



FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

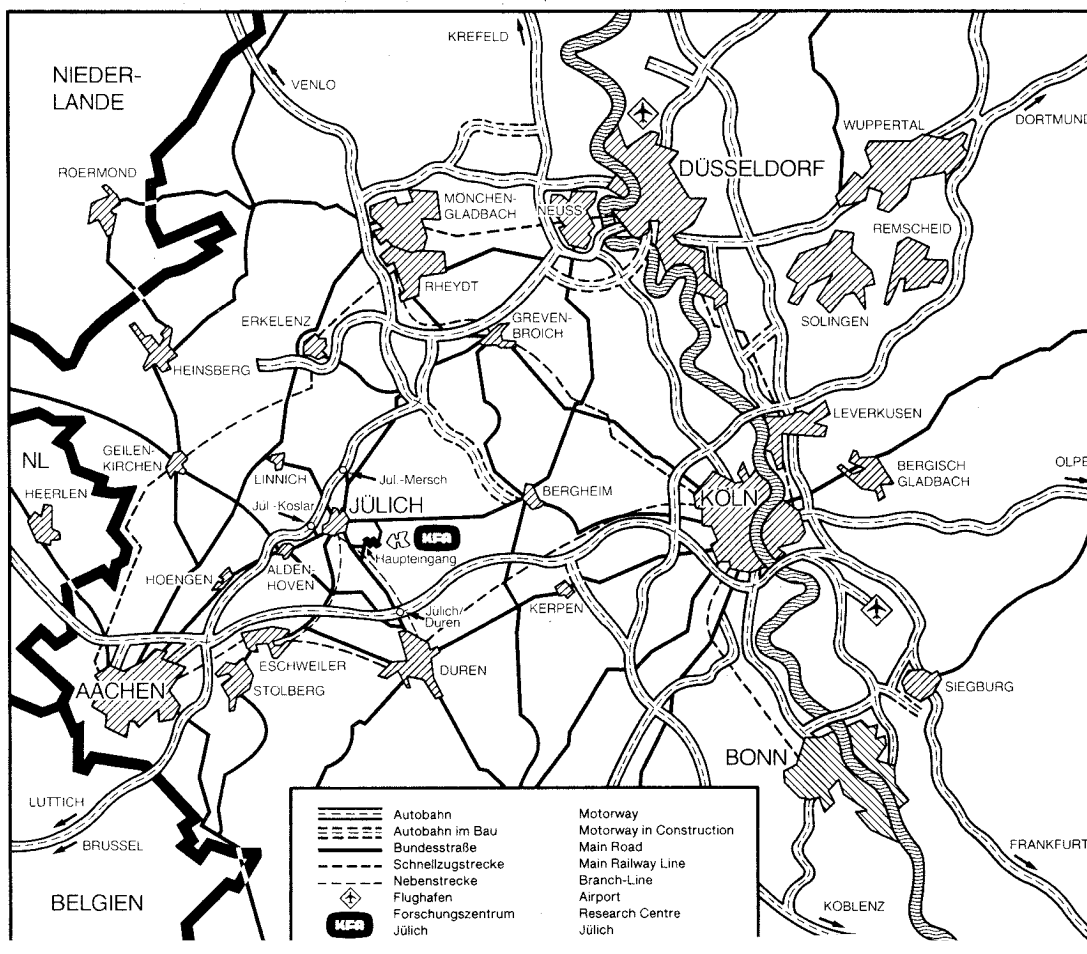
**Untersuchungen zur enzymatischen
C-C Verknüpfung am Beispiel der
chiralen Cyanhydrinbildung**

von

Uwe Niedermeyer

Jül-2343
Januar 1990
ISSN 0366-0885

0133200107



Forschungszentrum Jülich: Berichte Nr. 2343

Institut für Biotechnologie Jül-2343

D 61 (Diss. Uni. Düsseldorf)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK Forschungszentrum Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/61-0 · Telex: 833556-70 kf d

Untersuchungen zur enzymatischen C-C Verknüpfung am Beispiel der chiralen Cyanhydrinbildung

von

Uwe Niedermeyer

Die Arbeit entstand am Institut für Enzymtechnologie der Universität
Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich GmbH in Zusammenarbeit
mit dem Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die hilfreiche Unterstützung und die Freiheit, die bei seiner Bearbeitung gewährt wurden.

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und für zahlreiche wertvolle Anregungen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dipl.-Chem. U. Kragl für die äußerst angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die angenehme Atmosphäre als Voraussetzung für eine erfolgreiche Arbeit.

Bei allen Mitdoktoranden möchte ich mich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und den offenen Gedankenaustausch bedanken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Durchführung der Arbeit	13
2.1	Vorkommen und Bedeutung der Oxynitrilasen	13
2.2	Screening nach mikrobiellen Oxynitrilase-Produzenten	17
2.2.1	Enzymatische Verseifung von aliphatischen Dinitrilderivaten	22
2.3	Aufarbeitung von pflanzlichen Oxynitrilasen	25
2.3.1	Aufreinigung der Oxynitrilase aus <i>P. amygdalus</i>	25
2.3.2	Aufreinigung der Oxynitrilase aus <i>S. bicolor</i>	28
2.3.3	Proteinchemische Eigenschaften der aufgereinigten Enzyme	31
2.4	Darstellung der racemischen Referenzsubstanzen und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses	34
2.4.1	Darstellung der racemischen Referenzsubstanzen	34
2.4.2	Bestimmung des Enantiomerenüberschusses	36
2.5	Optimierung des Reaktionssystems	41
2.5.1	Grundlagen	41
2.5.2	Messungen zur pH-Abhängigkeit der enzymatischen und nicht-enzymatischen Cyanhydrinbildung	45
2.5.3	Bestimmung von kinetischen Konstanten der nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese	48
2.5.4	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese	51
2.5.4.1	Vorbemerkungen	51
2.5.4.2	Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinsynthese	52
2.5.4.3	Quantitative Deutung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Hammett-Gleichung	54
2.5.4.4	pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinsynthese	59
2.5.4.5	Temperaturabhängigkeit der Cyanhydrinsynthese	60
2.5.5	Thermodynamik und Kinetik der Spaltreaktion	62
2.5.6	Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten	66
2.5.7	Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Temperatur	68
2.5.8	Einfluß der Konzentrationen auf den Gleichgewichtsumsatz	71
2.6	Löslichkeit der Carbonylverbindungen in wäßrigen Lösungssystemen	73

2.7	Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Cyanhydrinsynthese	75
2.7.1	pH-Abhängigkeit der Oxynitrilasen	75
2.7.2	Substratabhängigkeit der untersuchten Oxynitrilasen	76
2.7.3	Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Cyanhydrinsynthese	82
2.8	Einfluß von wassermischbaren Cosolvenzien auf die Aktivität	84
2.9	Einfluß des Reaktionsmediums auf die Stabilität der Enzyme	85
2.10	Ergebnisse der Optimierung des Reaktionssystems	90
2.11	Synthesen mit der (R)- und (S)-Oxynitrilase	93
2.11.1	Diskontinuierliche Synthesen	93
2.11.2	Kontinuierliche Synthesen	102
2.11.2.1	Produktionsanlagen	104
2.11.2.2	Produktion	106
3	Zusammenfassung	109
4	Experimenteller Teil	112
4.1	Analytische Methoden und Geräte	112
4.1.1	Gaschromatographie	112
4.1.2	Dünnschichtchromatographie	112
4.1.3	Spektroskopische Geräte	113
4.1.4	Weitere technische Hilfsmittel	113
4.1.5	Verwendete Chemikalien	114
4.2	Screening nach mikrobiellen Oxynitrilase-Produzenten	114
4.3	Kulturbedingungen	115
4.3.1	Nährmedien	115
4.3.2	Minimalmedien zur Anreicherung von Mikroorganismen (M_1)	115
4.3.3	Minimalmedium zur Zellanzucht (M_2)	116
4.3.4	Vollmedium zur Zellanzucht (V_1)	116
4.3.5	Vollmedium zur Zellanzucht (V_2)	116
4.3.6	Spurensalzlösung	117
4.3.7	Vitaminlösung	117
4.4	Reinheitskontrolle und Stammhaltung	117
4.4.1	Reinheit der gescreenten Stämme	117
4.4.2	Stammhaltung	118
4.4.3	Kulturführung	118
4.4.4	Bestimmung der Biomassekonzentration	118
4.4.5	Gewinnung der zellfreien Rohextrakte	118
4.5	Bestimmungen der Enzymaktivitäten	119
4.5.1	Gaschromatographischer Oxynitrilase-Nachweis	119
4.5.2	Polarimetrischer Oxynitrilase-Nachweis (im Screening)	119
4.5.3	Gaschromatographische Bestimmung von Nitrilhydratase-Aktivitäten	119

4.5.4	Gaschromatographische Bestimmung von Amidase-Aktivitäten	120
4.5.5	Photometrische Aktivitätsbestimmungen für die Oxynitrilase aus <i>P. amygdalus</i>	120
4.5.5.1	"Spalttest"	120
4.5.5.2	Enzymatische Cyanhydrinsynthese	121
4.5.6	Photometrische Aktivitätsbestimmungen für die Oxynitrilase aus <i>S. bicolor</i>	121
4.5.6.1	"Spalttest"	121
4.5.6.2	Enzymatische Cyanhydrinsynthese	122
4.6	Proteinbestimmungen	122
4.6.1	BCA-Test	122
4.6.2	Bradford-Bestimmung	123
4.7	SDS-Elektrophorese	123
4.8	Enzymbaufreinigung und -charakterisierung	125
4.9	Quantitative Cyanid-Bestimmung	126
4.10	Darstellung von Substraten und Referenzsubstanzen	127
4.10.1	Darstellung der racemischen Cyanhydrine	127
4.10.2	Darstellung der racemischen Ethanolamine durch Reduktion der Cyanhydrine (präparativ)	130
4.10.3	Pentafluoracetylierung der Ethanolamine zur gaschromatographischen ee-Wert-Bestimmung	132
4.10.4	Kombinierte Reduktion und Pentafluoracetylierung der enzymatisch hergestellten Cyanhydrine zur Bestimmung des ee-Wertes	134
4.10.5	Bestimmung der optischen Reinheit von Cyanhydrinen über die "Mosher's-Derivate"	135
4.10.5.1	Darstellung des (R)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenyllessigsäurechlorids (R(+)-MTPA-Chlorid)	135
4.10.5.2	Darstellung der Cyanhydrin-Mosher's-Derivate zur Bestimmung der optischen Reinheit	135
4.10.6	Darstellung der Blausäure	135
4.10.7	Darstellung von trans-4,5-Dicyanocyclohex-1-en	136
4.10.8	Darstellung von Malonsäuremononitril	136
4.10.9	Darstellung von Malonsäuremonoamid	137
4.11	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Aldehyden und Cyanhydrinen	138
4.12	Bestimmung der Löslichkeit aromatischer Aldehyde in wässrigen und wässrig-alkoholischen Systemen	139
4.13	Bestimmung kinetischer Daten der enzymatischen und nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese	139
4.13.1	pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinsynthese	139
4.13.2	pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinspaltung	140
4.13.3	Synthese von Cyanhydrinen (Aldehyd-Abhängigkeit)	140
4.13.4	Synthese von Cyanhydrinen (Blausäure-Abhängigkeit)	140
4.13.5	Spaltung von Cyanhydrinen	140

4.14	Diskontinuierliche Umsetzungen mit der (R)- und der (S)-Oxynitrilase	141
4.15	Kontinuierliche Umsetzungen mit der (R)- und der (S)-Oxynitrilase	146
4.15.1	Kontinuierliche Produktion von (R)-Mandelsäurenitril mit dem Enzym-Membran-Reaktor (EMR)	146
4.15.2	Kontinuierliche Produktion von (S)-para-Hydroxymandelsäurenitril im Rührkesselreaktor mit immobilisierter (S)-Oxynitrilase	146
4.15.2.1	Immobilisierung der (S)-Oxynitrilase an Eupergit C	146
4.15.2.2	Produktion	147
4.16	Arbeiten zum Substratspektrum der Nitrilhydratasen und Amidasen	147
5	Literaturverzeichnis	149

1 Einleitung und Problemstellung

Im Jahre 1848 beobachtete Louis Pasteur, daß das optisch inaktive Natriumammoniumsalz der Weinsäure als Gemisch zweier verschiedener Kristallsorten vorliegt. Sie unterscheiden sich wie Bild und Spiegelbild. Pasteur trennte beide Kristallformen durch mechanisches Auslesen, löste sie in Wasser und fand, daß die Lösungen der getrennten Kristalle optisch aktiv und die spezifischen Drehungen der beiden Lösungen gleich waren, jedoch entgegengesetzte Vorzeichen besaßen (R. T. Morrison und R. N. Boyd).

Dieses Experiment, das man heute Racemattrennung nennen würde, hatte grundlegende Bedeutung für die Entwicklung der Stereochemie und legte weiterhin die Basis zum Verständnis eines grundlegenden Prinzips der belebten Natur, nämlich der Chiralität. Denn ähnlich wie bei diesen Kristallen gibt es Moleküle, die sich wie Spiegelbilder voneinander unterscheiden. Man nennt sie Spiegelbildisomere oder auch Enantiomere. Die Besonderheit der Enantiomeren ist, daß sie die Schwingungsebene des polarisierten Lichts zu drehen vermögen. Allerdings drehen bei einem zusammengehörigen Enantiomerenpaar die entgegengesetzten Enantiomeren jeweils in die andere Richtung. Ansonsten stimmen sie in allen physikalischen Eigenschaften überein. Auch in ihren chemischen Eigenschaften sind sie identisch, bis auf ihr Verhalten gegenüber optisch aktiven Verbindungen. Mit anderen Worten: In asymmetrischer Umgebung oder in Wechselwirkung mit chiralen Agenzien verhalten sich Enantiomere unterschiedlich (H. B. Kagan).

Bedenkt man nun, daß z.B. Enzyme, Rezeptoren und mit ihnen fast alle Biomoleküle chiral aufgebaut sind, wird es verständlich, daß die biologische Aktivität von Enantiomeren unterschiedlich sein kann und in vielen Fällen auch tatsächlich ist:

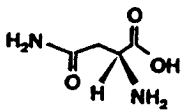
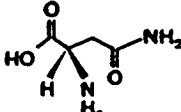
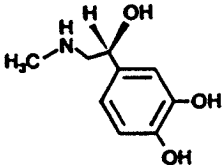
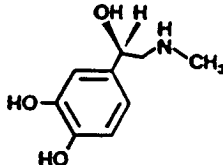
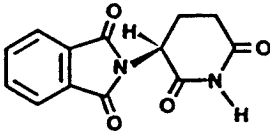
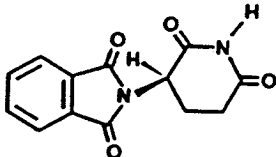
	(S)-Enantiomer	(R)-Enantiomer
Asparagin	 <chem>NC(=O)[C@H](O)C(=O)O</chem>	 <chem>NC(=O)[C@@H](O)C(=O)O</chem>
	bitter	nicht bitter
Adrenalin	 <chem>CN[C@H](O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>	 <chem>CN[C@@H](O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
	geringe biologische Aktivität	hohe biologische Aktivität
Thalidomid	 <chem>O=C1NC(=O)c2ccccc2N1C3CCCC3=O</chem>	 <chem>O=C1NC(=O)c2ccccc2N1C3CCCC3=O</chem>
	teratogen	verursacht keine Mißbildungen

Abbildung 1.1: Unterschiedliche biologische Aktivität von enantiomeren Molekülen

Wie diese Beispiele zeigen, kann es gerade bei pharmazeutischen Wirkstoffen von besonderer Wichtigkeit sein, auf Enantiomerenreinheit zu zielen. So ist z.B. das Thalidomid - der Wirkstoff des Contergans - nur in seiner (S)-Konfiguration teratogen wirksam, während der Antipode keine Mißbildungen verursacht (D. Enders und R. Hoffmann)

Die sich hieraus ableitende Notwendigkeit der Darstellung von chiralen Wirkmolekülen nimmt deshalb einen zunehmend größeren Stellenwert sowohl in der akademischen Forschung als auch in der technischen Produktion ein. Diesem Bedürfnis entsprechend sind in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Methodiken zur Racemattrennung, zur asymmetrischen Synthese und zu neuartigen Synthesestrategien unter Verwendung enantiomerenreiner Bausteine aus dem "chiral pool" entstanden (J. D. Morrison).

Im Rahmen dieser Entwicklung gewinnen aber auch enzymatische Stoffumwandlungen zunehmend an Interesse (J. B. Jones; G. Whitesides und C.-H. Wong). Ausschlaggebend ist hierbei die bekannte Chemo-, Regio-, Diastereo- und Enantioselektivität vieler Enzymreaktionen.

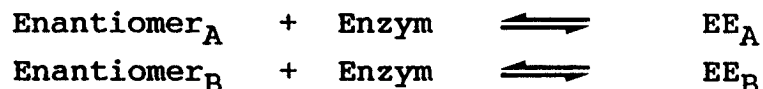
Schon lange weiß man, daß Enzyme Enantiomere und prochirale Moleküle selektiv umsetzen können. Ein bekanntes Beispiel ist die Aconitase, die Citronensäure streng stereoselektiv zu L-Iso-citrat umsetzt (A. L. Lehninger).

Dieses Phänomen versuchte man durch verschiedene Modelle zu erklären. Die "Dreipunkt-Anlagerung" von A. G. Ogston ist dabei sicherlich das bekannteste. Hierbei wird vorausgesetzt, daß das Substrat in der Nähe des aktiven Zentrums an drei Stellen gebunden wird. Dies hat zur Folge, daß chemisch identische Molekülteile oder Atome nicht mehr äquivalent sind, so daß in der enzymatischen Reaktion Enantiomere oder prochirale Moleküle unterschieden werden können (A. G. Ogston).

