronensäurecyclus unter Freisetzung von CoASH verbraucht, d. h. die Konzentration von Acetyl-CoA ist niedrig, jene von CoASH hoch und die 3-Ketothiolase somit inaktiv.

Die Limitierung eines Nährstoffes (je nach Bakterium beispielsweise Stickstoff, Sauerstoff oder Phosphor^[11]) bewirkt, daß Acetoacetyl-CoA infolge der steigenden NADH-Konzentration weniger effektiv über den Citronensäurecyclus abgebaut wird, die Acetyl-CoA-Konzentration nimmt zu und jene von CoASH ab. Die Hemmung der 3-Ketothiolase ist nun aufgehoben und Acetyl-CoA kann gemäß Schema 1 mit überschüssigem NADH zu P(3-HB) weiterreagieren. Die P(3-HB)-Synthese wirkt gewissermaßen als Senke für Acetyl- und Reduktionsäquivalente.

Der Abbau wird eingeleitet, falls zuwenig C-Quellen vorhanden sind; der damit verbundene hohe CoASH-Gehalt kompensiert die Hemmung der 3-Ketothiolase durch Acetoacetyl-CoA, und Acetyl-CoA-Einheiten können aus P(3-HB) freigesetzt werden. Wie der Abbau im einzelnen reguliert wird, ist noch weitgehend unverstanden, da noch zu wenig über die P(3-HB)-Depolymerase bekannt ist^[75].

Doi et al. zeigten für *A. eutrophus*, daß unter Stickstofflimitierung P(3-HB)-Aufbau und -Abbau simultan verlaufen. Inwiefern die freiwerdenden Monomereinheiten wieder zur Polymersynthese verwendet werden, ist noch nicht geklärt^[76].

2.3. Mikrobiologisch zugängliche Polyester

Vor allem im Hinblick auf die weiter unten behandelte Herstellung von Ausgangsverbindungen für die Synthese enantiomerenreiner Produkte (EPC) und von biologisch abbaubaren Materialien mit unterschiedlichen strukturabhängigen Eigenschaften wurden zahlreiche Untersuchungen mit

den verschiedensten Kohlenstoffquellen im Nährmedium und natürlich mit unterschiedlichen, zur Produktion von Polyesterspeichermaterial befähigten Mikroorganismen durchgeführt.

2.3.1. Synthese von Polyestern ohne weitere funktionelle Gruppen mit *Alcaligenes eutrophus* und *Pseudomonas oleovorans*

A. eutrophus synthetisiert nur nicht-funktionalisierte Polymere, auch wenn chlorierte oder ungesättigte Säuren, zum Beispiel 2-Chlorpropionsäure^[5], 5-Chlorvaleriansäure^[77] oder 4-Pentensäure^[78], als Substrate eingesetzt werden können. Mit nahezu allen C-Quellen werden Polyester aus C_4 / C_5 -Hydroxysäure-Bausteinen produziert. Bisher sind nur in wenigen Fällen C_3 -Struktureinheiten entdeckt worden (Tabelle 1, Nr. 4), C_6 -Einheiten wurden noch nie gefunden.

Tabelle 1. Herstellung von Polyestern mit den Struktureinheiten 3-HP (3-Hydroxypropionsäure), 3-HB (3-Hydroxybuttersäure), 4-HB (4-Hydroxybuttersäure), 3-HV (3-Hydroxyvaleriansäure) und 5-HV (5-Hydroxyvaleriansäure) aus unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen durch *Alcaligenes eutrophus*.

Nr.	Substrat	3-HP	3-HB	4-HB	3-HV	5-HV
1	Glucose	—	+	—	—	—
2	Glucose + Propionsäure	—	+	—	+	—
3	γ -Butyrolacton [5, 79, 80] [a]	—	+	+	—	—
4	3-Hydroxypropionsäure oder 1,5-Pentandiol [5]	+	+	—	—	—
5	5-Chlorvaleriansäure [77]	—	+	—	+	+

[a] Außerdem können auch 4-Hydroxybuttersäure, 1,4-Butandiol, 1,6-Hexandiol oder 4-Chlorbuttersäure eingesetzt werden.

Glucose und Propionsäure sind jene Substrate, die ICI für die Produktion von P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) einsetzt, wobei der limitierende Nährstoff jeweils Phosphat ist^[81]. Durch Variation des Verhältnisses Glucose/Propionsäure kann ein 3-HV-Anteil von 0–20 % erhalten werden. Die Polymere werden unter dem Namen BIOPOL kommerziell angeboten^[82]. Das P(3-HV)-Homopolymer scheint mikrobiologisch nicht zugänglich zu sein; der höchste beobachtete 3-HV-Gehalt liegt bei ca. 90 % mit Valeriansäure als C-Quelle^[57].

Mit $[D_3]$ Acetat als Substrat kann in H_2O oder D_2O P(3-HB) mit unterschiedlich hoch deuterierten Einheiten hergestellt werden^[83]. Bessere Deuterierungsgrade erreicht man mit *Rhodobacter sphaeroides*, wobei mit Acetat in D_2O / H_2O 92:8^[84] ein maximaler Anteil von 13 % $[D_6]$ 3-HB entsteht. Unter denselben Bedingungen werden mit $[D_3]$ Acetat 6 % $[D_6]$ 3-HB-, 73 % $[D_5]$ 3-HB- und 16 % $[D_4]$ 3-HB-Einheiten synthetisiert^[85]. Mit geeignet markierten C-Quellen kann auch ^{13}C - und ^{14}C -P(3-HB)^[1b, 8] hergestellt werden, aus der entweder Crotonsäure oder (*R*)-konfigurierte Hydroxybuttersäurederivate synthetisiert werden können.

Doi, Kunioka et al.^[79, 80] entdeckten 1988, daß mit gewissen Substraten ein Co-polymer aus 3-HB und 4-Hydroxybuttersäure (4-HB) gebildet wird (Tabelle 1, Nr. 3). Je nach Zusammensetzung der C-Quelle kann ein 4-HB-Gehalt zwischen 9 und 40 % erreicht werden^[86], wobei der Polymeranteil bis zu 30 % der Zelltrockenmasse betragen kann. Biologische Abbaubarkeit^[86] und Materialeigenschaften^[87]

unterscheiden sich von jenen von P(3-HB) und P(3-HB/3-HV).

Die letzten beiden Polymere in Tabelle 1 sind relativ wenig untersucht worden, sollen aber einen Eindruck über die Vielfältigkeit mikrobiologisch zugänglicher Polyhydroxysäuren vermitteln.

Witholt et al.^[88] entdeckten 1983, daß auch *Pseudomonas oleovorans* mit *n*-Octan als Substrat intrazelluläre PHA-Granulen bildet. Sie wiesen allerdings keine P(3-HB) nach, sondern ausschließlich Poly-(*R*)-3-hydroxyoctansäure. In der Folge untersuchten gleich mehrere Arbeitsgruppen das Potential von *P. oleovorans* und anderer Pseudomonaden zur Herstellung ungewöhnlicher PHAs^[40, 89, 90]. *P. oleovorans* kann als Substrate geradkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe, die entsprechenden Alkohole oder Säuren^[91], nicht aber Glucose verwerten. Meist werden statistische Copolymere aus C₆- bis C₁₂-(*R*)-3-Hydroxysäure-Bausteinen gebildet. Einheiten mit Kettenlängen kleiner als C₆- oder größer als C₁₂-Bausteine finden sich nur in unbedeutenden Mengen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Zusammensetzung der PHAs aus *Pseudomonas oleovorans* mit Carbonsäuren als Kohlenstoff-Quellen (aus [89b]). Mit 3-HC–3-HDD wird die homologe Reihe beginnend bei 3-Hydroxycapronsäure bis 3-Hydroxydodecansäure bezeichnet.

Substrat	PHA [a] [%]	Wiederholungseinheiten im Polyester [%]						
		3-HC	3-HH	3-HO	3-HN	3-HD	3-HUD	3-HDD
(<i>R</i>)-3-Hydroxybutyrat	1.2	—	—	22	—	57	—	21
Caproat	3.3	95	—	5	—	—	—	—
Heptanoat	2.3	—	100	—	—	—	—	—
Octanoat	8.7	8	—	91	—	1	—	—
Nonanoat	9.1	—	35	—	65	—	—	—
Decanoat	12.5	8	—	75	—	17	—	—
Undecanoat	9.8	—	28	—	59	—	13	—
Dodecanoat	6.6	6	—	57	—	32	—	5
Pentadecanoat	5.3	—	32	—	47	8	13	—
Heptadecanoat	—	—	—	—	—	—	—	—

[a] In Prozent der Zelltrockenmasse angegeben. Nur in Lit. [90b] sind auch die isolierten PHA-Mengen angegeben. Offenbar werden mit Nonanoat als Substrat die höchsten PHA-Mengen erhalten (0.7 g L⁻¹).

Mit C_{2n+1}-Säuren bilden sich Polyester aus C₇-, C₉- und C₁₁-Hydroxysäure-Einheiten, wobei meist die C₉-Einheit überwiegt. C_{2n}-Säuren geben ganz analog Polymere aus den geradzahigen C₆-, C₈-, C₁₀- und C₁₂-Hydroxysäure-Bausteinen mit einem maximalen Anteil an C₈-Säure. Polymere relativ einheitlicher Seitenkettenlänge bilden sich auch mit den Kohlenwasserstoffen Hexan, Heptan und Octan^[40, 89a].

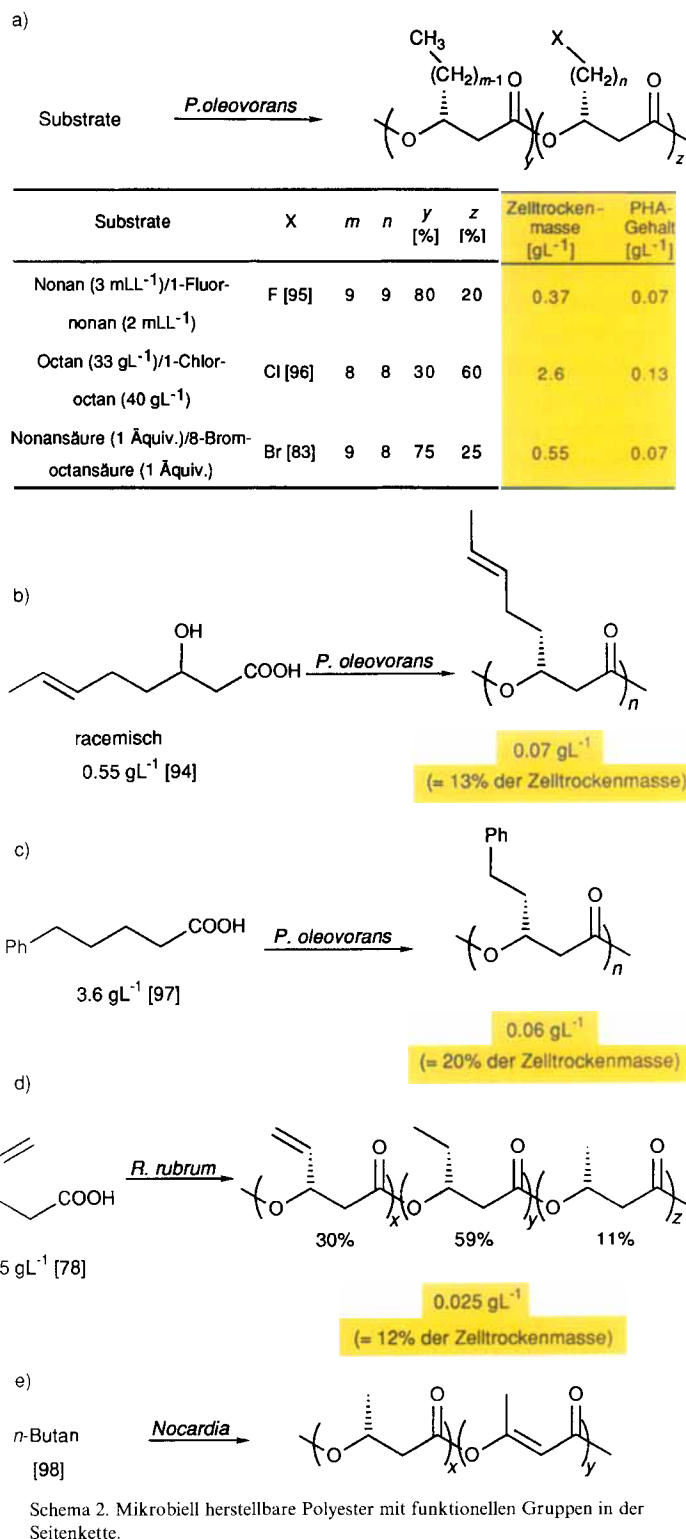
Je länger die Seitenketten der Hydroxysäuren werden, desto elastischer und weniger kristallin sind die entstehenden Polymere^[92a]. Andererseits sind die höheren PHAs, wie am Beispiel von Poly-(*R*)-3-hydroxyoctanoat oder Poly-(*R*)-3-hydroxynonanoat gezeigt wurde, auch nicht mehr biologisch abbaubar^[1b, 5, 11].

Vermutlich hat sich die PHA-Biosynthese der Pseudomonaden aus dem P(3-HB)-Stoffwechsel entwickelt, indem gewisse Stämme auch fähig waren, Substrate mit mehr als vier C-Atomen zu verwerten. Die direkte Polymerisation solcher Substrate ist sicher energetisch sinnvoller, als deren vorhergehender Abbau zu den C₄-Säuren^[89a]. Alkane können allerdings nur solche Mikroorganismen verwerten, die über das sogenannte OCT-Plasmid verfügen. Auf diesem Plasmid

ist die genetische Information jener Enzyme enthalten, die Alkane in die entsprechenden Alkohole umwandeln können^[93].

2.3.2. Synthese von Polyestern mit weiteren funktionellen Gruppen durch Mikroorganismen

Mit den bisher vorgestellten Polyhydroxysäuren sind nachträgliche Veränderungen der Polymerstruktur nicht mehr möglich, jedoch mit funktionalisierten Polymeren durch sogenannte polymeranaloge Umsetzungen durchführ-



Schema 2. Mikrobiell herstellbare Polyester mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette.

bar. Gewisse Bakterien können nun aus funktionalisierten Substraten Polyester herstellen, ohne daß die funktionelle Gruppe, wie es bei *A. eutrophus* der Fall ist, während des Aufbaus verlorengeht. Auch hier ist die Bildung von Homopolymeren eher die Ausnahme als die Regel, da aufgrund ihrer Biosynthese Polyester immer auch 3-Hydroxysäure-Bausteine enthalten können, die um C₂- oder C₄-Einheiten kürzere Seitenketten haben. Setzt man zum Beispiel 3-Hydroxy-7-octenoat unter analogen Bedingungen, wie in Schema 2b angegeben, um, so erhält man ein Polymer mit 23 % 3-Hydroxyhexansäure-Einheiten^[94].

Der erste Polyester mit einer weiteren funktionellen Gruppe konnte schon 1964 aus *Nocardia* isoliert werden. Die Enolester-Struktur dieses Polymers wurde allerdings nur aus IR-spektroskopischen Untersuchungen abgeleitet^[98]. Im allgemeinen dürfen die Gruppen nicht zu nahe an der Hauptkette liegen. So beobachtet man mit den Substraten 6-Bromhexansäure^[83], 3-Phenylpropionsäure^[97] und 3-Hydroxy-3-phenylpropionsäure^[97] kein Zellwachstum. Als einziges Substrat kann 5-Phenylvaleriansäure zu einem Homopolymer umgesetzt werden (mit 6-Octensäure enthält das in Schema 2b gezeigte Polymer nur zu 80% die angegebene Struktureinheit; der Rest besteht aus einem Gemisch anderer Einheiten^[94]). Überraschenderweise entstehen auch aus einer Mischung von Nonan- und 5-Phenylvaleriansäure die entsprechenden beiden Homopolymere und kein Copolymer^[99]! Die Ausbeuten sind in allen Fällen noch unbefriedigend.

3. Polyhydroxysäuren als Ausgangsverbindungen für chirale niedermolekulare Verbindungen

Dieses Thema brachte unsere Arbeitsgruppe vor über zehn Jahren erstmals mit P(3-HB) in Berührung, die wir als eine willkommene Quelle für den (*R*)-konfigurierten C₄-Synthesebaustein in unser Arsenal mit aufnahmen. Wir begannen, nach geeigneten Verfahren zum präparativen Abbau von P(3-HB) zum Monomer zu suchen, und interessierten uns bald auch für die gezielte Herstellung von Oligomeren aus den gewonnenen Monomeren.

3.1. Abbau von Poly[(*R*)-3-hydroxybuttersäure] und Chemie des Monomers

Aufgrund ihrer Stereoregularität sind mikrobiell hergestellte Polyester als Quelle chiraler Bausteine äußerst attraktiv. Die unter diesem Gesichtspunkt durchgeführten Versuche beschränken sich alle auf die Polymere P(3-HB) oder P(3-HB/3-HV), da diese zur Zeit als einzige Polyhydroxysäuren in größeren Mengen verfügbar sind. Je nach Zielsetzung können Oligomerenmischungen oder die Monomere von Interesse sein. Oligomerenmischungen bilden sich zum Beispiel durch partielle Hydrolyse oder Alkoholyse sowie durch Esterpyrolyse bei Temperaturen >175 °C, wobei das mittlere Molekulargewicht über die Heizdauer eingestellt werden kann^[100–103]. Die Pyrolyseprodukte tragen am Alkoholende jeweils eine Crotylgruppe, wie es aus mechanistischen Gründen auch nicht anders zu erwarten ist. Produktgemische desselben Typs erhielten Brändli et al.^[104], indem sie P(3-HB) oder P(3-HB/3-HV) in Gegenwart eines Über-

schusses an Lithiumdiisopropylamid/LiCl oder Lithiumhexamethyldisilazid/LiCl bei tiefen Temperaturen reagieren ließen. Auch bei mehrfacher Wiederholung der Reaktion mit derselben Probe verschieben sich die Maxima der als bimodal angenommenen Verteilung nur geringfügig zu kleineren Molekulargewichten (Abb. 1b). Ebenso verändern sich die Ausbeuten an isolierten Oligomeren nicht wesentlich (bei jedem Abbauschritt beträgt sie ca. 75 %). Der Abbaumechanismus ist zur Zeit noch nicht befriedigend geklärt, wahrscheinlich verläuft er aber nicht über die ursprünglich

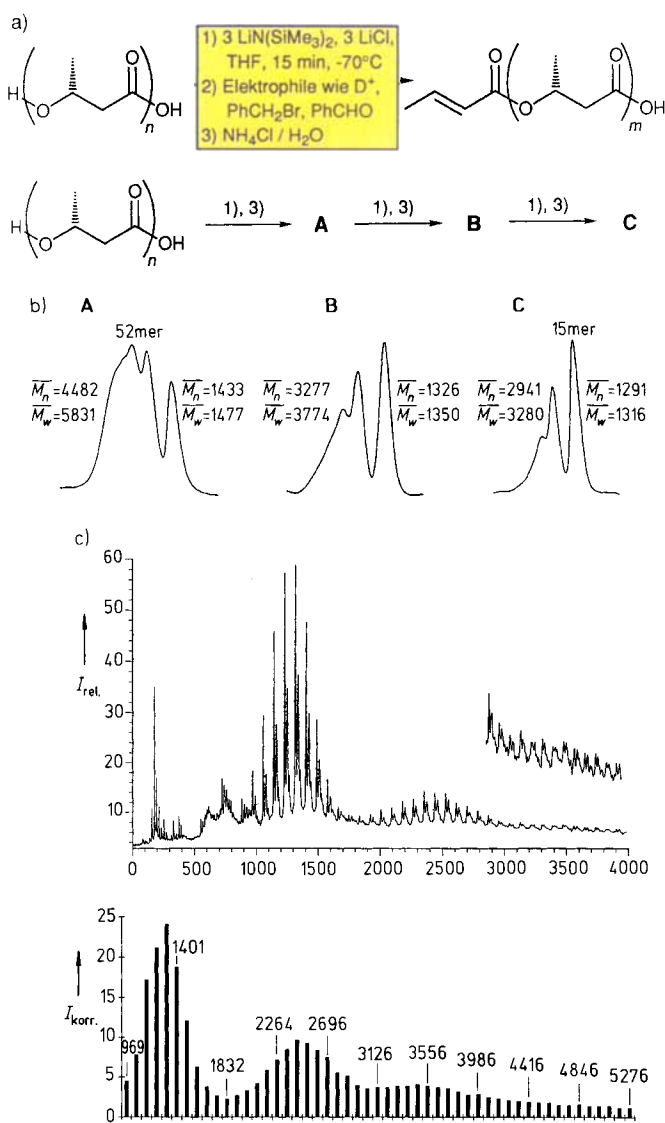
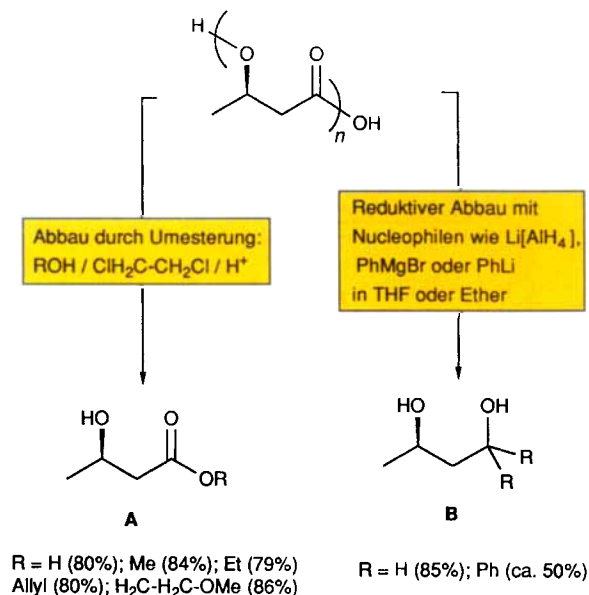


Abb. 1. a) Abbau von P(3-HB) ($M_n = 7.5 \times 10^5$) mit LiN(SiMe₃)₂ in Tetrahydrofuran bei tiefer Temperatur. Da sich die nach der Basenbehandlung gebildeten Produkte mit Elektrophilen nicht alkylieren ließen, dürften keine Polyenolate als Zwischenprodukte vorliegen [104]. b) Gelpermeationschromatogramme der Oligomerenmischungen, die man nach einmaliger (A), zweimaliger (B) und dreimaliger (C) Wiederholung der unter a) angegebenen Reaktionssequenz erhielt. Die beiden Maxima verschieben sich nur geringfügig zu kleineren Molekulmassen. Das Signal bei hohem Molekulargewicht entspricht bei A einem 52mer, bei C einem 34mer und der niedermolekulare Peak bei A einem 17mer, bei C einem 15mer. Die gezeigten Chromatogramme wurden nach Fraktionierung der Gemische an den Shodex-Säulen K-802, K-802.5 und K-803 mit Chloroform als Laufmittel erhalten. c) Oben: Matrixunterstütztes Laserdesorption/ionisations (LDI)-Spektrum vom dreifachen Abbau C. Der Einschub ist fünffach vergrößert. Unten: Das entsprechende Strichspektrum, das man erhält, wenn die $[M + H]$ - und $[M + Na]$ -Signale zusammengezählt und die Signalfäche anstelle der jeweiligen Höhe berücksichtigt wird. Auf der x-Achse ist jeweils m/z aufgetragen. Für die Aufnahme der LDI-Spektren bedanken wir uns bei Dr. K. Börnsen und Dr. M. Schär (Ciba-Geigy, Basel) [105, 106].

postulierten Polyenolate^[104], da mit verschiedensten Elektrophilen keine Alkylierungsprodukte nachgewiesen werden konnten (Abb. 1a).

