

Ohne Zweifel handelt es sich bei den Halogenkomplexen um Außerkomplexe **A** im Sinne von Mulliken und Person.<sup>[1]</sup> Die PRCs repräsentieren die Stufe des Partnereinfangs durch elektrostatische Anziehung in einem frühen Stadium einer exergonisch ablaufenden Reaktion.

Als Folge der schwachen Wechselwirkung zwischen Base und Halogen sind die PRCs labil, so daß sie auch leicht wieder zerfallen können. Ihr Existenzbereich im thermischen Ungleichgewicht ist auf niedrige Rotations- und sehr niedrige Translationstemperaturen unter stoßfreien Bedingungen beschränkt. Inwieweit sie Vorstufen für Übergangskomplexe der Folgereaktionen darstellen, ist eine andere Frage.

**Stichworte:** Halogene · Mikrowellenspektroskopie · Molekularstrahlexperimente · Präreaktive Komplexe · Spektroskopie

- [1] R. S. Mulliken, W. B. Person, *Molecular Complexes*, Wiley-Interscience, New York, 1969.  
 [2] A. C. Legon, *Chem. Commun.* **1996**, 109–116.

- [3] A. C. Legon, D. G. Lister, J. C. Thorn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 757–758; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 3205–3212.  
 [4] M. H. Studier, E. H. Appelman, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2349–2351.  
 [5] P. N. Noble, G. C. Pimentel, *Spectrochim. Acta Part A* **1968**, *24*, 797–806.  
 [6] H. I. Bloemink, C. M. Evans, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *248*, 260–268.  
 [7] H. I. Bloemink, K. Hinds, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *245*, 598–604.  
 [8] H. I. Bloemink, A. C. Legon, J. C. Thorn, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 781–787.  
 [9] H. I. Bloemink, A. C. Legon, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 876–882.  
 [10] A. C. Legon, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *237*, 291–298.  
 [11] A. C. Legon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91*, 1881–1883.  
 [12] S. A. Cooke, G. Cotti, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 81–83; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 129–130.  
 [13] S. A. Cooke, G. Cotti, C. M. Evans, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Chem. Commun.* **1996**, 2327–2328.  
 [14] G. Cotti, C. M. Evans, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *264*, 513–521.  
 [15] H. I. Bloemink, K. Hinds, J. H. Holloway, A. C. Legon, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *242*, 113–120.  
 [16] H. I. Bloemink, S. J. Dolling, K. Hinds, A. C. Legon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91*, 2059–2066.  
 [17] H. I. Bloemink, A. C. Legon, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 265–270.

## Quervernetzte Enzymkristalle (CLECs) – effiziente und stabile Biokatalysatoren für die präparative organische Chemie

Thomas Zelinski und Herbert Waldmann\*

Professor Maria-Regina Kula zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Vorteile der enzymatischen Katalyse für regio- und stereoselektive Synthesen sind bekannt. So können die ca. 3000 beschriebenen Enzyme eine Vielzahl von Reaktionen unter milde Bedingungen und oft mit hoher Selektivität effizient katalysieren.<sup>[1]</sup> Trotz der steigenden Zahl verfügbarer Enzyme wird ihre Anwendung in der präparativen organischen Synthese durch ihre häufig mangelnde Stabilität unter den Lager- und Reaktionsbedingungen behindert. Daher wurden vielfältige Methoden für ihre Stabilisierung und Immobilisierung entwickelt.<sup>[1]</sup> Dieses Repertoire wurde durch eine neue, alternative Technik erweitert, die auf der Anwendung außergewöhnlich stabiler, quervernetzter Enzymkristalle (cross-linked enzyme crystals, CLECs<sup>[2]</sup>) beruht. Der Nachweis der katalytischen Aktivität von kristallisierten Enzymen galt als ein frühes Indiz für ähnliche Konformationen von gelösten und kristallinen Proteinen.<sup>[3]</sup> Durch Quervernetzung mit bifunktionellen Reagenzien (wie Glutardialdehyd) konnten derartige Kristalle stabilisiert werden, ohne daß sich ihre Röntgenreflexe änderten.<sup>[4]</sup> Diese Art der Fixierung führt zu CLECs, die weiterhin katalytisch aktiv sind und zudem viele Vorteile eines herkömmlich immobilisierten Enzyms aufweisen.

