

## Gerichtete Evolution und Biokatalyse

**Keith A. Powell,\* Sandra W. Ramer, Stephen B. del Cardayré, Willem P. C. Stemmer, Matthew B. Tobin, Pascal F. Longchamp und Gjalt W. Huisman**

In diesem Aufsatz wird der gegenwärtige Stand der Biokatalyse in der chemischen Industrie beschrieben. Obwohl uns die Vorteile chemischer Methoden bekannt sind, gehen wir davon aus, dass der Einsatz biologischer Katalyseverfahren durch die jüngsten Fortschritte bei der künstlichen Evolution von Genen, die für Enzyme codieren, drastisch zunehmen wird. Erstmal ist es möglich, die schnelle Entwicklung eines Enzyms für eine spezifische chemische Reaktion zu

verfolgen. Durch diese Technik kann das Enzym an die Bedingungen des Verfahrens angepasst werden. Wir beschreiben hier die Entwicklung einer Technologie für die künstliche Evolution von Enzymen und speziell das zugrunde liegende DNA-Shuffling. Dabei gehen wir auf verschiedene Enzymklassen, ihre gegenwärtigen Einsatzmöglichkeiten und die Einschränkungen, die überwunden werden sollten, ein. In einem Aufsatz dieses Umfangs ist es unmöglich, auf

alle Enzyme mit einem Potential für eine industrielle Nutzung einzugehen; es gibt weitere Enzymklassen, die bei entsprechender Aktivität, Selektivität und Stabilität nützlich für Industriechemiker werden können. Die Biokatalyse befindet sich in einer aufregenden Ära, und wir erwarten große Fortschritte in der nahen Zukunft.

**Stichwörter:** DNA-Shuffling • Enzymbibliotheken • Enzymkatalyse • Gerichtete Evolution • Proteine

### 1. Einleitung

In den meisten Publikationen über die Biokatalyse findet man die Annahme, dass die chemische Industrie durch die Biokatalyse inhärent bessere Verfahren zu erwarten hat. Dabei sollte allerdings nicht übersehen werden, dass seit 200 Jahren verschiedenste Verbindungen von Arzneimitteln bis zu Haushaltsreinigern ohne Biokatalysatoren effizient hergestellt werden. Daher besteht kein Grund zu der Annahme, dass die Chemie in den nächsten Jahrhunderten nicht ebenso erfolgreich sein wird. Die großen Vorteile chemischer Verfahren sind Einfachheit, Geschwindigkeit (gesteigert durch den Einsatz von Hitze und Druck) und niedrige Kosten – warum also sollten Biokatalysatoren interessant sein? Die genannten Vorteile kommen manchmal nicht zum Tragen, wenn für das gewünschte Produkt regio- oder stereospezifische Reaktionen erforderlich sind, wenn das Edukt oder das Produkt instabil ist oder wenn Verunreinigungen durch Nebenreaktionen ein ernsthaftes Problem sind. Biokatalysatoren sind attraktiv, weil zu ihren Eigenschaften eine hervorragende Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, eine beein-

drückende Katalyseeffizienz und die Fähigkeit zur Reaktion in wässrigen Medien gehören. Diese Charakteristika können einerseits nützlich sein, gleichzeitig können sie manchmal aber auch die Einsatzmöglichkeiten von Biokatalysatoren einschränken.

In den letzten zwanzig Jahren hat es erhebliche kommerzielle Fortschritte bei der Biokatalyse gegeben (Abbildung 1). Einige der Verfahren haben auch in großem Maßstab spektakulären Erfolg. Doch was macht diese Verfahren so erfolgreich?

- Das Enzym existierte in einem natürlichen Isolat mit einer Aktivität ähnlich der, die für ein kommerzielles Verfahren benötigt wird.
- Das Enzym konnte unter Erhaltung der Aktivität immobilisiert werden oder die Aktivität war so groß, dass ein einmaliger Gebrauch noch wirtschaftlich war.
- Für die Enzymaktivität waren keine Cofaktoren notwendig oder man konnte auf ganze Zellen zurückgreifen, um die Aktivität ohne nennenswerte Nebenreaktionen bereitzustellen.

Wenn manche Reaktionen also mit kommerziell erhältlichen Enzymen durchgeführt werden können, woran scheitert ein breiterer Einsatz der Biokatalyse (Tabelle 1)?

- Das Enzym kommt in der Natur vielleicht nicht vor oder ist schwierig zu beschaffen oder herzustellen.
- Die Enzymeigenschaften sind für eine chemische Synthese ungeeignet.
- Die Aktivität ist unzureichend.

[\*] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman  
Maxygen, Inc.  
515 Galveston Drive, Redwood City, CA 94063 (USA)  
Fax: (+1)650-298-5449  
E-mail: keith.powell@maxygen.com

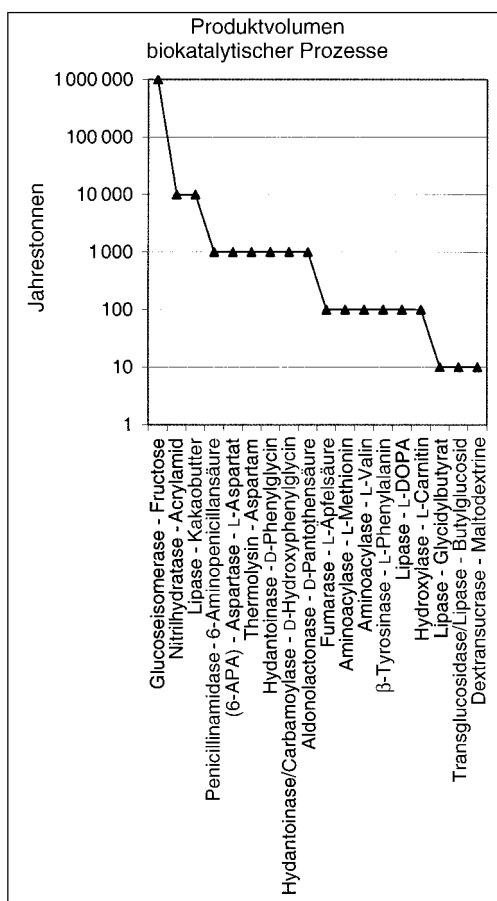


Abbildung 1. Kommerzielle Produkte, die durch biokatalytische Verfahren hergestellt werden.

- Das Enzym unterliegt einer Substrat- oder Produkthemmung, ist unter den Temperatur- oder pH-Bedingungen des Verfahrens nicht aktiv genug oder ist vielleicht einfach zu instabil für einen effektiven industriellen Einsatz.
- Ein teurer Cofaktor, für den es kein effizientes Recyclingverfahren gibt, ist für die Reaktion notwendig.

Welche Zukunft hat dann eine Chemie auf Enzymbasis?

Es gibt inzwischen Beispiele, bei denen das Enzym isoliert und zu einem effektiven Biokatalysator modifiziert wurde.<sup>[1-3]</sup> Durch die jüngsten Fortschritte wurde belegt, dass es mittlerweile möglich ist, mit Techniken einer gerichteten

Tabelle 1. Wichtige Einschränkungen der Biokatalyse, die näher untersucht werden müssen.

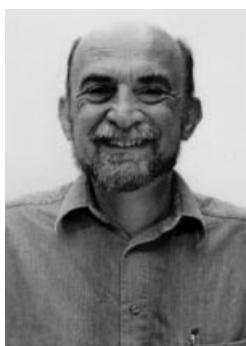
Begrenztes Substratspektrum
Begrenzte Stabilität gegenüber Temperatur, pH-Wert und Lösungsmitteln
Begrenzte Enantioselektivität
Begrenzte Lebensdauer
Begrenzte Wechselzahl

Evolution Enzyme zu entwickeln, die so modifiziert sind, dass sie für ein chemisches Verfahren tauglich sind. Während in der Vergangenheit kommerziell erhältliche Enzyme oft für eine spezifische Reaktion getestet und dann gegebenenfalls verworfen wurden, selektiert man jetzt aus einer Bibliothek verwandter Enzyme mit unterschiedlichen Eigenschaften, so kann man temperaturstabile Enzyme entwickeln, Enzyme mit erhöhter Aktivität, mit Enantioselektivität oder der Fähigkeit, unter verschiedenen anderen physikalischen oder chemischen Bedingungen zu arbeiten. Aus der Kombination von Flexibilität bei den Enzymeigenschaften mit einem schnellen Verfahren, sie zu erzeugen, ist ein neues Paradigma bei der Entwicklung biokatalytischer Prozesse entstanden.

In diesem Aufsatz werden wir einige der Fortschritte bei der Technologie zur Enzymverbesserung beschreiben und dann einige Beispiele der Biokatalyse, den Stand der Technik und das künftige Potential einer verbesserten Biokatalyse diskutieren. Wir konzentrieren uns hauptsächlich auf hydrolytische und oxidative Enzyme. Auf die sehr erfolgreiche Anwendung anderer Enzymklassen werden wir nicht eingehen. Diese Biokatalysatoren sind aber ebenfalls wichtige Untersuchungsobjekte für die Verbesserung durch gerichtete Evolution.