Durch die Arbeiten von Züger et al.^[107] und Vanlaetum et al.^[108] sind auch die monomere (*R*)-3-Hydroxybuttersäure oder die jeweiligen Ester (**A** in Schema 3) durch säurekatalysierte Verseifung oder Umesterung von P(3-HB) zugänglich^[109]. Die Reaktionsbedingungen wurden später von

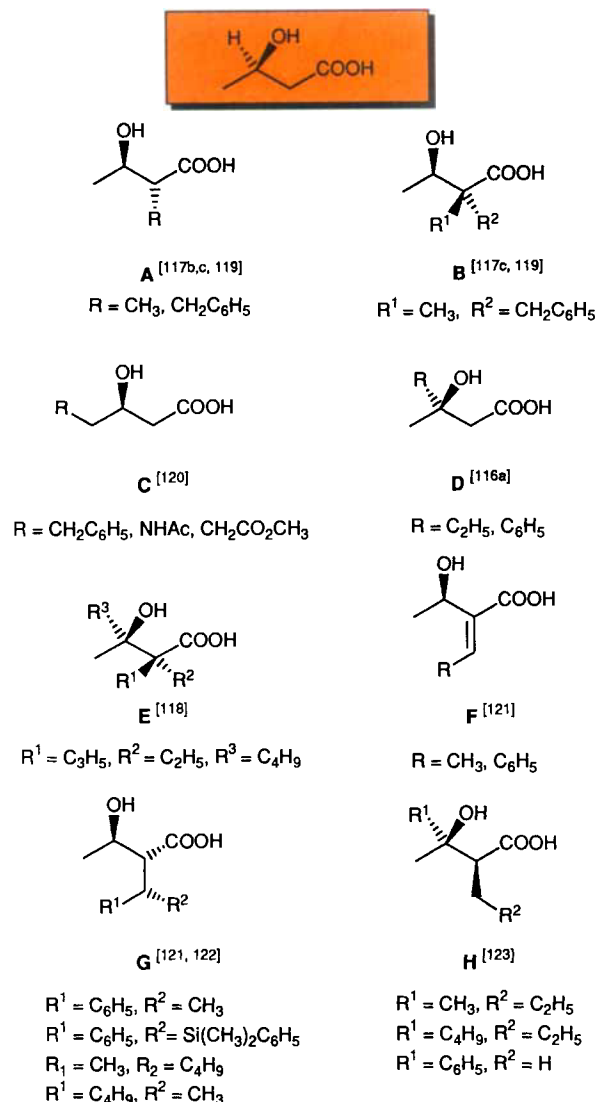


Schema 3. Depolymerisation von P(3-HB) durch Umesterung oder durch Reduktion der Estercarbonyl-Gruppen.

Breitschuh et al. noch weiter optimiert^[110], so daß die Monomere jetzt auf einfache Weise in ca. 80 % Ausbeute erhalten werden können. Ebenso können durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid aus P(3-HB)^[107] oder deren Abbau mit metallorganischen Reagentien direkt (*R*)-konfigurierte 1,3-Butandiole vom Typ **B** hergestellt werden (Schema 3). Solcherart zugängliche Derivate können durchaus als Erweiterung des „pool of chiral building blocks“^[111a] aufgefaßt werden. So werden laufend Naturstoffsynthesen ausgehend von (*R*)-Hydroxybuttersäure publiziert^[111b], beispielsweise jüngst Synthesen von Gloeosporon^[112], Grahamimycin A₁^[113] und (*R*)-Lasiodiplodin^[114].

Mittlerweile kann jedes beliebige Wasserstoffatom der (*R*)-3-Hydroxybuttersäure durch andere Gruppen ersetzt werden (Produkttypen **A–H** in Schema 4)^[115]. Bemerkenswerte Entwicklungen auf diesem Gebiet sind das chirale Acetessigesterderivat (*R*)-2-*tert*-Butyl-6-methyl-2*H*,4*H*-1,3-dioxin-4-on^[116] (über diesen Cyclus sind Verbindungen vom Typ **D** und im Prinzip auch **C** unter Selbstregeneration des stereogenen Zentrums zugänglich^[117]) oder die diastereoselektive Herstellung 2,5,5,6,6-pentaalkylsubstituierter Dioxanone^[118] (siehe **E**, entspricht formal dem Produkt einer enantioselektiven Aldolreaktion einer α -verzweigten Carbonsäure mit einem Keton).

Die Alkoholfunktion der 3-Hydroxybuttersäure kann unter Inversion entweder über das entsprechende Tosylat oder über β -Butyrolacton^[124, 125] durch andere Gruppen nucleophil substituiert werden (für erstere Verbindung sind schwach basische Nucleophile wie LiAlD_4 ^[126],



Schema 4. Produkte aus Umwandlungen von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure unter Erhaltung der Säure- und Alkoholfunktion.

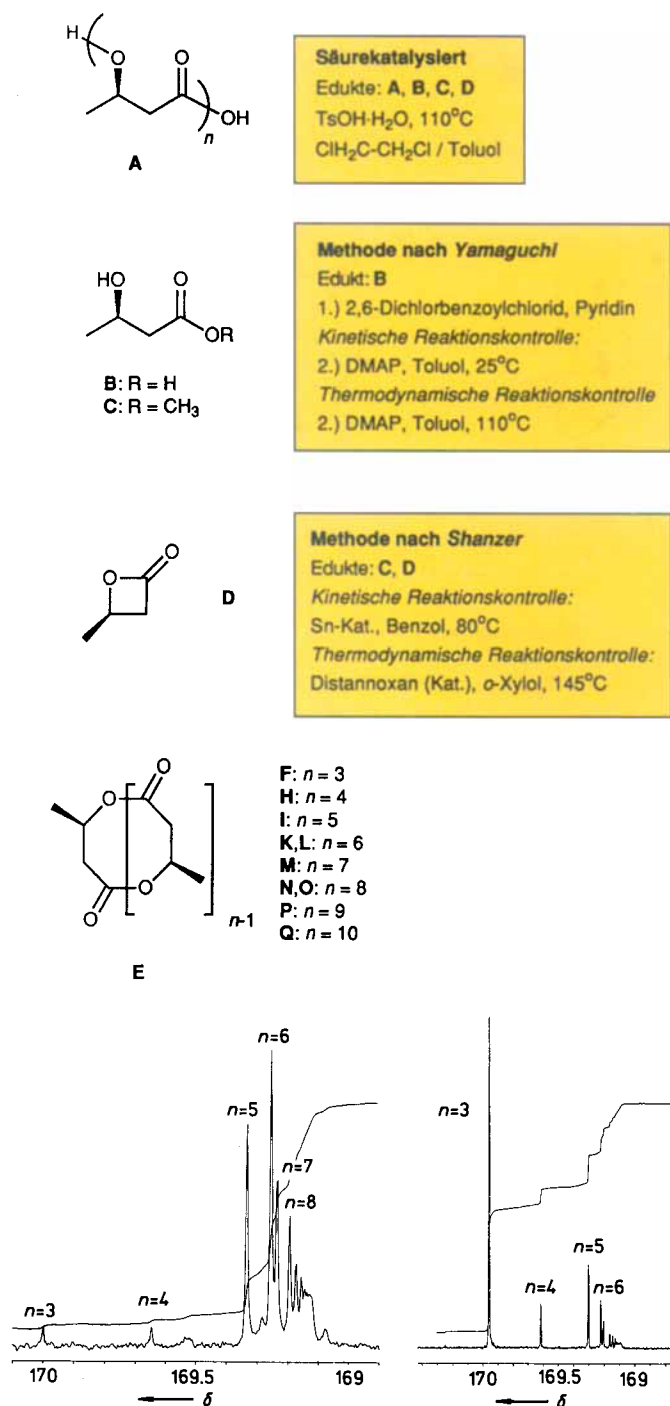
$\text{Bu}_4\text{N}^+\text{NO}_3^-$ ^[127] oder NaN_3 ^[128a] erforderlich; das Lacton kann mit S-Nucleophilen, zum Beispiel HS^- und $t\text{BuS}^-$ ^[129], oder N-Nucleophilen wie Benzylamin oder NaN_3 ^[129a] geöffnet werden).

Die diastereoselektive Öffnung von Dioxanonen aus HB durch $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion am Acetal-C-Atom ist eine bezüglich Selektivität sowie Durchführbarkeit in größerem Maßstab und in Gegenwart oxidationsempfindlicher Gruppen stark verbesserte Variante der Johnson-Methode, wobei die Hydroxybuttersäure in Crotonsäure überführt, also „geopfert“ wird (*immolative* enantioselektive Reaktionsfolge)^[117b, c, 128].

3.2. Synthese von Oligoliden aus 3-Hydroxybuttersäure und Strukturuntersuchungen

Chirale Makrolide vom Typ **E** in Schema 5 können auf einfache Weise direkt aus P(3-HB) **A** durch säurekatalysierte Umesterung oder aus den monomeren Bausteinen **B–D** nach den Methoden von Yamaguchi^[130–133], Shanzer^[132–134] oder wiederum säurekatalysiert erhalten werden^[135]. Je

nach den Reaktionsbedingungen werden die Cyclen in unterschiedlichen Verhältnissen gebildet und können durch sorgfältige Chromatographie voneinander getrennt werden^[133].



Schema 5. Oben: Synthese von Makrocyclen vom Typ E nach den Methoden von Yamaguchi über das gemischte Anhydrid mit 2,6-Dichlorbenzoylchlorid, von Shanzer mit dem Zinn-Katalysator 1,1,6,6-Tetrabutyl-1,6-distanna-2,5,7,10-tetraoxacyclodecan [136] (= Templat) oder unter Säurekatalyse mit Toluolsulfonsäure-Monohydrat (TsOH·H₂O). DMAP: *N,N*-Dimethylamino-pyridin. Unten: ¹³C-NMR-Spektren der Carbonyl-Region von Oligolid-Mischungen, die nach den oben spezifizierten Bedingungen durch Yamaguchi-Lactonisierung (links) von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure (kinetische Reaktionskontrolle) und säurekatalysiert (rechts) durch Abbau von P(3-HB) (thermodynamische Reaktionskontrolle) erhalten wurden. Korrekterweise muß erwähnt werden, daß nie das (*R*)-konfigurierte β -Butyrolacton D, sondern immer dessen Enantiomer eingesetzt wurde, das sich auch nach den bisher bekannten Methoden aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure bildet [124]. Die (*R*)-Form wurde hier nur aus darstellerischen Gründen bevorzugt. Aufnahmebedingungen der ¹³C-NMR-Spektren (100 MHz): Invers-gated-Experiment mit einer Relaxationsverzögerung von 3 s, einer Aquisitionszeit von 3.2 s und einem Pulswinkel von 45°.

Unter thermodynamischer Reaktionssteuerung dominiert das Triolid F von Schema 5; so konnte durch säurekatalysierte Umesterung von P(3-HB) diese doch recht komplexe Verbindung in ca. 50% Ausbeute aus dem Produktgemisch durch einfache Destillation isoliert werden^[135].

Von den Oligoliden F–O in Schema 5 konnten Einkristalle gezüchtet und somit deren Strukturen im Kristall bestimmt werden, wobei vom Hexolid (*n* = 6)^[132] und Octolid (*n* = 8) jeweils zwei Konformere ermittelt wurden (K, L bzw. N, O, siehe Abb. 2a). Die Strukturen haben bemerkenswerte Gemeinsamkeiten (Abb. 2b). Der Vergleich der beiden C₂-symmetrischen Konformationen von Tetrolid H und Hexolid K zeigt, daß letzteres aus H durch Halbieren und Einfügen zweier Hydroxybuttersäure-Einheiten entstanden gedacht werden kann. Die größeren Makrolidstrukturen L–O bestehen alle aus gefalteten Ringen und enthalten als gemeinsame Strukturelemente einen S-förmigen (Abb. 2b, grün) und einen Δ -förmigen Teil (Abb. 2b, rot). Die Untersuchung der gegenseitigen Abhängigkeiten der Torsionswinkel τ_1 , τ_2 und τ_3 zeigt zwei bevorzugte Anordnungen der (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-Einheiten in diesen Cyclen (Abb. 2c). Konformation A (bildet das Δ -förmige Strukturelement) kommt dabei etwa dreimal so häufig vor wie B (ist Bestandteil des S-förmigen Fragments)^[137].

Das Potential der Polyester als Vorläufer chiraler Bausteine ist sicher noch nicht ausgeschöpft, wie aus den laufend publizierten Synthesen neuer Verbindungen ersichtlich ist^[139].

4. Polyhydroxysäuren als biologisch abbaubare Kunststoffe

Heute haben Kunststoffe ca. sieben Gewichtsprozent und über dreißig Volumenprozent Anteil am Abfall in den USA und in Japan^[140], was unter anderem damit zusammenhängt, daß sie immer mehr die Verpackungsmaterialien Glas, Papier oder Metall verdrängen. Für die Kunststoff-Entsorgung stehen grundsätzlich drei Wege offen: Verbrennung, Recycling und Abbau in der Umwelt, wobei wahrscheinlich jeder Weg für sich zukünftige Anwendungen finden wird.

Einige Länder, zum Beispiel Italien, haben sich gesetzlich verpflichtet, daß alle Plastik-Verpackungsmaterialien bis 1991 abbaubar sind^[141]. Für den Markt abbaubarer Polymere wird pro Jahr weltweit eine Wachstumsrate von 75% erwartet, d.h. 1992 werden ca. 400 000 Tonnen Polymere und ungefähr 340 Mio. US-\$ umgesetzt. Bis dahin werden ungefähr 15% des Kunststoffabfalls biologisch abbaubar sein, im Vergleich zu 1% im Jahre 1987^[141, 142].

Prinzipiell kann ein Makromolekül durch chemische, biologische und physikalische Einflüsse abgebaut werden^[143]. Die Bindungsspaltung durch Licht ist der wichtigste Abbaueffekt für C-C-Hauptkettenpolymere und wird durch Einbau von Carbonylgruppen^[144] (kann zum Beispiel durch Copolymerisation eines Olefins mit Kohlenmonoxid geschehen^[145]) oder photoaktivierende Zusätze wie Benzophenon^[146] wesentlich beschleunigt (Abbau durch Norrish-Typ-I- und -II-Spaltung). Oxidative Kettenspaltungen sind durch Zugabe von Peroxiden und geeigneten Übergangsmetallen zu erreichen und vor allem bei ungesättigten Polymeren von Bedeutung^[147].

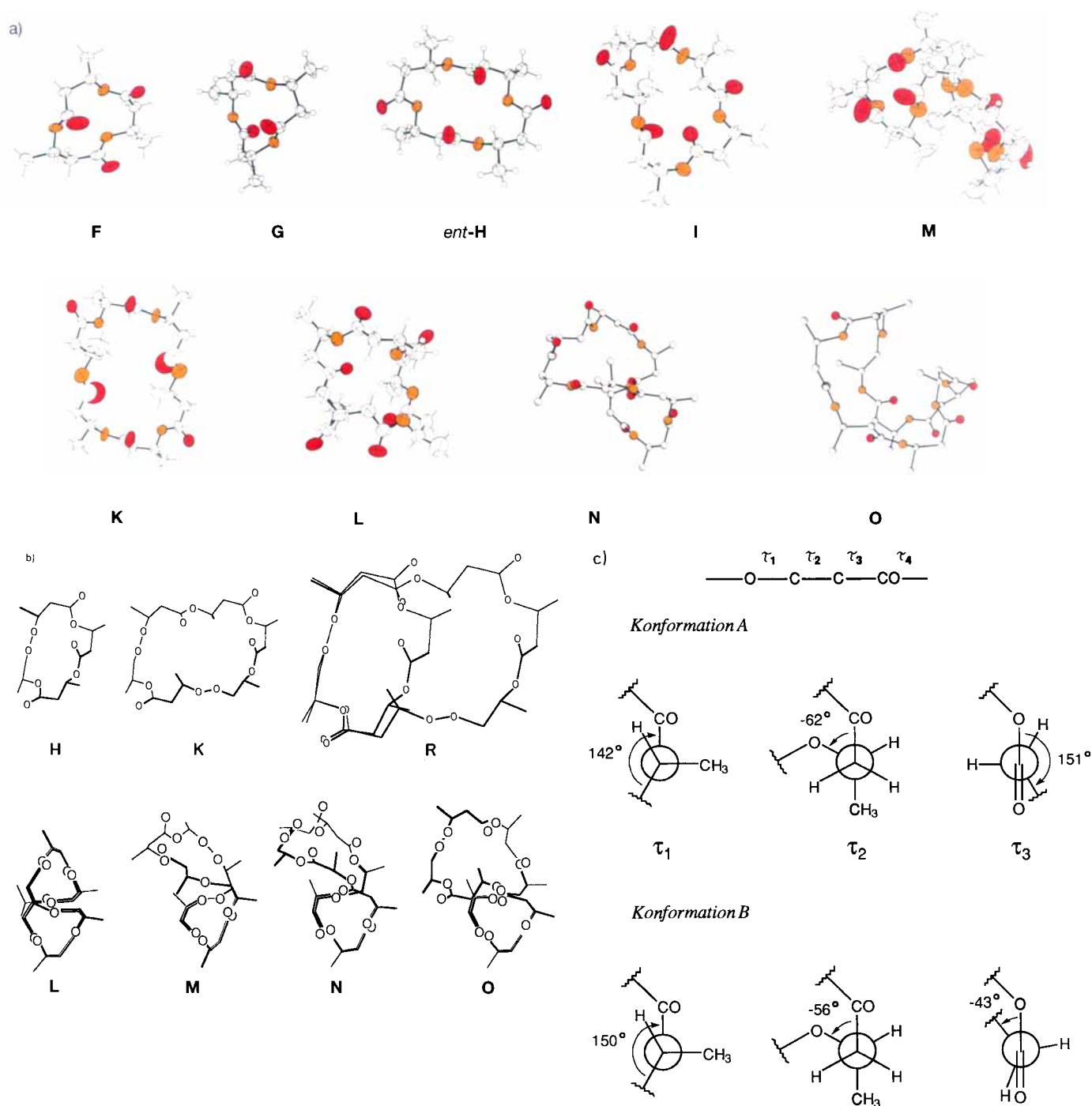


Abb. 2. a) Strukturen der Oligolide **F–O** in der all-(*R*)-Form, außer *ent*-**H**, das in der all-(*S*)-Konfiguration abgebildet ist (**F–M** als ORTEP- und **N,O** als PLUTO-Darstellungen). Das *rac*-*epi*-Triolid **G** (hier in der (*R,R,S*)-Form gezeigt) erhält man zum Beispiel durch säurekatalysierte Lactonisierung von *rac*- β -Butyrolacton in siedendem Toluol/1,2-Dichlorethan zusammen mit dem racemischen Triolid *rac*-**F** im Verhältnis 3:1. Rote Kugeln = Sauerstoffatome der CO-Funktion, orange = OR-Sauerstoffatome der Estergruppen. Herstellung und Charakterisierung der Oligolide siehe [131–135]. b) Strukturelle Gemeinsamkeiten der Makrolide. MacMoMo-Ansichten des all-(*R*)-Tetrolids **H** sowie des C_2 -symmetrischen Hexolids **K** und deren Superposition **R**. Die höheren Makrolide **L–O** enthalten alle als gemeinsame Strukturmerkmale ein Δ -förmiges (rot) und ein γ -förmiges Fragment (grün). Im Hexolid **L** kommen sie sogar doppelt vor [133]. c) Mittlere Torsionswinkel τ_1 – τ_3 und Newman-Projektionen der Bindungen der (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-Einheiten in den Konformationen *A* (Baustein des Δ -förmigen Teils) und *B* (bildet das γ -förmige Fragment) der höheren Makrolide **L–O** [133, 135b]. Die Torsionswinkel wurden nach der IUPAC-IUB-Definition angegeben [138]: Sie betragen Null für eine synperiplanare Anordnung der Hauptkette.

Weit verbreitet ist auch die Herstellung von Polymermischungen (Blends) aus schwer abzubauenen und biologisch abbaubaren Materialien (hauptsächlich Stärke^[148]). Auf diese Weise können die Vorteile der petrochemisch zugänglichen Kunststoffe mit jenen von Biopolymeren kombiniert werden. Beim Abbau wird der biologisch verwertbare Teil gewissermaßen aus der Mischung herausgelöst, der Rest muß dann durch nichtbiologische Einflüsse entsorgt werden.

4.1. Anforderungen an biologisch abbaubare Polymere

Mikrobielle Abbauprozesse verlaufen im Gegensatz zu chemischen Verfahren gewissermaßen autokatalytisch, indem durch das abzubauen Substrat die Organismuspopulation vermehrt wird. Die beteiligten Bakterien sollten dabei selbst vom Abbau profitieren, d. h. die entstehenden Bruchstücke müssen auch von ihnen verwertet werden können.

Viele Monomere synthetischer Polyester und Polyamide sind zwar prinzipiell mikrobiell abbaubar, die entsprechenden Mikroorganismen haben aber keine geeigneten Depolymerasen, so daß der Abbau demzufolge unmöglich ist. Dasselbe gilt, wenn die Depolymerase vorhanden ist, die Bruchstücke aber nicht abgebaut oder metabolisiert werden können. Der wichtigste Spaltungstyp ist die Hydrolyse von Ester-, Amid- oder glykosidischen Bindungen. Die entsprechenden Hydrolasen brauchen nur Wasser als Reaktionspartner, und ihr extrazelluläres Auftreten ist deshalb leichter möglich, als wenn komplizierte Cosubstrate erforderlich wären. Große Chancen auf biologische Abbaubarkeit haben darum Polyester mit leicht nutzbaren Monomeren wie Glycolat, Lactat, Malat, Caprolacton und eben 3-Hydroxysäure-Derivate^[149]. Reine C-Kettenpolymere sind wenig geeignet, auch wenn deren Abbau nachgewiesen wurde^[150].

4.2. Extrazellulärer Polyhydroxysäuren-Abbau

Eine bemerkenswerte Eigenschaft vieler mikrobiell hergestellter PHAs ist ihre biologische Abbaubarkeit in der Umwelt, wobei sie anaerob schneller abgebaut werden als aerob. Wie Doi et al. fanden^[5, 76], sind für *A. eutrophus* unter anaeroben Bedingungen Acetat und (*R*)-3-Hydroxybutyrat die hauptsächlichen intrazellulären Metaboliten. Vermutlich ist dabei die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP gekoppelt. Im aeroben Zustand wird aber Acetyl-CoA im Citronensäurecyclus zu CO₂ und H₂O abgebaut und dabei ca. zwölf ATP-Äquivalente freigesetzt, was eine viel ökonomischere Verwertung der Polyester ermöglicht.

Viele Bakterien und Pilze verfügen über extrazelluläre Depolymerasen^[151], mit denen Sie PHAs abbauen und bei Bedarf als alleinige C-Quelle nutzen können. Solche Enzyme wurden unter anderem bei *Alcaligenes faecalis*^[152–155], *Pseudomonas lemoignei*^[156–160], *Pseudomonas delafiel-dii*^[161], *Penicillium simplicissimum*^[162] und *Eupenicillium sp.*^[162] beobachtet, wobei die Enzyme der ersten beiden Spezies mit Abstand am besten untersucht sind.

A. faecalis verfügt über zwei extrazelluläre Esterasen, eine P(3-HB)-Depolymerase und eine Oligomerhydrolase. Die Depolymerase baut sowohl P(3-HB) als auch wasserlösliche Oligomere ab. Allerdings zeigt sie eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber längeren Oligomeren und greift jeweils endoartig an der zweiten Esterbindung vom Hydroxyterminus her an^[152]. Auf diese Weise wird auch ein Octolid (d. h. ein Ring aufgebaut aus acht (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-Einheiten) angegriffen, aber nicht das an der Alkoholfunktion *tert*-Butyldimethylsilyl-geschützte offenkettige Trimer^[154].

Die Oligomerhydrolase greift nur wasserlösliche Oligomere an und zwar mit einer ungefähr zehnmal höheren Aktivität als die Depolymerase. Längere Polymerketten werden schneller abgebaut als Dimere. Von den vier möglichen Stereoisomeren des 3-Hydroxybuttersäure-Dimers werden die (*R,R*)- und etwas langsamer die (*R,S*)-Form^[73] hydrolysiert; auch der monomere Methylester wird angegriffen, die entsprechenden Ethyl- und Benzylester sind aber nahezu inert. Der Angriff erfolgt hier exoartig vom Säureende her^[153].