Die allgemeine Darstellung von H. Hirschmann, die solche bildlichen Hilfen vom Grundprinzip ableitet, besagt folgendes: Eine dreidimensionale Darstellung eines Moleküls, das zwei (oder mehr) identische Gruppen oder Atome (a , a' ...) trägt, wird so bewegt, daß die Stellung von a' mit der ursprünglichen in a zur Deckung kommt. Wenn dies dergestalt geschehen kann, daß das zweite Arrangement vom ersten ununterscheidbar ist, können die Gruppen a und a' durch keine Reaktion voneinander unterschieden werden. Wenn jedoch eine solche Superposition unmöglich ist, können die Gruppen a und a' mit einem asymmetrischen Reagenz mit unterschiedlicher Geschwindigkeit reagieren (H. Hirschmann).

Aber auch ohne diese Modellvorstellungen kann man sich die Differenzierung von prochiralen und enantiomeren Molekülen durch Enzyme erklären. Denn - wie auch immer - bei einer enzymatischen Reaktion muß es zur Wechselwirkung von chiralem Enzym und Substrat kommen; dabei ist die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes obligatorisch.

Unter der Voraussetzung eines asymmetrisch aktiven Enzymzentrums muß der gebildete Komplex von diastereomerer Natur sein. Reagiert nun beispielsweise ein racemisches Gemisch mit einem Enzym, so sind folgende diastereomere Übergangszustände möglich:



Da Diastereomere, anders als Enantiomere, chemisch und physikalisch unterschiedliche Eigenschaften besitzen, sollten die Energiezustände der oben beschriebenen Enzym-Substrat-Komplexe nicht äquivalent sein.

Folgende Abbildung verdeutlicht die energetischen Reaktionsprofile für einige mögliche chirale und achirale Reaktionen (J. Retèy):

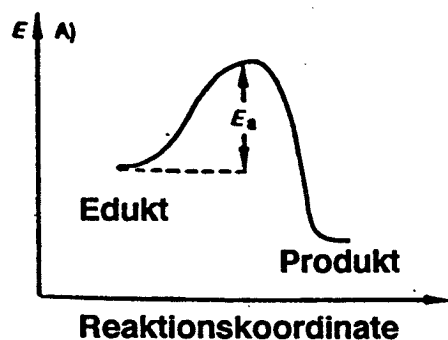


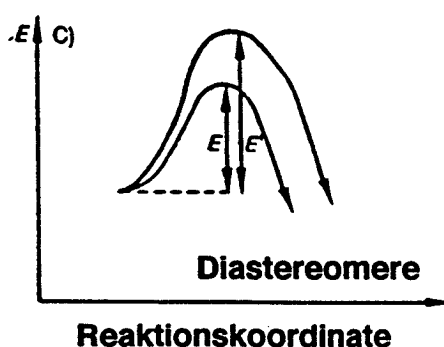
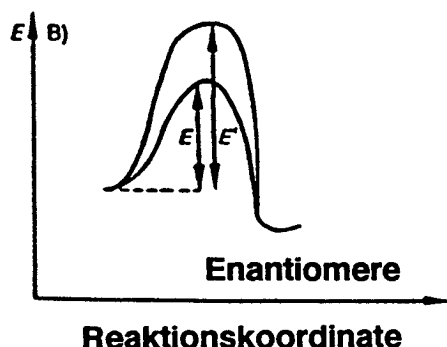
Abbildung 1.2:

Energetische Reaktionsprofile

A) achirale Bedingungen

B) chirale Bedingungen
(enantiomerenreine Produkte)

C) chirale Bedingungen
(diastereomere Produkte)



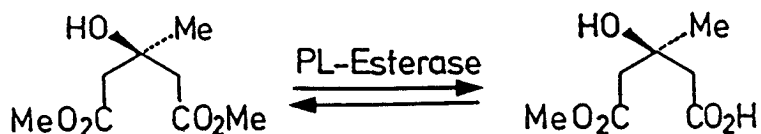
In einer derartigen Reaktion sollte also dasjenige Enantiomere bevorzugt oder sogar ausschließlich umgesetzt werden, das mit dem Enzym den energetisch niedrigeren Übergangszustand bildet. Bei prochiralen Molekülen, für die theoretisch mehr als ein Übergangszustand möglich ist, wird man ebenfalls nur dasjenige Endprodukt erwarten, für das der Übergangskomplex die niedrigere Energie besitzt.

Neben diesen selektiven Eigenschaften der Enzyme ist natürlich auch ihre katalytische Wirksamkeit ein prinzipieller Vorteil. Enzyme erhöhen ohne große Energiezufuhr die Reaktionsgeschwindigkeit unter milden physiologischen Bedingungen. Hierdurch können auch labile Moleküle unter milden Bedingungen schnell und ohne Nebenreaktion umgesetzt werden.

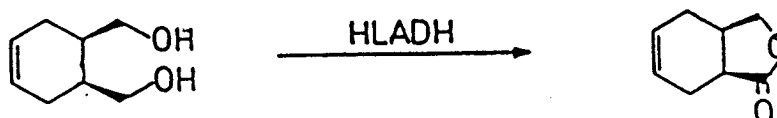
Aber die an sich vorteilhaften selektiven Eigenschaften der Enzyme können auch einen Nachteil darstellen. Denn hierdurch ist für jedes einzelne Enzym das Substratspektrum und damit die Bandbreite der Anwendungsmöglichkeiten eingeschränkt. Diese mangelnde Universalität jedes Enzyms für sich alleine genommen wird jedoch durch die Vielzahl der in der Natur vorkommenden Enzyme wieder ausgeglichen (M.-R. Kula, 1987a).

Jedenfalls gehören Enzyme zu den Katalysatoren der Wahl für die Herstellung von chiralen Spezial- oder Feinchemikalien (H. Yamada und S. Shimizu). Viele kommerzielle Verfahren und Synthesen im Labormaßstab werden zunehmend praktiziert. Folgende Beispiele geben einen kleinen ausschnittshaften Einblick in oft angewandte enzymatische Synthesen:

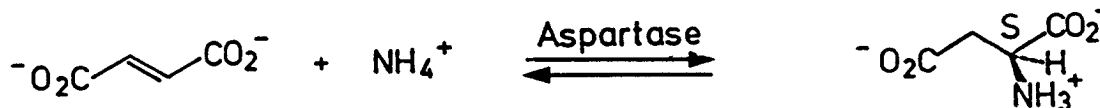
- Hydrolyse von meso-Diestern zur Gewinnung chiraler Synthesebausteine mit Hydrolasen im Labormaßstab (F. C. Huang et al.):



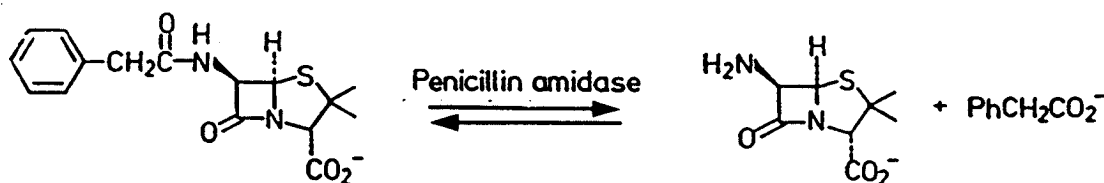
- Synthese chiraler Alkohole und chiraler Lactone durch Reaktionen mit Alkoholdehydrogenasen im Labormaßstab (I. J. Jakovac et al.):



- kommerzielle Gewinnung von L-Asparaginsäure (J. B. Jones):



- kommerzielle Gewinnung von 6-Aminopenicillinsäure zur Synthese von halbsynthetischen Penicillinen (H. Yamada):



Eine weitere präparativ genutzte enzymatische Reaktion (W. Becker et al., 1963) ist die durch die Oxynitrilase aus *Prunus amygdalus* (4.1.2.10) katalysierte Addition von Blausäure an Carbonylverbindungen.

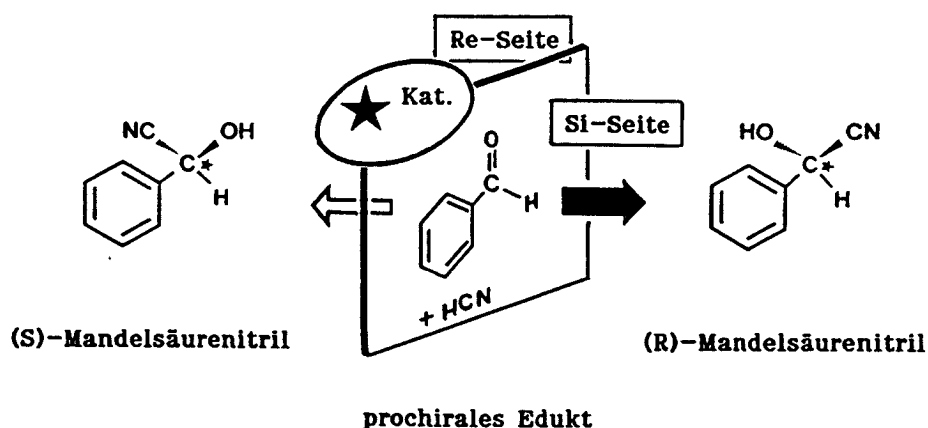


Abbildung 1.3: Cyanhydrinsynthese

Da diese enzymatische Reaktion auch Grundlage der vorliegenden Arbeit ist, soll an dieser Stelle darauf näher eingegangen werden. Zunächst wird die Bedeutung der Produkte erläutert.

Chirale Cyanhydrine besitzen ein erhebliches Synthesepotential. So werden z.B. Abkömmlinge des m-Phenoxybenzaldehyds (T. Matsuo) und substituierte Analoga zur Synthese von photostabilen Pyrethroiden eingesetzt.

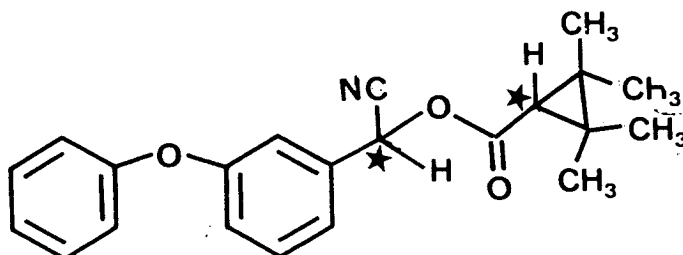


Abbildung 1.4: Pyrethroid

Weiterhin finden sie für die Synthese von optisch aktiven α -Hydroxysäuren Verwendung. Diese werden wiederum als Zusatzstoffe zu Futtermitteln oder zur Gewinnung von pharmazeutischen Wirkstoffen, Vitaminen und Flüssigkeitskristallen eingesetzt (W. Becker und E. Pfeil, 1966a).

Diese optisch aktiven α -Hydroxysäuren lassen sich auch vorteilhaft in sonst nur schwer zugängliche N-substituierte chirale α -Aminosäuren überführen (F. Effenberger et al., 1983).

Optisch aktive Cyanhydrine bieten ebenfalls einen leichten Zugang zu chiralen α -Aminoalkoholen (W. Becker und E. Pfeil, 1966b) und daraus abgeleiteten optisch aktiven Verbindungen, die in der Wirkstoffsynthese Bedeutung besitzen.

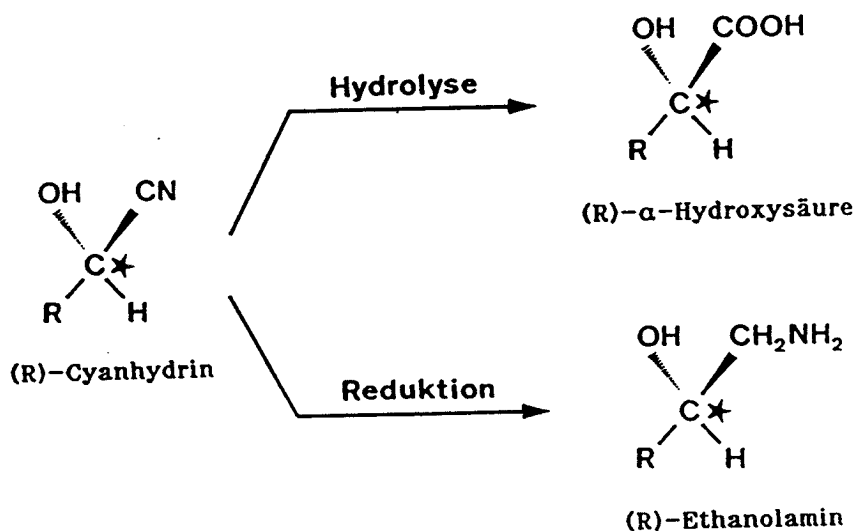


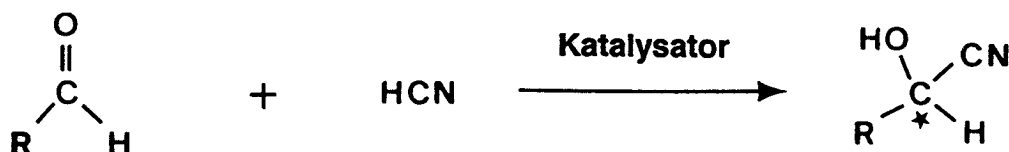
Abbildung 1.5: Chirale Ethanolamine und α -Hydroxysäuren durch von Cyanhydrinen ausgehende Folgereaktionen

Diese Beispiele erklären das Interesse und ständige Bemühen, Verfahren zur Synthese von chiralen Cyanhydrinen zu erarbeiten.

Schon in den Fünfziger Jahren waren es mehrere Arbeitsgruppen (H. und E. Albers; V. Prelog und M. Wilhelm; H.-H. Hustedt und E. Pfeil), die den Einfluß von chiralen Basen, insbesondere von China-Alkaloiden, auf die asymmetrische Cyanhydrinsynthese untersuchten.

In neueren Arbeiten wird der Einsatz von β -Cyclodextrin-Aldehyd-Komplexen (H. Gountzos et al.) und von chiralen Phasentransfer-Katalysatoren (S. Julia and A. Ginebreda) zur Induktion von chiralen Cyanhydrinen berichtet. Durch diese Methoden konnten Enantiomerenüberschüsse von bis zu 32% erreicht werden.

Cyanhydrine mit höherer optischer Reinheit erhält man durch den Einsatz asymmetrischer cyclischer Dipeptide als Katalysatoren (S. Asada et al.).



Katalysator:

Cyclo[(S)-phenylalanyl-(S)-histidyl]

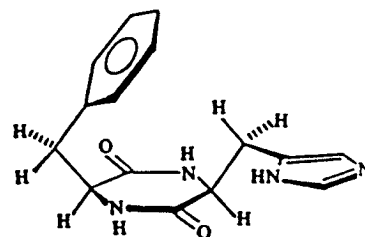


Abbildung 1.6: Asymmetrische Cyanhydrinsynthese durch Induktion mit cyclischen Dipeptiden

Jedoch racemisieren die während der Reaktion gebildeten chiralen Cyanhydrine unter dem Einfluß des basischen Dipeptids, so daß nur bei geringen Umsätzen einigermaßen hohe optische Reinheiten zu erzielen sind. So erhielten die Autoren für die (R)-Mandelsäurenitrilsynthese bei 40%igem Umsatz einen ee-Wert von 90% und bei 90%igem Umsatz nur noch einen von 21%. Die nach dieser Methode dargestellten aliphatischen Cyanhydrine besitzen einen geringeren, höchstens jedoch 69%igen Enantiomenüberschuß.

Bessere chemische Ausbeuten und optische Reinheiten von Cyanhydrinen liefert die asymmetrische Synthese über diastereomere Acetal-Template (J. D. Elliot et al.).

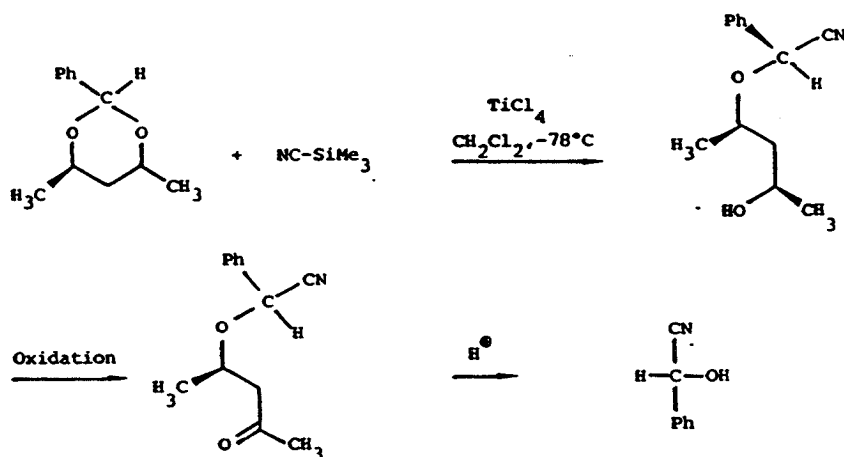


Abbildung 1.7: Asymmetrische Cyanhydrinsynthese über Acetal-Template

Mit einer chemischen Ausbeute von 97% und einem ee-Wert von über 91% sind sowohl aromatische als auch aliphatische (R)-Cyanhydrine zugänglich.