## 2. Genetische Ansätze zur Verbesserung der Biokatalyse

All die wunderbaren komplexen Strukturen und Sequenzen, mit denen die Natur uns versorgt hat, entwickelten sich nach einem einzigen Mechanismus, der *natürlichen Evolution*. Die natürliche Evolution hat allerdings solche Enzyme selektiert, die für das Überleben eines Organismus in seiner natürlichen Umgebung am besten geeignet sind. Doch so extrem diese natürliche Umwelt auch sein mag, das Enzym ist



Nach einem Studienabschluss in Mikrobiologie und Chemie an der University of Reading arbeitete Keith Powell im Rahmen seiner Promotion an genetischen Untersuchungen der Hämsynthese, wechselte dann zu Glaxo und arbeitete dort an der Verbesserung der Ausbeute der Vitamin-B12-Herstellung. Anschließend befasste er sich an der University of Newcastle mit DNA-Reparaturmechanismen. Später beschäftigte er sich bei ICI mit der Entwicklung des genetischen Systems für *Methylophilus methylotrophus*, den Organismus zur Herstellung von Single-Cell-Protein. Nachdem er die Synthese von Biopolymeren und verschiedenen Enzymen bearbeitet hatte, wechselte er zu ICI-Plant-Protection, einer Firma, die biologische Methoden für den Pflanzenschutz entwickelt. Auf Dauer konnte er sich von der Chemie allerdings nicht fernhalten und wechselte daher zu Zeneca Agrochemicals, um dort neue chemische Wirkstoffe zu suchen, und leitete später Arbeitsgruppen in der Biotechnologie, in der Umweltforschung und sogar im Patentwesen. Der Reiz der Biokatalyse führte ihn 1999 zu Maxygen, wo er gegenwärtig als vice-president für Chemicals and Applied Technology arbeitet.

wahrscheinlich nicht ideal für ein chemisches Verfahren. Enzyme wurden über viele Jahre erfolgreich durch Mutation und Selektion verbessert, doch weil dieser Prozess so langwierig ist, war es nicht möglich, in den kurzen – für Prozesschemiker – vertretbaren Zeiträumen Katalysatoren mit neuen Eigenschaften zu entwickeln. Bei dieser Technologie hat es viele Fortschritte gegeben und in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel sind die neu entstandenen biokatalytischen Verfahren beschrieben.<sup>[4]</sup>

Zu den bestehenden Verfahren zur Verbesserung einzelner Proteine oder Teile davon gehören Punktmutagenese aufgrund von Modellierungen, Kassettenmutagenese mit Bibliotheken (darunter zufällige, gerichtete, sättigende Mutagene und Codon-basierte Kassettenmutagenese) sowie zufallsbedingte Punktmutagenese (z.B. fehlerhafte PCR, Einsatz von Mutatorstämmen oder UV- und chemische Mutagene), durch die (teilweise) zufällig Mutationen in eine ausgewählte kleine Region eines Gens oder in das ganze Gen eingeführt werden.

Rationales Design durch Molecular Modeling ist eine ganz andere Herangehensweise, die Molekularbiologen gewählt haben, um die selben Moleküle zu manipulieren. Molecular Modeling kann eine sehr wirkungsvolle Methode sein, stößt aber an Grenzen bei Proteinen, die noch nicht kristallisiert wurden, bei der Wechselwirkung von Proteinen mit ihrer Umgebung oder bei der Vorhersage des Effektes von Mutationen über die Proteinstruktur hinaus. Rationales Design ist ein schöner Ansatz und wird in Zukunft sehr wichtig sein; gegenwärtig aber wird ein Verfahren benötigt, mit dem aus einem Protein ohne vollständiges Verständnis seines Aufbaus und seiner Funktion ein nützlicher Katalysator entwickelt werden kann.

Ein logisches Vorgehen, um die natürlichen Sequenzen weiter anzupassen, ist, die selben bewährten Mechanismen der Evolution anzuwenden, die diese Sequenzen ursprünglich hervorbrachten. Die Grüne Revolution ist ein eindrucksvoller Beleg dafür, dass komplexe Merkmale ganzer Organismen, die mehrere Gene betreffen, optimiert werden können, ohne auf eine Sequenz oder auf Strukturinformationen der zugrunde liegenden Gene zurückzugreifen. Züchtung ist ein konzeptionell einfaches, rekursives Verfahren, das aus der homologen Rekombination von DNA aus verwandten Genomen und der anschließenden Durchmusterung der Nachkommenschaft nach Klonen mit verbesserten Eigenschaften besteht. Wenn ganze Genome vergleichsweise einfach durch klassische Züchtung verbessert werden können, sollte dieses Verfahren durch einige Veränderungen an die Verbesserung der viel kürzeren Sequenzen anzupassen sein, die von den Molekularbiologen genutzt werden.

Das Konzept des schnellen Züchtens subgenomischer Sequenzen durch wiederholte Rekombination und funktionale Selektion haben wir „MolecularBreeding“, eine gerichtete molekulare Evolution, genannt. Im Unterschied zur klassischen Züchtung, die eine bewährte aber langsame Methode zur Optimierung ganzer, typischerweise eukaryotischer Genome ist, besteht MolecularBreeding aus verschiedenen Rekombinations- und Durchmusterungstechniken, die zusammengekommen die schnelle Evolution einzelner Gene, Stoffwechselwege, Episome, Viren oder bakterieller und

eukaryotischer Genome ermöglichen. MolecularBreeding zielt auf eine Generationsdauer von wenigen Tagen ab, die Durchmusterung wird normalerweise in Bakterien oder einzelnen Zellen durchgeführt, und der Selektionsdruck konzentriert sich auf kommerziell relevante Eigenschaften. Molekulare Züchtung entfaltet die größten Vorteile gegenüber rationalem Design, Kassettenmutagenese und zufallsbestimmter Punktmutagenese, wenn die Zielstruktur komplex ist, wie ein Protein aus vielen Untereinheiten mit komplexen Wechselwirkungen, wenn noch keine Strukturinformationen verfügbar sind oder wenn das zentrale Ziel der Optimierung keine Proteinstruktur enthält.<sup>[5]</sup>

Zur molekularen Züchtung gehört die Rekombination multipler DNA-Sequenzen zur Erzeugung einer Bibliothek von Chimären. Eine bevorzugte Form der molekularen Züchtung, auch DNA-Shuffling genannt, verläuft über die zufällige Fragmentierung eines Pools homologer DNA-Sequenzen mit DNase I.<sup>[6]</sup> Nach der Denaturierung der Fragmente hybridisieren homologe Sequenzen aus unterschiedlichen Strängen miteinander und bilden gegenseitig Transkriptionsprimer; dann können die entstehenden Cross-overs durch Kettenverlängerung durch Polymerasen verknüpft werden. Wiederholte Zyklen dieser Neuanordnung von Fragmenten ergeben eine Bibliothek von homolog rekombinierten chimären Sequenzen vollständiger Länge, erzeugt durch eine wechselnde Zahl von Cross-overs. Nach Insertion dieser Bibliothek von DNA-Sequenzen in einen Expressionsvektor und Transformation einer Wirtszelle zur Expression werden die Klone auf neue oder verbesserte Eigenschaften durchsucht. Dabei werden die besten Kombinationen der permutierten Sequenz-Diversität identifiziert. Wie bei der klassischen Züchtung wird eine Mischung der besten Klone dann als Ausgangsmaterial für die nächste Zuchtrunde genutzt (Abbildung 2). Wichtige Variable beim MolecularBreeding sind die Länge der durchmischten DNA, der Grad der DNA-Homologie, die Qualität und die Konservierung der Sequenz-Diversität (natürliche, nachgewiesene Diversität gegen zufällige Punktmutationen), die Zahl der Cross-overs (bestimmt durch die Fragmentgröße) und die Zahl und das molare Verhältnis der Elternstrände. Daneben sind auch

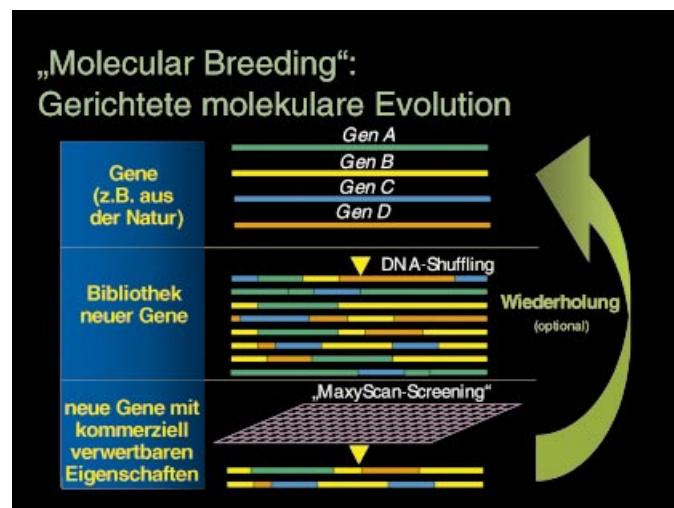


Abbildung 2. Der gerichtete molekulare Evolutionsprozess beim „Molecular Breeding“.

einige andere Vorgehensweisen für In-vitro- und In-vivo-Rekombinationen entwickelt worden.

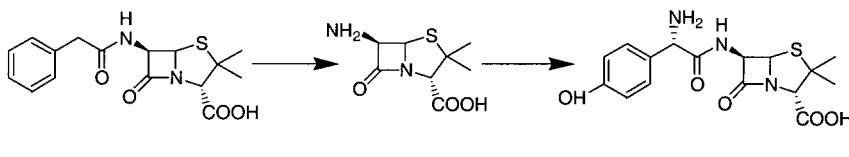
MolecularBreeding wurde bereits auf eine Reihe von Enzymen zur Verbesserung von Substratselektivität, katalytischer Effektivität, Stabilität, pH-Optimum und Aktivität unter verschiedenen physikalischen und chemischen Bedingungen angewendet.

Wir glauben, dass die gerichtete Evolution der Schlüssel ist, um das Potential der Biokatalyse in naher Zukunft zu erschließen. In den nächsten Kapiteln werden eine Reihe wichtiger chemischer Reaktionen beschrieben, die bereits jetzt von der Biokatalyse profitieren, und solche, die als Ergebnis gerichteter Evolution schon bald zur Anwendung gelangen können.