Auch das Gram-negative *P. lemoignei* besitzt zwei Enzyme, die am extrazellulären Abbau beteiligt sind, unterschei-

det sich aber insofern von *A. faecalis*, als nur die Depolymerase ausgeschieden wird. P(3-HB) wird extrazellulär zu einem Trimer/Dimer/Monomer-Gemisch abgebaut, das dann durch die Zellwand transportiert und erst innerhalb der Zelle durch eine Dimerhydrolase vollständig in Monomere verseift wird. Auch hier greift die Depolymerase endoartig an der zweiten oder dritten Esterverbindung vom Hydroxyterminus her an, wobei neben P(3-HB) auch Oligomere hydrolysiert werden können^[160]. Die Dimerhydrolase baut im Gegensatz zu *A. faecalis* neben dem (*R,R*)-Dimer das (*S,R*)-Dimer^[73] ab, die jeweiligen Enantiomere werden nicht verseift. Ebenso wird (*R*)-3-(Butanoyloxy)buttersäure angegriffen^[157].

Trotz zahlreicher Untersuchungen bleiben noch viele Fragen offen. So ist noch unklar, wie die Depolymerase sowohl wasserlösliche Oligomere als auch hydrophobe P(3-HB) angreifen kann, die hier im Gegensatz zum intrazellulären Fall (siehe Abschnitt 2.2.3) kristallin vorliegt! Aus chemischer Sicht wäre es auch interessant, den Einfluß von Endgruppen auf die Abbaubarkeit zu untersuchen; so ist synthetisch hergestellte all-(*S*)-P(3-HB) oder eine Stereoblock-P(3-HB) aus (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Segmenten biologisch nicht mehr verwertbar^[11].

5. Synthese von Poly[(*R*)-3-hydroxybuttersäure] und Derivaten

Viel früher noch als auf biotechnologischem Weg wurde P(3-HB) durch synthetische Verfahren hergestellt. Solche Prozesse werden durch die mittlerweile existierenden einfachen Herstellungsverfahren von (*R*)- und (*S*)-Hydroxysäuren zunehmend attraktiver. Grundsätzlich stehen für die Polymerisation zwei Typen von Monomeren zur Verfügung, nämlich die 3-Hydroxysäuren und die entsprechenden β -Butyrolactone. Die Säuren wurden allerdings infolge ihrer Crotonisierungsneigung nie eingesetzt, da durch Polykondensation nur aus sehr reinen Edukten Polyester hoher mittlerer Molekulargewichte synthetisierbar sind^[163]. Alle bis dato veröffentlichten Arbeiten gingen darum von β -Butyrolactonen aus, die unter Ringöffnung polymerisiert wurden. β -Propiolacton läßt sich leicht mit anionischen oder kationischen Initiatoren polymerisieren, auch α -mono- oder α,α -disubstituierte β -Lactone reagieren problemlos. Substituenten in β -Stellung vermindern die Reaktivität aber drastisch, so daß oftmals auch nach langen Reaktionszeiten unvollständige Umsätze festgestellt werden^[164].

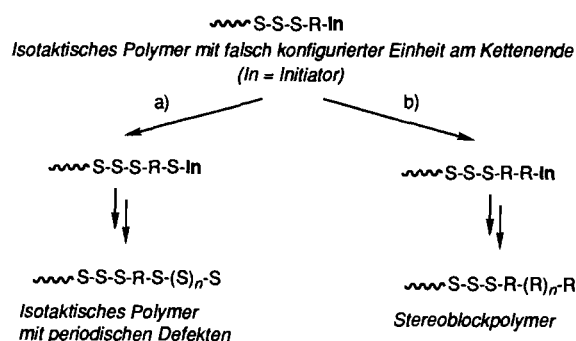
In allen bisher veröffentlichten Arbeiten wird P(3-HB) nach einem der drei folgenden Verfahren hergestellt: a) aus racemischem β -Butyrolacton und einem achiralen Initiator, b) aus racemischem β -Butyrolacton und einem chiralen Initiator oder c) aus enantiomerenreinem β -Butyrolacton und einem achiralen Initiator.

5.1. Polymerisation von racemischem β -Butyrolacton mit einem achiralen Initiator

Auf diese Weise können natürlich keine biologisch abbaubaren all-(*R*)-Polymere erhalten werden, allerdings wurden so mit dem leicht zugänglichen racemischen β -Butyrolacton^[165] geeignete Reaktionsbedingungen gefunden, die in

einigen Fällen auch zur Polymerisation von enantiomerenreinem Lacton verwendet wurden.

Der die Stereoselektivität bestimmende Schritt der Ringöffnungspolymerisation ist die Insertion eines Monomers in den endständigen Polymer-Initiator-Komplex^[166]. Grundsätzlich könnten so isotaktische (*-RRR-/-SSS-*), syndiotaktische (*-SRSRSR-*) oder ataktische (*-SSRSRRS-*) Polyester erhalten werden; β -Butyrolacton ergab allerdings nur isotaktische und ataktische P(3-HB). Je nachdem, ob das Polymerkettenende oder der Initiator selektivitätsbestimmend ist, können Stereoblockpolymere oder isotaktische Ketten mit periodischen Defekten resultieren, oder man bekommt ataktische Polymere, wenn kein Einfluß überwiegt (Schema 6). Die Taktizität bestimmte man früher durch Faser-Röntgenbeugungsanalyse^[167, 168], sie wird aber heute viel einfacher aus den ¹³C- und ¹H-NMR-Spektren abgeleitet. Zwischen isotaktischer und Stereoblock-P(3-HB) konnte bis jetzt weder röntgenbeugungsanalytisch noch durch Hochfeld-¹³C-NMR-Spektroskopie unterschieden werden^[169]. Wenn im folgenden von isotaktischen Polyestern die Rede ist, könnte es sich darum auch um Stereoblockpolymere handeln.



Schema 6. Stereoselektivität der Insertion eines Monomers in die endständige Initiator-Polymer-Bindung. R,S: (R)-konfigurierte bzw. (S)-konfigurierte Einheit im Polymer. Im Fall a) ist der Initiator für die Selektivität verantwortlich, bei b) die endständige Monomereinheit.

Ataktische und isotaktische Anteile lassen sich durch fraktionierende Fällung aus Aceton oder Methanol trennen, wobei das ataktische Polymer in Lösung bleibt. Die mehr oder weniger erfolgreich eingesetzten Initiatoren sind in Tabelle 3

zusammengestellt. Klassische Brönsted- oder Lewis-Säuren wie $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ^[170], $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$ ^[171, 172], $\text{Et}_3\text{O}^+ \text{BF}_4^-$ ^[164], Et_2AlCl ^[171] oder Nucleophile wie $n\text{BuLi}$ ^[171], Pyridin^[173], NEt_3 ^[171, 173], PPh_3 ^[173], NaOMe ^[170] und Tetraethylammoniumbenzoat^[170] liefern im besten Fall ölige Oligomengemische.

Agostini et al.^[174] berichteten 1971 erstmals ausführlich über die Herstellung von P(3-HB) aus β -Butyrolacton mit $\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, allerdings erwähnten Inoue et al. eine solche Säure schon 1961 beiläufig im Rahmen einer Kurzmitteilung zur Polymerisation von β -Propiolacton mit ZnEt_2/O_2 ^[172]. Tani et al.^[170, 171] verbesserten später die Reaktionsbedingungen der Al-initiierten Ringöffnungspolymerisation, die in der Folge verschiedentlich auch von anderen Gruppen übernommen wurden. Generell fallen in Tabelle 3 die langen Reaktionszeiten und die oft unbefriedigenden Umsätze auf, wobei die Ausbeute an isotaktischer P(3-HB) im besten Fall ca. 50% beträgt. Die erreichbaren Molekulargewichte sind je nach Initiator vergleichbar mit jenen von mikrobiologisch hergestellter P(3-HB), allerdings ist die Molekulargewichtsverteilung viel breiter. Eine Ausnahme machen die beiden letzten Systeme (Tabelle 3, Nr. 8 und 9), mit denen relativ enge Molekulargewichtsverteilungen zugänglich sind. Bei Nr. 9 ist der eigentliche Initiator Kaliumcrotonat, das ebenso wie Kaliumacetat oder Kaliumbenzoat in Gegenwart von [18]Krone-6^[177] oder Dibenzo[18]Krone-6^[173] anstelle von Kaliumnaphthalin als Starter eingesetzt werden kann.

5.2. Polymerisation von racemischem β -Butyrolacton mit einem chiralen Initiator

Bei der Polymerisation eines racemischen Monomers mit einem geeigneten chiralen Initiator sollte im Idealfall nur ein Enantiomer umgesetzt werden, während das andere im Reaktionsgemisch zurückbleibt (die Polymerausbeute kann also maximal 50% betragen). Vor allem LeBorgne und Spassky et al. haben mit einem Komplex aus (R)-3,3-Dimethyl-1,2-butandiol und ZnEt_2 als Initiator relativ erfolgreich Oxirane und Thiirane polymerisiert^[178]; mit β -Butyrolacton ist die Reaktion allerdings weit weniger selektiv (Tabelle 4).

Die nach dieser Strategie erreichbaren Selektivitäten sind sicher noch nicht zufriedenstellend. Im zweiten Fall dürfte es

Tabelle 3. Polymerisation von *rac*- β -Butyrolacton mit achiralen Initiatoren.

Nr.	Initiator	Reaktionsbedingungen			Ausb. an Polymer [%]	Isotakt. Frakt. [%]	$M_n \times 10^{-3}$ (der isotakt. Frakt.)	M_w/M_n [d]	Lit.
		T [°C]	t [d]	Lsm.					
1	$\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 1:1$ [a]	53	4	ohne	52	—	—	—	[174]
2	$\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{Epichlorhydrin} = 1:0.8:1$ [a]	60	10	Toluol	52	37	—	—	[171]
3	$\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 1:1$ [a]	60	7	Toluol	—	28	21.4 [d]	5.6	[175]
4	EAO [b]	60	7	Toluol	78	52	400 [d]	—	[170]
5	EAO [b]	60	14	Toluol	51	20	110 [d]	8.0	[169]
6	$\text{Zn}(\text{OEt})_2 \cdot \text{Al}(\text{O}i\text{Pr})_3$	40	14	Toluol	45	—	—	—	[164]
7	Bu_3SnOMe	50	2	ohne	—	—	ca. 6 [e]	—	[173]
8	TPPAICl [c]	25	33	CH_2Cl_2	60	—	4.4 [f]	1.05	[176]
9	Kaliumnaphthalid + Cryptand [2.2.2]	25	8	THF	95	0	11 [f]	1.29	[177]

[a] Der Initiator wird vor der Monomerzugabe in Toluol aus AlEt_3 und H_2O hergestellt. [b] Der Ethylaluminiumoxid(EAO)-Initiator wird wie in [a] hergestellt, dann das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand bei $180^\circ\text{C}/10^{-3}$ Torr getrocknet und wieder in Toluol gelöst. [c] Initiator aus 5,10,15,20-Tetraphenylporphin und Et_2AlCl . [d] Mit Gelpermeationschromatographie durch den Vergleich mit Polystyrol-Standards bestimmt. [e] Aus dem ¹H-NMR-Spektrum abgeschätzt. [f] Mit Dampfdruckosmometrie bestimmt. Das Monomer/Initiator-Verhältnis ist für Nr. 8 100 und für Nr. 9 150.

Tabelle 4. Polymerisation von *rac*- β -Butyrolacton mit den chiralen Initiatoren *A* (Komplex aus (*R*) 3,3-Dimethyl-1,2-butandiol und ZnEt_2) und *B* (*N,N'*-Disilyliden-(1*R*,2*R*)-1,2-cyclohexandiaminatocobalt(II)- AlEt_3 -Komplex).

Kat.	Reaktionsbedingungen			Umsatz [%]	Isotakt. Frakt. [%]	$[\alpha]_D$ vom Polymer [a]	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
	<i>T</i> [°C]	τ [d]	Lsm.					
<i>A</i> [179]	25	0.25	Toluol	84	27	−0.6 (CHCl_3) [b]	ca. 20	—
<i>B</i> [180]	30	14	Benzol	41	—	−46.1 (Benzol) [c]	—	9.4

[a] Drehwert von mikrobieller all-(*R*)-P(3-HB): $[\alpha]_D = -1.8$ (CHCl_3). [b] $[\alpha]_D$ des nicht umgesetzten Monomers: -12.8 (CHCl_3); (*S*)- β -Butyrolacton: $[\alpha]_D = -34.8$ (CHCl_3). [c] $[\alpha]_D$ des nicht umgesetzten Monomers: -1.65 (Benzol); (*S*)- β -Butyrolacton: $[\alpha]_D = -50.0$ (Benzol).

sich entweder um einen stark ataktischen Polyester oder um eine isotaktische P(3-HB) niedriger Molekülmasse handeln, da all-(*R*)-P(3-HB)-Oligomere $>1000 \text{ g mol}^{-1}$ in Benzol nahezu unlöslich sind.

5.3. Polymerisation von enantiomerenreinem β -Butyrolacton mit einem achiralen Initiator

Enantiomerenreines β -Butyrolacton kann entweder durch Cyclisierung von 3-Brombuttersäure^[124d] oder 3-Mesyloxybuttersäure^[124e] sowie durch Pyrolyse des cyclischen Orthoesters aus 3-Hydroxybuttersäure und Orthoessigsäuretriethylester^[124a, b] hergestellt werden, allerdings nur mit maximal 35% Ausbeute. Vierring-Lactone lassen sich mit Nucleophilen entweder unter Retention (Weg *a* in Tabelle 5) oder Inversion (Weg *b* in Tabelle 5) öffnen^[181], deshalb muß auch nach diesem Verfahren erhaltene P(3-HB) nicht zwangsläufig aus gleich konfigurierten Struktureinheiten aufgebaut, also 100% isotaktisch sein (Tabelle 5).

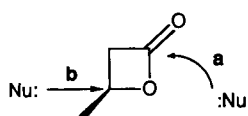
Wiederum waren es Agostini et al.^[124d], die als erste (*R*)- β -Butyrolacton mit $\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zu einer bevorzugt (*R*)-konfigurierten P(3-HB) polymerisierten, wobei das Lacton unter Retention geöffnet wurde. Lenz et al.^[182] fanden später mit demselben System gerade den umgekehrten Öffnungsmechanismus, nämlich Inversion (Nr. 2 in Tabelle 5). Den Mechanismuswechsel erklärten sie mit der anderen Herstellungsweise des Al-Komplexes^[183]. In allen Fällen wurde keine stereoreguläre P(3-HB) erhalten, wahrscheinlich wegen der polymeren Natur der eingesetzten Initiatoren, die unterschiedliche aktive Zentren enthalten können (siehe^[183], aber auch^[178a]). Aufgrund des Drehwerts der erhaltenen Polymere und der Reproduzierbarkeit der Versuche scheint das Zn-System am besten geeignet zu sein, für das Doi et al. neulich zeigen konnten, daß bei der Polymerisation von β -Butyrolacton-Enantiomergemischen die (*R*)- und (*S*)-Einheiten im Polyester statistisch verteilt werden^[184].

Mit dem Ethylaluminiumoxid(EAO)-Initiator nehmen die erreichbaren Molekulargewichte mit größer werdendem Rest im β -Lacton ab. Auf diese Weise konnten Tani et al. 1977 γ -mono-, di- und trichlorsubstituierte β -Lactone polymerisieren^[170], die mittlerweile nach der Wynberg-Methode auch enantiomerenrein zugänglich sind^[185]. Ein weiteres funktionelles Polymer wurde von Lenz et al. aus racemischem oder (*R*)-konfiguriertem β -Alkoxyacetyl- β -propiolacton hergestellt. Die resultierenden Äpfelsäure-Polyester sind biologisch abbaubar^[186].

5.4. Synthese definierter Oligomere und Polymere aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure

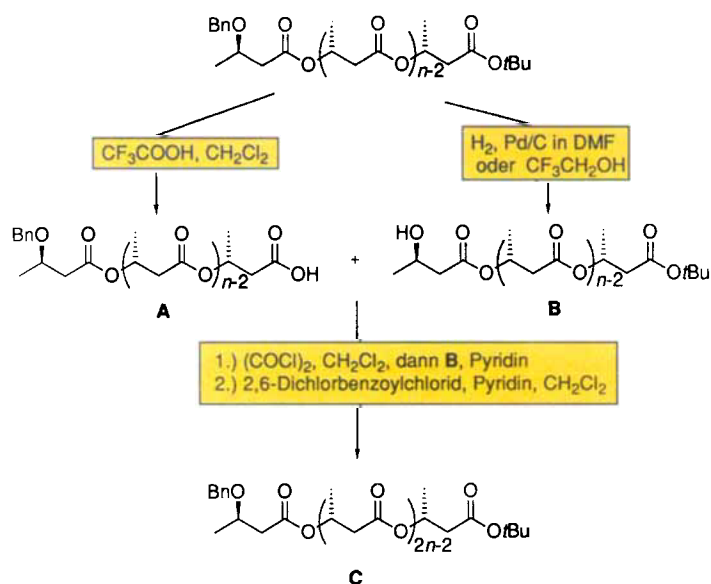
Durch gezielte Synthese sind auch Oligomere einheitlicher Molekülmasse hergestellt worden. Solche Verbindungen waren in der Vergangenheit aus mehreren Gründen von Interesse. So konnten über sie nähere Hinweise über den intra- und extrazellulären Abbaumechanismus von P(3-HB) gewonnen werden^[152, 154, 187], oder es wurden die entsprechenden offenkettigen Oligolid-Vorläufer synthetisiert^[131]. Bei allen bisherigen Synthesen erfolgte die Kettenverlängerung durch schrittweises Anhängen von Monomer-Einheiten. Wir haben uns zum Ziel gesetzt, Hinweise über Struktur und Funktion des schon oben erwähnten, mutmaßlichen P(3-HB)-haltigen Ionenkanals und Calciumpolyphosphat zu erhalten. Dazu sind Polymere mit Kettenlängen zwischen 100 und 150 Monomer-Einheiten nötig. Zur Herstellung so großer Moleküle ist ein schrittweises Vorgehen natürlich nicht mehr sinnvoll. Durch Polymerisation von enantiomerenreinem β -Butyrolacton wären wahrscheinlich relativ eng verteilte P(3-HB)-Proben erhältlich (Tabelle 3, Nr. 8 und 9), allerdings dürften sie aufgrund der oben beschriebenen Resultate nicht einheitlich konfiguriert sein. Als Alternative bietet sich die Segmentkondensations-Strategie an, bei der aus einem unsymmetrisch geschützten Oligomer je eine

Tabelle 5. Polymerisation von chiralem β -Butyrolacton mit achiralen Initiatoren.



Nr.	Initiator	Lacton-Konfiguration	Polymer	$[\alpha]_D$ in CHCl_3 [a]	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n	Lit.
1	$\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:1)	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)-P(3-HB)	+4.0 [b]	—	—	[124d]
2	$\text{AlEt}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:1)	(<i>S</i>)	(<i>R</i>)-P(3-HB)	+6.9	30	8.0	[182]
3	$\text{ZnEt}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)-P(3-HB)	−7.0	14	1.5	[182]
4	EAO [c]	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)-P(3-HB)	−5.8	24	7.8	[182]

[a] Bei λ_D hat all-(*R*)-P(3-HB) einen Drehwert von +7.4 (Die Wellenlänge in Lit. [182] (Nr. 2–4) ist wahrscheinlich falsch angegeben mit $\lambda = 589 \text{ nm}$). [b] $[\alpha]_{565}$ von all-(*R*)-P(3-HB): +10.2 (CHCl_3). Als Monomer wurde (*R*)- β -Butyrolacton von 73% optischer Reinheit verwendet. [c] EAO siehe Fußnote [b] in Tabelle 3.



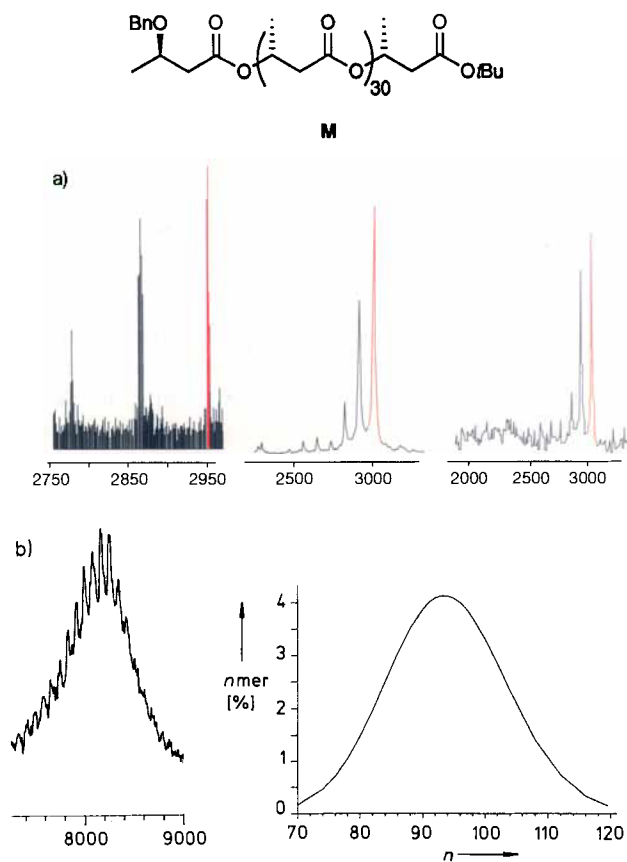
n	n -mere Säure A / n -merer Alkohol B	$2n$	$2n$ -meres C	Ausbeute [%] nach der Säurechloridkupplung
4	D/E	8	F	>95
8	G/H	16	I	90
16	K/L	32	M	60
32	N/O	64	P	45
64/32	Q/R	96	S (96meres)	45

Schema 7. Segmentkondensations-Algorithmus zur Synthese definierter Oligomere aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure, indem eine n -mere Säure **A** mit einem n -meren Alkohol **B** zu einem „doppelt so großen“ $2n$ -meren **C** gekuppelt wird. Die Ausbeuten nach der Säurechlorid-Kupplung nehmen mit steigendem Molekulargewicht der Verbindungen ab. Darum wurde zur Verbesserung der Gesamtausbeute bei der Herstellung der größeren Moleküle (**M**, **P** und **S**) mit 2,6-Dichlorbenzoylchlorid nachgekuppelt. Diese Methode ermöglicht die Aktivierung einer Säure in Gegenwart eines Alkohols [188].

der beiden Schutzgruppen selektiv entfernt wird. Die geschützten Teile werden dann zu einem „doppelt so großen“ Molekül gekuppelt. Das in Schema 7 als Ausgangsverbindung verwendete Tetramer wurde nach einem früher beschriebenen Verfahren hergestellt^[131], das allerdings stark modifiziert wurde; das Kupplungsverfahren über das Säurechlorid, die Benzylether- und *tert*-Butylester-Schutzgruppe wurden aber beibehalten.

Die Charakterisierung der gereinigten Produkte wurde mit steigender Kettenlänge der Verbindungen immer schwieriger, da diese infolge ihrer ähnlichen Strukturen im wesentlichen dieselben analytischen Daten haben. Glücklicherweise wurden in letzter Zeit große Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie mit den sogenannten weichen Ionisationsmethoden gemacht^[189]. Im Falle von P(3-HB) waren die Methoden allerdings nicht alle gleich leistungsfähig, die größeren Moleküle konnten schließlich nur noch mit matrix-unterstützter Laserdesorption/ionisation (LDI)-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abb. 3a, b).

