

Über die erste rekombinante Hydroxynitril-Lyase und ihre Anwendung in der Synthese von (S)-Cyanhydrinen**

Siegfried Förster, Jürgen Roos, Franz Effenberger*, Harald Wajant und Achim Sprauer

Professor Manfred Regitz zum 60. Geburtstag gewidmet

Kürzlich haben wir zusammenfassend über Synthesen und Reaktionen optisch aktiver Cyanhydrine berichtet^[1]. (R)-Cyanhydrine sehr unterschiedlicher Struktur sind demnach über die mit Hydroxynitril-Lyase aus Bittermandeln (PaHNL) [EC 4.1.2.10] katalysierte Addition von Blausäure an Aldehyde in sehr guten optischen Ausbeuten zugänglich. Da das Enzym auch in technischen Mengen leicht zugänglich ist, bietet dieses Verfahren den einfachsten Zugang zu (R)-Cyanhydrinen.

Wesentlich verschieden davon sind jedoch die Verhältnisse für die Enzym-katalysierte Darstellung von (S)-Cyanhydrinen. Als bislang am erfolgreichsten hat sich hierbei die Verwendung der Hydroxynitril-Lyase aus *Sorghum bicolor* (SbHNL) [EC 4.1.2.11] als Katalysator erwiesen^[2, 3], ein Enzym, das aus Hirsekeimlingen inzwischen auch in Mengen gewonnen werden kann, die für synthetische Anwendungen ausreichen. Neben der schwierigeren Zugänglichkeit ist das im Vergleich zur PaHNL deutlich eingeschränkte Substratspektrum der SbHNL, die nur aromatische und heteroaromatische Aldehyde als Substrate akzeptiert, ein gravierender Nachteil für die Anwendung dieses Enzyms^[2]. Eine weitere (S)-Hydroxynitril-Lyase, die in jüngster Zeit für die Darstellung von (S)-Cyanhydrinen eingesetzt wurde, ist ebenfalls nur schwer zugänglich^[4].

Aufgrund der Nachteile beider bisher in der organischen Synthese eingesetzten (S)-Hydroxynitril-Lyasen haben wir uns bemüht, ein Enzym zu erschließen, das einerseits ein breites Substratspektrum zur Gewinnung von (S)-Cyanhydrinen aufweist und das andererseits gentechnisch einfach und in ausreichenden Mengen zugänglich gemacht werden kann.

Die funktionelle Expression der klonierten SbHNL^[5] erfordert eine komplexe posttranskriptionale Prozessierung^[5b]. Eine enzymatisch aktive SbHNL kann gentechnisch deshalb in absehbarer Zeit nicht gewonnen werden.

Günstigere Verhältnisse bezüglich einer funktionellen Expression waren dagegen bei der Hydroxynitril-Lyase aus Maniok, *Manihot esculenta*, (MeHNL) [EC 4.1.2.37]^[6] zu erwarten, die sich serologisch von anderen Hydroxynitril-Lyasen deutlich unterscheidet^[7]. Erste orientierende Versuche der Anwendung des natürlichen Enzyms in der Synthese ließen darüber hinaus ein breites Substratspektrum erwarten^[7].

Es ist uns jetzt gelungen, das in pQE4 klonierte MeHNL-Gen (pQE4-MeHNLwt)^[7b] im *E. coli*-Stamm M15[pREP4] zur Überexpression zu bringen^[7b]. Im Lysat transzierter M15[pREP4]-Zellen (M15-MeHNL) wurden 0.5 Units HNL-Aktivität pro mL Bakterienkultur gefunden, im Lysat von nicht transzierten Bakterien dagegen war keine Aktivität nachweisbar^[7b].

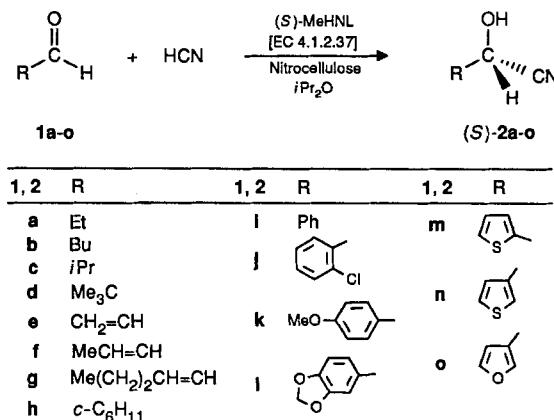
[*] Prof. F. Effenberger, Dr. S. Förster, Dipl.-Chem. J. Roos
Institut für Organische Chemie der Universität
Pfaffenwaldring 55, D-70569 Stuttgart
Telefax: Int. + 7 11/6 85 42 69

Dr. H. Wajant
Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart
Dipl.-Ing. (FH) A. Sprauer
Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

[**] Enzym-katalysierte Reaktionen, 23. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. – 22. Mitteilung: F. Effenberger, S. Heid, *Tetrahedron Asymmetry*, im Druck.