### 3. Der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren

#### 3.1. Acylierungsreaktionen

Die Acylierungsschemie ist ein wichtiger Bestandteil der Synthese zahlreicher antibakterieller, antifungischer und niedermolekularer Pharmazeutika. Trotz der Unempfindlichkeit der Acylierung spielen Biokatalysatoren eine wichtige Rolle bei der Synthese und Hydrolyse vieler kommerzieller Acylverbindungen. Historisch gesehen haben die Penicillinacylasen (Penicillin-Amidohydrolase E.C. 3.5.1.11) wegen ihres Einsatzes bei der Herstellung semisynthetischer Penicilline und Cephalosporine viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Die natürlichen Acyl-Seitenketten von Penicillin G **1**, Penicillin V und Cephalosporin C werden hydrolytisch entfernt und das zurückbleibende Grundgerüst wird zu einer Vielzahl kommerzieller Derivate wie Amoxicillin **3**, Carbenicillin, Piperacillin, Cephalexin, Cefaclor oder Cefotaxim reacyliert (Schema 1). Mit diesen Verbindungen erzielt die Industrie gegenwärtig Umsätze von mehr als einer Milliarde US-\$ pro Jahr.



Schema 1. Penicillinacylase-katalysierte Reaktionen.

Die natürlichen Seitenketten von Penicillin G, Penicillin V und Cephalosporin C sind Phenylacetyl-, Phenoxyacetyl- und Aminoadipylgruppen. Wenn sie hydrolytisch abgespalten werden, bleiben 6-Aminopenicillansäure (6-APA) und 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) als zentrale Bausteine für mögliche Modifizierungen zurück. Die kommerzielle Hydrolyse des natürlichen aromatischen Penicillins, ursprünglich ein ineffizienter dreistufiger Prozess in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei  $-40^\circ\text{C}$ , wird inzwischen in einer einstufigen enzymatischen Reaktion mit Penicillin G-Acylase in Wasser bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Eine effiziente Cephalosporin C-Acylase wurde bislang noch nicht beschrieben; es wurden allerdings andere

Verfahren für eine biokatalytische Produktion der Cephem-Grundkörper, 7-ACA und 7-Aminodeacetoxycephalosporansäure (7-ADCA), entwickelt.

Die Penicillinacylasen katalysieren die Addition und die Hydrolyse der Acyl-Seitenkette. Da die Penicillin G-Acylase spezifisch für die Phenylacetyl-Seitenkette von Penicillin G ist, kann sie für die enzymatische Acylierung von 6-APA und 7-ADCA mit verschiedenen Acyldonoren nicht genutzt werden. Ein weiterentwickeltes Enzym mit einer breiten Substratspezifität für solche Donoren könnte einen biokatalytischen Weg zu den halbsynthetischen  $\beta$ -Lactamen eröffnen. Außer der erweiterten Substratspezifität sind auch größere spezifische Aktivität, veränderte pH- und Temperatuoptima und verbesserte Gesamtstabilität erwünschte Merkmale für diese Enzyme. Vor allem eine Aktivität bei niedrigem pH-Wert wäre wichtig, weil unter diesen Bedingungen die Acylierung gegenüber der Hydrolyse bevorzugt abläuft.

Bei den Herstellungsverfahren für halbsynthetische  $\beta$ -Lactame werden die konkurrierenden Acylierungen und Hydrolysen entweder thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert. In einem thermodynamisch kontrollierten Prozess wird das Reaktionsgleichgewicht durch Einstellung von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und Lösungsmittelzusammensetzung bestimmt. Enzymvarianten mit optimaler Aktivität unter den Bedingungen, die thermodynamisch am meisten bevorzugt sind,<sup>[7]</sup> sollten das effizienteste Verfahren begünstigen. In kinetisch kontrollierten Reaktionen wird das Substrat ins Produkt umgewandelt, bevor das Gleichgewicht erreicht ist. Um herausragende Produktausbeuten zu erhalten, benötigt man Enzymvarianten mit optimalen kinetischen Konstanten für das Substrat.

Durch rationales Protein-Engineering der Penicillinacylasen von *Kluyvera citrophila*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas* konnte man Einblicke in die Funktion<sup>[8–11]</sup> und den Reifungsprozess dieses Enzyms<sup>[11, 12]</sup> gewinnen. Mit einem hypermutagenen *E.-coli*-Stamm wurde die Substratspezifität der *K.-citrophila*-Acylase erweitert.<sup>[13]</sup> Ishii et al. verbesserten

durch ortsspezifische Mutagenese die Aktivität einer Cephalosporin C-Acylase aus *Pseudomonas*, wobei sie sich auf Versuchsdaten von chemischen Modifikationsexperimenten stützten<sup>[14]</sup>. Dabei ergaben sich kleine Verbesserungen der enzymatischen Aktivität.

Die meisten industriell eingesetzten Enzyme werden in heterologen Organismen produziert. Dies ist bei Acylasen kein triviales Verfahren, weil die meisten Acylasen posttranslational modifiziert werden. In frühen ortsspezifischen Mutagenesexperimenten konnten einige der kritischen Aminosäurereste für diese Modifikationen identifiziert werden.<sup>[11, 12]</sup> Anschließend wurden Wirt-Vektor-Systeme für eine verbesserte Acylaseproduktion entwickelt, diese jedoch verursachten die Bildung von Einschlusskörpern.<sup>[15]</sup> Während Probleme bei der Transkription und Translation rational angegangen werden können,<sup>[16]</sup> muss man davon ausgehen, dass die Expression fremder Gene die Lebensfähigkeit des Wirts und die Qualität des exprimierten Proteins erheblich beeinträchtigen kann. Gerichtete Evolution und die Suche nach

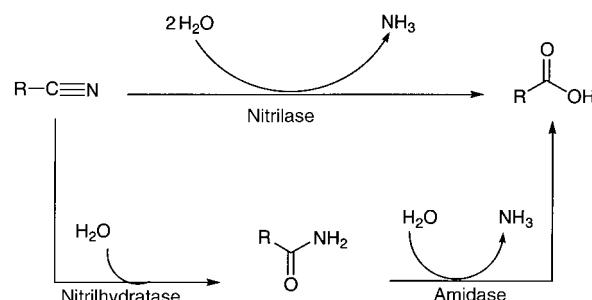
Zellen, die große Mengen des gewünschten Katalysators produzieren, sind einfache Mittel, um die komplexe Wechselwirkung zwischen dem Zielprotein und der Wirtsumgebung zu berücksichtigen. So wurde mit DNA-Shuffling beispielsweise die Produktion rekombinanter Proteins durch Verbesserung der Löslichkeit erhöht.<sup>[17]</sup>

Acylasen wurden auch für die Deacylierung von Naturstoffen beschrieben. In der Patentschrift US 6146872 wird die Isolierung von Bakterienstämmen beschrieben, die Acylasen für die Hydrolyse der Seitenkette eines cyclischen Lipopeptids mit antifungischer Aktivität produzieren.<sup>[18]</sup> Andere Beispiele sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Ebenso wie bei den  $\beta$ -Lactamen kann man auch hier erwarten, dass mit der Identifikation immer neuer biologisch aktiver Naturstoffe der Bedarf an Acylasen steigt, die die bestehenden Amidbindungen hydrolysieren und die Acylie rung zur Herstellung semisynthetischer Derivate katalysieren. Wegen der erheblichen Investitionskosten wird die Entwicklung industrieller Verfahren für diese neuen Verbindungen nur erfolgreich sein, wenn die modifizierenden Enzyme schnell verfügbar sind. Wir erwarten, dass das DNA-Shuffling eine wichtige Rolle bei der Kommerzialisierung dieser neuen bioaktiven Moleküle spielen wird.

### 3.2. Nitril-Konversionen

Nitrile sind chemische Bausteine mit großer Bedeutung für Syntheseverfahren, weil sie sich einfach herstellen lassen und in nützliche Amide und Carbonsäuren umgewandelt werden können. Die dazu erforderlichen Hydrolysen laufen bei hohen Temperaturen und in Gegenwart starker Säuren oder Basen ab. Enzymatisch ist die Umwandlung eines Nitrils in eine Carbonsäure in einem Schritt möglich: Durch eine Nitrilase werden zwei Mol Wasser angelagert und ein Mol Ammoniak freigesetzt. Alternativ ist auch ein zweistufiges Verfahren denkbar, in dem durch aufeinander folgende Einwirkung einer Nitrilhydratase zunächst ein Amid entsteht, das anschließend durch eine Amidase zur Carbonsäure hydrolysiert wird (Schema 2). Die Industrie hat ein starkes Interesse an der enzymatischen Umsetzung von Nitrilen, da die milden Reaktionsbedingungen, unter denen andere im Molekül vorhandene labile reaktive Gruppen nicht angegriffen werden, sehr attraktiv sind. Außerdem eröffnen enantioselektive und/oder regioselektive nitrilhydrolysierende Enzy-



Schema 2. Zwei Reaktionswege der enzymatischen Umwandlung von Nitrilen in Carbonsäuren.

me Synthesemöglichkeiten, die mit konventionellen Katalysatoren nur schwierig oder gar nicht zur Verfügung stehen.

Die erste und erfolgreichste industrielle Anwendung nitrilhydrolysierender Enzyme in kommerziellem Maßstab ist das Nitro-Verfahren zur Herstellung von Acrylamid aus Acrylnitril.<sup>[19]</sup> In diesem Verfahren, in dem ursprünglich ganze Zellen von *Pseudomonas chlororaphis* B23 oder *Rhodococcus* sp. N-774 eingesetzt wurden, verwendet man inzwischen das zehnmal produktivere *Rhodococcus rhodochrous* J1. Dieser Stamm bildet zwei verschiedene Nitrilhydratassen, außerdem eine Nitrilase und eine Amidase. Die Reaktion läuft bei 2–4 °C ab, wo die unerwünschte Nebenreaktion zur Acrylsäure kaum nachweisbar ist, und der Umsatz der Reaktion etwa 99.7% beträgt mit einer Produktivität > 7 kg Acrylamid pro g Zellen. Der Stamm toleriert Acrylamidkonzentrationen bis zu 50%, doch werden die Zellen nur für einen Reaktionsansatz verwendet. Gegenwärtig werden so etwa 40000 t Acrylamid pro Jahr gewonnen. *Rhodococcus rhodochrous* J1 wird auch von Lonza in dem kommerziellen Verfahren zur Umwandlung von 3-Cyanopyridin zu Nicotinamid, einem Vitamin, das als Ergänzungsmittel für Tiernahrung verwendet wird, genutzt.<sup>[20]</sup> Jährlich werden so etwa 3000 Tonnen Nicotinamid mit immobilisierten Zellen hergestellt, wobei keine Nicotinsäure, ein verbreitetes Nebenprodukt der chemischen Synthese von Nicotinamid, entsteht.