Im Falle des vollgeschützten 32meren **M** zeigten die Massenspektren in Abbildung 3a jeweils drei Signale (als Isotopenverteilungen) mit ungefähr gleichen m/z -Werten und relativen Intensitäten. Solche Peaks wurden bei den kleineren Oligomeren nicht beobachtet. Diese kommen nicht durch Fragmentierung zustande, sondern repräsentieren die molekulare Zusammensetzung der Probe. Eine genauere Untersuchung der Reaktionssequenzen zeigte, daß unter den in



n -meres	90	91	92	93	94	95	96
$I_{\text{gef.}}$	9	11	12	13.5	13	11	8.5
$I_{\text{ber.}}$	3.9	4.0	4.1	4.1	4.1	4.1	4.0

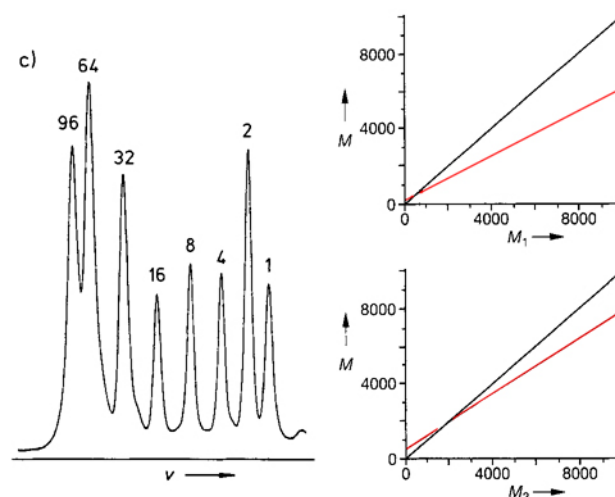


Abb. 3. a) Sekundärionisations- (in einer 3-Nitrobenzylalkohol-Matrix, links), Plasmasorption/ionisation (PDI)- (Mitte) und Laserdesorption/ionisation (LDI)-Massenspektren (in einer 2,6-Dihydroxybenzoesäure-Matrix, rechts) des vollgeschützten 32mer **M** (in Schema 7). Für die Aufnahme des PDI-Spektrums danken wir Prof. Dr. M. Przybylski und K. Schneider von der Universität Konstanz und für die Messung der LDI-Spektren Dr. K. Börnsen und Dr. M. Schär (Ciba-Geigy, Basel). b) Links: LDI-Massenspektren des vollgeschützten „96mer“ **S** in Schema 7. In der Verteilung (rechts) ist nicht mehr das 96mer, sondern das 93mer am häufigsten vertreten. Auf der x-Achse des Verteilungsdiagramms ist der Polymerisationsgrad n aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil an n -mer in %. Tabelle: Vergleich der ermittelten Verteilung des „96meren“ mit jener, die unter idealen Polymerisationsvoraussetzungen mit einer kinetischen Kettenlänge von 93 berechnet wurde ($M_w/M_n = 1.01$) [163]. c) Gelpermeationschromatogramm der vollgeschützten P(3-HB)-Verbindungen (links). v = Fluß. Vergleich der Molekülmassen mit den durch Polystyrol- oder Polyisopren-Eichung bestimmten Werten (rechts). M = reale Molekülmasse; M_1 = scheinbare Molekülmasse mit Polystyrol; M_2 = scheinbare Molekülmasse mit Polyisopren.

Schema 7 spezifizierten Entschützungsbedingungen endständige Einheiten abgespalten werden können. Schließlich konnte deshalb nur eine Polymermischung mit einem mittleren Polymerisationsgrad (\bar{X}_n) von 93 synthetisiert werden, die allerdings immer noch enger verteilt war, als es unter idealen Polymerisationsbedingungen^[190] der Fall wäre (Abb. 3b; siehe auch Hinweis auf eigene Arbeiten in Lit.^[106] und Lit.^[135b]).

Mit den synthetisierten P(3-HB)-Oligomeren steht eine Reihe von Verbindungen zur Verfügung, mit denen durch Gelpermeationschromatographie die Molekülmassen von Polymeren analoger Konstitution und Konfiguration verlässlich bestimmt werden können. Für uns war das vor allem in bezug auf den erwähnten Ionenkanal von Interesse. Ein Molekulargewichtsvergleich mit den durch Polystyrol- und Polyisopren-Eichung erhaltenen Werten zeigte, daß die mit diesen Standards bestimmten Molekulargewichte zum Teil beträchtlich höher liegen (Abb. 3c).

5.5. Mögliche künftige Anwendungen von Polyhydroxyfettsäureestern

Die Polyester P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) werden bisher als einzige PHAs biotechnologisch in größeren Mengen produziert. Aus 2.5 kg Glucose kann so ca. 1 kg P(3-HB) gewonnen werden^[191a]. Mitte der neunziger Jahre soll die bisherige Jahresproduktion an BIOPOL von ca. 300 Tonnen auf 5000–10000 Tonnen gesteigert werden^[191b]. Die Produktionskosten betragen heute etwa 50 DM pro kg^[191a], zukünftig wird ein Kilopreis im Bereich von 5–10 DM angestrebt^[141].

Durch den Einsatz phototropher Mikroorganismen ist es möglich, selbst Sonnenlicht als Energiequelle zu nutzen. So synthetisiert *Rhodobacter sphaeroides* P(3-HB), das bis zu 70 % seines Trockengewichts ausmacht^[192]. Es ist also möglich, PHAs unterschiedlichster Zusammensetzung und Materialeigenschaften mikrobiologisch herzustellen, wenn auch noch in den meisten Fällen mit unbefriedigender Ausbeute und auf Erdöl basierenden Rohstoffen. Wie weit diesen Nachteilen mit gentechnologisch modifizierten Organismen entgegengewirkt werden kann, wird sich in Zukunft herausstellen.

Die synthetischen Verfahren sind zur Zeit sicher noch nicht ausgereift genug, um es mit der biotechnologischen Herstellung, zumindest von BIOPOL, aufzunehmen. Eine breite Vielfalt an (R)- und (S)-Hydroxysäuren ist heute durch enantioselektive Hydrierung aus den entsprechenden 3-Ketoestern jedoch schon auf einfache Art zugänglich^[193]. Es ist darum zu erwarten, daß künftig auch synthetische Prozesse entwickelt werden, die mit der mikrobiellen Herstellung konkurrieren können. Mit einem solchen Verfahren wären wahrscheinlich ohne große Änderung der Reaktionsbedingungen die unterschiedlichsten Polyester zugänglich. Ebenfalls dürfte die Aufarbeitung gegenüber biotechnologischen Herstellungsmethoden wesentlich einfacher sein, da in organischen Lösungsmitteln und in hochkonzentrierter Form gearbeitet werden könnte.

BIOPOL ist bezüglich Molekulargewicht, Schmelzbereich, Kristallinität, Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit Polypropylen ziemlich ähnlich; etwas nachteilig wirken sich die geringe Reißfestigkeit, die schlechte Lösungsmittelbe-



Abb. 4. Haarwaschmittelflaschen aus BIOPOL nach 0, 3 und 9 Monaten in Komposterde. Deutlich sichtbar ist der langsamere Abbau der bedruckten Teile. Wie Doi et al. zeigten^[92b], findet der Abbau von der Oberfläche her statt und verläuft umso schneller, je größer die Oberfläche wird. Die nicht-enzymatische Hydrolyse ist um einige Größenordnungen langsamer als die enzymatische Depolymerisation.

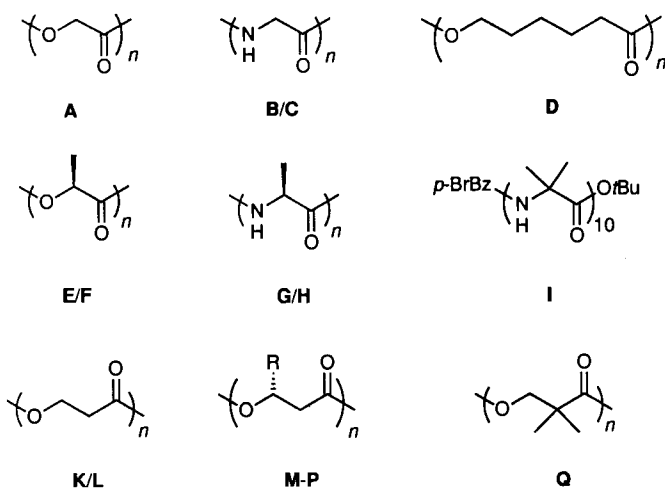
ständigkeit^[194], die begrenzte Beständigkeit gegen Säuren, Basen und Hitze sowie nicht zuletzt der hohe Preis aus. Es kann thermoplastisch zu Formteilen, Folien und Fasern verarbeitet werden^[195], wurde bisher aber hauptsächlich zur Produktion von Haarwaschmittelflaschen verwendet (Abb. 4). Andere Verwendungsgebiete solcher Polyester liegen in der Landwirtschaft (z.B. in Form von Frühbeetfolien, Samenkapseln oder Retardpräparaten zur Freisetzung von Pestiziden oder Herbiziden^[1b]) und wegen ihrer Biokompatibilität in der Human- und Veterinärmedizin. So existiert mittlerweile eine Vielfalt von Patenten, in denen unter anderem der Einsatz als chirurgisches Implantatmaterial zur Unterstützung von Organ- und Gewebsheilungsprozessen^[196], als Trägermaterial für slow-release-Systeme^[10, 197], zur Herstellung von Pudern^[198] oder als Bestandteil von Membranen^[199] beschrieben wird. Auch wurde zur Nitrateliminierung aus Trinkwasser ein Prozeß unter Beteiligung von P(3-HB) entwickelt^[200].

In jüngster Zeit versucht man, den Anwendungsbereich von P(3-HB) und P(3-HB/3-HV) durch die Anfertigung von abbaubaren Blockcopolymeren mit Polystyrol und Polyethern^[201] sowie Blends mit Polyethylen, Polystyrol, Polyvinylchlorid oder Polyethylenoxid weiter auszudehnen^[202]. Filme von P(3-HB) zeigen Gasbarrieren vergleichbar mit jenen von Polyvinylchlorid und Polyethylenterephthalat^[202a]. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte es durchaus auch als Verpackungsmaterial verwendet werden.

Nach der zunehmenden Zahl von Veröffentlichungen zu schließen, befindet sich das Gebiet in einer stürmischen Entwicklung. Es bleibt abzuwarten, wie sich PHAs gegen andere Biopolymere durchsetzen können.

6. Was ist bekannt über die Struktur von Polyestern?

Die Strukturen vieler Polyester wurden aus Röntgenbeugungsexperimenten an Fasern abgeleitet^[203]. Im Gegensatz zu Polyamiden können Polyester keine Wasserstoffbrücken bilden; das Kraftfeld bei Molecular-Modeling-Untersuchungen setzt sich darum nur aus Torsions-, nicht-bindenden und elektrostatischen Energietermen zusammen^[204]. In Ab-



Name	Konformation [a]	Identitätsperiode [Å]	Lit.
A Polyglycolid	gestaffelt	7.02	[205]
B Polyglycin I	?	–	[206]
C Polyglycin II	3 ₁ -Helix	9.3	[207]
D Polycaprolacton	gestaffelt	17.05	[208]
E β-Poly-(S)-lactid	3 ₁ -Helix	9.00	[209b]
F α-Poly-(S)-lactid	10 ₃ -Helix	28.8	[209]
G α-Poly-(S)-alanin	β-Faltblatt	6.9	[210]
H β-Poly-(S)-alanin	47 ₁₃ -Helix [b]	70.3	[211]
I Deca-α-aminoisobuttersäure	16 ₅ -Helix [c]	31.5	[212]
K Poly-β-propiolacton I	?	–	[213]
L Poly-β-propiolacton II	gestaffelt	4.77	[214]
M Polydiketen (R: =CH ₂)	2 ₁ -Helix	7.75	[215]
N P(3-HB) (R: -CH ₃)	2 ₁ -Helix	5.96	[167, 204, 216]
O P(3-HV) (R: -C ₂ H ₅)	2 ₁ -Helix	5.56	[168]
P P(3-HO) (R: -C ₅ H ₁₁)	2 ₁ -Helix	4.55	[217]
Q Poly-α,α-dimethylpropiolacton	2 ₁ -Helix	6.03	[218]

[a] In Anlehnung an die kristallographische Bezeichnungsweise von Schraubenachsen wird die Helixsymmetrie in der Form n_r ausgedrückt, d.h. innerhalb einer Identitätsperiode bilden n Struktureinheiten r Umdrehungen [219, 220]. Diese Klassifizierungsart unterscheidet sich von der bei Proteinen üblichen Nomenklatur; dort bedeutet in einer n_r -Helix n die Anzahl Aminosäuren pro Umdrehung und r die Atomzahl des Ringes, gebildet aus einer Wasserstoffbrücke und dem zugehörigen Hauptkettensegment [138]. [b] Entspricht einer α-Helix. [c] Entspricht einer 3₁₀-Helix.

Abb. 5. Bisher bekannte Festkörperstrukturen von Polyestern aus bifunktionalen Monomeren und, sofern untersucht, der entsprechenden Poly(α-amino-säure)amide.

bildung 5 sind bisher bekannte Strukturen aliphatischer Polyester aus Hydroxysäuren und, sofern vorhanden, entsprechender Aminosäure-Analoga aufgeführt. Oftmals konnten je nach Aufarbeitungsmethode Feststoffe mit unterschiedlichen Konformationen isoliert werden, deren Strukturen im Falle von Poly-β-propiolacton und Polyglycin noch nicht alle bestimmt wurden.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen ist wohl etabliert^[221]. Es zeigt sich, daß auch für Polyester gewisse Regeln abgeleitet werden können:

- Polymere vom Typ $[-O-(CH_2)_n-CO-]$ nehmen eine gestaffelte Konformation ein (Zickzackkette), zumindest für $n = 1, 2$ und 5 (A, D bzw. L in Abb. 5)^[203].
- Substituierte Poly-β-propiolactone bilden immer eine 2₁-Helix (M–Q in Abb. 5). In der Reihe β-substituierter Poly-β-propiolactone nimmt die Ganghöhe der Helix mit steigender Substituentengröße ab (N, O und P in Abb. 5). Nach Marchessault et al. ist bei 4.5 Å eine untere Grenze

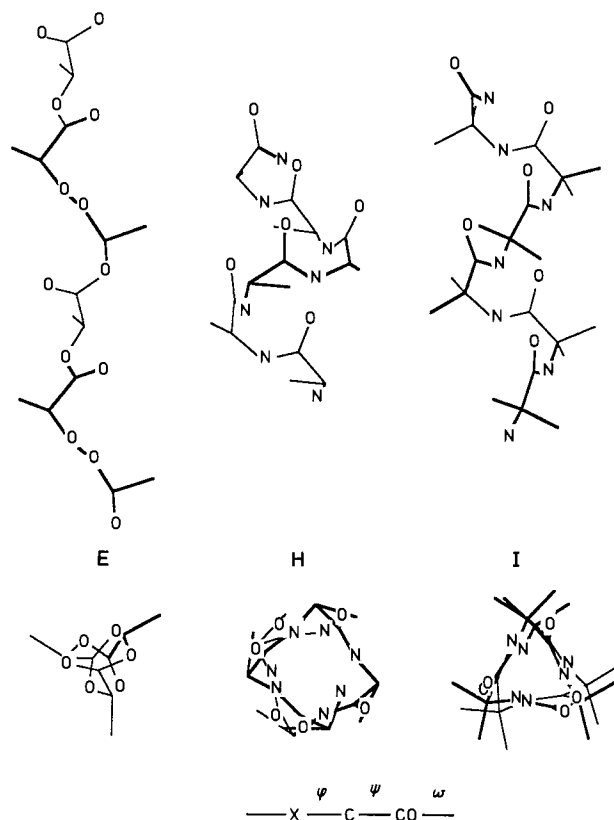
erreicht, die ohne Änderung der Helixgeometrie nicht unterschritten werden kann^[217].

Im folgenden sollen einige ausgewählte Strukturen etwas detaillierter vorgestellt werden.

6.1. Strukturvergleich der Homopolymere aus α-Hydroxysäuren und α-Aminosäuren

Für Polylactid wurden zwei Konformationen ermittelt, eine 10₃- und eine 3₁-Helix, die nahezu denselben Energieinhalt haben. Letztere ähnelt sehr stark der 3₁-Helix von Polyglycin (Tabelle in Abb. 6), das in dieser Modifikation keine intramolekularen Wasserstoffbrücken bildet^[207]. Die α-Helix von Polyalanin (H in Abb. 5 und 6), ein Strukturtyp, der durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, kommt bei Polyestern nicht vor.

α-Aminoisobuttersäure (Aib) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die aber in vielen natürlichen Peptiden (z.B. den Peptaibolen) enthalten ist^[222]. Aus vollgeschützten Oligomeren mit bis zu zehn Aib-Einheiten konnte man Einkristalle züchten^[212, 223]. Aufgrund des Substitutionsmusters von Aib ist die bevorzugte Sekundärstruktur solcher Oligomere nicht die α-, sondern die 3₁₀-Helix mit etwas kleinerem



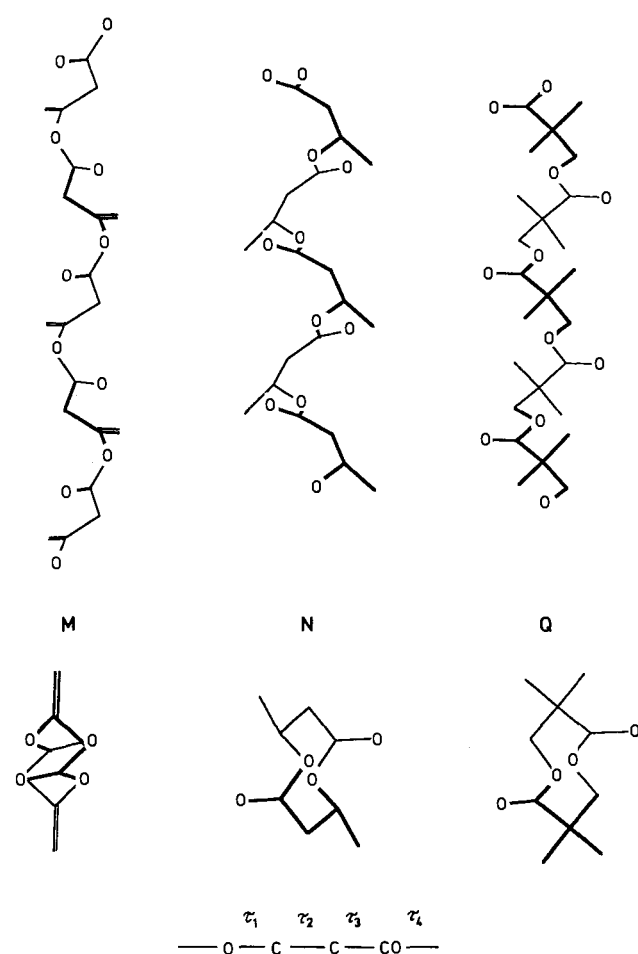
Polymer	Ganghöhe [Å]	φ [°]	ψ [°]	ω [°]
Poly-(S)-lactid : 3 ₁ -Helix E	9.0	-74	+144	180
Polyglycin : 3 ₁ -Helix C	9.3	+/-80	+/-150	180
Poly-(S)-alanin H	5.4	-66	-44	+179
p-BrBz-(Aib) ₁₀ -OtBu I	6.3	+/-54	+/-31	+/-176

Abb. 6. MacMoMo-Ansichten und Vergleich der Torsionswinkel der 3₁-Helix von Poly-(S)-lactid E, der α-Helix von Poly-(S)-alanin H und der 3₁₀-Helix von Deca-α-aminoisobuttersäure I. Gezeigt sind jeweils fünf Struktureinheiten. Die Torsionswinkel sind wie in Abbildung 2c definiert; die Buchstaben E, H und I beziehen sich auf die Verbindungen in Abbildung 5.

Innendurchmesser, die im Decameren **I** (Abb. 5 und 6) nahezu ideal ausgebildet ist. Auch diese Struktur wird von intramolekularen Wasserstoffbrücken stabilisiert und hat demzufolge kein Analogon bei den Polyestern. Überraschenderweise haben Oligomere von α,α -Diethylglycin (Deg) und α,α -Dipropylglycin (Dpg) gestaffelte Konformationen, stabilisiert durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Amid-H-Atomen und den benachbarten Carbonylgruppen, die offensichtlich energetisch günstiger sind als eine 3_{10} -Helix^[223].

6.2. Strukturvergleich der Homopolymere von 3-Hydroxysäuren – Modellieren mit den Strukturparametern der Oligolide von (R)-3-Hydroxybuttersäure

Dieselbe linksgängige 2_1 -Helix mit einer Identitätsperiode von 5.9 Å wurde von drei Arbeitsgruppen^[167, 204, 216] mit



Polymer	Ganghöhe [Å]	τ_1 [°]	τ_2 [°]	τ_3 [°]	τ_4 [°]
Poly- α,α -dimethyl- β -propiolacton Q	6.03	+/-178	+/-41	+/-61	+/-164
Poly-diketen M	7.75	+/-84	+/-74	+/-147	+/-177
Poly-(R)-3-hydroxybuttersäure N	5.96	+162	-52	-42	-175
Poly-(R)-3-hydroxyvaleriansäure O	5.56	+136	-60	-21	179
Poly-(R)-3-hydroxyoctansäure P	4.55	+111	-68	+15	-161

Abb. 7. MacMoMo-Ansichten und Vergleich der Torsionswinkel der 2_1 -Helix von Polydiketen **M**, Poly-(R)-3-hydroxybuttersäure **N** und Poly- α,α -dimethyl- β -propiolacton **Q**. Gezeigt sind jeweils fünf Struktureinheiten. Die Torsionswinkel sind wie in Abbildung 2c definiert; die Buchstaben **M**, **N** und **Q** beziehen sich auf die Verbindungen in Abbildung 5. Die Werte für P(3-HB) sind aus Lit. [170] entnommen.

unterschiedlichen Lösungsansätzen aus dem Beugungsmuster von P(3-HB)-Fasern abgeleitet^[224a]. Je nach Methode werden etwas andere Torsionswinkel ermittelt, sie liegen jedoch relativ nahe beieinander ($\tau_1 = +142^\circ$ bis $+152^\circ$, $\tau_2 = -52^\circ$ bis -59° , $\tau_3 = -31^\circ$ bis -42° und $\tau_4 = -173^\circ$ bis -180° ; Abb. 7).

Bisher konnte von P(3-HB) oder linearen Oligomeren von (3-HB) noch keine geeigneten Einkristalle gezüchtet werden^[224b]; die P(3-HB)-Helix wurde darum noch nie „direkt gesehen“. Die zur Zeit einzigen exakten Strukturparameter sind jene der P(3-HB)-Oligolide (siehe oben, Abb. 2). So kann aus dem S-förmigen Strukturteil (Abb. 2b, grün) eine linksgängige Helix mit ca. zwei Einheiten pro Umdrehung (2_1 -Helix) und aus dem Δ -förmigen Strukturelement (Abb. 2b, rot) eine rechtsgängige Helix mit ungefähr drei Einheiten pro Umdrehung (3_1 -Helix) und entspre-

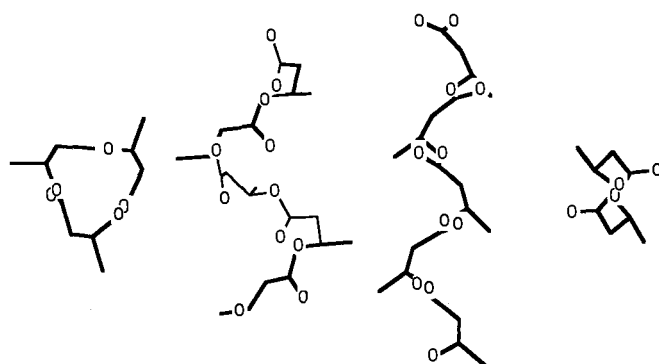


Abb. 8. MacMoMo-Ansichten der 2_1 -Helix (rechts), die aus dem S-förmigen Strukturteil (Abb. 2b, grün) konstruiert wurde und der 3_1 -Helix (links), die aus der Δ -förmigen Windung (Abb. 2b, rot) hervorgeht. In der Mitte sind die jeweiligen Projektionen entlang den Helixachsen gezeigt (es ist jeweils nur eine Windung dargestellt).

chend größerem Innendurchmesser konstruiert werden (Abb. 8)^[133, 135b].