Obwohl die asymmetrische Induktion von Carbonylgruppen zur Knüpfung neuer C-C Bindungen für mehrere Reaktionstypen gut untersucht ist (D. Enders) und in der Regel zuverlässig gelingt, erweist sich die asymmetrische Cyanhydrinsynthese - wie

obige Beispiele belegen - als weniger gut möglich. Diesen Schwierigkeiten entsprechend ist die enzymatische Induktion schon lange in das Konzept zur Synthese von chiralen Cyanhydrinen mit einbezogen.

Seit der Entdeckung der Oxynitrilase im Jahre 1908 durch Rosenthaler wurde versucht, dieses Enzym für die Cyanhydrinsynthese zu nutzen. Schon Rosenthaler selbst setzte das unaufgereinigte Enzym zur Mandelsäurenitrilsynthese ein. Er erhielt in seinen Versuchen allerdings nur dunkelbraun gefärbte Reaktionsprodukte von undefinierter Reinheit und mit geringer spezifischer Drehung (L. Rosenthaler, 1908).

Ab Anfang der 60er Jahre untersuchte dann E. Pfeil mit seiner Arbeitsgruppe die enzymatische Cyanhydrinsynthese. Es gelang ihnen, mit dem nativen und immobilisierten Enzym neben dem natürlichen Substrat Benzaldehyd eine Vielzahl anderer, sowohl aromatischer als auch heterocyclischer und aliphatischer Aldehyde umzusetzen. Damals war allein für das (R)-Mandelsäurenitril ein absoluter Drehwert bekannt. Dieses erhielten sie mit einem ee-Wert von 92%. Dagegen war der absolute Drehwert für die anderen enantiomeren Cyanhydrine unbekannt, weshalb über den Grad ihrer optischen Reinheit keine Aussage gemacht werden konnte.

In dem von Becker und Pfeil etablierten wäßrigen oder auch wäßrig-alkoholischen (50% v/v) Reaktionsmilieu mit einem pH zwischen 4,8 und 5,4 erhielten dann andere Autoren bei nicht natürlichen Substraten weniger befriedigende optische Ausbeuten. Die geringe optische Reinheit der Cyanhydrine ist dabei auf die nicht-enzymatische Reaktion zurückzuführen, die unter diesen Bedingungen ebenfalls abläuft und zu racemischen Produkten führt. Dieses Problem lösten Effenberger et al. (1987) dadurch, daß sie die enzymatische Reaktion in Gegenwart organischer Lösungsmittel durchführten, in denen die nicht-enzymatische Reaktion weitgehend unterdrückt ist. Auf diese Weise erhielten sie wesentlich höhere optische Reinheiten, mußten jedoch dafür in Kauf nehmen, daß sowohl die Enzymaktivität als auch die Enzymstabilität unter diesen Bedingungen deutlich schlechter ist als im wäßrigen Milieu (U. Kragl).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, das Synthesepotential sowie die technische Anwendbarkeit der enzymatischen Cyanhydrinsynthese zu überprüfen. Da die Enzyme bisher nur aus pflanzlichen Rohstoffen isoliert wurden, war zum einen eine Überprüfung der Zugangsmöglichkeiten zu den Oxynitrilasen vorzunehmen. Neben einer Analyse der bisher bekannten Möglichkeiten zur Gewinnung der pflanzlichen Oxynitrilasen wurde auch ein Screening nach eventuell vorhandenen mikrobiellen Alternativen durchgeführt.

Andererseits lag es auf Grund der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Darstellung von optisch reinen Cyanhydrinen nahe, ein wäßriges Reaktionssystem zu recherchieren, bei dem die Enzymaktivitäten möglichst stabil sind und die nicht-enzymatische Cyanhydrinsynthese neben der enzymatischen zu vernachlässigen ist, so daß auch in wäßrigen Systemen optisch hochreine Cyanhydrine zugänglich werden.

2 Durchführung der Arbeit

2.1 Vorkommen und Bedeutung der Oxynitrilasen

Die Oxynitrilase aus *P. amygdalus* - den Bittermandeln - ist eines der am längsten bekannten Enzyme (L. Rosenthaler, 1908). Sie gehört zu dem Enzymkomplex Emulsin, welcher zusätzlich noch β -Glucosidase- und β -Galactosidaseaktivität enthält. Die natürlichen Substrate dieses Enzymkomplexes sind cyanogene Glycoside, insbesondere das Amygdalin und das Prunasin.

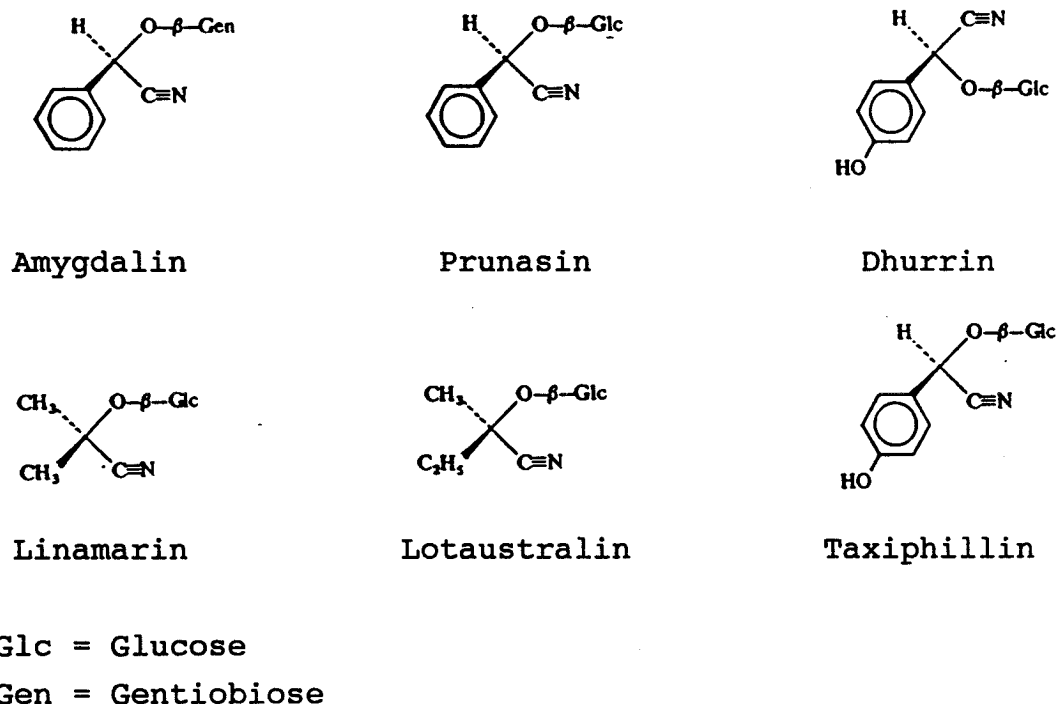


Abbildung 2.1: Einige natürlich vorkommende cyanogene Glycoside

Die physiologische Bedeutung der Oxynitrilase in diesem Enzymkomplex liegt offensichtlich in der schnellen enzymkatalysierten Gleichgewichtseinstellung von Benzaldehyd und Blausäure. Denn das nach Abspaltung des Glycosids aus dem Amygdalin entstehende (R)-Mandelsäurenitril ist instabil und würde auch

nicht-enzymatisch in Benzaldehyd und Blausäure zerfallen (E. Gerstner et al.).

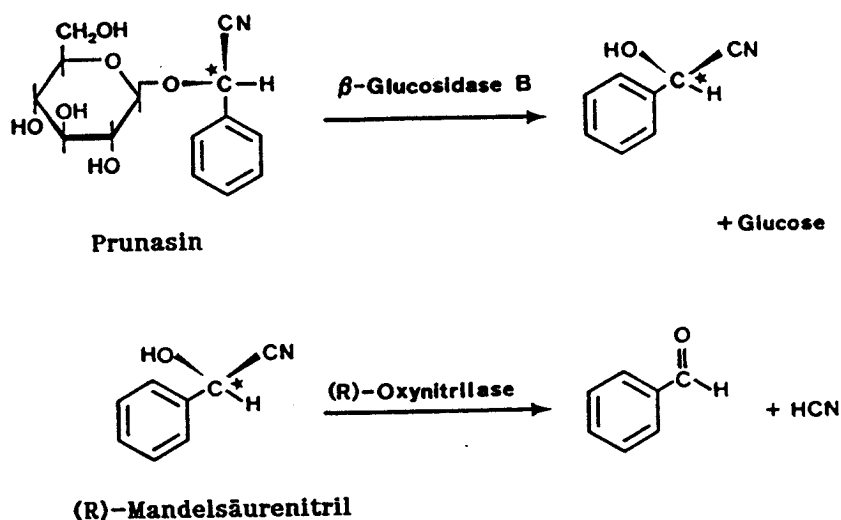


Abbildung 2.2: Enzymatische Spaltung des Prunasins

In Form des Emulsinkomplexes kommen die Oxynitrilasen in weiteren Pflanzen der Gattung der Rosaceen (z.B. Pfirsiche, Kirschen) vor. Aber auch außerhalb dieser Gattung sind Oxynitrilasen und mit ihnen die dazugehörigen Cyanhydrine bzw. die entsprechenden Glycoside - besonders bei Pflanzen - verbreitet. In *L. usitatissimum* (Flachs) (E. E. Conn) und in *S. bicolor* (Mohrenhirse) (C. Bovè und E. E. Conn) konnten ebenfalls Oxynitrilasen sowie die cyanogenen Glycoside Linamarin, Lotaustralin und Dhurrin nachgewiesen werden (Abb. 2.1).

In ca. 2000 weiteren höheren Pflanzen und Farnen konnten cyano-gene Glycoside nachgewiesen werden (R. Hegnauer). Obwohl bei diesen Pflanzen bisher vielfach nur von cyanogenen Glycosiden berichtet wurde, darf man sicherlich davon ausgehen, daß in den meisten von ihnen die cyanogenen Glycoside mit Oxynitrilasen vergesellschaftet sind (E. E. Conn).

Auch in einigen Gliedertieren konnten neuerdings cyanogene Glycoside gefunden werden (A. Nahrstedt, 1986). Offensichtlich haben sich diese Gliedertiere derart an ihre cyanogenen Wirtspflanzen adaptiert, daß sie in der Lage sind, cyanogene Glycoside sowohl unbeschadet aus ihrer Wirtspflanze aufzunehmen und zu akkumulieren (R. H. Davis) als auch de novo zu synthetisieren, um sie dann ebenso wie ihre Wirtspflanzen zur Abwehrstrategie zu nutzen.

Ebenso wie bei den Pflanzen ist ein Cyanidmetabolismus auch bei Mikroorganismen etabliert. Sowohl cyanidverwertende als auch cyanidproduzierende Organismen sind bekannt (C. J. Knowles). Anders als bei den Pflanzen sind jedoch bei dem mikrobiellen Cyanid-Stoffwechsel bis heute keine cyanogenen Glycoside und Oxynitrilasen detektiert worden.

Die mikrobielle Blausäurebildung geht dabei im allgemeinen vom Glycin aus. Durch Decarboxylierung und Oxidation des Glycins entsteht die Blausäure (P. A. Castric).

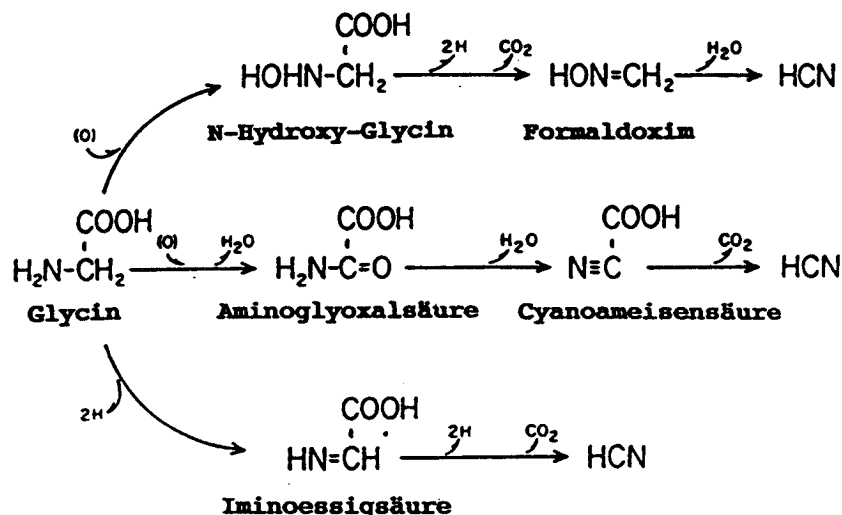


Abbildung 2.3: Mögliche Wege der Biosynthese von Blausäure durch Bakterien

Auch eine denkbare Assimilation der Blausäure mit Aldehyden zu Cyanhydrinen durch die cyanidverwertenden Organismen ist bisher nicht beobachtet worden. Vielmehr wird die Blausäure auf dem Wege einer Reaktion mit Cystein zu β -Cyanoalanin und anschließender Hydrolyse zu Asparaginsäure metabolisiert: eine Strategie, die auch von vielen Pflanzen und Insekten zur Entgiftung von Blausäure genutzt wird (P. A. Castric).

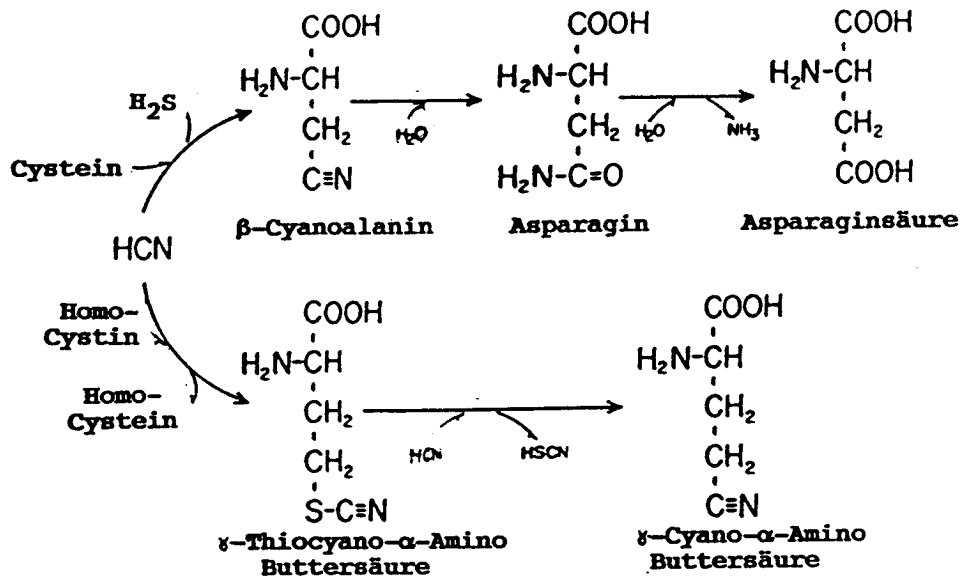


Abbildung 2.4: Assimilation von Blausäure bei Bakterien

2.2 Screening nach mikrobiellen Oxynitrilase-Produzenten

Im Screening nach mikrobiellen Oxynitrilasen wurden verschiedene Strategien zur Anreicherung und Isolierung entsprechender Mikroorganismen bearbeitet.

Zunächst wurde versucht, mit Cyanhydrinen eine Oxynitrilaseaktivität zu induzieren. Das Cyanhydrin sollte dabei als Kohlenstoffquelle fungieren. Eine mögliche Verseifung zur α -Hydroxysäure über ein mikrobielles Nitrilase-System (Y. Fukuda) sollte durch Zugabe von Ammoniumionen im Anreicherungsmedium unterdrückt werden. Als Cyanhydrine wurden das Propanalcyanhydrin und das Milchsäurenitril ausgewählt. Diese Cyanhydrine besitzen auch im wässrigen Milieu eine hohe Stabilität, da in der Cyanhydrinsynthese das Gleichgewicht von aliphatischen Aldehyden und Blausäure ganz auf der Seite des Cyanhydrins liegt (G. Schlesinger et al.).

	K (l/mol)
Formaldehyd	45870
Acetaldehyd	17700
Aceton	14
Benzaldehyd	194

Tabelle 2.1: Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion von Aldehyden und Aceton mit HCN in wässriger Lösung (G. Schlesinger et al.)

Zur Anreicherung wurde eine 1%ige Cyanhydrinlösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,1 mit Mineralsalzen, 100 mg/l Hefeextrakt und einer Vitaminlösung sowie 1 g/l Ammoniumchlorid benutzt. Parallel hierzu wurden Ansätze mit Cyanhydrin als alleiniger C- und N-Quelle, also ohne Ammoniumchlorid, durchgeführt. Diese Medien wurden mit ca. 50 Boden- und Klärwerksproben (auch aus industriellen, mit Cyanid belasteten Klärwerken) angeimpft,

mehrere Tage geschüttelt und anschließend auf festem Medium gleicher Zusammensetzung ausgestrichen.

Bei keiner der so bearbeiteten Proben konnte ein Organismus isoliert werden. Erst nach Zusatz von 2 g/l Hefeextrakt konnten 6 Stämme isoliert werden, die aber ausnahmslos keine Oxynitri-laseaktivität aufwiesen.

Bei einer anderen Strategie wurden Anreicherungsversuche mit Aldehyden und Blausäure als C- und N-Quellen durchgeführt.

Sowohl die Giftigkeit als auch die Flüchtigkeit der Blausäure erschweren allerdings ein solches Screening.

Aufgrund des pK-Wertes von 9,4 und des Siedepunktes von 25,8°C der Blausäure treten beim Arbeiten mit anorganischem Cyanid unter physiologischen Bedingungen prinzipielle Schwierigkeiten in der Aufrechterhaltung der Cyanidkonzentration bzw. der Konstanthaltung des pH-Wertes auf.