In der Literatur ist die Isolierung und Verwendung nitrilhydrolysierender Enzyme beschrieben, wobei vor allem ein Einsatz bei der Produktion spezifischer chiraler synthetischer Zwischenprodukte erwartet wird (Tabelle 3). Allerdings gibt es unseres Wissens bisher keine industriellen Verfahren, in denen diese Enzyme eingesetzt werden. Es

Tabelle 2. Beispiele für die industrielle Anwendung von Acylasen aus der Patentliteratur.

Patent	Titel	Lit.
US5316944	Enzymatic resolution of a racemic mixture of gamma-amino acids using penicillin acylase	[85]
US5068189	4"-O-Isovaleryl acylase for the production of novel antibiotic compounds	[86]
US4877734	$\alpha$ -Acetyl amino cinnamic acid acylase for enzymatic conversions which run via the intermediary stage $\alpha$ -imino- $\beta$ -phenylpropionic acid or phenylpyruvic acid	[87]
US4699879	Streptomyces or Streptoverticillium acylase for 3-(3,4-dihydroxy-phenyl)serine manufacture	[88]
US5916774	D-Aminoacylase from Amycolatopsis for producing D-amino acids	[89]
US5733754	Acylase from <i>Alcaligenes denitrificans</i> for preparing (S)-pipecolic acid	[90]
US5637768	Penicillin acylase for making (2S,5S)-5-fluoromethylornithine	[91]
US5212069	<i>N</i> -Acetyl-2,3-didehydroleucine acylase for the preparation of D- or L-tryptophyl glycine, D- or L-tryptophyl-D-methionine or L-tryptophyl-D-cysteine	[92]
US5219741	<i>N</i> -Acyl-L-proline acylase for making L-proline, L-pipecolic acid and L-thiazolidine-4-carboxylic acid	[93]
US5057607	Penicillin G amidase(acylase) for enantiomerically selective acylation of racemic 3-amino azetidinone intermediates	[94]

Tabelle 3. Patente auf Isolierung und Einsatz nitrilhydrolysierender Enzyme.

Patent	Titel	Lit.
US05811286	Nucleic acid fragments encoding stereospecific nitrile hydratase and amidase enzymes and recombinant organisms expressing those enzymes useful for the production of chiral amides and acids	[95]
US06133421	Polypeptides and polypeptide subunits of a stereospecific nitrile hydratase enzyme	[96]
US05888785	Method for using hydratase or a hydratase-amidase fusion for stereospecifically bioconverting certain racemic nitriles to the corresponding enantiomeric R- or S-amide or S-carboxylic acid	[97]
US05814497	Enzymatic hydrolysis of racemic $\alpha$ -substituted 4-methylthiobutyronitriles using a nitrilase from <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Gordona terrae</i> or <i>Rhodococcus</i> sp.	[98]
US05443973	Method of producing $\alpha$ -hydroxyisobutyramide from acetone cyanohydrin by nitrile hydratase	[99]
JP08131188	Production of optically active alpha-hydroxyacid or alpha-hydroxyamide	[100]
US05206158	Process for the preparation of difluorobenzamide	[101]

wurden enantioselektive Enzyme beschrieben, die bevorzugt entweder die D- oder die L-Form vieler nitrilhaltiger Substrate hydrolysierten.<sup>[21–29]</sup> Im Allgemeinen sind die Nitrilasen enantioselektiver als die Nitrilhydratasen. Die Enantioselektivität ist jedoch stark substratabhängig. Im Falle der Nitrilhydratasen werden diese unspezifischen Enzyme oft gemeinsam mit hohenantioselektiven Amidasen exprimiert.

Obwohl nitrilhydrolysierende Enzyme verlockend milde Reaktionsbedingungen ermöglichen, wurde ihr Routineeinsatz in der Industrie durch andere Faktoren eingeschränkt. Die bislang untersuchten Enzyme haben Halbwertszeiten zwischen 7,5 Minuten bei einem Enzym aus *Corynebacterium* sp. bei 45 °C und 58 Minuten bei der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 bei 60 °C.<sup>[30–32]</sup> Bei der Herstellung von Acrylamid und von Nicotinamid müssen ganze *Rhodococcus*-Zellen eingesetzt werden, u. a. weil die gereinigte Nitrilhydratase zu instabil ist. Obwohl Systeme mit ganzen Zellen ohne Enzymreinigung auskommen, sind sie meist unerwünscht, weil Verunreinigungen durch Nebenreaktionen von anderen Enzymen in der Zelle entstehen können. Gegenwärtig gibt es keine kommerzielle Quelle für eine gereinigte Nitrilase oder Nitrilhydratase. Novo verkaufte eine Zeitlang eine Kombination von Nitrilhydratase plus Amidase aus *Rhodococcus* sp. CH5, doch dieses Produkt ist inzwischen nicht mehr erhältlich. Bei Reaktionen, in denen Regio- oder Stereoselektivität gewünscht ist, hängt der Umsatz und sogar die absolute Konfiguration des Endproduktes erheblich vom Substrat ab. Es ist daher schwierig, vorherzusagen, ob bzw. welche der bekannten Nitrilhydratasen ein bestimmtes Substrat effizient zum gewünschten Produkt umsetzt.

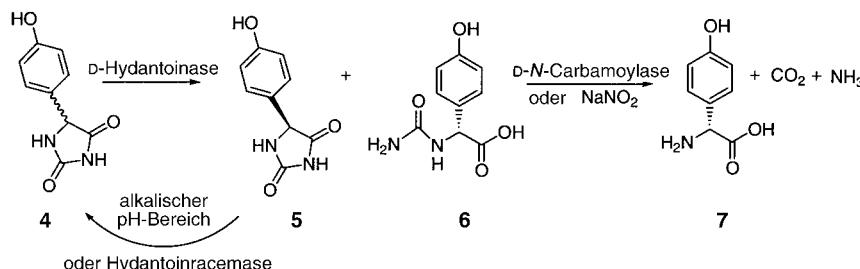
Erfolgreiche Versuche, die Charakteristika der nitrilhydrolysierenden Enzyme durch gerichtete Evolution zu verbessern oder an industrielle Bedürfnisse anzupassen, sind bisher nicht bekannt. Mit klassischer Mutagenese und Screening wurden Eigenschaften der ursprünglichen acrylamidproduzierenden Stämme verbessert, sodass sie weniger Schleim bilden, einfacher abzentrifugieren sind und weniger durch das Substrat inhibiert werden,<sup>[33]</sup> doch diese Verbesserungen wurden weitgehend durch die Isolierung des *Rhodococcus-rhodochrous*-Stammes J1 übertragen. Mit gerichteter Evolution können weiterhin Enzyme mit verbesserter Substratspezifität, Stabilität und Aktivität bei einer Reihe von physikalischen und che-

mischen Bedingungen erzeugt werden;<sup>[34]</sup> so lassen sich vielleicht auch stabile nitrilhydrolysierende Enzyme entwickeln, die unter den optimalen Verfahrensbedingungen aktiv sind und die regio- oder stereoselektiv kommerzielle nitrilhaltige Substrate umsetzen. Solche Enzyme wären eine wertvolle Ergänzung des biokatalytischen Arsenals, das dem präparativ arbeitenden Chemiker gegenwärtig zur Verfügung steht.

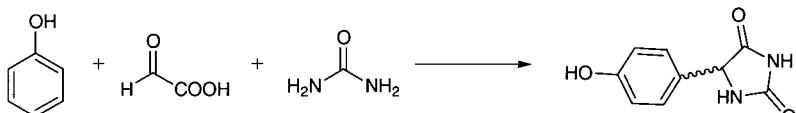
### 3.3. Hydantoinasen

Hydantoinasen werden industriell bei der Herstellung nichtnatürlicher Aminosäuren in einem Maßstab von vielen tausend Tonnen pro Jahr gebraucht. Die wichtigsten Prozesse sind die Herstellung von D-Phenylglycin und D-p-Hydroxyphenylglycin, die wichtige Bausteine für halbsynthetische  $\beta$ -Lactame wie Ampicillin, Amoxicillin und Cephalexin sind.<sup>[35]</sup> Sie werden auch zur Produktion von D-Tryptophan, D-Phenylalanin, D-Valin, D-Alanin, D-Methionin und etlichen substituierten Aminosäuren verwendet.<sup>[36]</sup> Hydantoinasen katalysieren die stereospezifische Hydrolyse von 5-monosubstituierten Hydantoinen **4** zu N-Carbamoyl- $\alpha$ -aminosäuren **6**. Die N-Carbamoyl- $\alpha$ -aminosäuren werden dann entweder in Gegenwart einer Carbamoylase (im Recordati-Verfahren) oder in einer Lösung von Natriumnitrit (in einem Verfahren, das von Kanegafuchi entwickelt wurde) zu **7**, Kohlendioxid und Ammoniak hydrolysiert (Schema 3).<sup>[37]</sup> Die meisten bis heute gefundenen Hydantoinasen sind spezifisch für die D-Form des Hydantoin.