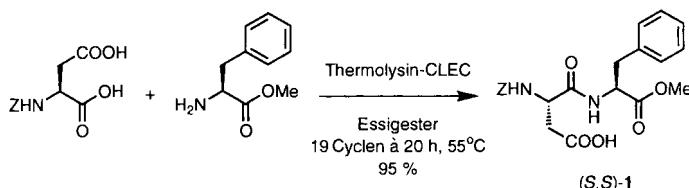
Zur Herstellung von CLECs werden die Fällungsparameter so gewählt, daß Mikrokristalle (Kristalle mit Kantenlängen

<100 µm) entstehen. Durch eine sich direkt anschließende Quervernetzung werden Proteinkristalle erhalten, die in Wasser unlöslich sind und zudem eine hohe mechanische Stabilität aufweisen, so daß sie leichter zu handhaben sind. CLECs sind – anders als herkömmlich immobilisierte Enzyme – auch bei höherer Temperatur und in organischen Lösungsmitteln katalytisch hochaktiv, da durch die Fixierung der Proteine im Kristallgitter und deren zusätzliche Vernetzung eine für den Denaturierungsvorgang nötige Entfaltung, Dissoziation oder Aggregation der Proteinmoleküle nicht stattfinden kann.<sup>[2]</sup> Darüber hinaus sind CLECs äußerst stabil gegen Proteolyse, was einerseits auf die Behinderung der dafür notwendigen Protein-Protein-Wechselwirkungen und andererseits auf die mangelnde Zugänglichkeit des Kristallverbands für die Proteasen zurückzuführen ist. Die Enzymkristalle weisen lange, solvens-gefüllte Kanäle auf, deren Durchmesser z. B. in Thermolysin-Kristallen etwa 25 Å beträgt.<sup>[5]</sup> Wegen dieser Makroporosität der CLECs können niedermolekulare Substrate bis zu einer Größe von etwa 3000 Da in den Kristall eindringen. Die Diffusion ist bei Verwendung von Mikrokristallen nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.<sup>[6]</sup>

Durch die hohe Proteaseaktivität von Thermolysin-CLECs auch unter extremen Bedingungen (z. B. in der Hitze, in 50%igen wäßrigen Mischungen organischer Lösungsmittel und nahezu wasserfreien organischen Lösungsmitteln) stieg das Interesse an CLECs stark an, da die so stabilisierten Biokatalysatoren in vielen Synthesen effizient eingesetzt werden können. Die Aspartamvorstufe **1** wurde in hohen Ausbeuten Thermoly-

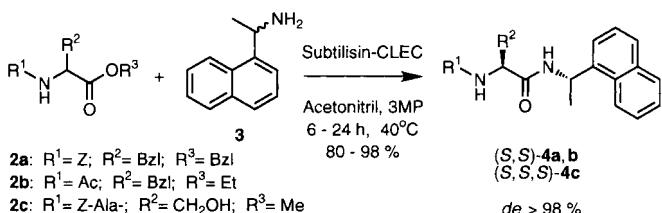
[\*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. T. Zelinski  
 Institut für Organische Chemie der Universität  
 Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe  
 Telefax: Int. +721/608-4825  
 E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

sin-CLEC-katalysiert in reinem Essigsäureethylester bei 55 °C hergestellt (Schema 1). In dieser Reaktion, die in 19 repetitiven Cyclen durchgeführt wurde, konnte bei den Enzymkristallen kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.<sup>[5]</sup> Die Synthese von chiralen Aminosäurealkylamiden gelang mit Subtilisin-CLECs.



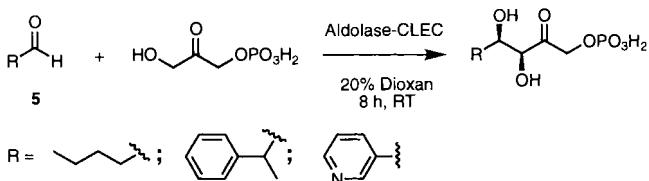
Schema 1. Thermolysin-CLEC-katalysierte Amidbildung bei der Synthese einer Aspartamvorstufe (Z = Benzylloxycarbonyl).