In Vorversuchen zeigte sich, daß eine Inkubation von KCN in Phosphatpuffer pH 7,1 zu einem Ansteigen des pH-Wertes bis zu 10,4 und zu einem schnellen Verlust des Cyanids führt, wenn die Gefäße, wie bei mikrobiologischen Arbeiten üblich, mit Zellstoffstopfen verschlossen sind. Durch dichtes Verschließen der Erlenmeyerkolben mit Parafilm erreicht man, daß die Anfangsbedingungen bis zu 2 Tage lang nahezu unverändert bleiben. Diesen Ergebnissen entsprechend wurden im Screening neben den Anreicherungskolben unangeimpfte Kolben mitgeführt, deren pH-Wert und Cyanidkonzentration alle 48 Stunden kontrolliert und mit 1M Phosphorsäure und 1M KCN auf die Ausgangsbedingungen eingestellt wurden. Anschließend wurden die Anreicherungskulturen mit den gleichen Mengen Phosphorsäure und KCN versetzt, so daß auch in diesen die Anfangsbedingungen unter sterilen Bedingungen wiederhergestellt werden konnten.

Nach Beimpfen des Mediums wurden die Kulturen bis zu 8 Tage lang geschüttelt, dann auf festes Medium übertragen und durch

mehrmaliges Überimpfen gereinigt. Die Zusammensetzung des festen Mediums war grundsätzlich die gleiche wie in den flüssigen Anreicherungskulturen. Allein die Zugabe und Dosierung des Cyanids war anders. Dieses wurde nach einer von Harries entwickelten Methode zugefügt (R. Harries). Hierzu plazierte man im Deckel der Petrischale ein Filterpapier, das täglich mit 50 µl einer 100 mM KCN-Lösung versetzt wird.

Die so gereinigten und isolierten Organismen wurden in flüssiges Medium überführt und fermentiert. Auch bei diesen (ca. 75) Organismen konnte keine Oxynitrilaseaktivität gemessen werden.

Möglicherweise weichen die so gescreenten Organismen der gewünschten Oxynitrilaseinduktion aus, indem sie atmosphärischen Stickstoff aus der Luft als Stickstoffquelle nutzen.

Um diese Stickstofffixierung zu unterdrücken, wurden zwei Varianten probiert. Im einen Fall wurden die Selektivbedingungen dahingehend geändert, daß Ammoniumchlorid als zusätzliche Stickstoffquelle zugegeben wurde. Im anderen wurden Anreicherungskolben mit Argon und Sauerstoff im Verhältnis 9 : 1 begast. Diesen Kolben wurden zusätzlich durch zwei Pumpen kontinuierlich Phosphorsäure und KCN-Lösung zudosiert. Damit konnte einerseits die Kolbenatmosphäre stickstofffrei gehalten werden, andererseits war die Cyanidkonzentration flexibel einstellbar. Hierbei wurden 4 Organismen isoliert, die jedoch auch keine Oxynitrilaseaktivität besaßen.

Da die oben geschilderten Methoden nicht zu dem gewünschten Ergebnis führten und darüber hinaus sehr aufwendig sind, wurde noch eine andere, mehr indirekte Methode zur Gewinnung von mikrobiellen Oxynitrilaseproduzenten probiert.

Ausgangspunkt für diese Variante waren Arbeiten von Yamada und Arnaud. Diese und andere Autoren beschreiben in ihren Arbeiten nitrilverwertende Mikroorganismen (A. Arnaud et al., 1976; Y. Asano et al.). Diese Organismen könnten möglicherweise, aufgrund ihres Nitrilmetabolismus, auch oxynitrilaseaktiv sein.

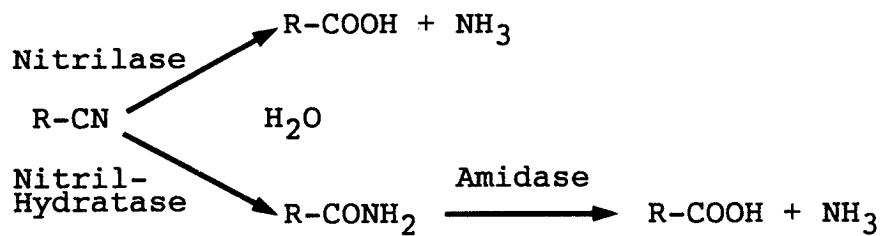


Abbildung 2.5: Enzymatische Verseifung von Nitrilen

Als Selektionsstoff wurde Propionnitril als alleinige C- und N-Quelle gewählt. Durch Anreicherung in flüssigem Medium oder direkt durch Ausplattierung auf festem Medium und wiederholte Selektion wurden aus 7 Bodenproben 90 Organismen isoliert, mit deren zellfreien Extrakten dann Enzymtests durchgeführt werden konnten. Zum einen wurden Oxynitrilase-Tests vorgenommen, die jedoch keine positiven Ergebnisse lieferten. Zum anderen wurde die enzymatische Propionnitrilverseifung gaschromatographisch getestet. Diese Tests verliefen positiv.

Bei 70 zellfreien Rohextrakten konnte eine Aktivität nachgewiesen werden. Bei allen diesen Stämmen verlief die Hydrolyse zweistufig. Neben dem Reaktionsendprodukt der Propionsäure wurde auch immer Propionsäureamid als Intermediat gebildet. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturergebnissen. Danach werden aromatische und heterocyclische Nitrile durch eine Nitrilase direkt zur Carbonsäure hydrolysiert, während aliphatische Nitrile durch eine Nitrilhydratase und Amidase sukzessive über das entsprechende Amid enzymatisch zur Säure hydrolysiert werden (R. H. Hook).

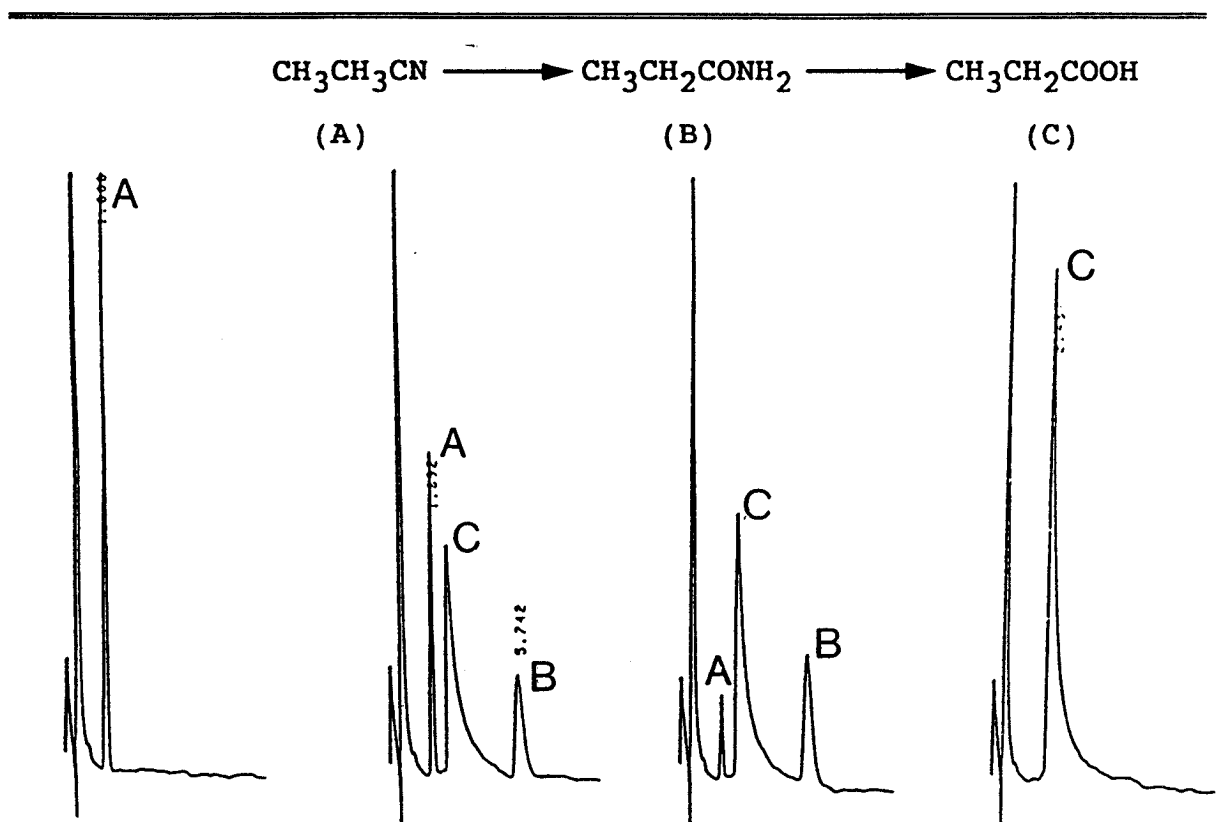


Abbildung 2.6: Gaschromatographische Aktivitätsbestimmung von Nitrilhydratase- und Amidaseaktivitäten

Sowohl Nitrilhydratase- als auch Amidaseaktivitäten wurden gaschromatographisch mit den Substraten Propionsäurenitril und Propionsäureamid jeweils getrennt bestimmt. Für die Nitrilhydratase wurden Aktivitäten von 12 - 415 mU/mg Protein und für die Amidase von 2 - 8720 mU/mg Protein bestimmt. Die Amidaseaktivitäten waren dabei in der Regel wesentlich größer als die Nitrilhydrataseaktivitäten. Dies deutet darauf hin, daß die Amidasen aller Wahrscheinlichkeit nach eine wesentlich geringere Affinität (größerer K_m -Wert) zu dem entsprechenden Amid haben als die Nitrilhydratase zu dem Nitril. Sonst wäre das intermediäre Auftreten des Amids bei der enzymatischen Propionnitrilverseifung nicht zu erklären.

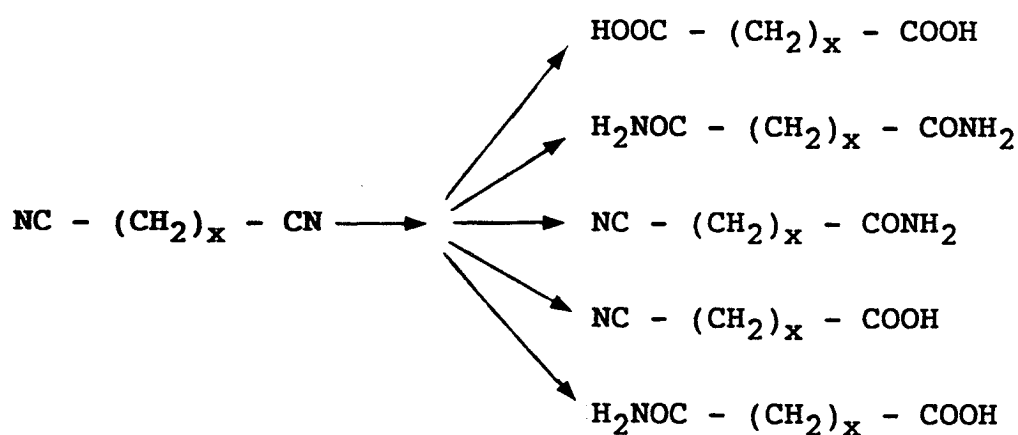
Obwohl eigentlich nicht Thema dieser Arbeit, schien es dennoch lohnenswert, das Substratspektrum dieser Enzyme etwas näher kennenzulernen. Denn es ist bekannt, daß Nitrilhydratase- und Amidase ein besonderes weites Substratspektrum besitzen und so als attraktive Katalysatoren für organisch-chemische Umsetzungen gelten (S. E. Godtfredsen et al.).

Eine Anwendungsmöglichkeit ist z.B. die kinetisch kontrollierte Verseifung von substituierten α -Amino- und α -Hydroxy-Nitrilen zur Darstellung von chiralen α -substituierten Säuren.

Interessant sind auch die selektive Verseifung von Dinitrilen und die gezielte Darstellung von Säureamiden durch Nitrilhydratasen. Diese letztgenannten Möglichkeiten wurden in einer orientierenden Untersuchung mit den gefundenen Stämmen geprüft.

2.2.1 Enzymatische Verseifung von aliphatischen Dinitrilderivaten

Aus der enzymatischen Verseifung solcher disubstituierter Substrate sind 5 verschiedene Produkte zu erwarten:



mit: $x = 1, 2, 3$

Abbildung 2.7: Produkte der Verseifung von Dinitrilen

Besonders wurde die Verseifung von Malonsäuredinitril untersucht. Denn von diesem sind die einzelnen Verseifungsprodukte chemisch zugänglich.

Ausgehend von Chloressigsäure wurde das Malonsäuremononitril synthetisiert. Von diesem wurde nach Veresterung das Malonsäureamidnitril dargestellt. Entsprechend wurde das Malonsäure-

rediamid aus der veresterten Malonsäure mit konzentrierter Ammoniaklösung präpariert (W. Kolbe).

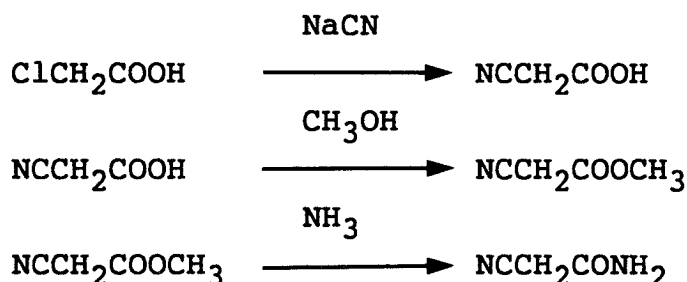


Abbildung 2.8: Darstellung der Referenzsubstanzen

Neben diesem Substrat wurden noch das Fumarsäuredinitril und das trans-4,5-Dicyanocyclohex-1-en getestet.

Mit den dargestellten Referenzsubstanzen wurde eine Methodik erarbeitet, die es gestattet, alle 5 möglichen Produkte sowie das Edukt selbst dünnschichtchromatographisch zu identifizieren. Die entsprechenden Bedingungen und die R_f -Werte sind auf Seite 148 detailliert beschrieben.

Die Verseifungsexperimente wurden in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 ausgeführt. Gleiche Volumina einer 50 mM Substratlösung im angegebenen Puffer und einer Rohextraktlösung wurden bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionsprodukte nach 3, dann nach 5 und schließlich nach 24 Stunden dünnschichtchromatographisch bestimmt.

Ungefähr ein Drittel der propionsäurenitrilverseifenden Stämme waren in der Lage, auch diese Substanzen zu hydrolysieren. Dabei wurden alle getesteten Substanzen wesentlich schlechter umgesetzt als das Propionnitril. Dies gilt besonders für das Cyclohexenderivat. Hierdurch bedingt ließen sich die Reaktionsansätze dieses Derivats nur schlecht interpretieren. Sie bleiben deshalb bei der folgenden Diskussion unberücksichtigt.

Eindeutige Ergebnisse lieferten die Verseifungen der beiden anderen Substrate, obwohl auch diese in der Regel nicht voll-

ständig abreagierten. Die Reaktionszusammensetzung änderte sich in der Regel nach 5 Stunden nicht mehr, obwohl immer noch Dinitrilderivate nachzuweisen waren. Dies könnte auf eine rasche Desaktivierung der beteiligten Enzymsysteme unter diesen Bedingungen hindeuten.

Eine weitergehende Analyse der Ergebnisse zeigte, daß nur bei 3 von 70 getesteten Rohextrakten symmetrische Produkte (insbesondere die vollständig hydrolysierte Dicarbonsäure) zu finden waren. Bei 35 Rohextrakten traten ausschließlich unsymmetrische Verseifungsprodukte auf. Dabei war das Mononitrilmonoamid-Derivat bei 31 Rohextrakten der Hauptbestandteil, während sich bei 4 Rohextrakten das Mononitrilmonocarbonsäure-Derivat als Hauptbestandteil der Hydrolyseprodukte auszeichnete. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da bei der Propionnitrilverseifung die Amidaseaktivität wesentlich größer ist als die Nitrilhydrataseaktivität. Möglicherweise besitzen die hier getesteten Amidasen ein wesentlich kleineres Substratspektrum als die Nitrilhydratasen, oder sie haben eine wesentlich schlechtere Affinität zu diesen bifunktionellen Derivaten. Für genauere Aussagen sind hier weiterführende, systematische Analysen vorzunehmen.

Da bei der überwiegenden Zahl der getesteten Rohextrakte nur eine Nitrilgruppe hydrolysiert wurde, darf man jedoch annehmen, daß die regioselektive enzymatische Differenzierung der beiden funktionellen Gruppen bei den Dinitrilen und den Reaktionsfolgeprodukten bevorzugt wird.

Eine enantioselektive Verseifung an meso-Dinitrilen könnte - in Analogie zur Verseifung von meso-Diestern durch Esterasen - zu chiralen Produkten führen (M. Schneider). Die Umsetzungen an dem meso-Cyclohexendinitril-Derivat verliefen jedoch für eine direkte Beantwortung dieser Frage zu unvollständig. Hierzu wären - ebenso wie zu den anderen Aspekten der enzymatischen Nitrilverseifung - weitere vertiefende Untersuchungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden konnten.

2.3 Aufarbeitung von pflanzlichen Oxynitrilasen

Neben der schon erwähnten Oxynitrilase aus *Prunus amygdalus* wurde noch die Oxynitrilase aus *Sorghum bicolor* aufgereinigt. Diese Oxynitrilase ist im Gegensatz zu dem Enzym aus Mandeln bisher nur unter botanischen Gesichtspunkten untersucht worden (M. K. Seely et al.). Spaltungsversuche verschiedener cyanogener Glycoside führten zu der Annahme, daß dieses Enzym in spezifischer Weise (S)-Cyanhydrine spaltet (Ch. Mao et al.). Durch diese mögliche komplementäre Spezifität der genannten Enzyme zeigten sich diese beiden als besonders prädestiniert für eine Bearbeitung des anstehenden Problems.