Im Gegensatz zur 2_1 -Helix, in der die Estercarbonyl-Ebene fast senkrecht zur Helixachse gerichtet ist, steht sie in der 3_1 -Helix nahezu parallel dazu. Letzterer Strukturtyp wurde bis jetzt in festem P(3-HB) noch nicht beobachtet, was allerdings ein Vorkommen in Lösung nicht ausschließt. Die Struktur in Lösung war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, mit zum Teil kontroversen Resultaten^[225].

Unter Zug ändern sich die Identitätsperioden der Polyester, vermutlich weil sich entweder die Helix oder die amorphen Bereiche in eine gestaffelte Konformation (Zickzackkette) umwandeln^[167, 204b]. Neuerdings haben Marchessault et al. durch Energieminimierung mit dem MM2-Kraftfeld die Konformation einer solchen Zickzackanordnung für P(3-HB) berechnet^[226]. Die Kette ist nicht ideal gestaffelt, die Torsionswinkel betragen $\tau_1 = +113^\circ$, $\tau_2 = -169^\circ$, $\tau_3 = -113^\circ$ und $\tau_4 = +172^\circ$ (Identitätsperiode: 4.60 Å, bei idealer Staffellung 4.74 Å).

Mit Röntgenbeugung und ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß das Copolymer P(3-HB/3-HV) bis ca. 40% HV-Gehalt in der P(3-HB)-Helix und ab 55% HV in der P(3-HV)-Helix kristallisiert (Isodimorphie)^[5, 227]. Poly- β -isopropyl- β -propiolacton kristallisiert wahrscheinlich auch in einer 2_1 -Helix, allerdings kennt man nur die Identitätsperiode von 6.49 Å^[228]. Leider ist zur Zeit ein Strukturvergleich zwischen PHAs und den entsprechenden β -Aminosäure-Homopolymeren nicht möglich, da vom letzteren Typ offensichtlich keine Strukturen bekannt sind^[229].

7. Poly(R)-3-hydroxybuttersäure-Calciumpolyphosphat[P(3-HB)CaPolyP_i]-Komplex – ein nicht-proteinogener natürlicher Ionenkanal?

Jede Zelle hat ein eigenes Mikroklima. Um die für sie speziellen Bedingungen im Zellinneren aufrecht zu erhalten, grenzt sie sich gegen Außen durch Membranen ab. Biologische Membranen sind im wesentlichen Lipiddoppelschichten mit eingelagerten Proteinen, typischerweise etwa 75 Å dick, wobei das hydrophobe Innere eine Dicke von ca. 25 Å aufweist, die aber je nach Anzahl an Doppelbindungen in den Lipidketten bis zu 35 Å betragen kann^[230]. Infolge ihrer Struktur sind Lipiddoppelschichten für Ionen und die meisten polaren Moleküle nahezu undurchlässig; trotzdem müssen diese die Membran irgendwie passieren können, da sie an vielen physiologischen Vorgängen wesentlich beteiligt sind. Dafür existieren zwei Arten des Transfers, nämlich der Carrier- und der Kanalmechanismus, wobei letzterer der effizientere und häufigere Weg ist. Meist sind Ionenkanäle proteinogener Natur, wobei die Röhre durch ringförmige Anordnung mehrerer amphiphiler Helices gebildet wird. Der Kanal kann entweder aus einem einzigen Protein oder aus einem Aggregat mehrerer ähnlicher oder identischer Untereinheiten bestehen^[231]. Daneben gibt es aber auch kanalbildende Peptide wie Gramicidin A^[232] oder Alamethicin^[233].

Aufgrund der großen physiologischen Bedeutung sind Ionenkanäle zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungen, deren Wichtigkeit eindrucksvoll durch die Verleihung des Nobel-Preises für Medizin 1991 an Neher und Sakmann unterstrichen wurde.

7.1. Befunde, die zur Postulierung eines PHB-haltigen Ionenkanals führten

Reusch et al. beobachteten 1983 in den Membranen verwandtschaftsmäßig sehr verschiedener genetisch kompetenter^[234] Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien (*Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* und *Haemophilus influenzae*) zwischen 50 und 60 °C eine sprunghafte Veränderung der Fluoreszenzintensität von *N*-Phenyl-1-naphthylamin. Jedesmal wurde dabei P(3-HB) in den Zellmembranen nachgewiesen, und zwar in wesentlich größeren Mengen als im nicht-kompetenten Zustand. Aufgrund dieser Beobachtungen schlossen die Autoren, daß die charakteristische Veränderung der Fluoreszenzintensität irgendwie mit P(3-HB) zusammenhängen mußte^[19]. Weitere Versuche mit *E. coli* zeigten, daß im kompetenten Zustand beachtliche Mengen an P(3-HB) isoliert werden können (siehe Tabelle 6)^[235]. Der Sprung in der Fluoreszenzintensität bei 50–60 °C war umso intensiver, je sorgfältiger die durch „trial and error“ gefundenen Kompetenzprotokolle eingehalten wurden. Ein solcher Übergang konnte nicht beobachtet werden, wenn die Biosynthese von P(3-HB) mit Acetaldehyd blockiert oder P(3-HB) künstlich in Liposomen eingebaut wurde. Offenbar muß die genetische Transformierbarkeit mit P(3-HB) zusammenhängen, wobei P(3-HB) nicht allein, sondern in Form eines ziemlich instabilen Komplexes auftreten soll^[20]. In der Folge zeigten die Autoren mit Gefrierbruchelektronenmikroskopie, daß in den Plasmamembranen kompetenter *A. vinelandii*- und *E. coli*-Bakterien Inseln mit sichtbar anderer Struktur vorhanden sind^[21]. Reusch und Sadoff isolierten

später aus genetisch kompetenten *E. coli*-Bakterien einen recht labilen Komplex, dessen Bestandteile sie als P(3-HB), Polyphosphat^[236] und Calcium-Ionen identifizierten, und postulierten eine Komplexstruktur (siehe Abb. 9 und 10)^[22, 23]. Außerdem konnten sie mit Fluoreszenzspektroskopie zeigen, daß dieser Komplex in vitro in Liposomen eingebaut werden kann^[22]. Neuerdings wies Reusch den Komplex auch mehr oder weniger überzeugend im Gewebe von Pflanzen und Tieren nach (vor allem in den Mitochondrien und Mikrosomen, etwas weniger in den Plasmamembranen), allerdings in wesentlich geringeren Mengen als in kompetenten Bakterien (Tabelle 6)^[23].

Tabelle 6. Vorkommen der als [P(3-HB)CaPolyP_i] identifizierten Komplexe in ausgewählten Prokaryoten und Eukaryoten [22, 23].

Quelle	P(3-HB) _{total} [µg g ⁻¹]	Komplexkomponenten [a]		
		P(3-HB) [ng g ⁻¹]	PolyP _i [ng g ⁻¹]	Ca ²⁺ [ng g ⁻¹]
<i>E. coli</i> log. Phase	0.26	—	—	—
<i>E. coli</i> kompetent	156	9600	4200	2000
Rinderherz	6.5	435	232	126
Rinderleber	9.2	662	353	178
Spinatblätter	0.86	163	88	47

[a] Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf das Naßgewicht.

7.2. Zusammensetzung und gemutmaßte Struktur des PHB-haltigen Komplexes

Im Komplex aus *E. coli* kommen nach Reusch 3-HB, Phosphat und Ca²⁺-Ionen ungefähr im Verhältnis von 1:1:0.5 vor. Der eukaryotische Komplex soll hingegen eine wesentlich längere PolyP_i-Kette aufweisen (Tabelle 7). Aufgrund von Molecular-Modeling- und Energieminimierungsbetrachtungen (mit dem Kraftfeld-Programm Charmm) nehmen Reusch et al. die in Abbildung 9 gezeigte exolipophile-endopolarophile Struktur an.

Tabelle 7. Kettenlängen der P(3-HB)- und Polyphosphatkette in den Organismen (Bestimmt aus dem Gelpermeationschromatogramm durch Vergleich der Retentionszeiten mit Standards) [22, 23].

Komplex	Kettenlänge in Monomereinheiten	
	P(3-HB)	PolyP _i [a]
Prokaryotischer Komplex	120–200 [b]	130–170
Eukaryotischer Komplex	120–200 [c]	170–220

[a] Gel: Showdex B804; Standard: Polyethylenglycol. [b] Gel: Altex m-Sphärogel; Standard: Polyisopren. [c] Gel: Altex m-Sphärogel; Standard: *Irrtümlich als Polystyrol angegeben* [23]! Gemäß persönlicher Mitteilung von Reusch wurde aber ebenfalls Polyisopren verwendet.

Die Ca²⁺-Koordinationsgeometrie war entscheidend für die postulierte räumliche Anordnung. Die äußere rechtsgängige P(3-HB)-Helix muß 14 Einheiten und die innere ebenfalls rechtsgängige PolyP_i-Helix 7 Einheiten pro Umdrehung aufweisen, um die Carbonyl- und Phosphatsauerstoffatome in eine geeignete Geometrie zur Komplexierung des Ca²⁺-Ions zu bringen^[237] (Abb. 10). Die Ca²⁺-Ionen liegen innerhalb des P(3-HB)-Zylinders vertikal übereinander. Auf der Außenseite stehen die Methyl- und Methylengruppen der Hydroxybuttersäure-Einheiten jeweils direkt übereinander.

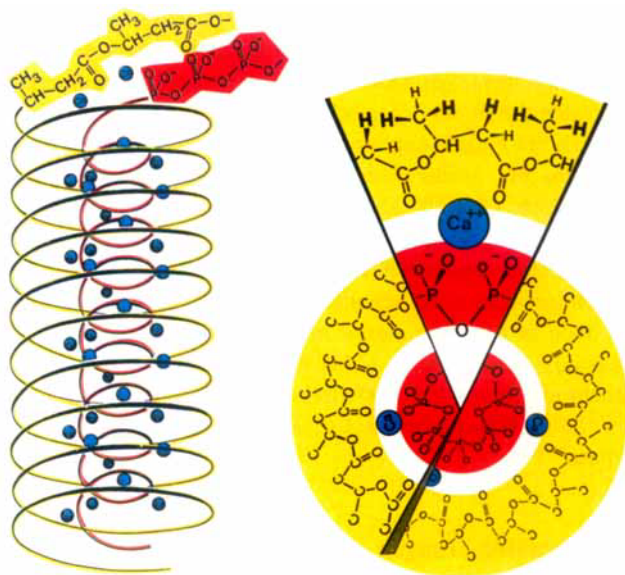


Abb. 9. Von Reusch vorgeschlagene Struktur eines [P(3-HB)CaPolyP]-Komplexes [23].

Es wurde ein Durchmesser von 24 \AA [238] und eine Länge von 45 \AA mit einer Identitätsperiodenlänge von 4 \AA berechnet, was ungefähr 150 3-HB- und 80 P_i -Einheiten entspricht. Um den hydrophoben Teil einer Membran zu durchspannen sollten 45 \AA mehr als ausreichen.

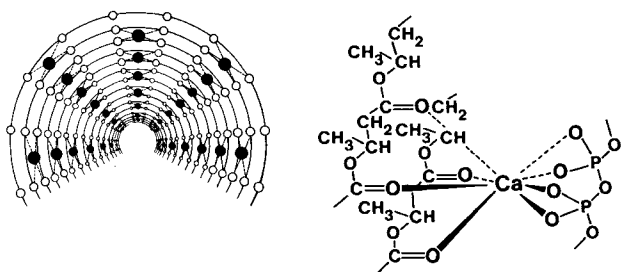


Abb. 10. Koordinationsgeometrie der Calcium-Ionen im postulierten [P(3-HB)-CaPolyP]-Komplex [22].

Allerdings scheinen die Esterbindungen der P(3-HB)-Helix in der in Abbildung 9 gezeigten Projektion entlang der Komplexachse im günstigsten Fall die (*E*)-Konformation einzunehmen, die um ca. 3 kcal mol^{-1} instabiler als die (*Z*)-Form ist [239].

Gemäß den Befunden von Reusch ist der Komplex *in vitro* ziemlich labil und äußerst wasserempfindlich, wahrscheinlich weil die Stabilisierung der postulierten exilipophilen-endopolarophilen Struktur durch die hydrophobe Lipidschicht wegfällt [240].

7.3. Mögliche Funktionen des Ionenkanals – DNA-Transport?

Die vermutete exilipophile-endopolarophile Struktur ist die ideale Anordnung für einen Ionenkanal. Reusch nimmt an, daß durch einen solchen Kanal vor allem Ca^{2+} -Ionen und Polyphosphate durch die Plasmamembran transportiert werden können. Die innere CaPolyP-Helix windet sich dabei wie eine Schraube durch die äußere P(3-HB)-Helix, wobei

die Ca^{2+} -Ionen von einer Carbonylgruppe zur nächsten verschoben werden. Der Transport des neutralen CaPolyP-Salzes benötigt weniger Energie als jener von getrennten Ca^{2+} - und PolyP-Ionen. Aufgrund der gegenseitigen Abhängigkeit von genetischer Transformabilität und Komplexkonzentration postulierte Reusch auch einen DNA-Transport. Allerdings müßte dazu zuerst das PolyP aus der P(3-HB)-Helix entfernt werden. Die äußere P(3-HB)-Helix bleibt bestehen, solange genügend Glucose als Energiequelle verfügbar ist. Nach Reusch und Sadoff reicht der innere Durchmesser aus, um Einzelstrang-DNA zu transportieren. Von welchen strukturellen Voraussetzungen dabei ausgegangen wurde, bleibt offen – muß die DNA als Faden transportiert werden oder kann sie in Sekundärstruktur vorliegen? Die Sekundärstrukturen von Einzelstrang-Polynucleotiden können beachtliche Durchmesser aufweisen, so hat zum Beispiel die Helix von Polyadenosin einen Durchmesser von 19 \AA , der somit nur wenig kleiner ist als jener von Doppelstrang-DNA (A-Form: ca. 21 \AA , B-Form: ca. 22 \AA und Z-Form: ca. 19 \AA) [220]. Außerdem setzt man bei Transformationsexperimenten meist Plasmide (cyclische Doppelstrang-DNA) ein, die selbst in Superhelix-Form weit größere Durchmesser haben! Die von den Autoren immer wieder betonte Rolle von Calcium für die genetische Transformabilität muß hier ebenfalls etwas relativiert werden, da offenbar auch nach dem Protokoll von Hanahan transformiert wird, bei dem Calcium nur eine untergeordnete Rolle spielt [241]! Ungeklärt bleibt auch, wie ein Öffnen und Schließen des Kanals vor sich gehen könnte.

Trotzdem ist ein mögliches DNA-Transportsystem durch Zellmembranen sehr verheißungsvoll, auch in Hinblick auf künftige Anti-sense-Medikamente [242]. Der Transport geladener Oligonucleotide durch Zellmembranen ist noch weitgehend unverstanden [242a, 243].

8. Komplexierung und Transport von Metall-Ionen durch Polyester

In der von Reusch et al. postulierten [P(3-HB)CaPolyP]-Struktur koordiniert das Calcium-Ion neben vier Polyphosphatsauerstoffatomen auch mit vier Ester-carbonylsauerstoffatomen (Abb. 10). Komplexe, in denen mehrere Ester-carbonyl-Gruppen desselben acyclischen Moleküls an ein Kation gebunden sind, kennt man nach unserem Wissen bisher noch nicht. Jedoch kommen relativ viele Komplexe unterschiedlichster Kationen mit cyclischen Liganden, in denen außer den Ester-carbonylsauerstoffatomen noch andere funktionelle Gruppen kooperieren, vor. Beim Nonactin sind das beispielsweise die Ethersauerstoffatome der Tetrahydrofuranringe [244]. Interessanterweise ähneln dessen Alkalimetallkomplexe stark der gefalteten Struktur des Octolids aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure **O** (in Abb. 2), das aber im Gegensatz zu Nonactin nicht antibiotisch aktiv ist [245] (Abb. 11). Bei den Depsipeptiden, beispielsweise Valinomycin, sind zwar nur die Ester-carbonyl-Gruppen an der Komplexbildung beteiligt, die Struktur wird aber zusätzlich durch Wasserstoffbrücken zwischen den Amidfunktionen stabilisiert [244].

Mit den synthetisierten linearen und cyclischen P(3-HB)-Verbindungen waren wir in der Lage, die Komplexbildungs-

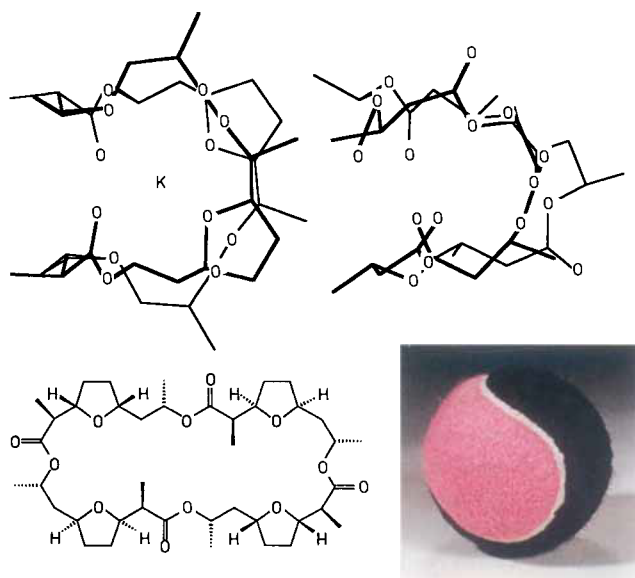


Abb. 11. MacMoMo-Ansichten des Kaliumkomplexes von Nonactin (oben links) und der gefalteten Octolidstruktur **O** (oben rechts) aus Abbildung 2 sowie Konstitutionsformel von Nonactin (unten links). Beide 32gliedrigen Ringe ähneln in ihrer Struktur im Kristall der Naht eines Tennisballs (unten rechts). Das K^+ -Ion im Nonactinkomplex ist von den vier O-Atomen der Tetrahydrofuranringe und den vier Estercarbonyl-O-Atomen in annähernd kubischer Geometrie umgeben. In der unkomplexierten Form hat Nonactin eine andere Konformation als im Kaliumkomplex und gleicht somit nicht mehr dem Octolid [244].

fähigkeit von Polyestern aus (*R*)-3-Hydroxybuttersäure genauer zu untersuchen. Während bisher alle Versuche zur Kristallzüchtung solcher Komplexe mit den offenkettigen Molekülen und den größeren Cyclen erfolglos waren, zeigten sich hoffnungsvolle Ergebnisse mit Triolid **F** aus Abbildung 2, das sich aufgrund seiner Struktur (alle Carbonylgruppen sind praktisch parallel in denselben Halbraum gerichtet) ja geradezu zur Komplexierung anbietet. Aus Lösungen des Triolids mit Natrium- oder Kaliumrhodanid in Acetonitril fallen Feststoffe aus, deren Strukturen bestimmt werden konnten^[135]. Im Falle von KSCN bildeten sich erst Kristalle, nachdem man die Lösung für einige Zeit der Luftfeuchtigkeit ausgesetzt hatte. Wie sich zeigte, ist hier etwas Wasser zur Kristallbildung erforderlich. Beide Komplexe sind polymer, und nur im Natriumkomplex sind ausnahmsweise alle drei Estercarbonyl-Gruppen eines Triolidmoleküls an der Koordination mit demselben Kation beteiligt. Sowohl die Natrium- als auch die Kalium-Ionen zeigen keine ausgeprägte Bevorzugung einer Koordinationsgeometrie mit den Estercarbonylsauerstoff-Atomen (Abb. 12). Schreiber et al. machten dieselbe Beobachtung für Alkalimetallkomplexe mit anderen Carbonylliganden^[246].

Aufgrund ¹H-NMR-spektroskopischer Untersuchungen und der Messung des Dipolmoments scheint das Triolid in Lösung eine ähnliche Struktur wie im Kristall zu haben. So beobachtet man in Methanol eine Wechselwirkung mit den Alkalimetall-Ionen, die aber mit zunehmender Verdünnung wieder verschwindet. Auch P(3-HB) scheint zumindest Lanthanide in gewissem Maße in Lösung zu komplexieren. Delsarte und Weill machten mit den geometrischen Daten, die sie mit der McCornell-Robertson-Beziehung aus dem Pseudokontaktkomplex von P(3-HB) mit [Eu(fod)₃] erhielten, einen Vorschlag zur Struktur von P(3-HB) in Lösung^[225c].

Okada et al.^[247] und Burke et al.^[248] untersuchten mit Polyestercyclen, die aber zusätzlich noch Acetal- oder Ether-sauerstoffatome enthielten, den Transport von Alkalimetallpikraten durch ein organisches Medium. Analoge Versuche mit Triolid **F** als Ionophor zeigten eine steigende Transporteffizienz mit größer werdendem Radius des Alkalimetall-Ions (Abb. 13)^[104b]. Diese Resultate lassen sich zwanglos mit der zunehmenden Lipophilie der Ionen erklären. Das Fehlen einer Ionenselektivität könnte mit der Starrheit des Triolidgerüsts zusammenhängen, so bleibt dessen Struktur ja auch in den Komplexen mit NaSCN und KSCN weitgehend unverändert (Abb. 13). Ähnlich transportiert hochmolekulare P(3-HB) und ein lineares Oligomer aus ca. 35 (3-HB)-Einheiten Cs^+ -Ionen durch eine CH_2Cl_2 -Phase^[104b].

9. Schlußfolgerungen und Ausblick

Nach der Entdeckung von P(3-HB) durch Lemoigne vor etwa 70 Jahren war das Interesse an diesem Biopolymer zunächst einmal sehr gering. Nur einige wenige Spezialisten wußten von der Existenz dieser Verbindung. Wegen der Zugänglichkeit von Polymeren dieses Typs aus nachwachsenden Kohlenstoffquellen durch Fermentation setzte zur Zeit der Ölkrise vor 20 Jahren eine explosionsartige Entwicklung ein, in neuester Zeit noch verstärkt durch die Tatsache, daß Poly(hydroxyalkanoate) biologisch abbaubare und biokompatible Polymere sind. Es werden Übersichtsartikel und Bücher geschrieben und Tagungen abgehalten, deren Teilnehmerschaft aus Industrie, Hochschule und staatlichen Institutionen interdisziplinär so bunt zusammengewürfelt ist, wie es auch der Erfahrenere von uns noch nie erlebt hat: beim neuesten internationalen Symposium über bakterielle Polyhydroxyalkanoate (ISBP '92, 1.–5. Juni 1992) in Göttingen waren die Vortragenden und Zuhörer Biologen, Mikrobiologen, Genetiker, Botaniker, Chemiker, Physiker, Polymerwissenschaftler und -ingenieure, Biotechnologen, Pharmazeuten und Mediziner. Viele stammten aus Einrichtungen der Rohstoff- und Agrotechnologie, der Nahrungsmittelwissenschaften^[249], der Abfall-, Siedlungs- und Wasserwirtschaft^[250], der Katalyse- und Oberflächenforschung, ja sogar des Konstruktions- und Bauwesens^[251]! Das Interesse konzentrierte sich dabei nahezu ausschließlich (35 von 37 Vorträgen) auf die hochmolekularen Polyhydroxyalkanoate, die bakteriellen Speichermaterialien aus über 10000 (3-HB)-Einheiten (im folgenden s-PHA oder s-P(3-HB) genannt^[252]), ihre Bildung, Produktion, Struktur, Materialeigenschaften, Anwendungen und ihr biologischer Abbau^[253].