Bei 40 °C wurden in Acetonitril unterschiedliche Acyldonoren **2** mit dem Nucleophil **3** zu Di- und Tripeptidamiden **4** verknüpft (Schema 2).<sup>[7]</sup> Da Subtilisin diese Reaktion hochspezifisch katalysiert, wird aus den racemischen Substraten **2a** und **3** mit hoher Selektivität (*S,S*)-**4a** gebildet. Da die als Methyl-, Ethyl- und Benzylester eingesetzten Acyldonoren in 3-Methyl-3-pentanol (3MP) nicht enzymkatalysiert umgeestert wurden, wurde der Alkohol als Lösungsmittel eingesetzt.



Schema 2. N-Alkylaminosäureamid-Synthese mit Subtilisin-CLEC (3MP = 3-Methyl-3-pentanol).

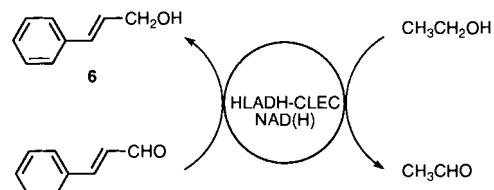
Die von Sobolov et al.<sup>[8]</sup> hergestellten CLECs des C-C-verknüpfenden Enzyms Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase aus Kaninchenmuskel sind erheblich stabiler als die gewöhnlich genutzten lyophilisierten Enzympräparationen. Die homogen gelöste Aldolase weist in gepufferten Lösungen und in Mischungen mit organischen Lösungsmitteln nach 5 d bzw. nach 1 h weniger als 50% ihrer ursprünglichen Aktivität auf, das CLEC-Immobilisat dagegen in beiden Fällen eine Aktivität von mehr als 90%. Das Synthesepotential der Aldolase-CLECs wurde bei den wenig wasserlöslichen nicht-natürlichen Substraten **5** deutlich. Die Ergebnisse ihrer Umsetzung mit Dihydroxyacetophosphat in 20%igem Dioxan sind ähnlich denen mit dem natürlichen Substrat D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) (Schema 3). Die relativen Aktivitäten (bezogen auf GA3P) der



Schema 3. Asymmetrische Reaktion unter C-C-Verknüpfung mit Aldolase-CLECs.

Aldehyde **5** sind mit 68–116% ca. 10- bis 100fach höher als in den Umsetzungen mit dem lyophilisierten Enzym. Aldolase-CLECs bieten somit eine Möglichkeit, bisher als unrentabel geltende Transformationen mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten durchzuführen.

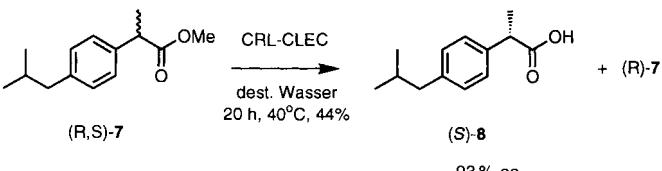
Aus der Klasse der cofaktorabhängigen Enzyme wurden die Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) und die Lactatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel (LDH) als stabile CLECs in der organischen Synthese eingesetzt. Die Kristallisation und Quervernetzung der HLADH-CLECs geschah in Gegenwart des Cofaktors NADH. Die HLADH wurde als Holoenzym in das Kristallgitter eingebaut, in dem der Cofaktor so fest gebunden ist, daß selbst durch intensives Waschen mit Puffer kein NADH freigesetzt wird. Zimtalkohol **6** wurde aus dem zugehörigen Aldehyd in Gegenwart von Dimethoxyethan und Ethanol als Lösungsvermittler synthetisiert, wobei Ethanol zudem als zweites Substrat für die Cofaktorregenerierung diente (Schema 4).<sup>[9]</sup> Die Immobilisierung als CLEC erhöht die Stabi-