Da sich im Verlauf der Untersuchungen dann auch tatsächlich herausstellte, daß mit beiden Enzymen die entgegengesetzten Enantiomeren dargestellt werden können, werden sie im folgenden auch (R)- (aus *P. amygdalus*) und (S)-Oxynitrilase (aus *S. bicolor*) genannt (Enzyme Nomenclature, 1984).

2.3.1 Aufreinigung der Oxynitrilase aus *P. amygdalus*

Die Oxynitrilase aus *P. amygdalus* kann direkt aus Bittermandeln oder, vorteilhafter, aus entfetteter Mandelkleie (Placenta amygdalarum amararum), die bei der Mandelölgewinnung als Preßrückstand anfällt, gewonnen werden (L. Jaenicke et al., 1984a).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym ausschließlich aus Mandelkleie aufgereinigt, die von der Firma Caesar und Loretz (Hilden) bezogen wurde.

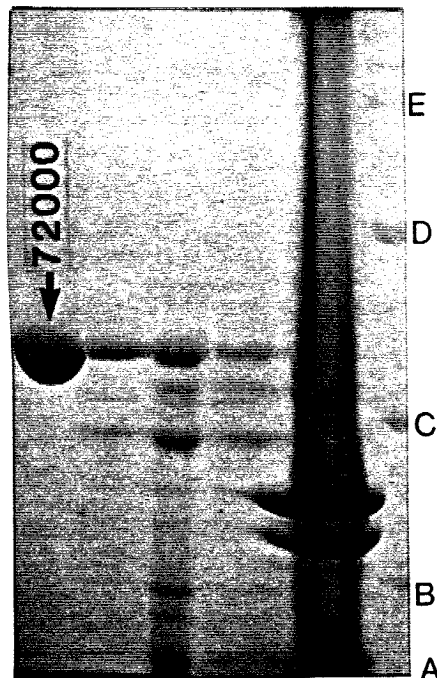
In einer typischen Aufreinigung werden 100 g dieser entfetteten Mandelkleie in 500 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 bei Raumtemperatur suspendiert und 2 Stunden gerührt. Der Überstand wird dann durch Zentrifugation von den festen Bestandteilen abgetrennt.

Der immer noch trübe Überstand wird dann zur Abtrennung von Begleitprotein der Oxynitrilase mit Ammoniumsulfat versetzt: Zuerst gibt man soviel Ammoniumsulfat hinzu, daß die Oxynitri-

lase gerade nicht präzipitiert; das sind 30% der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration. Anschließend trennt man das Sediment ab und erhöht im Überstand die Ammoniumsulfatkonzentration auf 50%, so daß die Oxynitrilase ausfällt. Nach Zentrifugation nimmt man das Sediment mit wenig Phosphatpuffer auf und fügt soviel Ammoniumsulfat hinzu, daß die Oxynitrilase nicht präzipitiert. Dann gibt man die Proteinlösung auf eine mit 50% der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration äquilibrierte Sepharose-4B-Säule. Dabei fällt das Protein im oberen Teil der Säule auf der Gelmatrix aus. Man chromatographiert mit einem linear fallenden Ammoniumsulfatgradienten von 45% bis 0%; hierbei werden die Proteine sukzessive gelöst (Scopes). Die Oxynitrilase eluiert bei ca. 35% der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration. Fraktionen mit akzeptabler spezifischer Aktivität werden vereinigt und durch Ultrafiltration mit einer YM-30-Membran von der Firma Amicon entsalzt und aufkonzentriert. Diese Lösung wird dann durch eine Gelchromatographie an einer Ultra-Gel-Säule AC 54 der Firma LKB fraktioniert. Die hierbei erhaltenen aktiven Fraktionen besaßen für den Spalttest bei pH 3,75 eine spezifische Aktivität von 67,3 U/mg und waren nach elektrophoretischen Untersuchungen nahezu einheitlich.

Abbildung 2.9: Elektrophorese

- 1) Gelchromatographie
- 2) Aussalzchromatographie
- 3) 50%ige Ammoniumsulfatfällung
- 4) 30%ige Ammoniumsulfatfällung
- 5) Rohextrakt
- 6) Eichproteine
 - A) 20100 Da
 - B) 36500 Da
 - C) 55400 Da
 - D) 97000 Da



1) 2) 3) 4) 5) 6)

Prozedur	Volumen (ml)	U (Gesamt)	Units/ml	Protein (mg/ml)	U (spezifisch)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Extraktion	428	1670	3,9	2,10	1,85		
1. (NH ₄)SO ₄ - Fällung 30%	454	1635	3,6	1,71	2,10	98	1,2
2. (NH ₄)SO ₄ - Fällung 60%	63	1564	24,8	3,08	3,08	93,5	1,63
Aussalz- chromatographie	20	1398	69,9	4,75	14,7	83,7	7,95
Gel- chromatographie	50	1284	25,7	0,38	67,3	76,9	36,4

Tabelle 2.2: Aufreinigung der (R)-Oxynitrilase

2.3.2 Aufreinigung der Oxynitrilase aus *S. bicolor*

Die Aufreinigung der Oxynitrilase aus *S. bicolor* erfolgte nach ähnlichem Schema wie die der Oxynitrilase aus *P. amygdalus*. Anders jedoch als bei den Mandeln befindet sich die Enzymaktivität hier nicht im Samen, sondern in den jungen Keimlingen.

Ausgangspunkt für die Enzymproduktion waren deshalb 5 Tage alte Pflänzchen, die unter ethiolierten Bedingungen bei 28°C gezogen wurden. Aus 100 g Samen der Firma Agrisaaten (Rellingen bei Hamburg), die auf Vermiculite ohne jegliche weiteren Wachstumsstoffe kultiviert wurden, erhielt man in der angegebenen Zeit ca. 1200 g Biomasse.

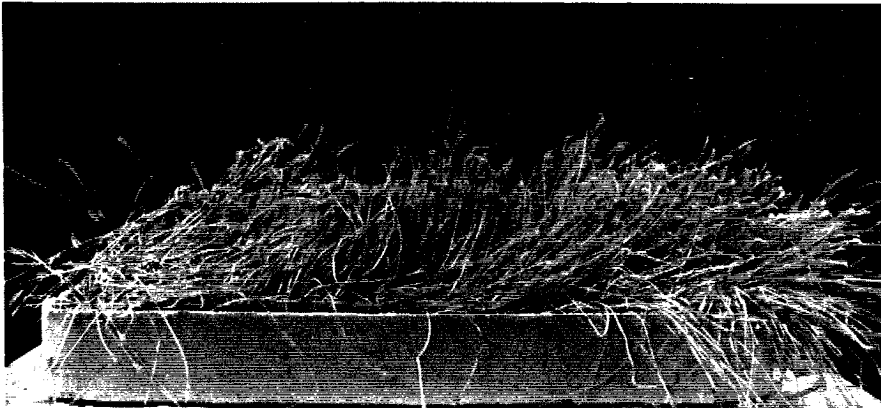


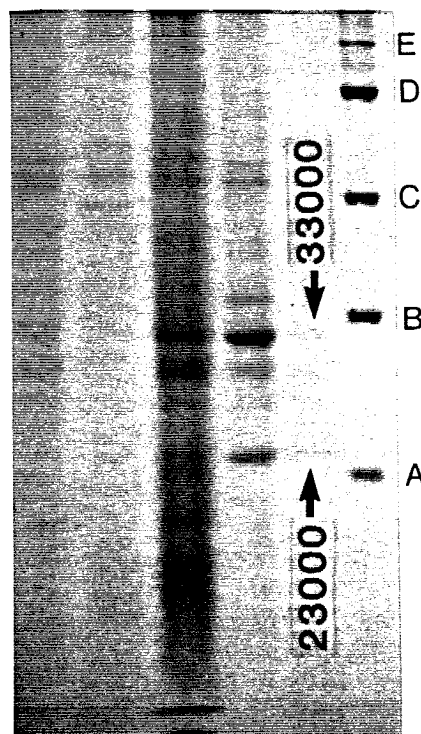
Abbildung 2.10: 5 Tage alte Pflanzen *S. bicolor*
(aus 100 g Samen)

Nach der Ernte der Pflanzen wurden sie mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in diesem Zustand gemörsert. Anschließend wurden die zermörserten Pflanzen in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 suspendiert, mit einem Ultraturrax noch weiter homogenisiert und dann bei Raumtemperatur ca. 6 Stunden lang gerührt.

Anschließend wurde der Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit Ammoniumsulfat bis zur 40%igen Sättigung versetzt. Nachdem das ausgefallene Begleitprotein durch Zentrifugation abgetrennt worden war, erhöhte man im Überstand die Ammoniumsulfatkonzentration auf 60% der Ammoniumsulfatsättigung, so daß die Oxynitrilase präzipitierte. Das Sediment wurde abgetrennt, mit wenig Puffer aufgelöst und mit gerade soviel Ammoniumsulfat versetzt, daß die Oxynitrilase nicht ausfällt. Daran schloß sich, wie bei der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* beschrieben, eine Aufreinigung der Proteinlösung durch Aussalz- und Gelchromatographie an. Auf eine mit 60% der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration äquilibrierte Sepharose-4B-Säule trug man die Lösung auf und chromatographierte mit einem linear fallenden Ammoniumsulfatgradienten von 50% bis 0%. Bei ca. 35% eluierte die Oxynitrilase. Die Fraktionen mit genügend hoher spezifischer Aktivität wurden vereinigt und mit einer YM-10-Membran von der Firma Amicon aufkonzentriert und entsalzt. Die sich hieran anschließende Gelchromatographie an einer S-200-HR-Säule wurde dann mit 10 ml der erhaltenen Proteinlösung unternommen.

Abbildung 2.11: Elektrophorese

- 1) Rohextrakt
- 2) 40%ige Ammoniumsulfatfällung
- 3) 60%ige Ammoniumsulfatfällung
- 4) Aussalzchromatographie
- 5) Gelchromatographie
- 6) Eichproteine
 - A) 20100 Da
 - B) 36500 Da
 - C) 55400 Da
 - D) 97400 Da
 - E) 340000 Da



1) 2) 3) 4) 5) 6)

Prozedur	Volumen (ml)	U (Gesamt)	Units/ml	Protein (mg/ml)	U (spezifisch)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Extraktion	1800	4800	2,6	2,2	2,2		
1. (NH ₄)SO ₄ - Fällung 30%	1920	4635	2,4	0,48	5,02	96,5	2,48
2. (NH ₄)SO ₄ - Fällung 60%	78	4357	55,8	1,31	42,6	90,7	19,36
Aussalz- chromatographie	94	3093	33,5	0,627	52,6	71	23,9
Gel- chromatographie	*		16,1	0,164	97,6	60	44,4

Tabelle 2.3: Aufreinigung der (S)-Oxynitrilase

* Wurde nur im analytischen Maßstab aufgereinigt (insgesamt wurden 5 ml der Proteinlösung, die nach der Aussalzchromatographie erhalten wurden, weiter aufgereinigt).

Das so gereinigte Enzym besaß eine spezifische Aktivität von 97,6 U für den Spalttest bei pH 3,75. Das entspricht einer Aktivität von ca. 190 U bei pH 5,5. Es weist somit die gleiche Qualität auf wie das in der Literatur beschriebene Enzympräparat (M. K. Seely), welches eine spezifische Aktivität von 188 U für den Spalttest bei pH 5,5 besaß.

2.3.3 Proteinchemische Eigenschaften der aufgereinigten Enzyme

Das Molekulargewicht der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* wurde durch SDS-Diskelektrophorese und Gelchromatographie zu 72 kDa bestimmt, das Molekulargewicht der Oxynitrilase aus *S. bicolor* durch Gelchromatographie zu 124 kDa. Anders als bei der Oxynitrilase aus Mandeln scheint dieses Enzym jedoch aus 4 Untereinheiten zu bestehen. Die aufgereinigten und aktiven Fraktionen zeigen nämlich bei der SDS-Diskelektrophorese keine Bande im Bereich von 120 bis 130 kDa, dafür aber zwei Banden mit gleicher Intensität bei 33 und bei 23 kDa.

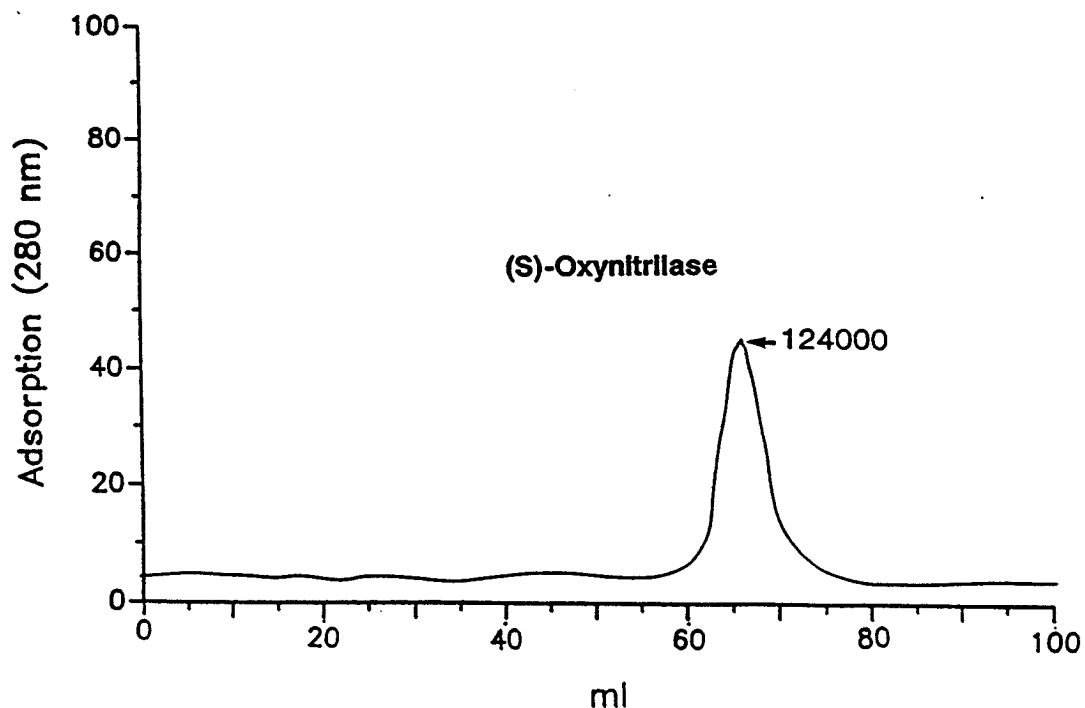


Abbildung 2.12a: Gelchromatographie der (S)-Oxynitrilasen an S-200-HR

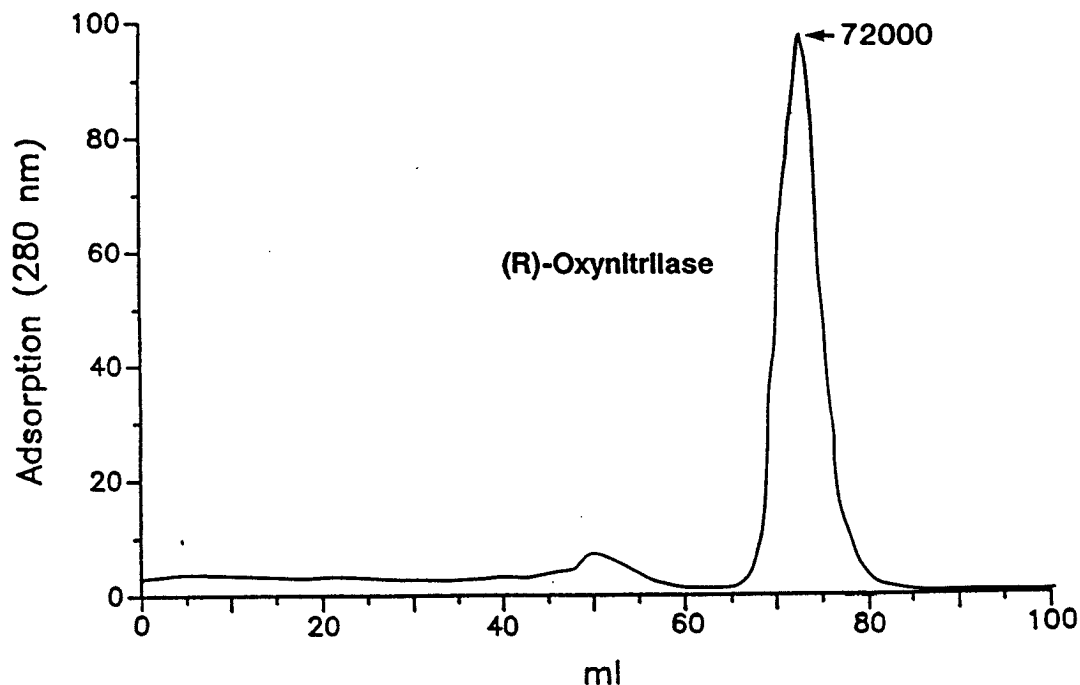


Abbildung 2.12b: Gelchromatographie der (R)- Oxynitrilasen
an S-200-HR

Ein weiterer Unterschied der beiden Enzyme zeigt sich im Adsorptionsspektrum. Die Oxynitrilase aus *P. amygdalus* ist ein Flavoprotein mit Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als prosthetischer Gruppe, gebunden mit einer Stöchiometrie von 1 Mol FAD pro Mol Enzym (W. Becker, 1966b). Im Gegensatz hierzu zeigt das Adsorptionsspektrum der Oxynitrilase aus *S. bicolor* keine Adsorption in diesem Bereich; das Enzym ist also kein Flavoprotein.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, weist das an der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* gebundene FAD, das zur Katalyse essentiell ist (W. Becker, 1966b; M. Jorns), charakteristische Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von gelöstem FAD auf.