Racemische Hydantoin **8** werden im Allgemeinen in einer Mannich-Kondensation aus Phenolderivaten, Glyoxylsäure und Harnstoff synthetisiert (Schema 4). Viele 5-substituierte Hydantoinen racemisieren leicht auf Grund des aciden Wasserstoffs über eine Keto-Enol-Tautomerie; dadurch ist eine



Schema 3. Enantioselektive Herstellung von **7** aus **4** mit einer D-selektiven Hydantoinase und einer D-selektiven N-Carbamoylase.



Schema 4. Mannich-Kondensation zur Herstellung von racemischem 8.

dynamische kinetische Auflösung und eine 100-prozentige theoretische Ausbeute des gewünschten Produktes möglich. In der Praxis hängt die Racemisierungsgeschwindigkeit allerdings stark von dem Substituenten an C5 ab. So liegt zum Beispiel  $\tau_{1/2}$  für die Phenylhydantoin-Racemisierung bei 0.3 Stunden, während sie bei Isopropylhydantoin 56 Stunden beträgt.<sup>[38]</sup> Außerdem sind viele Hydantoinen schlecht löslich oder sogar unlöslich, sodass das Substrat in der Praxis oft als Suspension dem Reaktionsgemisch zugegeben wird und die Auflösung des Substrates zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden kann. Die momentan kommerziell erhältlichen Hydantoinasen benötigen  $Mn^{2+}$  als Cofaktor und werden irreversibel inaktiviert, wenn das  $Mn^{2+}$  oxidiert wird. Daher muss die Reaktion anaerob durchgeführt werden, sodass bei jedem neuen Zyklus der Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt werden muss. Obwohl also native Hydantoinasen schon jetzt kommerziell genutzt werden, sollte wegen der Enzym- und Substrateigenschaften das Verfahren noch verbessert werden, wobei die gerichtete Evolution hilfreich wäre. Ein Katalysator, der bei erhöhter Temperatur aktiv ist, wäre für ein Verfahren tauglich, bei dem das Substrat besser löslich wäre und die Racemisierung schneller ablaufen würde. Eine Weiterentwicklung des Enzyms zur Entfernung oder Veränderung des  $Mn^{2+}$ -Bedarfs würde eine anaerobe Prozessführung erübrigen.

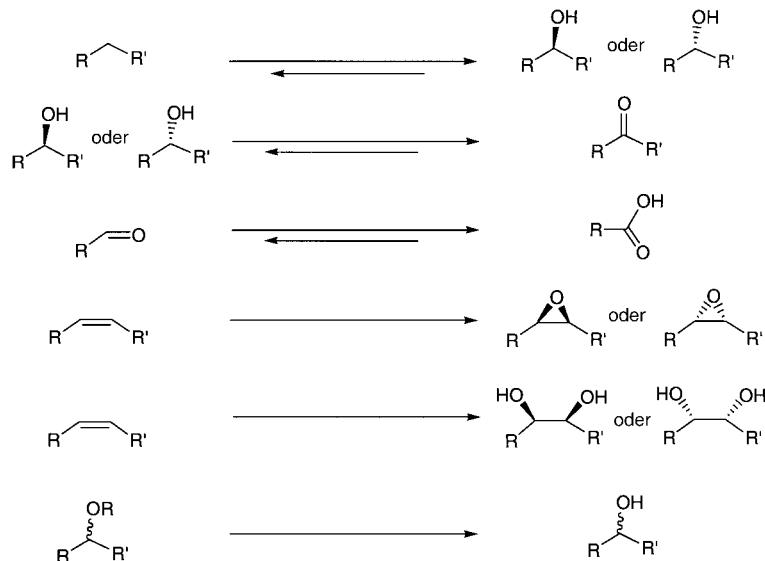
Im Unterschied zu vielen anderen industriell viel versprechenden Enzymen wurden die Hydantoinasen intensiv mit Methoden der gerichteten Evolution untersucht. Frühe Mutageneseansätze wurden nach sehr komplizierten Strategien durchgeführt. Hybride Enzyme, die aus der aminoterminalen Hälfte der *Bacillus stearothermophilus*-Hydantoinase und der carboxyterminalen Hälfte der *Bacillus thermocatenulatus*-Hydantoinase zusammengefügt wurden, zeigten im Vergleich zu beiden Eltern-Enzymen veränderte Substratspezifitäten.<sup>[39]</sup> Kim et al. fusionierten eine Hydantoinase und eine Carbamoylase, um so die bei traditionellen Coexpressionssystemen unvermeidliche ungleiche Expressionsstärke, die Bildung von Einschlusskörpern und Probleme beim Substrattransport zu umgehen.<sup>[40]</sup> Das entstandene Fusionsenzym aus *N*-Carbamoylase und *D*-Hydantoinase war ebenso aktiv und katalytisch effizient wie die coexprimierten Wildtypenzyme. Es war allerdings auf Grund seiner ausgeprägten Proteolyseempfindlichkeit instabil, weswegen versucht wurde, die Stabilität des Fusionsenzymes durch DNA-Shuffling zu verbessern. Dabei entstand ein Enzym, das im Vergleich zum ursprünglichen Fusionsprotein einen sechsfach höheren Durchsatz bei der Hydantoinumwandlung zur *D*-Aminosäure zeigte.<sup>[41]</sup> Ein direkter Vergleich der Leistungsfähigkeit des

weiterentwickelten Fusionsenzymes mit dem besten Co-Expressionssystem wurde allerdings noch nicht veröffentlicht. In einem überzeugenden Beispiel für den Nutzen der gerichteten molekularen Evolution gelang es schließlich May et al., die starre Stereoselektivität der bekannten Hydantoinasen, eines der Schlüsselprobleme bei der Aminosäureproduktion aus Hydantoinen, zu überwinden. Sie nutzten Gen-Shuffling, um die Stereospezifität einer *Arthrobacter*-Hydantoinase vom *D*- zum *L*-Enantiomer von Methionin-Hydantoin umzukehren.<sup>[3]</sup>

Roche setzt dieses weiterentwickelte Enzym inzwischen in einem industriellen Verfahren zur Produktion von *L*-Methionin ein. Bislang gibt es noch keine Berichte über Versuche, das Temperaturprofil der Aktivität zu ändern oder die Cofaktorabhängigkeit der Hydantoinasen zu verringern oder zu umgehen, obwohl diese beiden Eigenschaften sich direkt in Verfahrensverbesserungen überführen lassen könnten.

### 3.4. Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen (EC1) katalysieren eine ungeheure Vielzahl chemo-, stereo- und regioselektiver Reaktionen (Schema 5) und werden schon jetzt für die Produktion zahlreicher pharmazeutischer und chemischer Produkte genutzt (Tabelle 4). Sie werden im Allgemeinen in Fermentationsprozessen oder in Biotransformationen mit ganzen Zellen eingesetzt, wobei letzteres wie bereits oben erläutert unvorteilhaft sein



Schema 5. Oxidase- und Oxidoreduktasekatalysierte Reaktionen.

Tabelle 4. Beispiele für biokatalytische Verfahren auf der Basis von Oxidoreduktasen.

Reaktionprodukt	Enzym	Lit.
L- <i>tert</i> -Leucin	Leucinedehydrogenase	[102]
6-Hydroxynicotinsäure	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	[103]
5-Methylpyrazin-2-carbonsäure	<i>Pseudomonas putida</i>	[103]
( <i>R</i> )-2-(Hydroxyphenoxy)-propionsäure	<i>Beauvaria bassiana</i>	[103]
Steroide	zahlreiche	[104]

kann. Um das industrielle Potential der Oxidoreduktasen besser nutzen zu können, wären Verfahren mit isolierten (bevorzugt immobilisierten) Enzymen günstiger. Oxidoreduktasen sind allerdings unpraktisch für einen In-vitro-Gebrauch, da sie teure Cofaktoren benötigen (z. B. NAD(H) oder NADP(H)) und oft membranassoziiert sind. Wie bei den meisten Enzymen würden Verbesserungen der Stabilität, der Wechselzahl und der Spezifität viele Anwendungen begünstigen.

Verschiedene Versuche wurden gemacht, um diese Herausforderungen zu meistern, so wurden z. B. Systeme zur NAD(P)H-Regeneration entwickelt, um aus dem Substrat NAD(P)H in der Reaktion einen (katalytischen) Cofaktor zu machen. Verfahrensbezogene Problemlösungen wurden in chemischen und elektrochemischen Regenerationsmethoden gesucht, während wirtszellbezogene Lösungen die Überproduktion NAD(P)H-regenerierender Enzyme zum Ziel hatten.<sup>[42]</sup> Besser an die Verwendung von gereinigten oder immobilisierten Enzymen angepasst sind Genfusionen zwischen einem interessierenden Gen und einem Gen, das für einen Redoxpartner codiert.<sup>[43,44]</sup> Obwohl diese NAD(P)H-regenerierenden Systeme alle sehr wichtige Fortschritte darstellen, ist der Bedarf von NAD(P)H in mehr als katalytischen Konzentrationen noch immer ein schwerwiegendes Hemmnis für zellfreie Verfahren.

Die gerichtete Evolution erweckt Hoffnungen, dass das Problem des NAD(P)H-Bedarfs lösbar ist. Arnold et al. stellten erfolgreich Mutanten von bakteriellen Cytochrom-P450-Enzymen her, die die Hydroxylierung von Naphthol ca. 20-mal besser katalysieren als der Wildtyp und dabei einen NAD(P)H-unabhängigen Wasserstoffperoxid-Stoffwechsel-Nebenweg nutzen.<sup>[45]</sup> Sie entwickelten auch einen digitalen Hochdurchsatztest, in dem Oxygenasen mit einer Spezifität für Arene sichtbar gemacht werden: Die hydroxylierten Arene werden durch Meerrettich-Peroxidase oxidativ zu fluoreszierenden Verbindungen gekuppelt.<sup>[46]</sup> Unterschiedliche Hydroxyierungsmuster führen zu Verbindungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren. Mit diesem System konnten Arnold et al. weiterentwickelte Oxidasen mit neuer Hydroxyierungsspezifität identifizieren. Solche Suchverfahren sind für die Entwicklung von Mono- und Dioxygenasen als nützliche Biokatalysatoren für die Herstellung hydroxylierter aromatischer Verbindungen geeignet.