Neben hochmolekularer P(3-HB) der Einschlüsse in Mikroorganismen kommt nach den Arbeiten von Reusch in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen und Organismen auch kurzkettige P(3-HB) aus 100–200 (3-HB)-Einheiten vor (im folgenden c-P(3-HB) genannt^[254]). Sie liegt dort stets komplexiert vor, z.B. in Zellmembranen mit Ca-Ionen und einem Polyphosphat^[19–23] und in menschlichem Blutplasma mit Albumin und den sogenannten low-density lipoproteins (LDL)^[24]. Die Tatsache, daß der c-P(3-HB)-haltige Komplex z.B. in *E. coli*, das im allgemeinen kein s-P(3-HB) zu produzieren vermag (siehe aber Lit.^[18]), nur im genetisch kompetenten Zustand der Mikrobe in der inneren Zellmem-

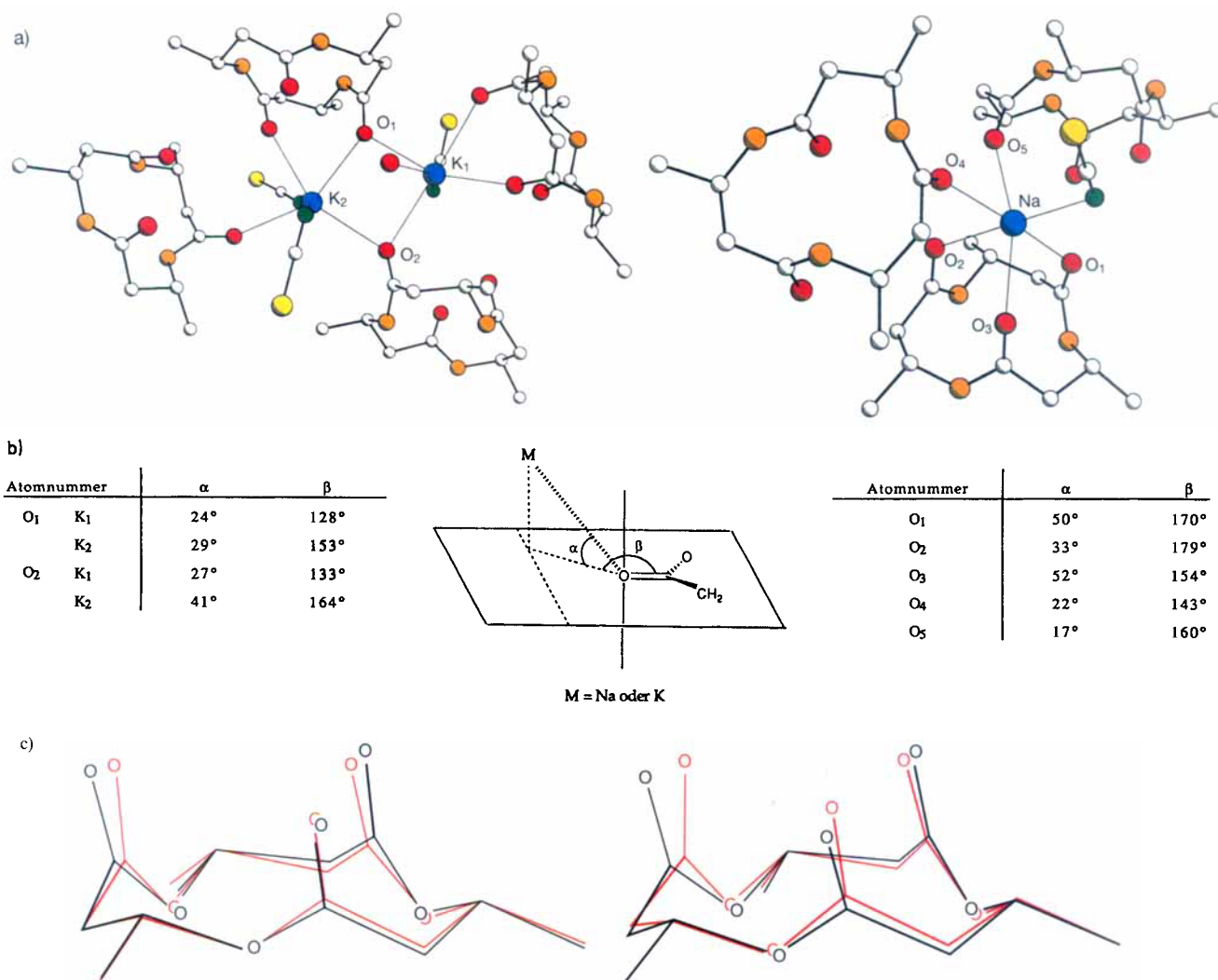


Abb. 12. a) PLUTO-Darstellung von Ausschnitten aus den Strukturen der Triolidkomplexe von KSCN (links) und NaSCN (rechts) im Kristall. Alle Kalium- und Natrium-Ionen sind hexakoordiniert mit den Estercarbonyl-O-Atomen der Triolide und den N-Atomen der Rhodanid-Ionen als Liganden, beim Kaliumkomplex koordiniert außerdem noch ein Wassermolekül mit K₁. Rote Kugeln = Sauerstoffatome der CO-Funktion, orange = OR-Sauerstoffatome der Estergruppen, weiße = Kohlenstoffatome, gelbe = Schwefelatome, grüne = Stickstoffatome. b) Koordinationsgeometrien der Kalium- und Natrium-Ionen in den beiden Komplexen mit ausgewählten Estercarbonyl-Gruppen. Zum Vergleich: Im C₂-symmetrischen Nonactinkaliumkomplex betragen die Winkel α 61° bzw. 67° und β 154° bzw. 150°. c) Superpositionen des freien (schwarz) mit dem dreifach koordinierenden Triolid (rot) im Na-Komplex (rechts) und dem zweifach koordinierenden Triolid (rot) im K-Komplex (links).

bran gefunden wird oder daß dieser Komplex bei Eukaryoten vor allem in den Mitochondrien (den „Mikroorganismen“ innerhalb der eukaryotischen Zelle) und Mikrosomen angereichert ist, sprechen dafür, daß c-P(3-HB) wichtige Wirkungen und Funktionen hat. Die Ergebnisse unserer bisherigen Untersuchungen über Struktur und Eigenschaften linearer und cyclischer (3-HB)-Oligomere stehen nicht im Widerspruch zu der Hypothese, wonach c-P(3-HB) Komponente eines Ionenkanals durch Zellmembranen sein könnte. Daß es ausgerechnet als Teil eines Komplexes mit Ca-Polyphosphat vorkommen soll, ist im Zusammenhang mit einer von Lipmann 1965 geäußerten Vermutung bemerkenswert, wonach die ersten Organismen auf unserem Planeten nicht ATP, sondern anorganisches Polyphosphat oder Pyrophosphat als Energieträger benutzt haben könnten (Polyphosphat – „ein metabolisches Fossil“!)^[255].

Wenn man vom anorganischen Polyphosphat^[256, 257] und dem aus aromatischen Aminosäuren abgeleiteten, nicht leicht charakterisierbaren, uneinheitlichen Polymer Lignin der Pflanzen^[258, 259] absieht, gibt es vier Klassen von phy-

siologisch bedeutsamen Biopolymeren (Biomakromoleküle): Polyisoprenoide, Polynucleotide, Polypeptide und Polysaccharide. Alle vier zeichnen sich dadurch aus, daß a) die monomeren Bausteine fundamentale Stoffwechsel-Zwischenprodukte der Organismen sind, daß b) die zugehörigen Oligomeren bedeutsame Wirkungen aufweisen, z.B. als Cofaktoren, Hormone oder Vitamine, bei der Signal- und Informationsübertragung sowie bei Erkennungsmechanismen, und daß c) die hochmolekularen Vertreter wichtige Funktionen innehaben, z.B. als Katalysatoren und Rezeptoren, Informationsträger, Transportvehikel, Speichermaterialien oder als Gerüststoffe. Nach diesen Kriterien muß man jetzt die Poly(hydroxyalkanoate) als die fünfte wichtige Klasse von Biopolymeren bezeichnen. a) Ihre Bausteine, die Hydroxycarbonsäuren, im einfachsten Falle Hydroxybuttersäure, sind Teil des Fettsäuremetabolismus; wie Isoprenoide und Polyketide^[260] leiten sie sich letztlich von Essigsäure ab. b) Die Oligomere, oben c-PHA genannt, kommen als Komponenten von Komplexen mit anderen Molekülen mit heute weitgehend unbekannter Wirkung vor;

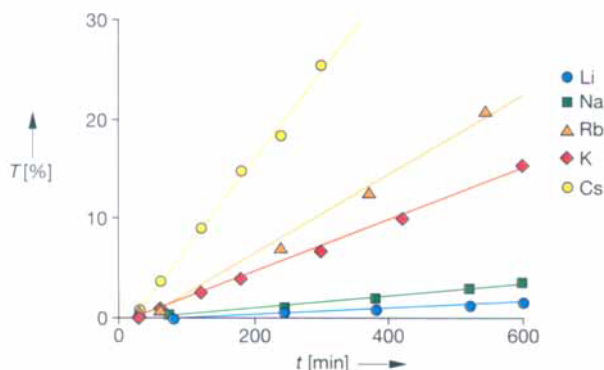
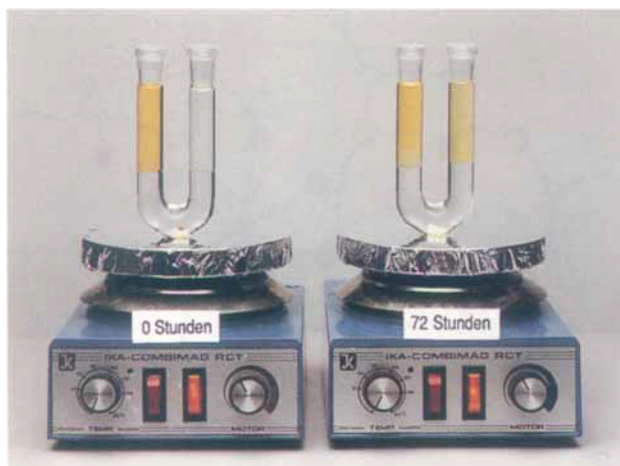


Abb. 13. Oben: Apparatur zur Durchführung der Transportexperimente durch eine Flüssigmembran. Aus der Tris-gepufferten (0.1 M) wäßrigen Lösung mit anfänglich 1 mM Alkalimetallpikrat/0.1 M Alkalimetallchlorid im linken U-Rohr-Schenkel werden unter Rühren die Ionen durch eine 0.1 M Triolid/ CH_2Cl_2 -Lösung in den anderen Schenkel transportiert, dessen Wasserphase mit zunehmender Dauer des Experiments immer intensiver gelb wird. Die Messung der Pikratkonzentration erfolgte UV-spektroskopisch bei $\lambda_{\text{max}} = 356 \text{ nm}$. Unten: Relative Geschwindigkeit des Transports T der verschiedenen Alkalimetall-Ionen. Es handelt sich um eine sogenannte lipophile Reihe (ohne Selektivität für einen bestimmten Ionenradius!) [104 b].

c-P(3-HB) ist an der Modifikation der Eigenschaften von Zellmembranen (Phasenübergang, Fluidität, Permeabilität) beteiligt. c) Das hochmolekulare s-P(3-HB) ist mikrobielles Speichermaterial (Kohlenstoffreservoir, NADH-Äquivalente). In Tabelle 8 sind für die fünf Klassen von Biopolymeren

Beispiele angegeben und die Polymere den niedermolekularen Verwandten gegenübergestellt.

Zu guter Letzt bleibt die Frage, warum die niedermolekularen c-PHA so spät entdeckt wurden und weshalb man ihre Bedeutung erst jetzt zu erkennen beginnt. Offensichtlich wurden sie in den Lipidfraktionen von Zellextrakten wegen ihrer chemischen (Hitze, Säure, Base) und biochemischen (Ester spaltende Enzyme) Instabilität übersehen. c-P(3-HB) kommt z.B. in *E. coli* nur in sehr geringen Konzentrationen vor und wird zur Erzielung einer bestimmten Wirkung aufgebaut (Membranmodifikation), danach wieder abgebaut. Wahrscheinlich unterliegt es einem schnellen Anabolismus/Catabolismus in den Organismen. Der Sachverhalt ist also ähnlich wie bei den Hormonen, deren stabile Vertreter seit langem bekannt und identifiziert sind, während beispielsweise die so wichtigen Moleküle der Arachidonsäure-Kaskade (ebenfalls Lipide!), also die Leukotriene, Prostaglandine, Thromboxane etc., erst in den letzten Jahrzehnten isoliert, charakterisiert, synthetisiert und in ihrer Bedeutung voll erkannt wurden (einige weisen Halbwertszeiten im Blutserum oder im Gewebe von weniger als einer Minute auf!).

Wir danken Silvia Sigrist für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Herstellung des Manuskripts. Ohne die Hilfe von Hans-Michael Bürger, Andreas Brunner und Urs Lengweiler bei der Anfertigung der endgültigen Version von Abbildungen, Schemata und Tabellen wäre das Werk nicht gelungen!

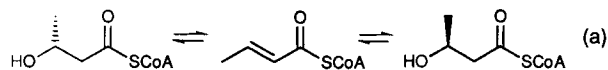
Eingegangen am 29. Juli 1992 [A 900]

- [1] a) Der Ausdruck Polyhydroxysäure [englisch: *poly hydroxy acid* (PHA)] wurde 1983 von Findley und White eingeführt (R. H. Findley, D. C. White, *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, 45, 71), als man realisierte, daß das Vorkommen des Homopolymers Poly(*R*)-3-hydroxybuttersäure eher die Ausnahme als die Regel ist; viel häufiger sind Polymere mit unterschiedlichen Hydroxysäure-Struktureinheiten. b) Neuerdings wurde von Steinbüchel die deutsche Bezeichnung Polyhydroxyfettsäuren (PHF) vorgeschlagen (A. Steinbüchel, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, 39, 1112–1124).
- [2] M. Doudoroff, R. Y. Stainer, *Nature (London)* **1959**, 183, 1440.
- [3] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1985**.
- [4] In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß Mikroorganismen mit PHA-Speicherstoffen Hungerperioden viel besser durchstehen als solche ohne. Die Überlebensfähigkeit ist oft direkt abhängig vom anfänglichen PHA-Gehalt (E. A. Dawes, *Microbiol. Energetics*, Blakie, London, **1986**).
- [5] Y. Doi, *Microbial Polyester*, VCH, Weinheim, **1990**.

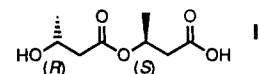
Tabelle 8. Vergleich von Monomeren, Oligomeren und Polymeren in Chemie und Biochemie der Naturstoffe.

Monomer <i>metabolische Zwischenprodukte</i> Aufbau und Abbau aus bzw. zu anderen niedermolekularen Bausteinen	Oligomer <i>Wirkung</i> z.B. als Hormon, Cofaktor, Vitamin, Träger von Information, Signal, Erkennung	Polymer <i>Funktion</i> Katalysator, Rezeptor Energie-, Materialspeicher, Transportvehikel, Gerüststoff
Aminosäuren	Oligopeptide z.B. Endorphine, Bradykinin	Polypeptide z.B. Fettsäure-Synthase Hämoglobin, Immunglobuline Haut, Nägel, Haare, Seide
Monosaccharide, Zucker	Oligosaccharide z.B. Blutgruppenderminanten Heparin, Zuckerteil der Glycoproteine Dextrin	Polysaccharide z.B. Cellulose, Stärke Chitin, Glucan, Glycogen Murein
Essigsäure, Mevalonsäure Isopentenyl-Pyrophosphat	Isoprenoide Carotinoide, Rhodopsin, Vitamin A, E Squalen, Steroide, Steroidhormone	Polysisoprenoide Kautschuk, Guttapercha
Purin- und Pyrimidinbasen Nucleoside, Nucleotide Phosphat	Oligonucleotide NADH, NADPH, tRNA	Polynucleotide m- und rRNA, DNA
Hydroxycarbonsäuren	niedermolekulares P(3-HB) (c-PHB, Komplexierung)	hochmolekulares P(3-HB) (s-PHB, Speicher)

- [6] J. Schurz, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1988**, 36, 388; H. Zoebelein, *Chem. Unserer Zeit* **1992**, 26, 27–34.
- [7] The New York Times vom 3. Mai 1985; Neue Zürcher Zeitung vom 12. Dezember 1986; Tagblatt der Stadt Zürich vom 23. August 1990; Allgemeiner Hochschulanzeiger **1990**, Nr. 9, 11; Geo **1990**, Nr. 10, 224; Geo **1991**, Nr. 3, 80.
- [8] H. G. Schlegel, G. Gottschalk, *Angew. Chem.* **1962**, 74, 342–347.
- [9] E. A. Dawes, P. J. Senior, *Adv. Microb. Physiol.* **1973**, 10, 135–266.
- [10] R. M. Lafferty, B. Korsatko, W. Korsatko, *Biotechnology*, Vol. 6b (Hrsg.: H. J. Rehm), VCH, Weinheim, **1988**, S. 135–176.
- [11] H. Brandl, R. A. Gross, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1990**, 41, 77–93.
- [12] A. J. Anderson, E. A. Dawes, *Microbiol. Rev.* **1990**, 54, 450–472.
- [13] *Novel Biodegradable Microbial Polymers (NATO ASI Ser. Ser. E, 1990, 186)*.
- [14] Jährliche Patentanmeldungen gemäß P(3-HB)-Substruktursuche in *Chem. Abstr.*: 29 (1991); 14 (1990); 13 (1989); 20 (1988); 7 (1987); 10 (1986), 9 (1985); 5 (1984); 5 (1983); 7 (1982); 1 (1981); 3 (1980).
- [15] M. Lemoigne, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1925**, 39, 144.
- [16] M. Lemoigne, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1926**, 8, 770; *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **1927**, 41, 148.
- [17] a) W. G. C. Forsyth, A. C. Hayward, J. B. Roberts, *Nature (London)* **1958**, 182, 800; b) O. P. Peoples, A. J. Sinskey, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15298.
- [18] Der *E. coli*-Stamm K12 kann unter geeigneter Nährstoffbegrenzung bis zu 1.2% seines Trockengewichts P(3-HB) produzieren. Enthält er zusätzlich noch das R-Plasmid RP1, können es bis zu 5.8% sein, wenn das Wachstum unter C-limitierenden Bedingungen stattfindet (P. Gilbert, M. R. W. Brown, *J. Bacteriol.* **1978**, 133, 1062). Die Autoren machen aber keine Aussagen darüber, ob es als Speicherstoff oder als Membranbestandteil (siehe Abschnitt 7) vorkommt.
- [19] R. Reusch, H. Sadoff, *J. Bacteriol.* **1983**, 156, 778.
- [20] R. Reusch, T. Hiske, H. Sadoff, *J. Bacteriol.* **1986**, 168, 553.
- [21] R. Reusch, T. Hiske, H. Sadoff, R. Harris, T. Beveridge, *Can. J. Microbiol.* **1987**, 33, 435.
- [22] R. Reusch, H. Sadoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4176.
- [23] R. Reusch, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1989**, 191, 377.
- [24] R. Reusch, A. W. Sparrow, J. Gardiner, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1123, 33.
- [25] S. Schulz, S. Toft, Abstract eines Vortrages gehalten am 8th Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology (ISCE) vom 2.–7. Juli 1991 in Dijon. Das (R,R)-3-Hydroxybuttersäure-Dimer ist eine schwerflüchtige Verbindung und für Menschen geruchlos. Eventuelle Gerüche können durch NMR-spektroskopisch nicht nachweisbare Mengen an Crotonsäureverbindungen entstehen. Auch der Ester aus Crotonsäure und (R)-3-Hydroxybuttersäure hat dieselbe Wirkung wie das (R,R)-Dimer: S. Schulz, Universität Hamburg, persönliche Mitteilung.
- [26] D. B. Karr, J. K. Warers, F. Suzuki, D. W. Emerich, *Plant Physiol.* **1984**, 75, 1158.
- [27] D. Ellar, D. G. Lundgren, K. Okamura, R. H. Marchessault, *J. Mol. Biol.* **1968**, 35, 489.
- [28] R. Griebel, Z. Smith, J. M. Merrick, *Biochemistry* **1968**, 7, 3676.
- [29] J. M. Merrick, M. Doudoroff, *J. Bacteriol.* **1964**, 88, 60.
- [30] Y. Kawaguchi, Y. Doi, *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, 70, 151.
- [31] a) G. N. Barnard, J. K. M. Sanders, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 3286; S. B. Amor, T. Rayment, J. K. M. Sanders, *Macromolecules* **1991**, 24, 4583. – Bei der diesjährigen Göttinger Tagung über PHB (siehe [251, 253]) hielt Sanders einen Vortrag (K. M. Bonthron, J. Clauss, D. M. Horowitz, B. K. Hunter, J. K. M. Sanders, *The Biological and Physical Chemistry of Polyhydroxyalkanoates as seen by NMR Spectroscopy*), der im zugehörigen Kongreßband publiziert worden ist [253]; b) J. K. M. Saunders, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 1.
- [32] W. J. Orts, M. Romansky, J. E. Guillet, *Macromolecules* **1992**, 25, 949, zit. Lit.
- [33] J. Schindler, H. G. Schlegel, *Biochem. Z.* **1963**, 339, 154.
- [34] H. Hippe, H. G. Schlegel, *Arch. Mikrobiol.* **1967**, 56, 278.
- [35] V. Oeding, H. G. Schlegel, *Biochem. J.* **1973**, 134, 239.
- [36] G. W. Haywood, A. J. Anderson, L. Chu, E. A. Dawes, *FEMS Microbiol. Lett.* **1988**, 52, 91.
- [37] G. W. Haywood, A. J. Anderson, L. Chu, E. A. Dawes, *FEMS Microbiol. Lett.* **1988**, 52, 259.
- [38] G. W. Haywood, A. J. Anderson, L. Chu, E. A. Dawes, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, 16, 1046.
- [39] G. W. Haywood, A. J. Anderson, E. A. Dawes, *FEMS Microbiol. Lett.* **1989**, 57, 1.
- [40] A. J. Anderson, G. W. Haywood, E. A. Dawes, *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, 12, 102.
- [41] G. A. F. Ritchie, P. J. Senior, E. A. Dawes, *Biochem. J.* **1969**, 112, 803.
- [42] G. A. F. Ritchie, P. J. Senior, E. A. Dawes, *Biochem. J.* **1971**, 121, 309.
- [43] P. J. Senior, E. A. Dawes, *Biochem. J.* **1973**, 134, 225.
- [44] T. Fukui, A. Yoshimoto, M. Matsumoto, S. Hosokawa, T. Saito, H. Nishikawa, K. Tomita, *Arch. Microbiol.* **1976**, 110, 149.
- [45] T. Nishimura, T. Saito, K. Tomita, *Arch. Microbiol.* **1978**, 116, 21.
- [46] H. Shuto, T. Fukui, T. Saito, Y. Shirakura, K. Tomita, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 118, 53.
- [47] Y. Tanaka, T. Saito, T. Fukui, T. Tanio, K. Tomita, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 118, 177.
- [48] T. Nakada, T. Fukui, T. Saito, K. Miki, C. Oji, S. Matsuda, A. Ushijima, K. Tomita, *J. Biochem.* **1981**, 89, 625.
- [49] T. Fukui, M. Ito, K. Tomita, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 127, 423.
- [50] J. M. Merrick, M. Doudoroff, *Nature (London)* **1961**, 189, 890.
- [51] J. M. Merrick, F. P. Delafield, M. Doudoroff, *Fed. Proc.* **1962**, 21, 228.
- [52] J. M. Merrick, C. I. Yu, *Biochemistry* **1966**, 5, 3563.
- [53] R. Gavard, A. Dahinger, B. Hauttecoeur, C. Reynaud, *C. R. Acad. Sci.* **1967**, 265, 1557.
- [54] G. J. Moscovitz, J. M. Merrick, *Biochemistry* **1969**, 8, 2748.
- [55] R. Griebel, J. M. Merrick, *J. Bacteriol.* **1971**, 108, 782.
- [56] J. M. Merrick, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1988**, 29(1), 586.
- [57] Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 28, 330.
- [58] Eine dritte Variante [Gl. (a)] wurde von Merrick et al. in *R. rubrum* gefunden [54]. Aus Acetoacetyl-CoA wird zuerst das (S)-Hydroxybuttersäurederivat gebildet, das dann unter dem Einfluß einer Enoyl-CoA-Hydratase zur (R)-konfigurierten Verbindung epimerisiert wird. Die weitere Umsetzung verläuft wie in Schema 1 gezeigt. *R. rubrum* kann offensichtlich (R)-3-Hydroxybuttersäure-CoA nicht direkt durch Reduktion aus Acetoacetyl-CoA herstellen.