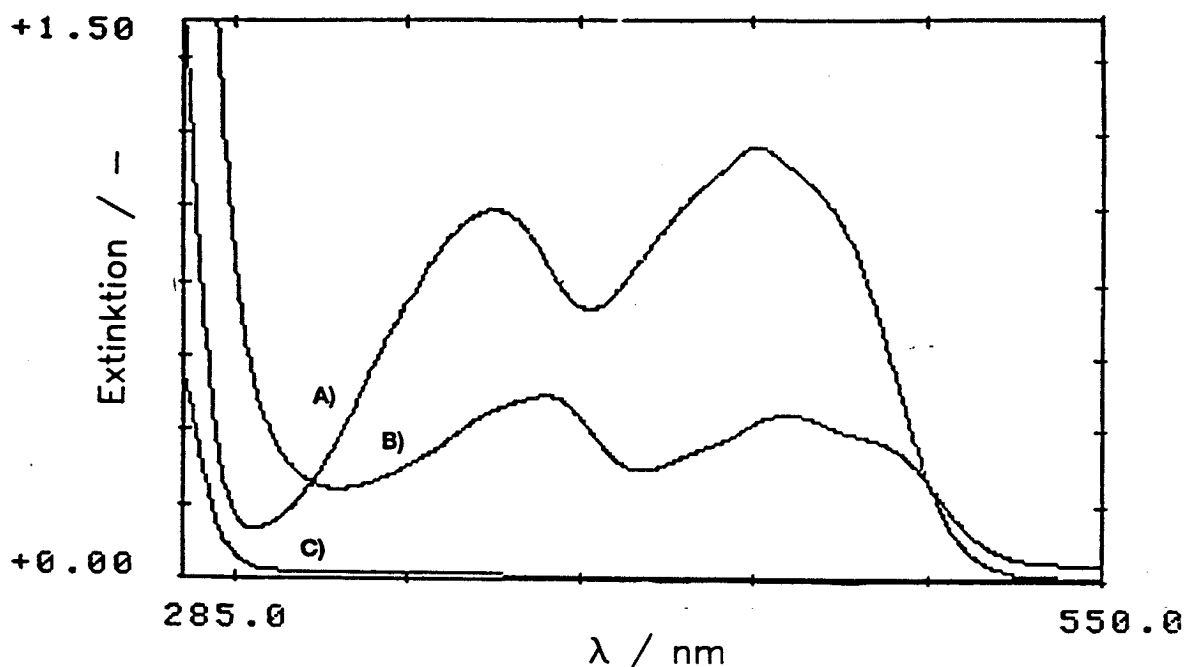


Abbildung 2.13: Adsorptionsspektren in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 3,75, $d = 1$ cm,
 A) freies FAD 0,0102 g/l;
 B) Oxynitrilase aus *P. amygdalus* 1,9 g/l;
 C) Oxynitrilase aus *S. bicolor* 0,627 g/l.

Wie auch bei anderen Flavoproteinen sind die Adsorptionsmaxima gegenüber dem ungebundenen FAD bathochrom verschoben (M. Jorns). Die Maxima des freien FAD's liegen in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 bei 375 und 450 nm, die der Oxynitrilase bei 460 und 390 nm. Außer der Rotverschiebung der Maxima ändert sich auch deren relatives Höhenverhältnis (W. Becker 1966b). Im freien FAD beträgt das Verhältnis der Maxima (E_{375}/E_{450}) 0,83, beim Spektrum der Oxynitrilase jedoch (E_{390}/E_{460}) 1,1.

Weitere Charakteristika beider Enzyme, wie pH- und Temperaturabhängigkeit, Substratspektrum und Enzymstabilitäten, sollen nicht an dieser Stelle diskutiert werden. Sie sind von großer Bedeutung bei der Optimierung des Reaktionssystems und werden deshalb an späterer Stelle ausführlich behandelt.

2.4 Darstellung der racemischen Referenzsubstanzen und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

2.4.1 Darstellung der racemischen Referenzsubstanzen

Sowohl zur kinetischen Untersuchung der Cyanhydrinsynthese als auch zur Erarbeitung einer effektiven Methode, um den Enantiomerenüberschuß zu bestimmen, mußten die nicht käuflichen Cyanhydrine dargestellt werden. Dies waren alle Isomere des Toluolmandelsäurenitrils, das meta-Hydroxymandelsäurenitril sowie das Furfural- und Vanillincyanhydrin.

Bei der Umsetzung von aromatischen Aldehyden mit Cyaniden ist zu beachten, daß neben der gewünschten Cyanhydrinbildung auch eine Benzoinaddition unter dem katalytischen Einfluß des Cyanids erfolgen kann (Houben-Weyl).

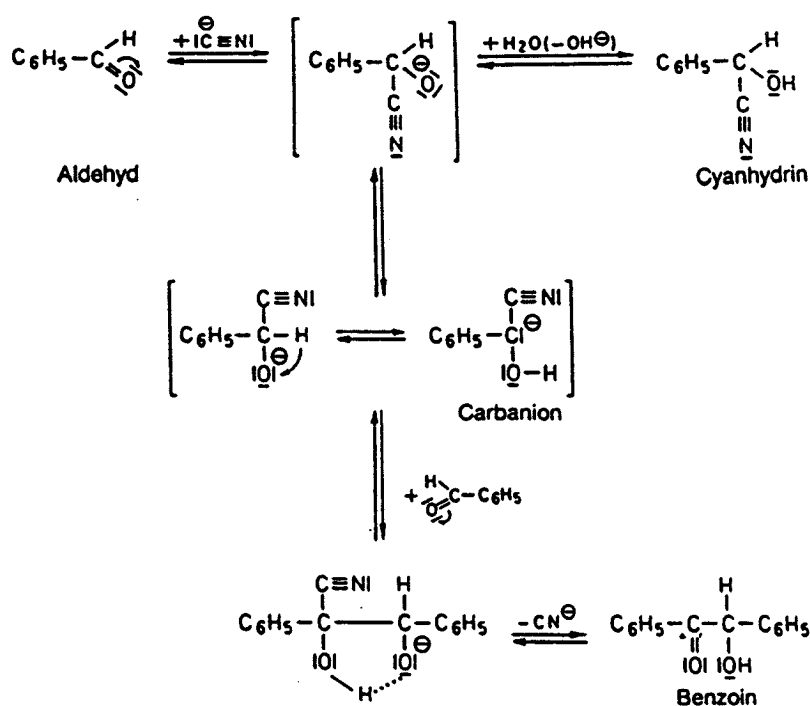


Abbildung 2.14: Mechanismus der Benzoinaddition und der Mandelsäurenitrilbildung

Um diese Nebenreaktion zu unterbinden, wurden die Aldehyde zuerst in die "Hydrogensulfitaddukte" des entsprechenden Aldehyds überführt und dann unter Eiskühlung des Reaktionsansatzes zu einer Kaliumcyanidlösung gegeben (K. Ladenburg). Nach beendeter Reaktion wurden die Produkte mit Ether oder Chloroform extrahiert. Durch Kristallisation aus Ether/Pentan-Gemischen erhält man schließlich die aldehydfreien Cyanhydrine.

Die Reduktion von Cyanhydrinen zu Ethanolaminen ist ebenso wie die Cyanhydrinsynthese eine gängige Standardreaktion (Houben-Weyl).

Eine schonende Methode ist die Reduktion mit Diboran (M.-L. Anhoury). Dieses Verfahren hat außerdem den Vorteil, daß bei der Zersetzung des überschüssigen Reduktionsmittels kein Feststoff entsteht, der durch Filtration abgetrennt werden muß, wie etwa bei der LiAlH_4 -Reduktion (Organikum). Hierdurch wird die Aufarbeitung, besonders von kleinen Mengen, entscheidend vereinfacht.

Die enzymatisch dargestellten chiralen Cyanhydrine wurden nach diesem Verfahren reduziert. Die racemischen Referenzsubstanzen konnten durch Umsetzung mit LiAlH_4 und anschließender Einleitung von trockenem HCl als Hydrochloride aus Diethylether isoliert werden.

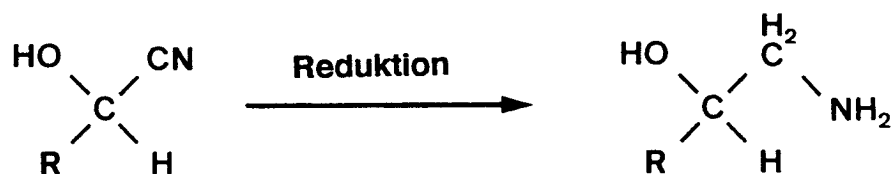


Abbildung 2.15: Reduktion der Cyanhydrine

2.4.2 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

Die optische Reinheit eines Gemisches ist durch das Verhältnis der beiden Enantiomeren zueinander charakterisiert und wird üblicherweise als Enantiomerenüberschuß (enantiomeric excess = ee-Wert) angegeben (R. S. Chan).

$$ee = \frac{E^m - E^n}{E^m + E^n} * 100 \quad (1)$$

Hierbei wird die Konzentration (E^n) des Enantiomeren, das im Unterschuß vorliegt, von der Konzentration (E^m) desjenigen Enantiomeren, das im Überschuß vorliegt, abgezogen (H. B. Kagan).

Eine Bestimmung der ee-Werte über die polarimetrisch bestimmten Drehwerte läßt dabei im allgemeinen keine ausreichend genaue Aussage über die optische Reinheit zu. Insbesondere ist es in den Grenzbereichen, in denen eine kleine Menge des einen Enantiomeren neben einer großen Menge des anderen vorliegt, notwendig, zu einer von den Drehwerten unabhängigen Bestimmung des ee-Wertes zu gelangen (V. Schurig, 1983 und 1984).

Dazu bieten sich besonders chromatographische Methoden an, da man aus den Peakflächen der untersuchten Probe leicht das Enantiomerenverhältnis errechnen kann. Hierzu ist es allerdings notwendig, daß die zu trennenden Enantiomeren mit optisch reinen chiralen Hilfsreagenzien in diastereomere Derivate umgesetzt werden oder daß die Enantiomeren auf einer stationären chiralen Trennphase unterschiedliche Wechselwirkung mit dieser zeigen, so daß eine chromatographische Trennung der optischen Antipoden erfolgt.

Während bei der direkten Trennung der Enantiomeren auf einer chiralen Phase direkt auf den Enantiomerenüberschuß der Substanz geschlossen werden kann, muß man bei der Derivatisierung zu Diastereomeren berücksichtigen, daß eine Racemisierung während der Derivatisierung oder eine kinetische Racematspaltung

bei unvollständigem Umsatz den tatsächlichen Enantiomerenüberschuß in der Probe verfälschen kann. Ein systematischer Fehler kann bei der Derivatisierung auftreten, wenn der chirale Hilfsstoff nicht völlig enantiomerenrein ist oder während der Reaktion racemisiert.

Eine direkte Trennung von racemischen Ethanolaminen auf einer chiralen stationären Phase durch Kapillargaschromatographie ist von H. Frank beschrieben worden (H. Frank et al.). Der chirale Selektand ist L-Valin-tert.-butylamid.

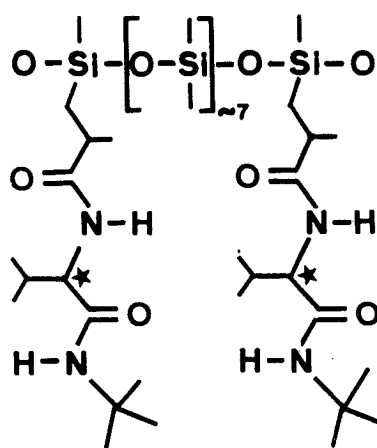
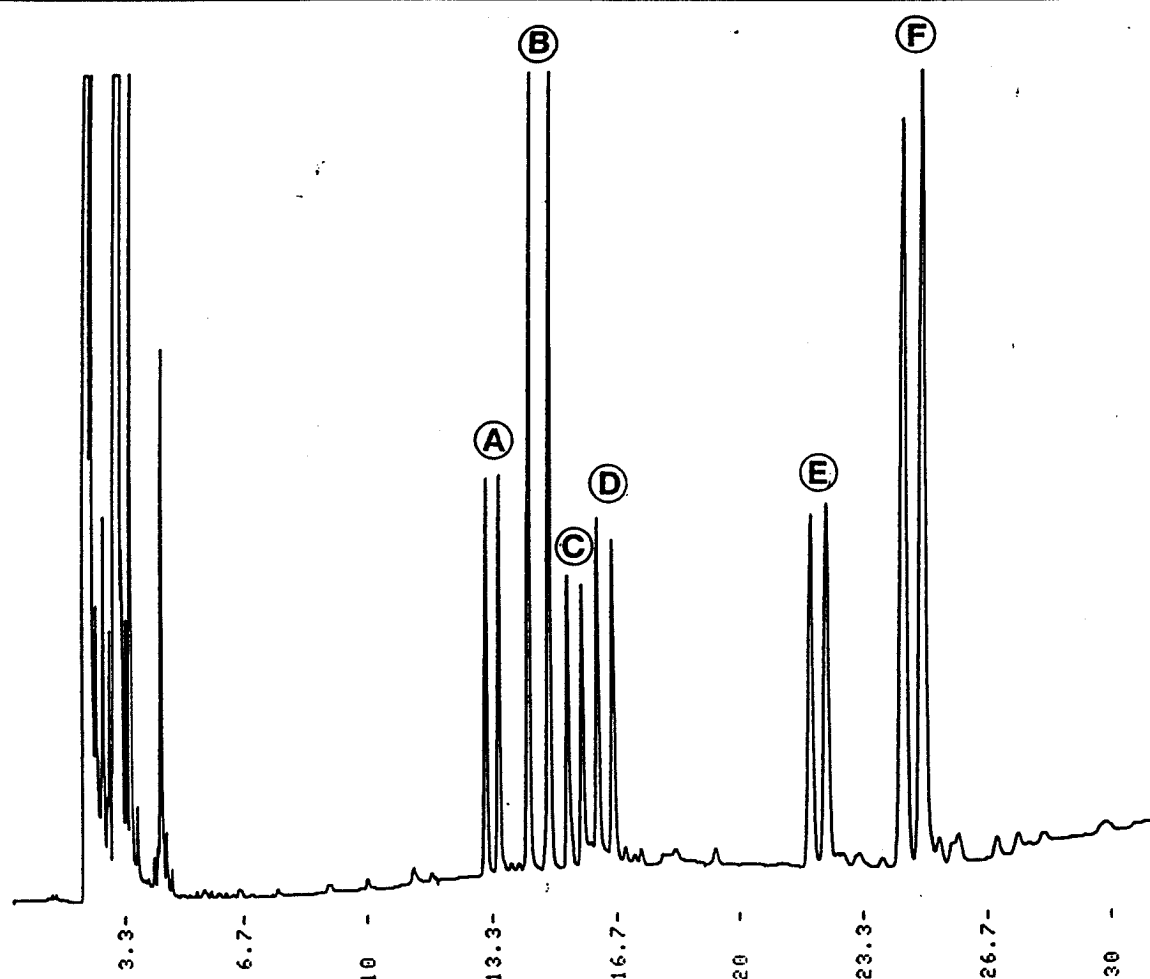


Abbildung 2.16: Struktur von Chirasil-Val

Ethanolamine sind - wie oben beschrieben - leicht durch Reduktion aus Cyanhydrinen zu erhalten, so daß sich diese Methode ideal zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Cyanhydrinen eignet. Zur gaschromatographischen Analyse der Enantiomeren wurden die Ethanolamine mit Pentafluorpropionsäureanhydrid in die leichter flüchtigen N,O-(pentafluorpropionyl)-Derivate überführt. Diese Reaktion wurde nach Literaturvorschriften (B. Koppenhoefer et al.; W. König et al.) bei Raumtemperatur in Methylenchlorid durchgeführt.



- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Ⓐ (R/S)-Mandelsäurenitril | Ⓒ (R/S)-3-Methylmandelsäurenitril | Ⓔ (R/S)-3-Hydroxymandelsäurenitril |
| Ⓑ (R/S)-2-Methylmandelsäurenitril | Ⓓ (R/S)-4-Methylmandelsäurenitril | Ⓕ (R/S)-4-Hydroxymandelsäurenitril |

Abbildung 2.17: Trennung von racemischen Ethanolaminen an Chirasil-Val

Neben der exakten Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung kann auch eine direkte Aussage über die absolute Konfiguration der Enantiomeren gemacht werden. Nach theoretischen und thermodynamischen Untersuchungen (V. Schurig) ist eine stärkere Wechselwirkung des (R)-Enantiomeren mit der stationären Phase möglich. Entsprechend eluiert das (S)- vor dem (R)-Enantiomeren.

Neben der im Chromatogramm ersichtlichen Trennung von aromatischen Ethanolamin-Enantiomeren ist auch der ee-Wert von aliphatischen Cyanhydrinen auf diese Weise bestimmbar. Allerdings nimmt die Trennkapazität der Säule mit größer werdendem alipha-

tischem Rest ab. Eine glatte Basislinientrennung erhält man nur noch für die Enantiomerenderivate des Propanalcyanhydrins, noch höhere Aliphaten werden nur unzureichend getrennt. Eine Enantiomerenbestimmung ist für diese Cyanhydrine auf der verwendeten Säule nicht möglich.