Die M15-MeHNL-Zellen wurden bei pH 5.4 aufgeschlossen und mit Benzonase behandelt. Das Lysat wurde mit Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF gereinigt. Die Aktivität der gereinigten rekombinanten MeHNL beträgt nach Ultrafiltration 900 U mL⁻¹. Eine 80L-M15-MeHNL-Kultur mit ca. 150–200 g Feuchtmasse ergibt ca. 40000 U rekombinanter MeHNL. Um eine vergleichbare Menge an Enzym aus natürlichem Material zu erhalten, wären 150–200 kg Maniokblätter erforderlich. Damit ist erstmals eine (S)-Hydroxynitril-Lyase gentechnisch auf einfache Weise zugänglich gemacht worden. Hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften sind die rekombinante MeHNL und die aus *Manihot esculenta* isolierte MeHNL identisch^[7b].

Erste Untersuchungen des katalytischen Potentials der aus Maniokblättern isolierten MeHNL zur Synthese von (S)-Cyanhydrinen hatten zwar den Vorteil eines breiten Substratspektrums erkennen lassen, die erzielten optischen Ausbeuten waren jedoch nicht befriedigend^[7a]. Nachdem nun ausreichende Mengen an rekombinantem Enzym mit einer gegenüber dem natürlichen Enzym 25fach höheren spezifischen Aktivität zur Verfügung standen, haben wir die durch MeHNL katalysierte enantioselektive Addition von Blausäure an eine Vielzahl von Aldehyden (Schema 1, Tabelle 1) und Ketonen (Schema 2, Tabelle 2)

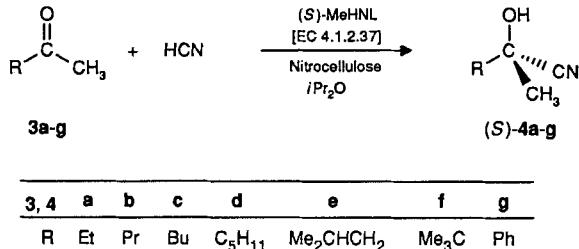


Schema 1. Synthese von (S)-Cyanhydrinen durch MeHNL-katalysierte Addition von HCN an Aldehyde.

Tabelle 1. (S)-Cyanhydride (S)-2 durch MeHNL-katalysierte Addition von HCN an Aldehyde 1 in Diisopropylether als Lösungsmittel bei 25 °C.

Aldehyde 1 R	Enzym [U mmol ⁻¹ 1]	t [h]	(S)-Cyanhydride 2 Ausb. [%][a]	ee [%][b]
a C ₂ H ₅	34	4.3	86	91
b n-C ₄ H ₉	61	4.0	100	91
c (H ₃ C) ₂ CH	32	6.5	91	95
d (H ₃ C) ₃ C	39	8.8	80	94
e H ₂ C=CH	119	0.5	100	47
	100	1.0 [c]	70	56
f E-H ₃ CCH=CH	145	1.0	100	92
g E-H ₃ C(CH ₂) ₂ CH=CH	130	3.0	82	97
h cC ₆ H ₁₁	70	5.3	100	92
i C ₆ H ₅	58	7.0	100	98
j 2-Cl-C ₆ H ₄	107	8.7	100	92
k 4-H ₃ CO-C ₆ H ₄	130	9.5	82	98
l 3,4-CH ₂ O ₂ -C ₆ H ₃	110	10.3	84	86
m 2-Thienyl	134	6.0	85	96
n 3-Thienyl	149	4.0	98	98
o 3-Furyl	141	6.5	98	92

[a] Die Ausbeuteangaben für (S)-2a–j beziehen sich auf die isolierten Reinprodukte, für (S)-2k–o sind die Ausbeuten ¹H-NMR-spektroskopisch bestimmt. [b] Nach Acetylierung mit Acetanhydrid gaschromatographisch auf β-Cyclodextrinphasen bestimmt [1, 9]. [c] Bei 0 °C.



Schema 2. Synthese von (S)-Ketoncyanhydrinen durch MeHNL-katalysierte Addition von HCN an Methylketone.

Tabelle 2. (S)-Ketoncyanhydrine (S)-4 durch MeHNL-katalysierte Addition von HCN an Methylketone 3 in Diisopropylether bei 25 °C.