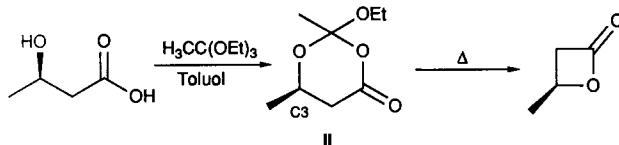
- [59] P. A. Holmes, L. F. Wright, S. H. Collins, *Eur. Pat. Appl.* **1982**, EP 52459 (*Chem. Abstr.* **1982**, 97, 143 146r); P. A. Holmes, F. Leonard, S. H. Collins, *ibid.* **1983**, EP 69497 (bzw. 1983, 98, 141 883a).
- [60] C. Pedros-Alio, J. Mas, R. Guerrero, *Arch. Microbiol.* **1985**, 143, 178.
- [61] Neben Zuckern können unter anderem auch Carbonsäuren (bis zu und einschließlich Capronsäure [5]) und selbst (S)-3-Hydroxybuttersäure (H. W. Ulmer, R. A. Gross, P. Weisbach, R. C. Fuller, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1989**, 30 (2), 402) verwertet werden. Als Knallgasbakterium kann *A. eutrophus* natürlich auch ein Gemisch aus H₂, CO₂ und Luft als C-Quelle nutzen, das ursprünglich sogar als Rohstoff für die industrielle Produktion von P(3-HB) diskutiert wurde (D. Byrom, *Trends Biotechnol.* **1987**, 5, 246).
- [62] S. Masamune, C. T. Walsh, A. J. Sinskey, O. P. Peoples, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 303–312.
- [63] J. E. Bailey, *Science* **1991**, 252, 1668.
- [64] S. C. Slater, W. H. Voige, D. E. Dennis, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 4431.
- [65] P. Schubert, A. Steinbüchel, H. G. Schlegel, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 5837.
- [66] P. Schubert, N. Krüger, A. Steinbüchel, *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 168.
- [67] A. Witte, W. Lubitz, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 180, 393.
- [68] W. Lubitz, *Eur. Pat. Appl.* **1990**, EP 435028 A2 (*Chem. Abstr.* **1990**, 115, 134 2165b).
- [69] a) R. Pool, *Science* **1989**, 245, 1187; b) Y. Poirier, D. E. Dennis, K. Klomparens, C. Somerville, *ibid.* **1992**, 256, 520.
- [70] O. P. Peoples, A. J. Sinskey, *Mol. Microbiol.* **1989**, 3, 349.
- [71] G. W. Huisman, E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra, B. Witholt, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 2191.
- [72] Die Autoren konnten nur eine angereicherte Depolymerase aus *A. eutrophus* isolieren. Sie halten darum fest, daß der fehlende Nachweis des Dimers auch auf die Wirkung einer Esterase zurückgeführt werden könnte, die neben der Depolymerase vorliegt [33].
- [73] (R,S)-Dimer oder (3R)-3-[(3'R)-3'-Hydroxybutyryloxy]buttersäure **1**:



Das (R,S)-Dimer ist identisch mit der in früheren Publikationen [47, 52] als 3-L-[3-D-Hydroxybutyryloxy]buttersäure (= L,D-Dimer) bezeichneten Verbindung.

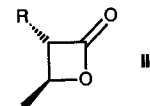
- [74] Exoenzyme greifen eine Polymerkette von den Enden her an, im Gegensatz zu Endoenzymen, die auch innerhalb der Polymerketten eine Spaltung herbeiführen können (*Lexikon der Biochemie* (Hrsg.: H. D. Jakubke, H. Jeschkeit), VCH, Weinheim, **1974**).
- [75] Merrick et al. zeigten, daß die Depolymerase im Normalfall von einem Inhibitor desaktiviert wird, dessen Wirkung durch ein Aktivatorprotein aufgehoben werden kann. Der Inhibitor kann auch durch Behandlung der P(3-HB)-Granulen mit Trypsin oder Extraktion mit Alkali zerstört oder entfernt werden [55,56]. Die Aktivität der anderen Enzyme wird ebenfalls durch gewisse Stoffwechselprodukte beeinflußt, so hemmt beispielsweise NADH, Pyruvat und je nach Mikroorganismus Oxalacetat [35] oder 2-Oxoglutarat die 3-Hydroxybuttersäuredehydrogenase [43].

- [76] Y. Doi, Y. Kawaguchi, Y. Nakamura, M. Kunioka, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2932.
- [77] Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1987**, *8*, 631.
- [78] R. A. Gross, H. Brandl, H. W. Ulmer, M. A. Posada, R. C. Fuller, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1989**, *30*, 492.
- [79] M. Kunioka, Y. Nakamura, Y. Doi, *Polym. Commun.* **1988**, *29*, 174.
- [80] Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, K. Soga, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2727.
- [81] D. Byrom, *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 246.
- [82] *BIOPOL. Nature's Plastic*, ICI Bio Products & Fine Chemicals, PO Box 1, GB-Billingham, Cleveland TS23 1LB.
- [83] R. W. Lenz, B.-W. Kim, H. Ulmer, K. Fritzsche, R. C. Fuller, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1990**, *31*(2), 408.
- [84] In reinem Deuteriumoxid ist das bakterielle Wachstum zu langsam, siehe Lit. [85].
- [85] R. A. Gross, H. Brandl, H. W. Ulmer, D. J. Tshudy, P. C. Uden, R. C. Fuller, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1989**, *30*(2), 398.
- [86] Mit einer Mischung aus Buttersäure und γ -Butyrolacton als C-Quelle wird eine Polymermischung aus einem 3-HB- und 4-HB-reichen Polymer erhalten, das bis zu 80% 4-HB-Einheiten enthalten kann (Y. Doi, A. Segawa, M. Kunioka, *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, *12*, 106).
- [87] M. Scandola, G. Ceccorulli, Y. Doi, *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, *12*, 112.
- [88] M. J. Smet, G. Eggink, B. Witholt, J. Kingma, H. Wynberg, *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 870.
- [89] a) R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2924; b) G. W. Huisman, O. Leeuw, G. Eggink, B. Witholt, *ibid.* **1989**, *55*, 1949.
- [90] a) H. Brandl, R. A. Gross, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1977; b) R. A. Gross, C. DeMello, R. W. Lenz, H. Brandl, R. C. Fuller, *Macromolecules* **1989**, *22*, 1106.
- [91] Auch substituierte Carbonsäuren können verwertet werden; die Verzweigungsstelle darf allerdings nicht zu nahe an der Hauptkette liegen (K. Fritzsche, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, *12*, 92).
- [92] a) R. H. Marchessault, C. J. Monasterios, *Biotechnology and Polymers* (Hrsg.: C. G. Gebelein), Plenum, New York, **1991**, S. 47–52. b) Y. Doi, Y. Kanesawa, M. Kunioka, T. Saito, *Macromolecules* **1990**, *23*, 31.
- [93] G. Eggink, P. H. Lelyveld, A. Arnberg, N. Arfman, C. Witteveen, B. Witholt, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6400.
- [94] K. Fritzsche, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Int. J. Biol. Macromol.* **1990**, *12*, 85.
- [95] C. Abe, Y. Taima, Y. Nakamura, Y. Doi, *Polym. Commun.* **1990**, *31*, 404.
- [96] Y. Doi, C. Abe, *Macromolecules* **1990**, *23*, 3705.
- [97] K. Fritzsche, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Macromol. Chem.* **1990**, *191*, 1957.
- [98] J. B. Davis, *Appl. Microbiol.* **1964**, *12*, 301.
- [99] Y. B. Kim, R. W. Lenz, R. C. Fuller, *Macromolecules* **1991**, *24*, 5256.
- [100] F. E. Küng, US-A 2361036 **1944** (*Chem. Abstr.* **1944**, *38*, 6301).
- [101] B. Hauttecoeur, M. Jolivet, R. Gavard, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* **1975**, *280*, 2801; S. Coulombe, P. Schaeuwecker, R. H. Marchessault, B. Hauttecoeur, *Macromolecules* **1978**, *11*, 279; H. Morikawa, R. H. Marchessault, *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2306.
- [102] N. Grassie, E. J. Murray, P. A. Holmes, *Polym. Degrad. Stab.* **1984**, *6*, 47, 95, 127.
- [103] M. Kunioka, Y. Doi, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1933.
- [104] a) U. Brändli, Dissertation (Herstellung von Charakterisierung cyclischer und offenkettiger Oligomerer von 3-Hydroxybutter- und -valeriansäure sowie Versuche zur Racematspaltung von 3,3,3-Trifluormilchsäure; Dissertation-Nr. 8680), ETH Zürich, **1988**; D. Seebach, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1685–1715; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1624–1654; D. Seebach, A. K. Beck, U. Brändli, D. Müller, M. Przybylski, K. Schneider, *Chimia* **1990**, *44*, 112; b) H. M. Bürger, bisher unveröffentlichte Versuche im Rahmen der Dissertation, ETH Zürich, **1990–1993**.
- [105] K. O. Börnsen, M. Schär, H. M. Widmer, *Chimia* **1990**, *44*, 412; M. Schär, K. O. Börnsen, E. Grossmann, H. Widmer, *ibid.* **1991**, *45*, 123, zit. Lit.
- [106] Als neue Methode zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren etablieren sich immer mehr massenspektrometrische Verfahren, siehe beispielsweise I. V. Bletsos, D. M. Hercules, D. vanLeyen, B. Hagenhoff, E. Nieuhuis, A. Benninghoven, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1953, zit. Lit. Bisher existieren relativ wenige Arbeiten, die sich mit einem massenspektrometrischen Nachweis von P(3-HB)-Verbindungen befassen: A. Ballistreri, D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Impallomeni, G. Montaudo, *Macromolecules* **1989**, *22*, 2107; A. Ballistreri, D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Montaudo in Lit. [13]; S. 49–64; A. Ballistreri, G. Montaudo, D. Garozzo, M. Giuffrida, M. S. Montaudo, *Macromolecules* **1991**, *24*, 1231; Lit. [104]; H. M. Bürger, H.-M. Müller, D. Seebach, *Macromolecules*, eingereicht; hier werden GPC-analytisch ermittelte P(3-HB)-Oligomerenverteilungen mit solchen verglichen, die mit matrixunterstützter LDI-Massenspektrometrie bestimmt wurden.
- [107] D. Seebach, M. Züger, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 495; P. Schnurrenberger, M. F. Züger, D. Seebach, *ibid.* **1982**, *65*, 1197; D. Seebach, M. F. Züger, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *26*, 2747 (Herstellung von (R)-3-Hydroxyvalerat aus P(3-HB/3HV)-Copolymer).
- [108] N. Vanlautem, G. Jacques, *Eur. Pat. Appl.* **1982**, EP 43 620 A1 (*Chem. Abstr.* **1982**, *96*, 163 397f).
- [109] Selbstverständlich sind so auch Oligomerenmischungen (ohne Crotylendgruppe) zugänglich, deren mittleres Molekulargewicht über das Verhältnis P(3-HB)/Alkohol eingestellt werden kann: S. Akita, Y. Einaga, Y. Miyaki, H. Fujita, *Macromolecules* **1976**, *9*, 774; siehe auch Lit. [101], Arbeiten von Montaudo et al. in [106] und [108].
- [110] D. Seebach, A. K. Beck, R. Breitschuh, K. Job, *Org. Synth.* **1992**, *71*, 39–47; Vorschrift wurde überprüft von E. R. Hickey, L. Paquette.
- [111] a) D. Seebach, H. O. Kalinowski, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1976**, *24*, 415. b) Die Totalsynthesen von Colletodiol, Grahamimycin A1, Pyrenophorin und Elaiophylidin durch unsere Arbeitsgruppe sind in Schema 1 der folgenden Veröffentlichung zusammengestellt: D. Seebach, H.-F. Chow, R. F. W. Jackson, M. A. Sutter, S. Thaisrivongs, J. Zimmermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 1281–1308.
- [112] N. R. Curtis, A. B. Holmes, M. G. Looney, N. D. Pearson, G. C. Slim, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 537.
- [113] K. Ohta, O. Mitsunobu, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 517.
- [114] M. Braun, U. Mahler, S. Houben, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 513.
- [115] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1363–1409; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1320–1367.
- [116] a) D. Seebach, J. Zimmermann, U. Gysel, R. Ziegler, T. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4763; b) D. Seebach, U. Gysel, K. Job, A. K. Beck, *Synthesis* **1992**, 39.
- [117] a) D. Seebach, R. Naef, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2704; b) D. Seebach, R. Imwinkelried, T. Weber, *Mod. Synth. Methods* **1986**, 125–260; c) D. Seebach, S. Roggo, J. Zimmermann in *Stereochemistry of Organic and Biorganic Transformations* (Hrsg.: W. Bartmann, K. B. Sharpless), VCH, Weinheim, **1987**, S. 85–126.
- [118] T. Pietzonka, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1837.
- [119] G. Frater, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 2825, 2829; *ibid.* **1980**, *63*, 1383; *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 425; D. Seebach, D. Wasmuth, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 197; M. Sutter, D. Seebach, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 939; J. Aebi, M. Sutter, D. Wasmuth, D. Seebach, *ibid.* **1983**, 2114.
- [120] Y. Noda, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 2137.
- [121] W. Amberg, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 2413.
- [122] W. Amberg, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 2439.
- [123] W. Amberg, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 2429.
- [124] Die zur Zeit beste Methode zur Herstellung von enantiomerenreinem β -Butyrolacton führt über den Orthoester **II**, aus dem durch Pyrolyse das β -Butyrolacton unter ausschließlicher Inversion der Konfiguration an C3 in ca. 30–35% Ausbeute freigesetzt wird. Der S_N2 -Angriff auf das Lacton entspricht formal also einer Retention bezüglich der als Edukt verwendeten (R)-3-Hydroxybuttersäure. Ursprüngliche Synthesvorschrift



und eine Verbesserung davon: a) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1320; b) R. Breitschuh, D. Seebach, *Chimia* **1990**, *44*, 216; andere Herstellungsmethoden: c) A. R. Olson, R. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 2687; d) J. R. Shelton, D. E. Agostini, J. B. Lando, *J. Polym. Sci. Part A1* **1971**, *9*, 2789; e) R. A. Gross, Y. Zang, R. M. Thomas, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1988**, *29*(1), 596.

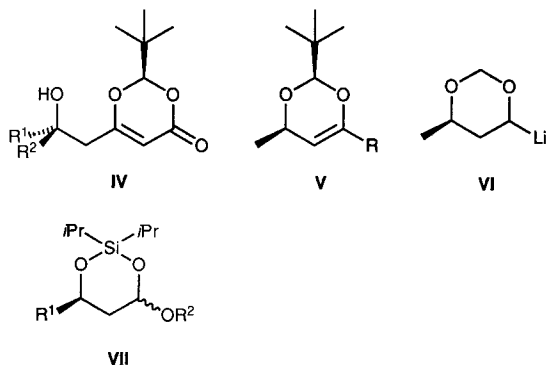
- [125] β -Butyrolacton kann mit geeigneten Basen stereoselektiv α -alkyliert werden, so daß Produkte vom Typ **III** in ca. 30–40% Ausbeute zugänglich sind; siehe Lit. [124a]; R. Schwesinger, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1990**, *38*,



1214–1226; H. Schlemper, Dissertation (Extrem starke Oligophosphazenen-Basen, Synthesen und Anwendungen), Universität Freiburg, **1990**. Solche Versuche wurden schon früher mit α,β -substituierten β -Propiolactonen durchgeführt; siehe J. Mulzer, T. Kerkmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3620.

- [126] H. Liu, R. Auchus, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5335.
- [127] G. Cainelli, F. Manescalchi, G. Martelli, M. Panunzio, L. Plessi, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3369.
- [128] a) R. Imwinkelried, Dissertation (Organovanadiumverbindungen und enantiomerenreine Acetalderivate in der Synthese, Dissertation Nr. 8142), ETH Zürich, **1986**; b) D. Seebach, R. Imwinkelried, G. Stucky, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 448–464.

- [129] a) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1326; b) R. Breitschuh, D. Seebach, *Synthesis* **1992**, 83.
- [130] N. Yamaguchi, J. Inanga, H. Saeki, T. Katsuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1989.
- [131] D. Seebach, U. Brändli, P. Schnurrenberger, M. Przybylski, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 155.
- [132] D. Seebach, U. Brändli, H.-M. Müller, M. Dobler, M. Egli, M. Przybylski, K. Schneider, *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 1704.
- [133] H.-M. Müller, M. Dobler, P. Zbinden, D. Seebach, *Chimia* **1991**, 45, 376.
- [134] A. Shanzer, J. Libman, F. Frolow, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7339; A. Shanzer, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1983**, 92, 411; A. Shanzer, J. Libman, F. Frolow, *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 60; A. Shanzer, J. Libman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 846. Der Naturstoff Enterobactin enthält das Strukturelement des Triolids F (Schema 5); die Kristallstruktur eines Vanadiumkomplexes von Enterobactin wurde soeben veröffentlicht: T. P. Karpishin, K. N. Raymond, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 486; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 466.
- [135] a) D. Seebach, H.-M. Müller, H. M. Bürger, D. A. Plattner, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 443; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 434; b) D. A. Plattner, A. Brunner, M. Dobler, H.-M. Müller, W. Petter, P. Zbinden, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1993**, im Druck.
- [136] T. B. Grindley, R. Thangarasa, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1364, zit. Lit.
- [137] Die beschriebenen Resultate werden zu einem späteren Zeitpunkt in ausführlicherer Form veröffentlicht.
- [138] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochemistry* **1970**, 9, 3471.
- [139] Zum Beispiel wurden in jüngster Zeit unter anderem die Verbindungen IV–VII aus 3-Hydroxysäuren hergestellt oder erzeugt. Verbindung IV: D. Seebach, U. Mißlitz, P. Uhlmann, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 484; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 472; D. Seebach, U. Mißlitz,



P. Uhlmann, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1845. Verbindung V: U. Gysel, Dissertation (Chromatographische Enantiomerentrennung von 1,3-Dioxinonen und Synthese von enantiomerenreinen 1,3-Dioxinen aus 3-Hydroxybuttersäure. Dissertation Nr. 9473), ETH Zürich, **1991**. Konfigurativ stabile 4-Lithium-1,3-dioxane der Struktur VI sind über mehrere Schritte aus P(3-HB) erzeugt worden. In THF ist das (4R,6R)-Derivat bei -78°C und das (4R,6S)-Epimere bis 0°C stabil (R. J. Linderman, B. D. Griedel, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5491). Lactole vom Typ VII wurden kürzlich durch Hydrosilylierung der entsprechenden 3-Hydroxysäuren hergestellt. Sie lassen sich mit Allylsilan und geeigneten Lewis-Säuren diastereoselektiv allylieren (A. P. Davis, S. C. Hegarty, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2745). Zahlreiche Pheromone haben Mori et al. aus 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure hergestellt (K. Mori, *Tetrahedron* **1989**, 45, 3233–3298).

- [140] *Agricultural and Synthetic Polymers. Biodegradability and Utilization (ACS Symp. Ser.* **1990**, 433).
- [141] J. D. Evans, S. K. Sikdar, *CHEMTECH* **1990**, 38.
- [142] Im Gegensatz dazu wird an einschlägigen Tagungen und Seminaren immer wieder betont, daß ein vermehrter Einsatz biologisch abbaubarer Polymere gar nicht so sehr erwünscht ist, da sie einerseits ohne kommerziellen Nutzen entsorgt werden, andererseits ihre Abbauprodukte die Gewässer verschmutzen können (z.B. durch Eutrophierung).
- [143] Conference on Degradability of Polymers and Plastics, London, **1973**.
- [144] R. Leaversuch, *Mod. Plast.* **1987**, 64, 52.
- [145] T.-W. Lai, A. Sen, *Organometallics* **1984**, 3, 866; A. Sen, J. S. Brumbaugh, *J. Organomet. Chem.* **1985**, 279, C5; M. Marsacchini, G. Consiglio, L. Medici, G. Petrucci, U. W. Suter, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 992; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 989; A. Batistini, G. Consiglio, U. W. Suter, *ibid.* **1992**, 104, 306 bzw. **1992**, 31, 303.
- [146] C. E. Swanholm, R. G. C. Caldwell, DE-A 2216650, **1973** (*Chem. Abstr.* **1974**, 80, 37852g).
- [147] G. J. L. Griffin, *PCT Int. Appl.* **1988**, WO 8809354-A (*Chem. Abstr.* **1989**, 110, 76828m).