Von den Oxidoreduktasen sind die ubiquitären Cytochrom-P-450-Enzyme, von denen bereits mehrere Hundert charakterisiert sind, besonders interessant. In Struktur- und Mutationsuntersuchungen wurde gezeigt, dass schon kleine Veränderungen im P-450-Protein zu Veränderungen bei der Chemo-, Regio- und Stereoselektivität führen können, wie in einem Übersichtsartikel<sup>[47]</sup> von Holland dargestellt. Durch die gerichtete Evolution dieser Enzyme konnten auch Biokatalysatoren für die selektive Oxidation vieler interessanter Substrate hergestellt werden.

Beispielsweise wurde mit gerichteter Evolution eine Indolhydroxylase aus Cytochrom P450 BM-3, einer nicht substratspezifischen Fettsäurehydroxylase, entwickelt.<sup>[48]</sup> Arnold et al. verbesserten mit gerichteter Evolution auch die Löslichkeit eines Säger-Cytochrom-P450, das normalerweise membranassoziiert ist.<sup>[49]</sup> Hybride Cytochrom-P450-Gene

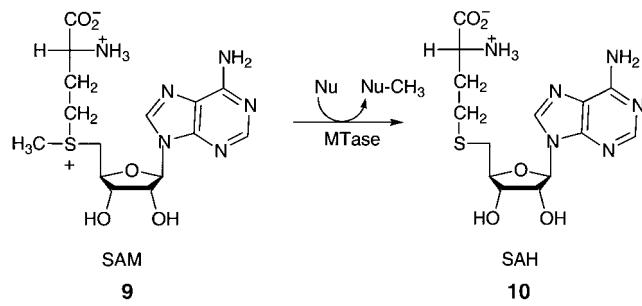
wurden aus membranassoziiertem humanem Cytochrom P450 und der Häm-Domäne eines bakteriellen Cytochrom P450 mit „SHIPREC“ (Sequenzhomologie-unabhängige Proteinrekonstruktion - „sequence homology-independent protein recombination“) erzeugt. Beim Screening auf die Aktivität des Säugergens wurden zwei funktionelle Hybridproteine identifiziert, die im bakteriellen System löslicher waren.

Auch andere Oxidoreduktasen wurden mit dieser Methode verändert, so wurde z. B. die Peroxidaseaktivität vom Herzmyoglobin des Pferdes gesteigert, wodurch ein direktes Hochdurchsatz-Screening von peroxidaseproduzierenden *E.-coli*-Stämmen möglich wurde.<sup>[50]</sup> Eine hitzestabilere Catechol-2,3-Dioxygenase wurde durch DNA-Shuffling zwischen der *nahH* und der *xylE* 2,3-Dioxygenase erzeugt.<sup>[51, 52]</sup> Mit einer Kombination aus rationalen und evolutionären Methoden verbesserten Cherry et al. die oxidative und thermische Stabilität einer Hämperoxidase als Waschmittelzusatz.<sup>[53]</sup> Meerrettich-Peroxidase wurde ebenfalls hinsichtlich einer besseren Expression in *E. coli* in löslicher Form weiterentwickelt.<sup>[54]</sup> Möglicherweise ist die Stabilität von Cytochrom P450 und anderen Häm-Enzymen durch die Instabilität der Porphyrin-Gruppe unter oxidierenden Bedingungen begrenzt.<sup>[55]</sup> Daher vermutete man, dass Häm-unabhängige Monooxygenasen, die ähnliche Reaktionen wie die Cytochrome P450 katalysieren, ebenfalls hervorragende Ziele für eine gerichtete Evolution sein könnten.<sup>[56]</sup>

### 3.5. Methylgruppen-Übertragungen

Wir haben einige wichtige chemische Reaktionstypen diskutiert, für die biokatalytische Verfahren geprüft wurden. Andere chemische Reaktionen, die sich für biokatalytische Verfahren eignen könnten, ohne dass dies bereits umfassend untersucht wurde, sind z. B. Methylierungen. Methylierungen sind besonders nützlich, weil die Änderungen durch sie so subtil sind. Normalerweise wird mit Methylhalogeniden wie MeI methyliert. Diese Reaktion ist allerdings ungerichtet, obwohl man eine regioselektive Methylierung erreichen kann, wenn die Reaktivität konkurrierender Nucleophile innerhalb eines Moleküls durch Änderungen beim Lösungsmittel, bei gelösten Zusätzen, durch Variation physikalischer Randbedingungen oder durch selektive Schutzgruppen differenziert werden kann. Die Selektivität ist meist nicht vollständig und das gewünschte Isomer muss gereinigt werden. Ein biokatalytischer Zugang zu regio- und stereospezifischer Methylierung könnte die Ausbeuten stark erhöhen und eine teure Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ersparen.

Bei enzymatischen Methylierungen dient *S*-Adenosylmethionin (SAM, **9**) als Methyldonor. SAM ist das „biologische Äquivalent“ des Methylhalogenids. Die aktive Gruppe von SAM ist ein Methylsulfonium-Kation. Durch einen enzymkatalysierten nucleophilen Angriff auf die Methylgruppe wird *S*-Adenosylhomocystein (SAH **10**) ersetzt (Schema 6). Der Verlust der positiven Ladung am Schwefelatom ist thermodynamisch begünstigt und ist die treibende Kraft für eine vollständige Umsetzung. Für die meisten biologischen Nucleophile ist die biologische Methylierung beschrieben. Anders als chemische Methylierungen sind enzymatische Me-

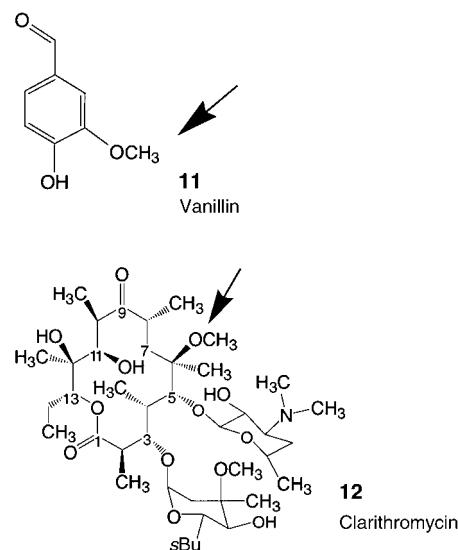


Schema 6. *S*-Adenosylmethionin (SAM) fungiert in enzymkatalysierten Methyltransferreaktionen als Methyldonor. Methyltransferasen (MTasen) katalysieren die Methylierung verschiedenster biologischer Nucleophile.

thylierungen regio- und enantioselektiv, wie man dies von biologischen Katalysatoren erwartet.

Der Nutzen von Methyltransferasen für die Biokatalyse ist begrenzt. SAM ist teuer und Methyltransferasen reagieren notorisch langsam ( $k_{\text{cat}} \approx 1 \text{ s}^{-1}$ ) und sind oft membranassoziiert. In-vitro-Verfahren benötigen stöchiometrische Mengen SAM, da noch keine anderen Methyldonoren oder SAM-regenerierende Systeme beschrieben wurden. Außerdem wären für industrielle Verfahren verbesserte Löslichkeit, Stabilität, Selektivität und katalytische Effizienz wünschenswert. Die Etablierung eines biokatalytischen Methyltransfers, der durch eine maßgeschneiderte Methyltransferase katalysiert wird, ist sehr gut vorstellbar, so erzeugten Trautner et al. chimäre DNA-Methyltransferasen mit Spezifitäten für verschiedene DNA-Sequenz-Kombinationen.<sup>[57]</sup> Methyltransferasen wurden auch im Zusammenhang mit der kombinatorischen Biosynthese diskutiert.<sup>[58]</sup> In der Literatur zitierte Beispiele für die biokatalytische Nutzung von Methyltransferasen sind allerdings schwer zu finden.

In vivo gibt es eine Reihe sinnvoller Ziele für die Anwendung von Methyltransferasen. Bei Naturstoffen übernehmen Methyltransferasen gewöhnlich einen abschließenden Schritt zur Synthese niedermolekularer Antibiotika wie Erythromycin, Tylosin, Rapamycin und Daunomycin.<sup>[59, 60]</sup> So ist beispielsweise die Macrocin-Methyltransferase, die durch das *tylF*-Gen aus *Streptomyces fradiae* codiert wird, geschwindigkeitsbestimmend bei der Produktion des kommerziell erhältlichen Antibioticums Tylosin. Mit zusätzlichen Kopien des *tylF*-Gens wurde die Tylosinausbeute bei Fermentationen von *S. fradiae* gesteigert.<sup>[61]</sup> DNA-Shuffling von *tylF* mit dem Ziel einer besseren katalytischen Aktivität könnte Ausbeute und Produktivität von Tylosinfermentationen weiter verbessern. Li und Frost beschrieben eine Methode zur biokatalytischen Methylierung von Protocatechuat an der 3-Hydroxygruppe durch Catechol-OMTase (COMTase).<sup>[62]</sup> Leider methyliert die COMTase beide Hydroxygruppen (3- und 4-Position) von Protocatechuat. Eine gerichtete Evolution der COMTase zu einer Spezifität für die 3-Position würde einen verbesserten biokatalytischen Reaktionsweg zur Vanilinsäure (Schema 7) eröffnen, deren anschließende Reduk-



Schema 7. Molekulare Zielstrukturen für weiterentwickelte Methyltransferasen. Eine Erythromycin-6-O-methyltransferase würde einen biokatalytischen Reaktionsweg zum Clarithromycin **12** eröffnen. Mit einer Catechol-3-O-methyltransferase könnte man zu natürlichem Vanillin **11** gelangen. Die Pfeile geben die Stelle der gewünschten Methylgruppen-Einführung an.

tion durch eine Aryl-Aldehyd-Reduktase naturidentisches Vanillin **11** ergeben würde.