Schema 4. Chemoselektive Reduktion von Zimtaldehyd mit HLADH-CLECs.

lität der HLADH, so daß selbst bei einem Anteil von 40% organischen Cosolvens noch die gleiche Aktivität für die Reduktion erzielt wird wie in rein wässrigen Lösungen. Durch Verwendung von LDH-CLECs in der enantioselektiven Lactatsynthese konnte ein Problem der elektroenzymatischen Cofaktorregenerierung gelöst werden. LDH-CLECs wurden – im Unterschied zur homogen gelösten LDH – nicht vollständig deaktiviert; nach einer anfänglichen Verringerung der Aktivität um 10% wurde innerhalb von 25 d kein weiterer Verlust festgestellt. Darüber hinaus wurde der Bereich des optimalen pH-Werts der LDH-CLECs verbreitert, so daß die Dehydrogenase universeller anwendbar wurde.<sup>[10]</sup>

Die Fähigkeiten der *Candida-rugosa*-Lipase(CRL)-CLECs wurden anhand der kinetischen Racematspaltung von Arylpropiionsäureestern verdeutlicht (Schema 5).<sup>[11]</sup> Die Hydrolyse des

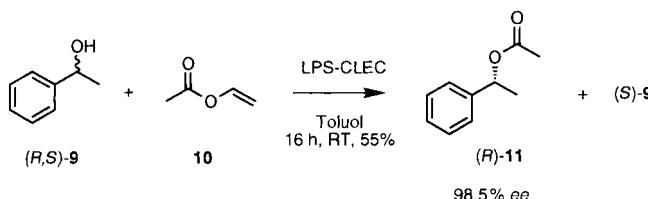


Schema 5. Enantioselektive Esterhydrolyse mit CLECs der Lipase aus *Candida rugosa*.

(*R,S*)-Ibuprofenmethylester **7** lieferte (*S*)-Ibuprofen **8** in hoher Enantiomerenüberschüß (93%). CRL-CLEC katalysierte diese Reaktion mit dreimal höherer Enantioselektivität als die entsprechende Rohenzympräparation, was auf die hohe Reinheit der Enzymkristalle (>98%) zurückgeführt wurde. Somit

wurde gewährleistet, daß Nebenaktivitäten konkurrierender Lipasen mit entgegengesetzter Stereoselektivität nicht auftraten. Die Verträglichkeit von wassermischbaren Lösungsmitteln und Hitzeinfluß ist sehr hoch, so wurde innerhalb von 10 d kein Aktivitätsverlust bei CRL-CLEC in 50%igem THF festgestellt.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind bei Lipase- und Protease-CLEC-katalysierten Umesterungen in reinen organischen Lösungsmitteln (Schema 6) um mehrere Größenordnungen



Schema 6. Kinetische Racematspaltung durch LPS-CLEC-katalysierte Umesterung.

kleiner als die, die für Reaktionen mit homogen gelösten Enzymen in wasserhaltigen Mischungen ermittelt wurden. Bei Subtilisin-CLECs wurde dies auf die Verschiebung des pH-Optimums durch die Kristallisation, auf eine ungünstige Desolvatisationsenergie der Substrate und auf die unzureichende wasservermittelte molekulare Flexibilität der Proteine im Kristallverband zurückgeführt.<sup>[6]</sup> Durch Zusatz von denaturierenden Lösungsmitteln (DMSO und Formamid) zum organischen Reaktionsmedium konnte die Umesterungsaktivität von Subtilisin-CLEC um den Faktor  $\leq 100$  gesteigert werden, was die Flexibilitäts-theorie stützt.<sup>[12]</sup> Auch durch Zugabe eines organischen Puffers, der die katalytische Triade der Serinprotease im aktiven Zentrum optimal protoniert, konnte die Aktivität der Subtilisin-CLECs um zwei Größenordnungen verbessert werden.<sup>[13]</sup> Wurden CLECs in Gegenwart von Detergentien getrocknet, erhielt man CLEC-Formulierungen, die in nahezu wasserfreien organischen Lösungsmitteln hohe Aktivitäten aufweisen. So konnten CLECs der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (LPS) erfolgreich zur enzymatischen Trennung von racemischem 1-Phenylethanol **9** mit Vinylacetat **10** eingesetzt werden. Nach 16 h wurde bei 50% Umsatz in reinem Toluol das Acetat **11** erhalten (ee 98.5%; Schema 6).<sup>[14]</sup> Das Substrat-Enzym-Verhältnis betrug 4700:1, d. h. auch unter diesen ungewöhnlichen Bedingungen ist eine effiziente enzymatische Katalyse möglich. Mit detergensbehandelten CRL-CLECs konnte in der Racematspaltung von (+, -)-Menthol eine höhere Enantioselektivität und eine um mehr als fünf Größenordnungen höhere Aktivität erzielt werden als mit gereinigter und lyophilisierter CRL.<sup>[15]</sup> Die Ursachen für