Ketone 3 R	Enzym [U mmol ⁻¹ 3]	t [h]	(S)-Ketoncyanhydrine 4 Ausb. [%][a] ee [%][b]
a C ₂ H ₅	53	4.0	91 18
b n-C ₃ H ₇	123	0.5	36 69 [c]
c n-C ₄ H ₉	123	0.5	58 80 [c]
d n-C ₅ H ₁₁	126	2.0	39 92
e (H ₃ C) ₂ CHCH ₂	107	0.7	69 91
f (H ₃ C) ₃ C	107	0.8	81 28
g C ₆ H ₅	112	7.0	13 [d] 78

[a] Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten Reinforme. [b] Nach Acetylierung mit Acetanhydrid oder Verseifung zur Carbonsäure und anschließender Veresterung zum Methylester gaschromatographisch auf β-Cyclodextrinphasen oder über diastereomere (S)-MTPA-Ester (MTPA = α-Methoxy-β-trifluormethylphenylsäure) gaschromatographisch bestimmt [1, 9]. [c] Vergleich mit Lit. [11]. [d] Ausbeute ¹H-NMR-spektroskopisch bestimmt.

untersucht. Zur Erzielung möglichst hoher optischer Ausbeuten wurden die Umsetzungen wiederum in Diisopropylether als Lösungsmittel durchgeführt^[11]. Während sich jedoch bei den Reaktionen mit den Hydroxynitril-Lyasen Cellulose (Avicel oder Celulose P100PSC) als Trägermaterial sehr bewährt hatte^[1, 8], konnten bei den Umsetzungen mit der rekombinanten MeHNL mit diesem Träger nur mäßige optische Ausbeuten erzielt werden^[9]. Erst durch Verwendung von Nitrocellulose als Trägermaterial, die eine höhere Affinität zu Proteinen hat, konnte eine zufriedenstellende Enantioselektivität der Addition erreicht werden (Tabelle 1, 2). Tabelle 1 zeigt, daß die MeHNL ein ähnlich breites Substratspektrum aufweist wie die (R)-Hydroxynitril-Lyase aus Bittermandeln, d. h. es werden sowohl aromatische als auch aliphatische Aldehyde als Substrate akzeptiert. Selbst der sterisch sehr anspruchsvolle Pivalaldehyd (**1d**) ergibt noch hohe optische Ausbeuten.

Eine durch Enzyme katalysierte enantioselektive Addition von HCN an Ketone konnte bisher für die PaHNL^[10a] und für die Hydroxynitril-Lyase aus *Linum usitatissimum*^[10b], die beide die Bildung von (R)-Ketoncyanhydrinen katalysieren, nachgewiesen werden. Eine Synthese von (S)-Ketoncyanhydrinen mit einer (S)-Hydroxynitril-Lyase ist bisher unseres Wissens noch nicht beschrieben worden. (S)-Ketoncyanhydrine konnten in jüngster Zeit durch Transcyanierung aus racemischen Ketoncyanhydrinen mit der (R)-Hydroxynitril-Lyase PaHNL hergestellt werden^[11]. Nicht unerwartet nehmen die optischen Ausbeuten bei den Umsetzungen von Alkylmethylketonen mit zunehmender Größe des Alkylrestes zu^[10a]. Während Verzweigungen in β-Position des Alkylsubstituenten keinen nachteiligen Einfluß auf die Enantioselektivität haben (**4e**), nehmen bei starker sterischer Hinderung in Nachbarstellung zur Carbonylgruppe (**4f**) die optischen Ausbeuten stark ab. Die MeHNL aus *Manihot esculenta* ist die bisher einzige Hydroxynitril-Lyase, die ein aromatisches Keton wie Acetophenon als Substrat akzeptiert.

Arbeitsvorschriften

Überexpression der MeHNL in *E. coli*:

Die codierende Region des MeHNL-Gens wurde aus oligo(dT) gepräpter cDNA mit PCR amplifiziert („Sense“-Primer: GCA GGG CCG GAT CCC ATT TCC AAA ATG GTA ACT GCA CA; „Antisense“-Primer: GCA GGG CCG GAT CCA CAC AAC GTG GAA CTCTCC CAT ATT; unterstrichene Bereiche entsprechen Position 16–39 bzw. 933–910 der cDNA-Sequenz der MeHNL [6b]) und im korrekten Leseraster in den pQE4-Expressionsvektor (Qiagen) kloniert. Das so erhaltene Expressionsplasmid pQE4-MeHNLw wurde zur MeHNL-Expression in *E. coli*-M15[pREP4]-Zellen transfiziert (M15-MeHNL).