Besonders erstrebenswert wäre ein Enzym, das die spezifische Methylierung der 6-Hydroxygruppe von Erythromycin A katalysiert. Ein solches Enzyme würde eine einstufige Synthese von Clarithromycin **12** (Schema 7), einem Wirkstoff mit einem Marktvolumen von einer Milliarde Dollar, der gegenwärtig chemisch über sieben Stufen methyliert wird, ermöglichen.<sup>[63]</sup> Methyltransferasen mit einer Spezifität für tertiäre Alkohole sind selten, vielleicht ist das eine Folge der sterischen Hemmung – im Unterschied zu primären oder sekundären Alkoholen. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist EryG, das den tertiären Alkohol des Mycaroserestes von Erythromycin C methyliert.<sup>[59]</sup> So ist die O-Methylierung einer tertiären Hydroxygruppe nicht ohne Vorbild und die Evolution der Erythromycin-6-O-Methyltransferase ist sicherlich erfolgversprechend.

### 3.6. Hydrolytische Enzyme: Lipasen, Esterasen und Proteasen

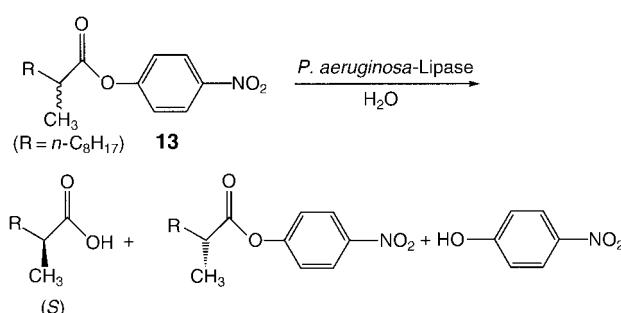
Hydrolytische Enzyme (EC 1) werden mehr als die Enzyme der anderen Enzymklassen als Katalysatoren für organische Synthesen eingesetzt. Hydrolasen katalysieren die selektive Hydrolyse von Estern, Amiden, Halogeniden, Peptiden und Glycosiden. Viele Enzyme werden an Reaktionsbedingungen mit reduziertem Wassergehalt angepasst, unter denen sie die thermodynamisch stärker begünstigten Synthesereaktionen katalysieren. Besonders Lipasen, die normalerweise hydrophobe Verbindungen umsetzen, können in organischen Lösungsmitteln Ester- und Lactonsynthesen katalysieren.<sup>[64, 65]</sup> Zu industriellen hydrolysevermittelten Verfahren gehören die Produktion von Zwischenprodukten für z. B. Pharmazeu-

tika und Pestizide, die Herstellung chiraler Synthone für asymmetrische Synthesen und die Anwendungen in der Lebensmittelindustrie wie die Herstellung von hochfructosehaltigem Sirup, von lactosearmer Milch und von Aspartam. Aktuelle Beispiele sind bereits zusammengestellt und diskutiert worden.<sup>[57, 66, 67]</sup>

Wie die meisten Enzyme sind auch natürliche Hydrolasen nicht generell gute Biokatalysatoren. Zahlreiche Parameter könnten durch gerichtete Evolution verändert werden, um die Wirkung der Enzyme zu verbessern. Hydrolasen wirken in der Natur auf ein breites Substratspektrum, behalten dabei aber paradoxe Weise einen hohen Grad an Chemo-, Regio- und Stereoselektivität bei. Mit gerichteter Evolution lässt sich diese Spezifität an die gewünschten Verfahren anpassen. So wurden Verbesserungen der Substratspezifität,<sup>[68]</sup> der Enantioselektivität,<sup>[1, 69]</sup> der spezifischen Aktivität, der Thermostabilität,<sup>[70–74]</sup> der Lösungsmitteltoleranz,<sup>[70, 75]</sup> der Aktivität über einen weiten pH-Bereich und Kombinationen dieser Eigenschaften<sup>[34]</sup> beschrieben.

### 3.6.1. Lipasen und Esterasen

Lipasen und Esterasen katalysieren beide die Hydrolyse von Estern. Verglichen mit Esterasen bevorzugen Lipasen weniger gut lösliche Ester und haben eine breite Substratspezifität und hohe Enantioselektivität. Lipasen werden vielfach zur Produktion optisch aktiver Alkohole, Säuren, Ester und Lactone bei kinetischer Prozesskontrolle eingesetzt. Solche Anwendungen sind von großer Bedeutung, weil die Industrie im Allgemeinen Verbindungen von einer optischen Reinheit  $\geq 95\%$  benötigt. Daher verbesserten Reetz et al. die Enantioselektivität einer *Pseudomonas-aeruginosa*-Lipase durch gerichtete Evolution.<sup>[69]</sup> Die native Lipase katalysiert die Hydrolyse der racemischen Verbindung **13** mit 2% (s) ee-Wert (Schema 8). In vier Mutagenese- und



Schema 8. Kinetisch gesteuerte Spaltung von **13** durch eine Lipase-katalysierte Hydrolyse.

Screeningzyklen wurde eine Lipase entwickelt, die einen ee-Wert von 81 % erzeugte. In zusätzlichen Runden mit fehlerhafter PCR, verbunden mit erschöpfender Mutagenese, konnte der ee-Wert auf mehr als 90 % gesteigert werden.<sup>[1]</sup> Modellierungen der entwickelten Lipasestruktur ergaben, dass die Aminosäuresubstitutionen möglicherweise eine flexiblere Konformation des Enzyms verursachten. In vergleichbarer Weise steigerten Bornsheuer et al. mit gerichteter Evolution den ee-Wert einer Esterase für die Spaltung von

3-Hydroxyethylestern.<sup>[68, 76, 77]</sup> Eine gesteigerte katalytische Aktivität und Stabilität in Gegenwart organischer Lösungsmittel ist von besonderem Interesse,<sup>[78]</sup> weil diese Bedingungen oft nötig sind, um das Substrat aufzulösen oder die Thermodynamik der Reaktion günstig zu beeinflussen. Aus diesem Grund verbesserten Moore und Arnold die Aktivität einer *Bacillus-subtilis*-Esterase in 15 % DMF durch gerichtete Evolution auf das 150fache.<sup>[79, 80]</sup>

### 3.6.2. Proteasen

Proteasen katalysieren die selektive Hydrolyse von Peptiden, Amiden und Estern nach einem Mechanismus, der dem von Lipasen und Esterasen ähnelt. Sie werden vor allem in der organischen Synthese für die enantioselektive Hydrolyse von  $\alpha$ -Aminosäureestern und Carbonsäureestern genutzt. Wie Esterasen katalysieren sie unter geeigneten Bedingungen auch Transaminierungen, Umesterungen sowie Synthesreaktionen. Kommerzielle Proteasen wie Subtilisin werden im Wesentlichen als Waschmittelzusatz verwendet und sind intensiv zur Verbesserung der Stabilität und Aktivität bei hohem pH-Wert und hoher Temperatur bearbeitet worden. Obwohl bereits seit 30 Jahren Subtilisin rational optimiert wurde, gelang es nun mit DNA-Shuffling von Subtilisin und 25 Homologen, die Aktivität unter verschiedenen chemischen und physikalischen Extrembedingungen eindrucksvoll zu verbessern.<sup>[34]</sup> In anderen Versuchen konnte die spezifische Aktivität von Subtilisin E um das 470fache gesteigert werden.<sup>[81]</sup> Das Temperaturoptimum dieses Enzyms wurde ebenfalls erweitert, und die mittlere Lebensdauer bei 65 °C wurde um den Faktor 200 verlängert.<sup>[82, 83]</sup> Taguchi et al. verbesserten die Aktivität von Subtilisin BPN' bei 10 °C auf das Doppelte<sup>[84]</sup> und zeigten so in einer interessanten Versuchsreihe, dass sich die Aktivität von Enzymen auch bei ziemlich niedrigen Temperaturen verbessern lässt. Mit Sicherheit erweitert die gerichtete Evolution die Optionen der Biokatalyse für die Organische Chemie. Es bleibt zu hoffen, dass die Entwicklung weiterer hydrolytischer Enzymfamilien wie den Dehalogenasen und Epoxidhydrolasen auch zu neuen Anwendungen in der kommerziellen Biokatalyse führen wird.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Wir stehen am Beginn einer neuen Ära der industriellen Biokatalyse. Die Fähigkeit, Eigenschaften von Enzymen zu verbessern, eröffnet die Möglichkeit, regio- und stereospezifische Biokatalysen mit Enzymen, die für diesen Zweck selektiert wurden, zu nutzen. In der Zukunft wird das Potential der Zusammenarbeit zwischen Chemikern und Biologen, die diese Katalysatoren entwickeln und einführen, deutlich werden. Bibliotheken von Enzymen, die schnell verfügbar sind, sowie zielgerichtete und spezifische Katalysatoren für eine gewünschte Reaktion werden die chemische Synthese sicherlich stark beeinflussen und weiterentwickeln.

Die Autoren danken Sharon Fujita und Chris Davis für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für hilfreiche Anregungen. Außerdem danken sie Ann Nishimoto und Pam O'Donnell für ihre Unterstützung bei den bibliographischen Arbeiten.