die Aktivierung des Biokatalysators durch die oberflächenaktiven Substanzen in wasserfreien CLEC-Reaktionen sind noch weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden ein Einfluß auf die Enzymflexibilität, eine Verbesserung des Substratüberganges vom Lösungsmittel durch das fest im Kristall gebundene Wasser zum aktiven Zentrum und eine Regulierung der optimalen Wasseraktivität.

Die neu entwickelten CLECs sind hochselektive und -aktive Katalysatoren mit einer außergewöhnlichen Stabilität in wäßrigen und organischen Lösungsmitteln. Ein Beispiel für die Erwartungen, die an ihr Potential geknüpft werden, ist die Ankündigung einer Kooperation von Altus Biologics, dem Hersteller von CLECs, mit Ciba-Geigy, die in der Entwicklung von Waschmitteladditiva künftig auf die CLEC-Technologie zurückgreifen wollen. Da CLECs leicht zu handhaben sind, können sie als wertvolles Hilfsmittel in der präparativen organischen Chemie eingesetzt werden, besonders wenn große Mengen zu synthetisieren sind. Bisher ist die Kristallstruktur nur von einem Bruchteil der bekannten Biokatalysatoren ermittelt worden. Zwar konnten viele Enzyme kristallisiert werden, doch war die Qualität der erhaltenen Kristalle häufig nicht hoch genug für eine diffraktometrische Untersuchung.<sup>[2]</sup> Auf die bei der Kristallisation gewonnenen Erfahrungen sollte man bei der Entwicklung neuer CLECs zurückgreifen können, um so eine Vielzahl besserer Biokatalysatoren für die organische Chemie zu erhalten.

**Stichworte:** Enzymkatalyse • Immobilisierung

- [1] a) K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, 1995; b) K. Faber, *Biotransformation in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, 1992; c) C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Elsevier, London, 1994.
- [2] N. L. St. Clair, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314–7316.
- [3] F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *52*, 833–838.
- [4] F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Biochemistry* **1966**, *5*, 4062–4076.
- [5] R. A. Persichetti, N. L. S. Clair, J. P. Griffith, M. A. Navia, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2732–2737.
- [6] J. L. Schmitke, C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3360–3365.
- [7] Y.-F. Wang, K. Yakovlevsky, A. L. Margolin, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5317–5320.
- [8] S. B. Sobolov, A. Bartoszko-Malik, T. R. Oeschger, M. M. Montelbano, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7751–7754.
- [9] K. M. Lee, M. Blaghen, J. P. Samama, J. F. Biellmann, *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 202–210.
- [10] S. B. Sobolov, M. D. Leonida, A. Bartoszko-Malik, K. I. Voivodov, F. McKinney, J. Kim, A. J. Fry, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2125–2158.
- [11] J. J. Lalonde, C. P. Govardhan, N. Khalaf, A. G. Martinez, K. Visuri, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845–6852.
- [12] O. Almarsson, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 87–92.
- [13] K. Xu, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9815–9819.
- [14] N. Khalaf, C. P. Govardhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y.-F. Wang, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5494–5495.
- [15] R. A. Persichetti, J. J. Lalonde, C. P. Govardhan, N. Khalaf, A. L. Margolin, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6507–6510