Zur Verifizierung der pentafluoracylierten Substanzen wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht. Hierzu wurden die racemischen Referenzsubstanzen auf einem GC-MS-System mit achiraler stationärer Phase (OV 1) analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, daß es sich bei den auf der Chirasil-Val-Säule analysierten Enantiomeren tatsächlich um die vollständig pentafluoracylierten Substanzen handelte. Sowohl für die unsubstituierte Stammverbindung als auch für die Toluol-Analogen ist das M^+ -Fragment im Massenspektrum enthalten. Die hydroxysubstituierten Verbindungen weisen dieses nicht auf, besitzen jedoch auch das typische Fragmentierungsmuster.

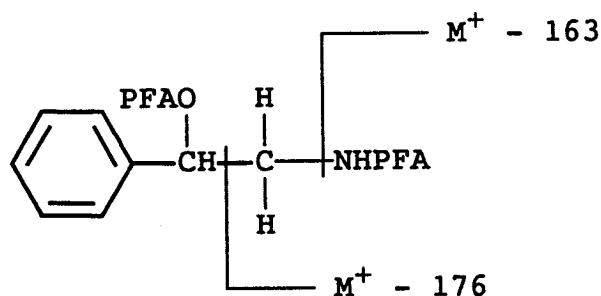


Abbildung 2.18: Fragmentierung von pentafluoracylierten Ethanolaminen

Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit der beschriebenen Fragmentierung von trifluoracylierten Procatechulaminen (M.-T. Wang).

Ebenso wie für einige aliphatische Cyanhydrine ließ sich der $[\alpha]_D^{25}$ -Wert für das Furfuralcyanhydrin nicht nach dieser Methode bestimmen, da bei der Umsetzung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid nur teerartige Produkte erhalten wurden, die eine Analyse nicht ermöglichten.

Die Bestimmung der optischen Reinheit für dieses Cyanhydrin erfolgte nach Umsetzung mit (R)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenyllessigsäurechlorid (Mosher's-Reagenz) in die diastereomeren Ester (J. A. Dale et al.). Diese wurden dann ebenfalls kapillargaschromatographisch analysiert (J. D. Elliot et al., 1983).

2.5 Optimierung des Reaktionssystems

2.5.1 Grundlagen

Zwar führt die enzymatische Reaktion in Gegenwart organischer Lösungsmittel zu optisch hochreinen Cyanhydrinen, doch ist diese Variante nach heutigem Wissensstand in kontinuierlicher Arbeitsweise nicht ökonomisch durchführbar (U. Kragl). Deshalb war es erklärtes Ziel dieser Arbeit, ein wäßriges System zu finden, um dann die Reaktion im Enzym-Membran-Reaktor in kontinuierlicher Arbeitsweise mit den Enzymen ausführen zu können.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist es unbedingt notwendig, ein Reaktionssystem zu finden, in dem die enzymatische Reaktion abläuft, während die spontane Cyanhydrinbildung unterdrückt oder aber neben der enzymatischen Reaktion zu vernachlässigen ist. In den von W. Becker und E. Pfeil etablierten wäßrigen und wäßrig-alkoholischen Systemen mit einem pH zwischen 4,8 und 5,4 ist die spontane Cyanhydrinbildung zwar schon reduziert, jedoch nicht vernachlässigbar, so daß die optische Reinheit verbesserungswürdig ist. Dies gilt insbesondere für nicht-natürliche Substrate, die schlechter enzymatisch umgesetzt werden als die natürlichen Substrate.

Aufschlußreiche Hinweise für die Bearbeitung dieses Problems konnten aus mechanistischen Arbeiten zur Cyanhydrinbildung erhalten werden (H. H. Hustedt, 1961).

Hiernach verläuft die Addition von HCN an Carbonylverbindungen in wäßrigen Solventien unter schwach sauren Bedingungen proportional zu den Substratkonzentrationen gemäß einer chemischen Reaktionskinetik 2. Ordnung. Hierbei wird folgender Reaktionsablauf diskutiert:

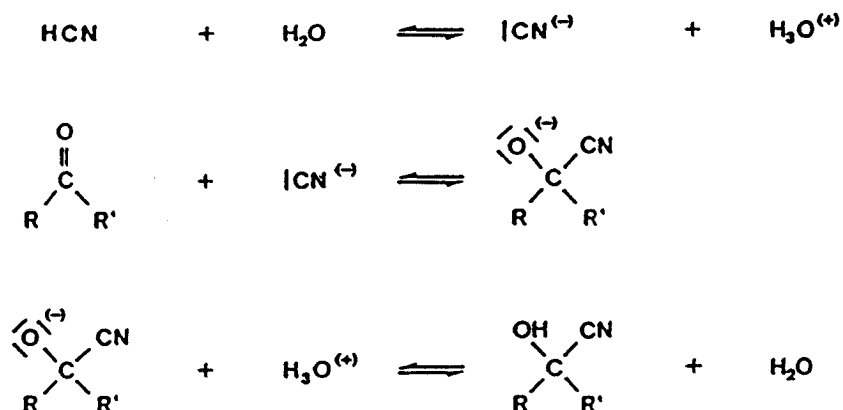


Abbildung 2.19: Reaktionsmechanismus der chemischen Cyanhydrinsynthese

Der nukleophile Angriff auf den positiv polarisierten Carbonylkohlenstoff ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt, während die beiden anderen Schritte schnell erfolgen.

Da die eigentliche Reaktion nicht von der Blausäure, sondern vom Cyanid-Anion ausgeht, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung pH-abhängig. Nach Literaturdaten verläuft die Synthese im schwach sauren Medium am schnellsten, verlangsamt ist sie im acideren Medium und nahezu kein Umsatz ist im alkalischen Bereich feststellbar (H. H. Hustedt, 1961). Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit im sauren Medium mit der Konzentration des Cyanid-Anions ansteigt, zeigt reines Kaliumcyanid - also alkalisches Medium - keinerlei Umsatz. Hierdurch wird deutlich, daß nicht nur die Konzentration der Cyanid-Anionen, sondern auch die Konzentration der Protonen und Hydroxidionen sowie deren Verhältnis zueinander entscheidenden Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausüben.

Der Enantiomerenüberschuß in einer asymmetrischen Cyanhydrinsynthese ist aber nicht allein durch das Verhältnis von asymmetrischer und symmetrischer Reaktion bestimmt, sondern auch durch die in situ stattfindende Racemisierung der gebildeten chiralen Cyanhydrine.

Am asymmetrischen α -Kohlenstoff sind sowohl das direkt gebundene H-Atom als auch das H-Atom der Hydroxylgruppe durch den elektronenziehenden Effekt der Nitrilgruppe acide und somit leicht abspaltbar (A. Nahrstedt, 1973).

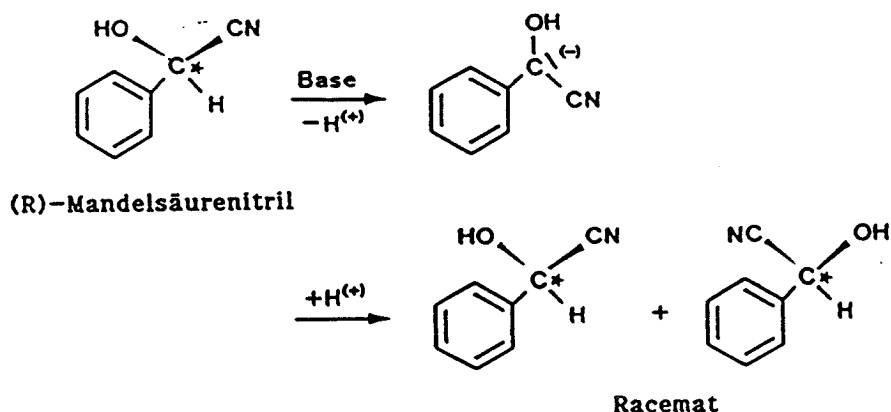


Abbildung 2.20: Mechanismus der Racemisierung von Cyanhydrinen

Im einen Fall kann die Racemisierung dann über die Gleichgewichtseinstellung (Abbildung 2.19) verlaufen. Im anderen Fall - bei der Abspaltung des direkt am Kohlenstoff gebundenen H-Atoms - entsteht ein planares Carbanion, das ebenfalls die chirale Information verliert (Abbildung 2.20).

Einen wesentlichen Einfluß auf die Acidität der beiden H-Atome und die damit verbundene Neigung zur Racemisierung hat die

Struktur der Cyanhydrine. Auch die ^1H -NMR-Spektren von Mandelsäurenitril und Milchsäurenitril in DMSO-d_6 und in $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ verdeutlichen dies. Während bei dem Milchsäurenitril weder das C-H-Proton bei 4,5 ppm noch das Hydroxylproton bei 5,2 ppm nach Zugabe von D_2O austauschen, wird das Hydroxylproton des Mandelsäurenitrils bei 4,8 ppm spontan und vollständig ausgetauscht; das C-H-Proton bleibt, wie bei dem Milchsäurenitril, unausgetauscht. Dies ist ein deutlicher Hinweis, daß das Hydroxylproton im Mandelsäurenitril acider ist als im Milchsäurenitril und daß damit auch die Neigung zur Racemisierung größer ist.

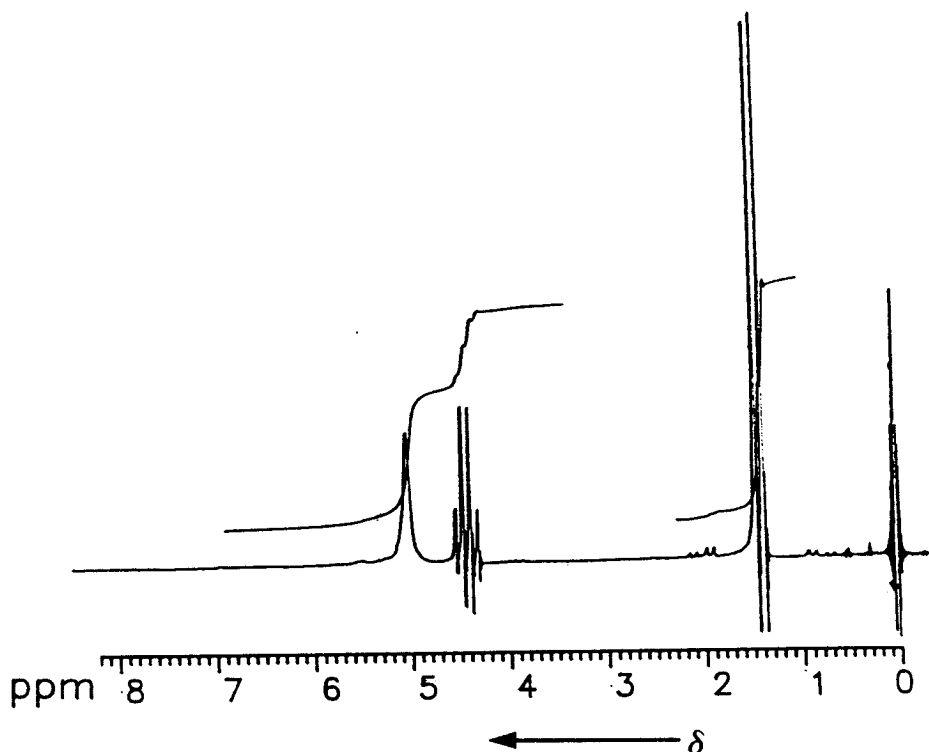


Abbildung 2.21: ^1H -NMR-Spektrum von Milchsäurenitril in DMSO-d_6 mit D_2O

Sowohl die spontane Cyanhydrinbildung als auch die Racemisierung sind - wie die mechanistischen Untersuchungen zeigen - vom Reaktionsmilieu, insbesondere vom pH-Wert, abhängig. Zur Optimierung des Systems erscheint daher eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit am sinnvollsten. Hierbei ist von besonderem Inter-

esse, wie sich die spezifischen Enzymparameter 'Aktivität' und 'Stabilität' unter den Bedingungen, bei denen weder Racemisierung noch spontane Cyanhydrinbildung eintreten, verhalten. D.h. es ist zu prüfen, ob sich unter diesen Bedingungen die enzymatische Cyanhydrinsynthese ökonomisch durchführen läßt.

2.5.2 Messungen zur pH-Abhängigkeit der enzymatischen und nicht-enzymatischen Cyanhydrinbildung

Erste orientierende Messungen wurden mit der Oxynitrilase aus *S. bicolor* und dem natürlichen Substrat para-Hydroxybenzaldehyd bei unterschiedlichen pH-Werten und 25°C unternommen. Hierzu wurden 0,96 ml einer 27,5 mM para-Hydroxybenzaldehyd-Lösung in 50 mM Natriumcitratpuffer mit einem pH von 5,25 bis 3,2 mit 20 µl HCN und 20 µl Oxynitrilaselösung versetzt, in eine 1 dm Küvette gefüllt und der Reaktionsverlauf dann mit einem Polari-
meter bei $\lambda=578$ nm verfolgt.

Durch die Abbildung wird deutlich, daß die Enddrehwerte mit zunehmend acideren pH-Werten ansteigen. Während man bei pH 5,25 einen Enddrehwert von -0,058 erhält, beträgt der Drehwert bei pH 4,5 schon -0,110, bei pH 4 dann -0,138, bei pH 3,5 ist er -0,148 und bei pH 3,25 erhält man dann einen Enddrehwert von -0,152. Weiterhin ist ersichtlich, daß die Enddrehwerte der Reaktion in acideren Reaktionsmedien später erreicht werden, dann aber zeitlich stabil sind, im Gegensatz zu denjenigen bei pH 4,5 und 5,25. Diese erreichen ein Maximum und nehmen dann mit der Zeit wieder ab, die chirale Information geht verloren.

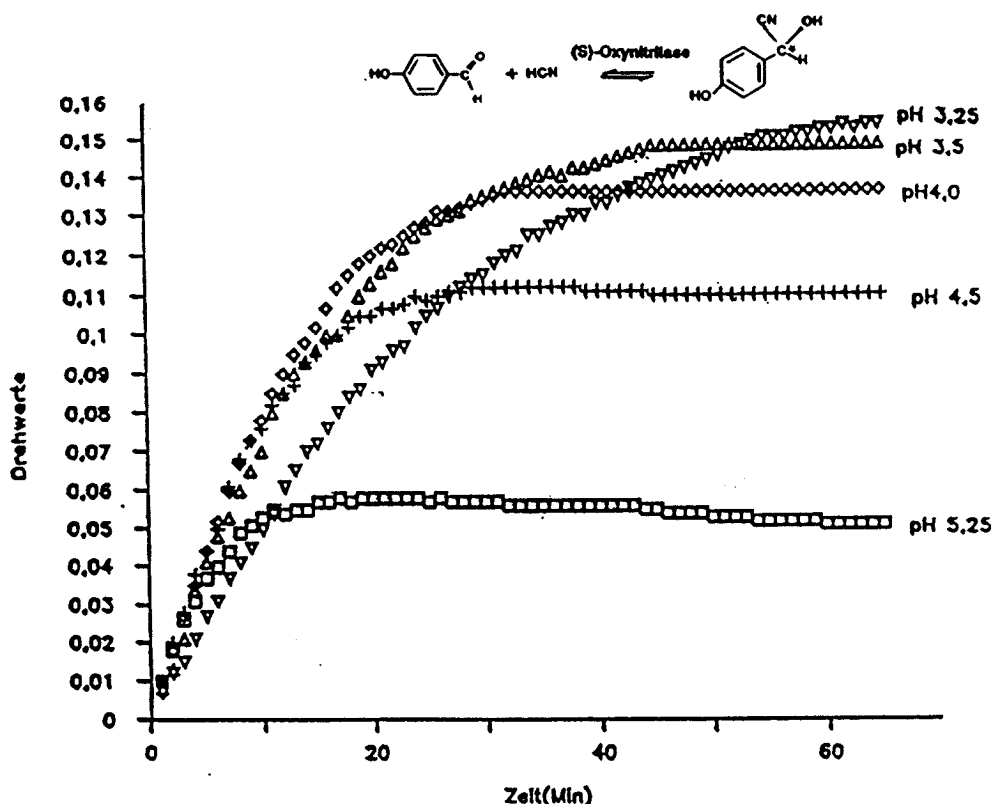


Abbildung 2.22: Polarimetrischer Verlauf der enzymatischen Cyanhydrinsynthese

Dieses Experiment verdeutlicht, daß bei gleicher Katalysatorkonzentration die enzymatische Reaktion gegenüber der spontanen Cyanhydrinbildung zu acideren pH-Bereichen hin zunimmt. Dadurch ist ein deutlich höherer Enantiomerenüberschuß zu erzielen.

Das analoge Experiment mit der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* führte zu ähnlichen Ergebnissen.

pH							
3,00	3,25	3,50	3,75	4,00	4,50	5,00	5,25
ee-Wert							
98,2	97,1	96,0	94,7	93,7	93,2	91,0	82,5

Tabelle 2.4: Abhängigkeit des ee-Wertes vom pH-Wert in der Cyanhydrinsynthese ((R)-Oxynitrilase)

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß es tatsächlich möglich ist, über eine Änderung des pH-Wertes den Anteil der enzymatischen Cyanhydrinsynthese zu erhöhen. Sie zeigen weiterhin, daß die spontane Cyanhydrinbildung - wenn auch wesentlich verlangsamt - in aciden pH-Bereichen dennoch stattfindet. Zu einer weiteren Optimierung des Systems ist es daher erforderlich, genaue Kenntnisse über den jeweiligen Anteil der enzymatischen und der nicht-enzymatischen Reaktion zu erhalten, um dann über eine Variation der Reaktionsparameter, insbesondere pH-Wert, Temperatur, Substrat- und Enzymkonzentration, die Reaktion so zu lenken, daß höchste Enantiomerenüberschüsse und chemische Ausbeuten erhalten werden.