Eingegangen am 2. April 2001 [A 463]  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 709.
- [2] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 31.
- [3] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317.
- [4] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253.
- [5] W. P. C. Stemmer, *Bio/Technology* **1995**, *13*, 549.
- [6] W. P. C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10747.
- [7] R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, J. M. Guisan, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, *24*, 139.
- [8] I. Prieto, J. Martin, R. Arche, P. Fernandez, A. Perez-Aranda, J. L. Barbero, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *33*, 553.
- [9] J. Martin, I. Prieto, J. L. Barbero, J. Perez-Gil, J. M. Mancheno, R. Arche, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1037*, 133.
- [10] A. Slade, A. J. Horrocks, C. D. Lindsay, B. Dunbar, R. Virden, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 75.
- [11] K. S. Choi, J. A. Kim, H. S. Kang, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 6270.
- [12] I. Prieto, M. C. Rodriguez, G. Marquez, A. Perez-Aranda, J. L. Barbero, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *36*, 659.
- [13] A. Roa, J. L. Garcia, F. Salto, E. Cortes, *Biochem. J.* **1994**, *303*, 869.
- [14] Y. Ishii, Y. Saito, T. Fujimura, H. Sasaki, Y. Noguchi, H. Yamada, M. Niwa, K. Shimomura, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 773.
- [15] C. P. Chou, W. Lin, B. Kuo, C. Yu, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 766.
- [16] C. P. Chou, C. C. Yu, W. J. Lin, B. Y. Kuo, W. C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 219.
- [17] A. Cramer, E. A. Whitehorn, E. Tate, W. P. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 315.
- [18] S. Ueda, M. Tanaka, M. Ezaki, K. Sakamoto, S. Hashimoto, N. Oohata, M. Tsuboi, M. Yamashita, Fukisawa Pharmaceutical Co., Ltd., **1998**.
- [19] M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada, *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 402.
- [20] T. Nagasawa, C. D. Mathew, J. Mauger, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1766.
- [21] A. M. Macadam, C. J. Knowles, *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 865.
- [22] T. C. Bhalla, A. Miura, A. Wakamoto, Y. Ohba, K. Furuhashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *37*, 184.
- [23] M. L. Gladley, C. J. F. Deverson, C. J. Knowles, *Arch. Microbiol.* **1994**, *161*, 246.
- [24] M. L. Gladley, C. J. Knowles, *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 41.
- [25] N. Layh, A. Stolz, S. Forster, F. Effenberger, H. J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.* **1992**, *158*, 405.
- [26] N. Klempier, A. Deraadt, K. Faber, H. Grieng, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 341.
- [27] H. Kakeya, N. Sakai, T. Sugai, H. Ohta, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 1877.
- [28] F. Effenberger, B. W. Graef, *J. Biotechnol.* **1998**, *60*, 165.
- [29] K. Yamamoto, K. I. Komatsu, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 1459.
- [30] Y. Tani, M. Kurihara, H. Nishise, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 3151.
- [31] T. Nagasawa, K. Takeuchi, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *196*, 581.
- [32] T. Nagasawa, K. Takeuchi, V. Nardi Dei, Y. Mihara, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *34*, 783.
- [33] K. Ryuno, T. Nagasawa, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1813.
- [34] J. E. Ness, M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J. R. Cherry, T. V. Borchert, W. P. Stemmer, J. Minshull, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 893.
- [35] B. Schulze, M. G. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609.
- [36] A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 1.
- [37] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [38] M. Pietzsch, C. Syldatk, F. Wagner, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1992**, *672*, 478.
- [39] G.-J. Kim, D.-C. Lee, J.-H. Park, H.-S. Kim, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1998**, *864*, 332.
- [40] G. J. Kim, D. E. Lee, H. S. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2133.
- [41] G. J. Kim, Y. H. Cheon, H.-S. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 211.
- [42] F. L. De Felipe, M. Kleerebezem, W. M. De Vos, J. Hugenholtz, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3804.
- [43] S. B. Lamb, D. C. Lamb, S. L. Kelly, D. C. Stuckey, *FEBS Lett.* **1998**, *431*, 343.
- [44] M. S. Shet, C. W. Fisher, P. L. Holmans, R. W. Estabrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11748.
- [45] H. Joo, Z. Lin, F. H. Arnold, *Nature* **1999**, *399*, 670.
- [46] H. Joo, A. Arisawa, Z. Lin, F. H. Arnold, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 699.
- [47] H. L. Holland, *Steroids* **1999**, *64*, 178.
- [48] Q. S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1531.
- [49] V. Sieber, C. A. Martinez, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 456.
- [50] L. Wan, M. B. Twitchett, L. D. Eltis, A. G. Mauk, M. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12825.
- [51] M. Kikuchi, K. Ohnishi, S. Harayama, *Gene* **2000**, *243*, 133.
- [52] M. Kikuchi, K. Ohnishi, S. Harayama, *Gene* **1999**, *236*, 159.
- [53] J. R. Cherry, M. H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, A. H. Pedersen, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 379.
- [54] Z. Lin, T. Thorsen, F. H. Arnold, *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 467.
- [55] M. P. J. Van Deurzen, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13183.
- [56] R. Sheldon, *Nature* **1999**, *399*, 636.
- [57] T. A. Trautner, T. S. Balganesh, B. Pawlek, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*, 6649.
- [58] H. Fu, M. A. Alvarez, C. Khosla, J. E. Bailey, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6527.
- [59] J. M. Weber, B. Schoner, R. Losick, *Gene* **1989**, *75*, 235.
- [60] E. T. Seno, R. H. Baltz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21* (5), 758.
- [61] R. H. Baltz, M. A. McHenney, C. A. Cantwell, S. W. Queener, P. J. Solenberg, *Antonie van Leeuwenhoek* **1997**, *71*, 179.
- [62] K. Li, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10545.
- [63] Y. Watanabe, M. Kashimura, T. Asaka, T. Adachi, S. Morimoto, *Heterocycles* **1993**, *36*, 243.
- [64] Y. L. Khmelnitsky, J. O. Rich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 47.
- [65] I. L. Gatfield, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1984**, *434*, 569.
- [66] S. M. Roberts, *Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*, Wiley, New York, **1999**.
- [67] H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, *Biotransformation I, Vol. 8a*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [68] U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2169.
- [69] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830.
- [70] L. Giver, A. Gershenson, P. O. Freskgard, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12809.
- [71] G. Gonzalez-Blasco, J. Sanz-Aparicio, B. Gonzalez, J. A. Hermoso, J. Polaina, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13708.
- [72] H. Shibuya, S. Kaneko, K. Hayashi, *Biochem. J.* **2000**, *349*, 651.
- [73] J. K. Song, J. S. Rhee, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 890.
- [74] H. Uchiyama, T. Inaoka, T. Ohkuma-Soyejima, H. Togame, Y. Shibanaka, T. Yoshimoto, T. Kokubo, *J. Biochem. (Tokyo)* **2000**, *128*, 441.
- [75] B. Spiller, A. Gershenson, F. H. Arnold, R. C. Stevens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12305.
- [76] E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029.
- [77] U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Biotechnol. Bieng.* **1998**, *58*, 554.
- [78] M. N. Gupta, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 25.
- [79] F. H. Arnold, J. C. Moore, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, *58*, 1.
- [80] J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 458.

- [81] L. You, F. H. Arnold, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 77.
- [82] H. Zhao, F. H. Arnold, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 47.
- [83] H. Zhao, L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 258.
- [84] S. Taguchi, A. Ozaki, T. Nonaka, Y. Mitsui, H. Momose, *J. Biochem. (Tokyo)* **1999**, *126*, 689.
- [85] A. J. Margolin (Merrell Dow Pharmaceuticals), US Patent 5316944, **1994**.
- [86] J. K. Epp, B. E. Schoner (Eli Lilly and Company), US Patent 5068189, **1991**.
- [87] M.-R. Kula, W. Hummel, H. Schutte, W. Leuchtenberger (Degussa), US Patent 4877734, **1989**.
- [88] H. Umezawa, T. Takeuchi, T. Nagatsu, M. Hamada, S. Iwadare, I. Matsumoto, H. Morishima (Banyu Pharmaceutical Co.), US Patent 4699879, **1987**.
- [89] S. Tokuyama (Daicel Chemical Industries, Ltd.), US Patent 5916774, **1999**.
- [90] R. A. Wisdom, C. S. Lee, P. M. Ricaud (Chiroscience Limited), US Patent 5733754, **1998**.
- [91] K. Jund, J.-B. Ducep (Merrell Pharmaceuticals Inc., USA), US Patent 5637768, **1997**.
- [92] M.-R. Kula, M. Kittelmann (Degussa AG), US Patent 5212069, **1992**.
- [93] U. Groeger, W. Leuchtenberger, K. Drauz (Degussa AG), US Patent 5219741, **1993**.
- [94] M. J. Zmijewski, Jr., J. N. Levy (Eli Lilly and Company), US Patent 5057607, **1991**.
- [95] R. D. Fallon, M. J. Nelson, M. S. Payne (E.I. du Pont de Nemours and Company, USA), US Patent 05811286, **1998**.
- [96] R. D. Fallon, M. J. Nelson, M. S. Payne (E.I. du Pont de Nemours and Company, USA), US Patent 06133421, **2000**.
- [97] R. D. Fallon, M. J. Nelson, M. S. Payne (E.I. du Pont de Nemours and Company, USA), US Patent 05888785, **1999**.
- [98] O. Favre-Bulle, M.-C. Bontoux, D. Largeau, A. Ariagno (Rhône-Poulenc Nutrition Animale, USA), US Patent 05814497, **1998**.
- [99] K. Soshiwata, M. Shimada, A. Hatamori (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc., USA), US Patent 05443973, **1995**.
- [100] K. Tamura (Nitto Chem. Ind Co Ltd, Japan), JP Patent 08131188, **1996**.
- [101] K. H. Clifford, P. J. Geary, R. J. Pryce (Gist-Brocades N.V., USA), US Patent 05206158, **1993**.
- [102] G. Krix, A. S. Bommarius, K. Drauz, M. Kettenhahn, M. Schwarm, M.-R. Kula, *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 29.
- [103] H. P. Meyer, A. Kiener, R. Imwinkelried, N. Shaw, *Chimia* **1997**, *51*, 287.
- [104] W. Charney, H. L. Herzog, *Microbial Transformation of Steroids: A Handbook*, Academic Press, New York, **1967**.