Eine 8 L-Kultur wurde mit 2 mL einer ca. 12 h alten Kultur von M15-MeHNL in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg mL⁻¹) und Kanamycin (25 µg mL⁻¹) angesetzt. Diese Kultur wurde nach ca. 12 h Kultivierung bei 37 °C zum Animpfen eines 100 L-Fermenters (Bioengineering) verwendet. Die M15-MeHNL-Zellen wurden 1 h bei 30 °C und nach Induktion der Expression mit Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (Endkonzentration 1 mM) weitere 3.5 h kultiviert. Dann wurden die Zellen durch „Cross-flow“-Konzentrierung (Maxisette System) an einer 0.3 µm-Membran (0.46 m²) (Filtron) auf ca. 7.5 L eingeeignet. Zur Abtrennung von restlichem LB Medium wurden die Zellen 10 min bei 10000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 L Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 5.4) resuspendiert und die Zellen durch Hochdruck-Homogenisation (500 bar, drei Cyclen, Rannie-APV MiniLab) aufgeschlossen. Zur Entfernung chromosomaler DNA wurde das Rohlysat (Gesamtmenge an HNL 40000 U, spez. Aktivität 2.8 U mg⁻¹) mit Benzonaç (Merck) (Endkonzentration 5000 U L⁻¹) 1 h bei Raumtemperatur verdaut. Nach 1 h Zentrifugieren bei 130000 × g wurde die MeHNL durch Anionenaustauschchromatographie auf eine spezifische Aktivität von 12 U mg⁻¹ angereichert. Hierzu wurde eine Q-Sepharose FF 100/1200 Säule mit 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5.7, (Puffer A) equilibriert, und die gebundenen Proteine wurden mit 7200 mL eines linearen Gradienten von 0–1 M NaCl in Puffer A mit einer Flußrate von 50 mL min⁻¹ eluiert. MeHNL eluiert nach 450 mL Salzgradient.

Enzym-katalysierte Darstellung von (S)-Cyanhydrinen:

Man läßt 50 mg Träger (Nitrocellulose) in 3 mL 0.02 M Natriumcitrat-Puffer (pH 3.3) 30 min quellen. Nach Dekantieren, Zentrifugieren (30 min, 5700 × g) und 5 h Trocknen im Hochvakuum tropft man die in den Tabellen angegebene Menge konz. MeHNL-Lösung (900 U mL⁻¹) zu und zentrifugiert nach 15 min (bei –5 °C, 30 min 3650 × g). Man überführt den enzymbeladenen Träger in einen Kolben, gibt 5 mL Diisopropylether, 0.3–0.4 mmol I oder 3 und 100 µL (2.6 mmol) HCN zu und läßt die in den Tabellen angegebene Zeit bei Raumtemperatur röhren. Man saugt den Träger ab, wäscht mit Diethylether, trocknet die vereinigten Filtrate und destilliert die Lösungsmittel und nicht umgesetztes Edukt (1a–g, 3a–f) ab. Die Aldehydcyanhydrine (S)-2a–j (Tabelle 1) und die Ketoncyanhydrine (S)-4a–f (Tabelle 2) fallen in reiner Form an. Im Falle der Verbindungen (S)-2k–o und (S)-4g erfolgt die Reindarstellung über eine Derivatisierung als Acetate bzw. Trimethylsilylether, wobei die NMR-spektroskopisch ermittelten Ausbeuten (Tabelle 1, 2) bestätigt werden.

Eingegangen am 11. Oktober 1995 [Z 8461]

Stichworte: Asymmetrische Synthesen · (S)-Cyanhydrine · Enzymkatalyse · Lyasen

- [1] F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1609–1619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1555–1564.
- [2] F. Effenberger, B. Hörsch, S. Förster, T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1249–1252.
- [3] a) U. Niedermeyer, M.-R. Kula, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 423–425; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 386–387. b) M.-R. Kula, U. Niedermeyer, I. M. Stuertz (Degussa AG), EP-B 350 908, **1990**; DE-B 3 823 866, **1988** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 57462 h].
- [4] a) N. Klempier, H. Griengl, M. Hayn, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4769–4772. b) N. Klempier, U. Pichler, H. Griengl, *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 845–848.
- [5] a) H. Wajant, H. Böttlinger, K.-W. Mundry, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, *18*, 75–82. b) H. Wajant, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [6] a) F. J. P. De C. Carvalho, Dissertation, University of California, Davis, **1981**. b) J. Hughes, F. J. P. De C. Carvalho, M. A. Hughes, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 496–502.
- [7] a) H. Wajant, S. Förster, H. Böttlinger, F. Effenberger, K. Pfizenmaier, *Plant Sci. (Limerick, Irel.)* **1995**, *108*, 1–11. b) H. Wajant, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [8] F. Effenberger, J. Eichhorn, J. Roos, *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 271–282.
- [9] J. Roos, Diplomarbeit, Universität Stuttgart, **1995**.
- [10] a) F. Effenberger, B. Hörsch, F. Weingart, T. Ziegler, S. Kühner, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2605–2608. b) J. Albrecht, I. Jansen, M.-R. Kula, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, *17*, 191–203.
- [11] E. Menéndez, R. Brieva, F. Rebollo, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 989–990.