- [148] Zum Beispiel: F. H. Otey, R. P. Westhoff, W. M. Doane, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1980**, 19, 592.
- [149] J. Tomka, B. Schink in den Proceedings zur Tagung *Werkstoffe für die Bedürfnisse von Morgen*, 17.–18. April **1991**, Zürich.
- [150] J. G. Leahy, R. R. Colwell, *Microbiol. Rev.* **1990**, 54, 305–315.
- [151] A. A. Chowdhury, *Arch. Mikrobiol.* **1963**, 47, 167.
- [152] T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, T. Kaio, S. Masamune, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 124, 71.
- [153] Y. Shirakura, T. Fukui, T. Tanio, K. Nakayama, R. Matsuno, K. Tomita, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 748, 331.
- [154] Y. Shirakura, T. Fukui, T. Saito, Y. Okamoto, T. Narikawa, K. Koide, K. Tomita, T. Takemasa, S. Masamune, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 880, 46.
- [155] T. Fukui, T. Narikawa, K. Miwa, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 952, 164.
- [156] F. P. Delafield, M. Doudoroff, N. J. Palleroni, C. J. Lusty, R. Contopoulos, *J. Bacteriol.* **1965**, 90, 1455.
- [157] F. P. Delafield, K. E. Cooksey, M. Doudoroff, *J. Bacteriol.* **1965**, 240, 4023.
- [158] C. J. Lusty, M. Doudoroff, *Biochem.* **1966**, 56, 960.
- [159] M. W. Stinson, J. M. Merrick, *J. Bacteriol.* **1974**, 119, 152.
- [160] K. Nakayama, T. Saito, T. Fukui, Y. Shirakura, K. Tomita, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 827, 63.
- [161] D. Davies, R. Y. Stanier, M. Doudoroff, M. Mandel, *Arch. Microbiol.* **1970**, 70, 1.
- [162] D. W. McLellan, P. J. Halling, *FEMS Microbiol. Lett.* **1988**, 52, 215.
- [163] Der mittlere Polymerisationsgrad (\bar{X}_n) mit bifunktionellen Monomeren kann nach Gleichung (b) berechnet werden; siehe Lehrbücher der Polymerchemie, beispielsweise P. C. Hiemenz, *Polymer Chemistry*, Dekker, New York, **1984**.
- [164] N. C. Billingham, M. G. Proctor, J. D. Smith, *J. Organomet. Chem.* **1988**, 341, 83.
- [165] F. E. Küng, US-A 2356459, **1944**, (*Chem. Abstr.* **1944**, 38, 6301).
- [166] J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke, *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, **1987**, Kap. 11.
- [167] M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi, H. Tani, *Polymer* **1973**, 14, 267.
- [168] M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, H. Tani, *Polym. J.* **1974**, 6, 248.
- [169] S. Bloembergen, D. A. Holden, T. L. Blum, G. K. Hamer, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1989**, 22, 1656.
- [170] K. Teranishi, M. Iida, T. Araki, H. Tani, *Macromolecules* **1977**, 10, 275.
- [171] K. Teranishi, M. Iida, T. Araki, S. Yamashita, H. Tani, *Macromolecules* **1974**, 7, 421.
- [172] S. Inoue, Y. Tomoi, T. Tsuruta, J. Furukawa, *Makromol. Chem.* **1961**, 48, 229.
- [173] H. Kricheldorf, N. Scharnagel, *J. Macromol. Sci. Chem. A* **1989**, 26(7), 951.
- [174] D. E. Agostini, J. B. Lando, J. R. Shelton, *J. Polym. Sci. Part A1* **1971**, 9, 2775.
- [175] R. A. Gross, Y. Zhang, G. Konrad, R. W. Lenz, *Macromolecules* **1988**, 21, 2657.
- [176] T. Yasuda, T. Aida, S. Inoue, *Macromolecules* **1983**, 16, 1792. T. Yasuda, T. Aida, S. Inoue, *Macromolecules* **1984**, 17, 2217.
- [177] Z. Jedlinski, M. Kowalczyk, W. Głokowski, J. Grobelny, M. Szwarc, *Macromolecules* **1991**, 24, 349.
- [178] a) N. Spassky, A. LeBorgne, M. Sepulchre, *Pure Appl. Chem.* **1981**, 53, 1735–1744; b) H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1984**, 18, 249–330.
- [179] A. LeBorgne, N. Spassky, *Polymer* **1989**, 30, 2312.
- [180] T. Takeichi, Y. Hieda, Y. Takayama, *Polym. J.* **1988**, 20, 159.
- [181] Lit. [124a], zit. Lit.; L. D. Arnold, T. H. Kalantar, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7105; L. D. Arnold, J. C. G. Drover, J. C. Vederas, *ibid.* **1987**, 109, 4649; L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas, *ibid.* **1988**, 110, 2237.
- [182] Y. Zang, R. A. Gross, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1989**, 30(2), 400.
- [183] Y. Zang, R. A. Gross, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1990**, 31(1), 1.
- [184] N. Tanahashi, Y. Doi, *Macromolecules* **1991**, 24, 5732.
- [185] P. E. F. Ketelaar, E. G. Staring, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4665, zit. Lit.
- [186] S. C. Arnold, R. W. Lenz, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1986**, 6, 285.
- [187] I. Ohlson, J. M. Merrick, I. J. Goldstein, *Biochemistry* **1965**, 4, 453.
- [188] Die beschriebenen Resultate werden in einer geplanten Veröffentlichung ausführlicher diskutiert werden.
- [189] *Methods Enzymol. (Mass Spectrometry)* **1991**, 193.
- [190] Die Geschwindigkeit der Reaktion des Monomers mit dem Initiator muß größer als die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Polymerisation sein, und es dürfen keine Kettenübertragungs- oder Kettenabbruchsreaktionen auftreten. Man kann dann zeigen, daß in solchen Fällen die Moleku-

$$\bar{X}_n = 1/(1 - \text{Umsatz an funktionellen Gruppen}) \quad (\text{b})$$

merchemie, beispielsweise P. C. Hiemenz, *Polymer Chemistry*, Dekker, New York, **1984**.

- [164] N. C. Billingham, M. G. Proctor, J. D. Smith, *J. Organomet. Chem.* **1988**, 341, 83.
- [165] F. E. Küng, US-A 2356459, **1944**, (*Chem. Abstr.* **1944**, 38, 6301).
- [166] J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke, *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, **1987**, Kap. 11.
- [167] M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, K. Teranishi, H. Tani, *Polymer* **1973**, 14, 267.
- [168] M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, H. Tani, *Polym. J.* **1974**, 6, 248.
- [169] S. Bloembergen, D. A. Holden, T. L. Blum, G. K. Hamer, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1989**, 22, 1656.
- [170] K. Teranishi, M. Iida, T. Araki, H. Tani, *Macromolecules* **1977**, 10, 275.
- [171] K. Teranishi, M. Iida, T. Araki, S. Yamashita, H. Tani, *Macromolecules* **1974**, 7, 421.
- [172] S. Inoue, Y. Tomoi, T. Tsuruta, J. Furukawa, *Makromol. Chem.* **1961**, 48, 229.
- [173] H. Kricheldorf, N. Scharnagel, *J. Macromol. Sci. Chem. A* **1989**, 26(7), 951.
- [174] D. E. Agostini, J. B. Lando, J. R. Shelton, *J. Polym. Sci. Part A1* **1971**, 9, 2775.
- [175] R. A. Gross, Y. Zhang, G. Konrad, R. W. Lenz, *Macromolecules* **1988**, 21, 2657.
- [176] T. Yasuda, T. Aida, S. Inoue, *Macromolecules* **1983**, 16, 1792. T. Yasuda, T. Aida, S. Inoue, *Macromolecules* **1984**, 17, 2217.
- [177] Z. Jedlinski, M. Kowalczyk, W. Głokowski, J. Grobelny, M. Szwarc, *Macromolecules* **1991**, 24, 349.
- [178] a) N. Spassky, A. LeBorgne, M. Sepulchre, *Pure Appl. Chem.* **1981**, 53, 1735–1744; b) H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Top. Stereochem.* **1984**, 18, 249–330.
- [179] A. LeBorgne, N. Spassky, *Polymer* **1989**, 30, 2312.
- [180] T. Takeichi, Y. Hieda, Y. Takayama, *Polym. J.* **1988**, 20, 159.
- [181] Lit. [124a], zit. Lit.; L. D. Arnold, T. H. Kalantar, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7105; L. D. Arnold, J. C. G. Drover, J. C. Vederas, *ibid.* **1987**, 109, 4649; L. D. Arnold, R. G. May, J. C. Vederas, *ibid.* **1988**, 110, 2237.
- [182] Y. Zang, R. A. Gross, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1989**, 30(2), 400.
- [183] Y. Zang, R. A. Gross, R. W. Lenz, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1990**, 31(1), 1.
- [184] N. Tanahashi, Y. Doi, *Macromolecules* **1991**, 24, 5732.
- [185] P. E. F. Ketelaar, E. G. Staring, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4665, zit. Lit.
- [186] S. C. Arnold, R. W. Lenz, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1986**, 6, 285.
- [187] I. Ohlson, J. M. Merrick, I. J. Goldstein, *Biochemistry* **1965**, 4, 453.
- [188] Die beschriebenen Resultate werden in einer geplanten Veröffentlichung ausführlicher diskutiert werden.
- [189] *Methods Enzymol. (Mass Spectrometry)* **1991**, 193.
- [190] Die Geschwindigkeit der Reaktion des Monomers mit dem Initiator muß größer als die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Polymerisation sein, und es dürfen keine Kettenübertragungs- oder Kettenabbruchsreaktionen auftreten. Man kann dann zeigen, daß in solchen Fällen die Moleku-

- largewichte Poisson-verteilt sind und der Anteil eines n meren in der Mischung sowie die Polydispersität (M_w/M_n) lassen sich berechnen [163]. Auf diese Art lassen sich relativ engverteilte „lebende“ Polymere erzeugen (engl.: living polymers). Neuere Entwicklungen auf diesem Gebiet sind die Gruppentransferpolymerisation (GTP): D. Y. Sogah, W. R. Hertler, O. W. Webster, G. M. Cohen, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1473; M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1026; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 994, die ringöffnende Methathesepolymerisation (ROMP): R. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 733; R. R. Schrock, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 158, oder auch die kationische Polymerisation: T. Higashimura, S. Aoshima, M. Sawamoto, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1988**, *13/14*, 457; *ibid.* **1988**, *13/14*, 513; M. Zsuga, R. Faust, J. P. Kennedy, *Polym. Bull. (Berlin)* **1989**, *21*, 273.
- [191] a) Nach einem Referat, gehalten von Dr. F. Wynne, ICI (Deutschland), bei einem Workshop über abbaubare Kunststoffe an der Universität Zürich vom 27. November 1991; b) *Chimia* **1990**, *44*, 222.
- [192] Unabhängig von der C-Quelle wird auch von diesem Mikroorganismus hauptsächlich P(3-HB) gebildet (H. Brandl, R. A. Gross, R. W. Lenz, R. Lloyd, R. C. Fuller, *Arch. Microbiol.* **1991**, *155*, 337).
- [193] a) R. Noyori, M. Kitamura, *Mod. Synth. Methods* **1989**, 115–198; R. Noyori, H. Takaya, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 345–350; b) A. Tai, T. Kikukawa, T. Sugimura, Y. Inoue, T. Osawa, S. Fujii, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 795.
- [194] P(3-HB) löst sich gut in halogenierten Lösungsmitteln, z.B. Dichlormethan, Chloroform, 1,2-Ethylendichlorid oder Trifluorethanol. In der Hitze ist es auch in Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Xylol, Pyridin, Dichloressigsäure, Trifluoressigsäure und Essigsäure löslich, wobei in den letzten vier Fällen vor allem bei höherer Temperatur mit Depolymerisation gerechnet werden muß. Eine weiterführende Löslichkeitsdiskussion findet sich in Lit. [1 b] und [10].
- [195] *BIOPOL from ICI – A Guide for Processors*, ICI Bio Products & Fine Chemicals, PO Box 1, GB-Billingham, Cleveland TS23 1LB.
- [196] Zum Beispiel: A. Heimerl, H. Pletsch, K. H. Rademacher, H. Schwengler, G. Winkeltau, K. H. Treutner, *Eur. Pat. Appl.* **1989**, EP 336148 A2 (*Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 240568r); F. S. Bowald, E. G. Gunilla, *ibid.* **1990**, EP 349 505 A2 (bzw. **1990**, *113*, 46362z); M. Talja, P. Törmälä, P. Rokkanen, S. Vainionpää, T. Pohjonen, *PCT Int. Appl.* **1990**, WO 9004982 (bzw. **1991**, *114*, 88740x).
- [197] Zum Beispiel: M. Trau, R. W. Truss, *Eur. Pat. Appl.* **1988**, EP 293172 A2 (*Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 90646g); L. Kwan, W. Steber, *ibid.* **1991**, EP 406015 A1 (bzw. **1991**, *115*, 57187p); B. Korsatko, W. Korsatko, K. Wegleitner, *ibid.* **1991**, EP 450262 A1 (bzw. **1992**, *116*, 67196a).
- [198] P. A. Holmes, *UK Pat. Appl.* **1985**, GB 2160208 A (*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 230469e).
- [199] T. Kamata, R. Numazawa, J. Kamo, JP 60137402 A2, **1983** (*Chem. Abstr.* **1986**, *104*, 39779b).
- [200] M. Kloss, DE-A 3711598 A1, **1988** (*Chem. Abstr.* **1989**, *110*, 141188u).
- [201] M. S. Reeve, S. McCarthy, R. A. Gross, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1990**, *31(1)*, 437.
- [202] a) M. Avella, E. Martuscelli, *Polymer* **1988**, *29*, 1731; b) P. Greco, E. Martuscelli, *ibid.* **1989**, *30*, 1475; c) P. B. Dave, N. J. Ashar, R. A. Gross, S. P. McCarthy, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)* **1990**, *31(1)*, 442; d) S. N. Bhalakia, T. Patel, R. A. Gross, S. P. McCarthy, *ibid.* **1990**, *31(1)*, 441.
- [203] H. Tadokoro, *Structure of Crystalline Polymers*, 2. Aufl., R. E. Krieger, Malabar, **1990**.
- [204] a) J. Cornibert, R. H. Marchessault, *J. Mol. Biol.* **1972**, *71*, 735; b) J. Cornibert, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1975**, *8*, 296.
- [205] Y. Chatani, K. Suehiro, Y. Okita, H. Tadokoro, K. Chujo, *Makromol. Chem.* **1968**, *113*, 215.
- [206] C. H. Bamford, L. Brown, E. M. Cant, A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, *Nature (London)* **1955**, *176*, 396.
- [207] F. H. C. Crick, A. Rich, *Nature (London)* **1955**, *176*, 780; G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, C. Ramakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *112*, 168.
- [208] Y. Chatani, Y. Okita, H. Tadokoro, Y. Yamashita, *Polym. J.* **1970**, *1*, 555.
- [209] a) P. DeSantis, A. J. Kovacs, *Biopolymers* **1968**, *6*, 299; b) W. Hoogsteen, A. R. Postema, A. J. Pennings, G. ten Brinke, P. Zugmaier, *Macromolecules* **1990**, *23*, 634.
- [210] S. Arnott, S. D. Dover, A. Elliott, *J. Mol. Biol.* **1967**, *30*, 201.
- [211] S. Arnott, A. J. Wonacott, *J. Mol. Biol.* **1966**, *21*, 371.
- [212] C. Toniolo, M. Crisma, G. M. Bonora, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, A. Santini, *Biopolymers* **1991**, *31*, 129.
- [213] S. Okamura, T. Higashimura, A. Tanaka, R. Kato, Y. Kikuchi, *Makromol. Chem.* **1962**, *54*, 226.
- [214] K. Suehiro, Y. Chatani, H. Tadokoro, *Polym. J.* **1975**, *7*, 352.
- [215] M. Yokouchi, Y. Chatani, H. Tadokoro, *J. Polym. Sci.* **1976**, *14*, 81.
- [216] S. Brückner, S. V. Meille, L. Malpezzi, A. Cesaro, L. Navarini, R. Tombolini, *Macromolecules* **1988**, *21*, 967.
- [217] R. H. Marchessault, C. J. Monasterios, F. G. Morin, P. R. Sundararajan, *Int. J. Biol. Chem.* **1990**, *12*, 158.
- [218] G. Perego, A. Melis, M. Cesari, *Makromol. Chem.* **1972**, *157*, 269.
- [219] J. P. Glusker, K. N. Trueblood, *Crystal Structure Analysis*, 2. Aufl., Oxford University Press, New York, **1985**.
- [220] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2. Aufl., Springer, New York, **1988**.
- [221] Zum Beispiel: M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 551–571; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535–554.
- [222] R. Nagaraj, P. Balaran, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 356; I. J. Karle, P. Balaran, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6787; H. Heimgartner, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 271–297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 238–264.
- [223] C. Toniolo, E. Benedetti, *Macromolecules* **1991**, *24*, 4004.
- [224] a) In vielen Artikeln wird dem P(3-HB) unkorrekterweise eine rechtsgängige 2₁-Helix zugeschrieben, z.B. in Lit. [5, 10, 11, 22], vielleicht weil Marchessault und Okamura ursprünglich eine solche postuliert hatten (K. Okamura, R. H. Marchessault, *Conformation of Biopolymers* (Hrsg.: G. N. Ramachandran), Academic Press, London, **1967**), sich dann allerdings später korrigiert haben [204]. b) Über die Züchtung sowie die röntgenographische und elektronenmikroskopische Identifizierung von lamellaren Kristalliten von P(3-HB) siehe: P. J. Barham, A. Keller, E. L. Otun, P. A. Holmes, *J. Mater. Sci.* **1984**, *19*, 2781.
- [225] a) R. Marchessault, K. Okamura, C. Su, *Macromolecules* **1970**, *3*, 737; b) J. Cornibert, R. Marchessault, *J. Mol. Biol.* **1972**, *71*, 735; c) J. Delsarte, G. Weill, *Macromolecules* **1974**, *7*, 343; d) *ibid.* **1974**, *7*, 450; e) S. Akita, Y. Einaga, Y. Miyaki, H. Fujita, *ibid.* **1976**, *9*, 774; f) Y. Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, K. Soga, *ibid.* **1986**, *19*, 1274; g) *ibid.* **1986**, *19*, 2860; h) N. Kamiya, Y. Inoue, Y. Yamamoto, R. Chujo, Y. Doi, *ibid.* **1989**, *22*, 1676; i) P. Dais, M. E. Nedeia, F. G. Morin, R. H. Marchessault, *ibid.* **1989**, *22*, 4208; k) N. Kamiya, Y. Inoue, Y. Yamamoto, R. Chujo, Y. Doi, *ibid.* **1990**, *23*, 1313.
- [226] W. J. Orts, R. H. Marchessault, T. L. Blum, G. K. Hamer, *Macromolecules* **1990**, *23*, 5368.
- [227] M. Scandola, G. Ceccorulli, M. Pizzoli, M. Gazzano, *Macromolecules* **1992**, *25*, 1405.
- [228] K. Teranishi, T. Araki, H. Tani, *Macromolecules* **1972**, *5*, 660.
- [229] Gemäß Suche im Cambridge Crystallographic Data File und Lit. [203].
- [230] G. Boheim, W. Hanke, H. Eibel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3403; L. Stryer, *Biochemie*, 3. Aufl., Spektrum der Wissenschaften, Heidelberg, **1990**; M. Jain, *Introduction to Biological Membranes*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1988**.
- [231] J. Findlay, *Chem. Br.* **1991**, 724.
- [232] D. A. Langs, *Science* **1988**, *241*, 188; F. R. Salemme, *ibid.* **1988**, *241*, 145; B. A. Wallace, K. Ravikumar, *ibid.* **1988**, *241*, 182; D. Buster, J. Hinton, F. Millett, D. Shungu, *Biophys. J.* **1988**, *53*, 145; D. W. Urry, *Membranes and Transport*, Band 2 (Hrsg.: A. Martonosi), Plenum, New York, **1982**, S. 175–218.
- [233] K. Voges, G. Jung, W. Sawyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *896*, 64; G. Boheim, W. Hanke, G. Jung, *Biophys. Struct. Mech.* **1983**, *9*, 181; W. Hanke, G. Boheim, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *596*, 456.
- [234] Mit genetischer Transformation bezeichnet man die Fähigkeit einer Zelle, DNA aus dem äußeren Medium aufzunehmen, wobei sie sowohl einen neuen Genotyp und – wegen der geforderten Expression der eingeführten DNA – einen neuen Phänotyp erhält (W. Wenzel, M. J. Amann, *Lexikon der Gentechnologie*, Springer, Heidelberg, **1985**; H. Smith, D. Danner, R. Deich, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 41).
- [235] Es bleibt aufzuklären, auf welche Weise P(3-HB) von *E. coli* unter den vorliegenden Bedingungen produziert werden kann, zeigten doch Sinskey et al. [17 b], daß nur genetisch modifiziertes *E. coli* zur Biosynthese von P(3-HB) nach Schema 1 befähigt ist, das sowohl das Ketothiolase-, das Reduktase- und das Synthesegen zusammen enthält. Dasselbe scheint bei Pflanzen der Fall zu sein [69 b].
- [236] Wie schon eingangs erwähnt, kommen Polyphosphate in vielen Bakterien vor [4]. Ihre Funktion ist noch ungeklärt, so können sie Energie- oder Phosphatreservoir sein oder ATP in Kinasereaktionen substituieren (K. A. Ahn, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11734; I. S. Kulaev, *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, Wiley, New York, **1979** und Lit. [13]). Ihr gemeinsames Auftreten mit P(3-HB) ist nicht so überraschend, konnten doch Doi et al. zeigen, daß in *A. eutrophus* die Polyphosphat-Synthese mit der P(3-HB)-Synthese zusammenhängt [76].
- [237] In diesem Ansatz ist offensichtlich die Struktur von Calciummetaphosphat [Ca(PO₃)₂]_n nicht entscheidend, von dem vier Modifikationen (α -, β -, γ - und δ -Form) existieren (A. O. McIntosh, W. L. Jablonski, *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 1424). Die Struktur der β -Form ist bekannt: sie ist zickzackförmig und keine Helix (M. Schneider, K. H. Jost, P. Leibnitz, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1985**, *527*, 99). Allerdings ist die Rotationsbarriere einer P-O-P-Bindung relativ klein, so daß je nach Kation unterschiedliche Konformationen gefunden wurden, unter anderem auch helicale Anordnungen für [AgPO₃]_n oder [NaPO₃]_n in den Kuroll A- und B-Modifikationen (D. E. C. Corbridge, *The Structural Chemistry of Phosphorus*, Elsevier, Amsterdam, **1974**).
- [238] Damit ist wahrscheinlich der äußere Durchmesser gemeint, was in der zitierten Arbeit nicht präzisiert wurde [22].
- [239] P. Deslongchamps, *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1983**, zit. Lit.
- [240] Eine Stabilisierung und besserer Schutz gegenüber Wasser wäre wahrscheinlich mit geeigneten Detergentien zu erreichen. Huber, Deisenhofer und Michel konnten auf diese Weise das ebenfalls exolipophile-endopolarophile photosynthetische Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas* vi-

- ridis* besser in Wasser solubilisieren und schließlich als Detergensmicellen kristallisieren (J. Deisenhofer, H. Michel, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 872–892; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 829).
- [241] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, 557.
- [242] a) U. English, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 613; b) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 553–584.
- [243] L. A. Yakubov, E. A. Deeva, V. F. Zarytova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6454; S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang, *ibid.* **1989**, 86, 3474.
- [244] M. Dobler, *Ionophores and Their Structures*, Wiley, New York, **1981**.
- [245] Es zeigt keine antibiotische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Comamonas terrigena*, *Candida albicans* und *Aspergillus niger*; wir danken auch an dieser Stelle Herrn Dr. J.-J. Sanglier von der Sandoz AG in Basel für die Durchführung der Antibiotica-Tests.
- [246] S. Shambayati, W. E. Crowe, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 273–290; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 256.
- [247] I. Tajima, M. Okada, H. Sumitomo, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4096.
- [248] S. D. Burke, W. J. Porter, J. Rancourt, R. F. Kaltenbach, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5285.
- [249] Es wurde gezeigt, daß 3-Hydroxybutyrat Glucose als Gehirnnahrung zu ersetzen vermag, z.B. bei Patienten, die wegen übermäßiger Fettleibigkeit vor einer Operation abnehmen mußten, oder bei Koma-Patienten: G. L. S. Pawan, S. J. G. Semple, *The Lancet* **1983**, 1, 15.
- [250] ICI hat vor Jahren gezeigt, daß man die Fermentation von *Alkaligenes eutrophus* in städtischen Abwässern vornehmen kann und so prinzipiell s-P(3-HB) produzieren könnte [61].
- [251] International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates ISBP'92, Göttingen, June 1–5, **1992**; Programme and Abstracts, einschließlich Liste und Adressen der Teilnehmer.
- [252] Das s soll für Speicher oder storage stehen.
- [253] Die Manuskripte der Vorträge und Poster wurden in *FEMS - Microbiol. Rev.* **1992**, 103, 91–376 publiziert.
- [254] Das c soll nach einem Vorschlag von R. Reusch [251, 253] für complexed stehen.
- [255] Seite 151–158 in dem unter [4] zitierten Buch von Dawes; dort ausführliche Literatursammlung.
- [256] Es gibt Mikroorganismen, die Polyphosphat von Molekulargewichten bis über 10^6 speichern [255].
- [257] Literaturliste zu Kapitel 11 in dem unter [4] zitierten Buch.
- [258] Neben Cellulose ist Lignin wohl der mengenmäßig weitestverbreitete Naturstoff auf unserem Planeten!?
- [259] Übersichten: K. Freudenberg, *Science* **1965**, 148, 595; E. Adler, S. Larson, K. Lundquist, G. E. Mikshe, *Abstr. Int. Wood Chem. Symp.* **1969**. – Siehe auch: *Natural Product Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: K. Nakanishi, T. Goto, S. Ito, S. Natori, S. Nozoe), Academic Press, New York, **1975**, Kap. 9.16.
- [260] Klassifizierung von Naturstoffen: *Natural Product Chemistry*, Vol. 1 (Hrsg.: K. Nakanishi, T. Goto, S. Ito, S. Natori, S. Nozoe), Academic Press, New York, **1974**, Kap. 1.

... meine
ANGEWANDTE
CHEMIE
gehört zu mir !



Adelheid T., Dr., Syntheschemikerin,
und ihr Weltbild der Chemie,
so persönlich wie ihr Exemplar der
ANGEWANDTEN

Bestellen auch Sie gleich Ihr
persönliches Abonnement der Angewandten!
Anruf beim VCH-Leserservice genügt:
0 62 01/ 606-199 (Fax -117).