Alternativ zu polarimetrischen Messungen, die im wesentlichen nur die enzymatische Reaktion erfassen, bietet sich zur Messung der Cyanhydrinsynthese die Photometrie an.

Die UV-Spektren der aromatischen Aldehyde sind geprägt durch die Adsorption der $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergänge im Bereich von 250 bis 320 nm. Die entsprechenden Cyanhydrine zeigen in diesem Bereich keine oder wesentlich geringere Adsorptionen. Hierdurch ist es möglich, sowohl die enzymkatalysierte als auch die spontane Cyanhydrinbildung quantitativ über die Konzentrationsänderung des Aldehyds zu bestimmen.

Die Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Aldehyde und Cyanhydrine wurden hierzu in Natriumcitratpuffer nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bei einer geeigneten Wellenlänge bestimmt (s. "Experimenteller Teil"). Eine pH-Abhängigkeit der Extinktionskoeffizienten wurde im Bereich von pH 5,5 bis 2,8 nicht gefunden.

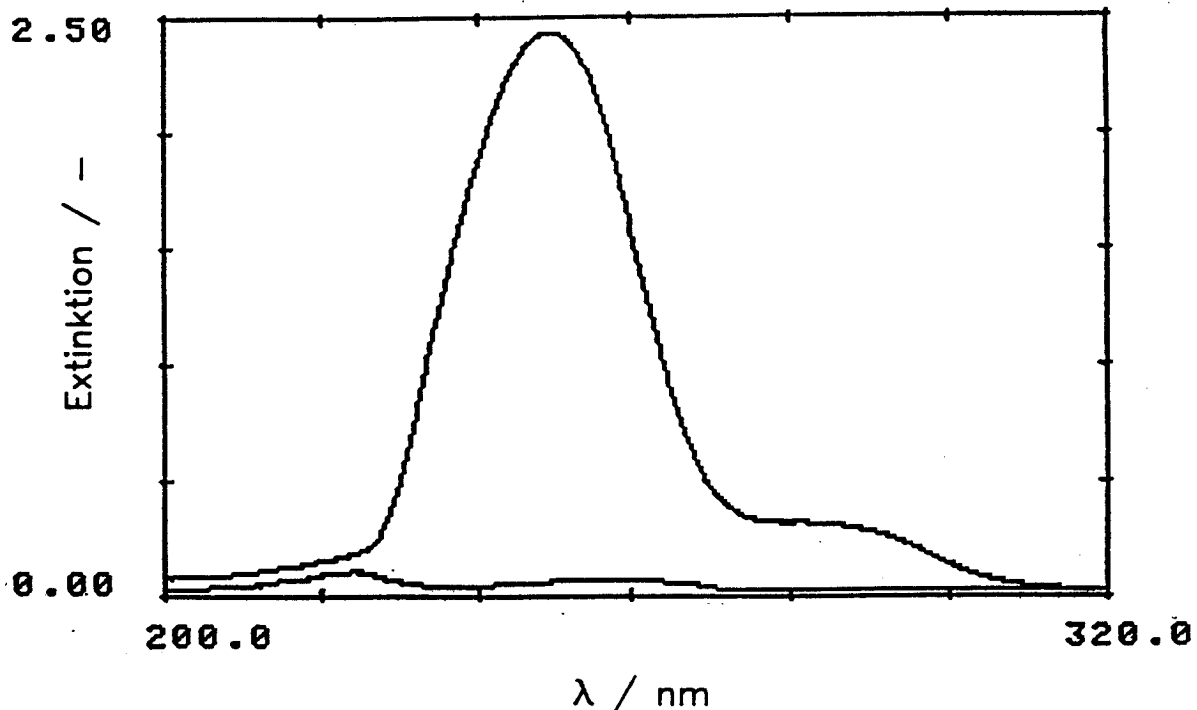


Abbildung 2.23: UV-Spektrum von 2 mM Benzaldehyd und 2 mM Mandelsäurenitril in Natriumcitratpuffer pH 3,75, $d = 1$ cm

Wie die Abbildung verdeutlicht, lässt sich die Mandelsäurenitrilsynthese beispielsweise bei 250 und bei 280 nm photometrisch über die Abnahme der Benzaldehydkonzentration verfolgen.

2.5.3 Bestimmung von kinetischen Konstanten der nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese

Um einen weiteren Einblick in das Reaktionssystem zu bekommen, wurde zunächst die pH-Abhängigkeit der Synthese und der Spaltung von para-Hydroxy- wie auch von Mandelsäurenitril im pH-Bereich zwischen 3,0 und 5,0 untersucht. Hierzu wurden die Aldehyde mit Blausäure versetzt und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten photometrisch, wie oben beschrieben, gemessen.

Unter diesen Synthesebedingungen reagiert der Benzaldehyd deutlich ca. 4mal schneller als das substituierte Analoge. Dieser Effekt spiegelt sich auch bei den unterschiedlichen pH-Werten wieder. Die Mandelsäurenitrilsynthese ist ab dem pH 3,25 nahezu

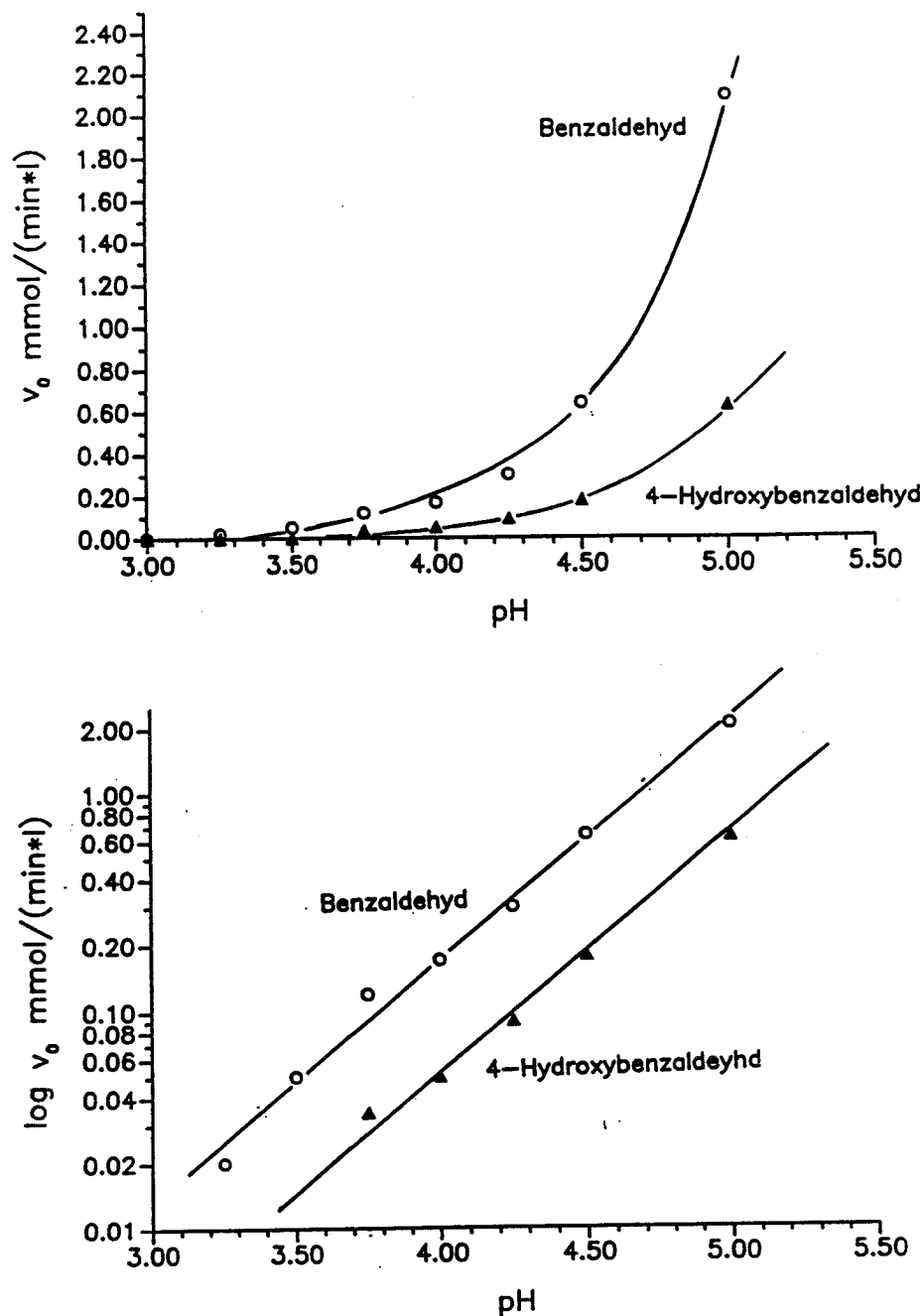


Abbildung 2.24: pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinsynthese

Bedingungen : $45 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ Benzaldehyd,
 $131 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ HCN; 20°C ; $d = 0,02$; 280 nm
 $45 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ para-Hydroxybenzaldehyd,
 $131 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ HCN; 20°C ; $d = 0,02$; 285 nm

vollständig unterdrückt, die para-Hydroxy-Mandelsäurenitril-Bildung bereits beim pH 3,75. Obschon beide deutlich verschiedenen schnell reagieren, zeigen sie die gleiche pH-Abhängigkeit, denn die Bildungsgeschwindigkeit nimmt logarithmisch mit dem pH-Wert ab.

Dieser Effekt kann auch bei der Cyanhydrinspaltung beobachtet werden. Jedoch reagiert hier umgekehrt das para-Hydroxymandelsäurenitril schneller. Prinzipiell ist aber auch bei der Spaltung die gleiche pH-Abhängigkeit wie bei der Synthese zu verzeichnen.

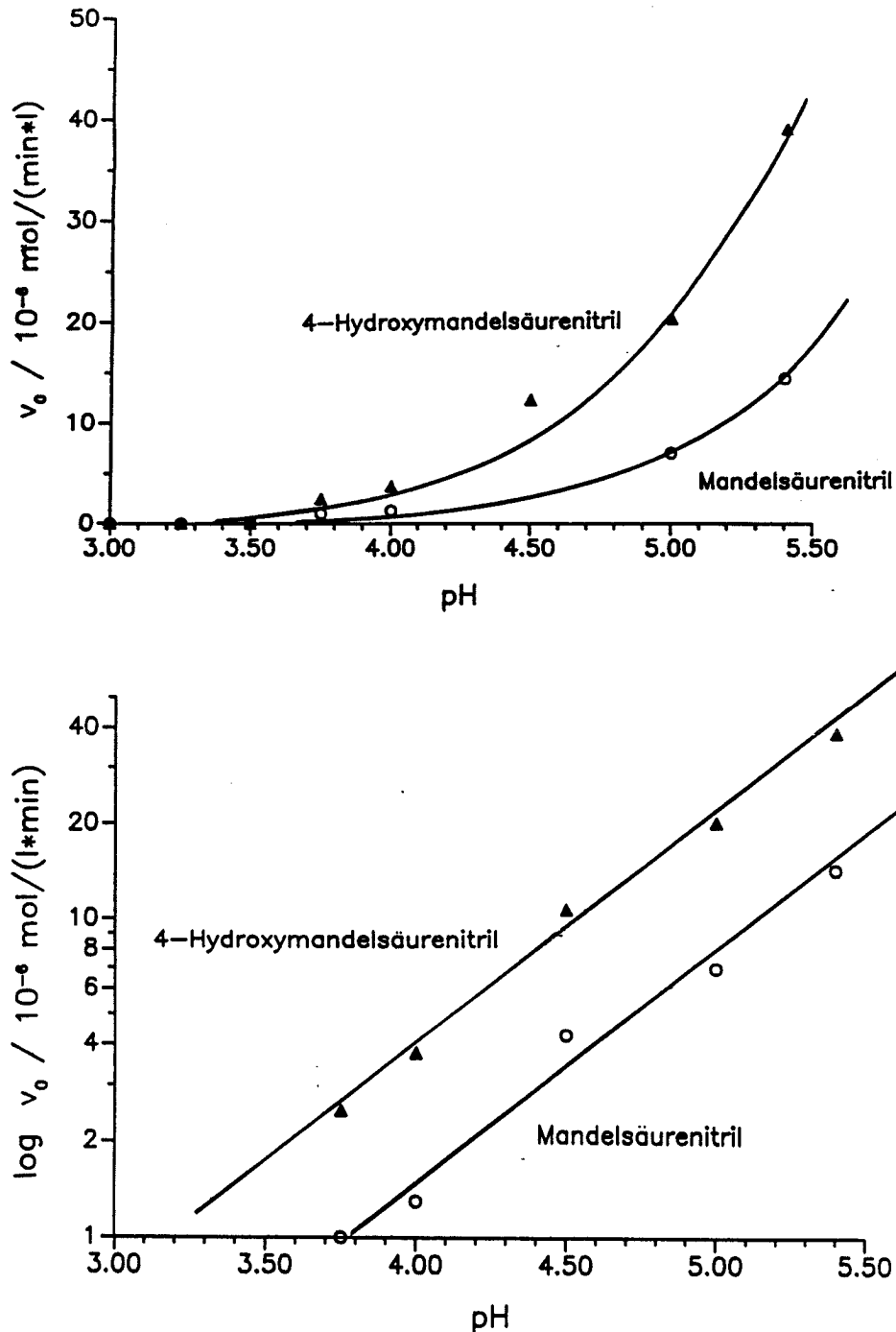


Abbildung 2.25: pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinspaltung in Natriumcitratpuffer bei 20°C

2.5.4 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese

2.5.4.1 Vorbemerkungen

Da es bei diesem Reaktionstyp immer zu einer Konkurrenzreaktion zwischen enzymatischer und spontaner Reaktion kommt, ist es erforderlich, bei einem geeigneten pH-Wert einen möglichst genauen Einblick in die Thermodynamik und Kinetik des Systems zu erhalten.

Hierzu wurde zuerst die nicht-enzymatische Reaktion bei pH 3,75 gemessen. Da die Oxynitrilasen vor allem aromatische Aldehyde umsetzen, wurden von letzteren die kinetischen Daten besonders untersucht.

Vermessen wurden die meta- und para- hydroxy- und methyl-substituierten Benzaldehydderivate sowie der Benzaldehyd selbst.

Diese Messungen wurden ebenso wie die Messungen zur pH-Abhängigkeit photometrisch durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Aldehyde und der entsprechenden Cyanhydrine mußten die Konzentrationen für die einzelnen Meßreihen stark variiert werden. Insbesondere weisen die UV-Spektren der untersuchten parasubstituierten Aldehyde keine Schulter auf wie etwa der Benzaldehyd bei 280 nm (Abbildung 2.23). Somit können diese nur bis maximal 5 mM photometrisch untersucht werden. Wie aus den oben beschriebenen Messungen zur pH-Abhängigkeit hervorgeht, scheint die spontane Cyanhydrinbildung bei dem pH-Wert von 3,75 für den Benzaldehyd hinreichend diskriminiert zu sein. Da dies der Intention entsprach, mußten die Messungen auch unter diesen Bedingungen ausgeführt werden. Diese Limitierung der Aldehydkonzentration führt dazu, daß die Reaktionen nur dann meßbar werden, wenn die Konzentration der Blausäure drastisch erhöht wird. In der Regel mußte die HCN-Konzentration bis zu 1 M erhöht werden.

Hierdurch gewinnt die Dosierung und Handhabung der Blausäurelösung an Bedeutung. 1 ml der zu dosierenden HCN-Stammlösung (12,5 M) enthält ca. das 6fache der toxischen HCN-Menge, die bei etwa 50-70 mg liegt. Dies verlangt besondere Vorsicht und

Aufmerksamkeit bei der Ausführung der Experimente. Alle Experimente wurden deshalb in einem Abzug mit hoher Leistung (1200 m³ Luft pro Stunde) unternommen, bei dem zusätzlich noch an der Frontscheibe eine Gaswarnanlage installiert war, die spezifisch auf Blausäure anspricht. Neben diesem Gefahrenmoment macht die Blausäure aber auch hinsichtlich der genauen Dosierung Probleme. Durch die leichte Flüchtigkeit (Siedepunkt: 26°C) sind Verdampfungsverluste während des Pipettierens nicht zu vermeiden. Zur genauen Bestimmung der Parameter mußte jede Messung mehrmals durchgeführt werden, um die Meßfehler statistisch zu korrigieren.

Die Gesamtanalyse der Ergebnisse zeigt eine gute Übereinstimmung der errechneten und der gemessenen Werte. Es ist also offensichtlich durch die Beachtung der genannten Probleme gelungen, die Messungen hinreichend genau auszuführen.

2.5.4.2 Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinsynthese

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß die Reaktion linear von den Konzentrationen der Reaktanden abhängt, also eine Reaktion 2. Ordnung ist, und sich durch Gleichung (2) beschreiben läßt:

$$v_1 = k_1 * C_{(A)} * C_{(B)} \quad (2)$$

mit: v_1 = Geschwindigkeit der spontanen
Synthese (mol/(l*s))
 k_1 = Geschwindigkeitskonstante (l/(mol*s))
 $C_{(A)}$ = Konzentration des Aldehyds (mol/l)
 $C_{(B)}$ = Konzentration der Blausäure (mol/l)

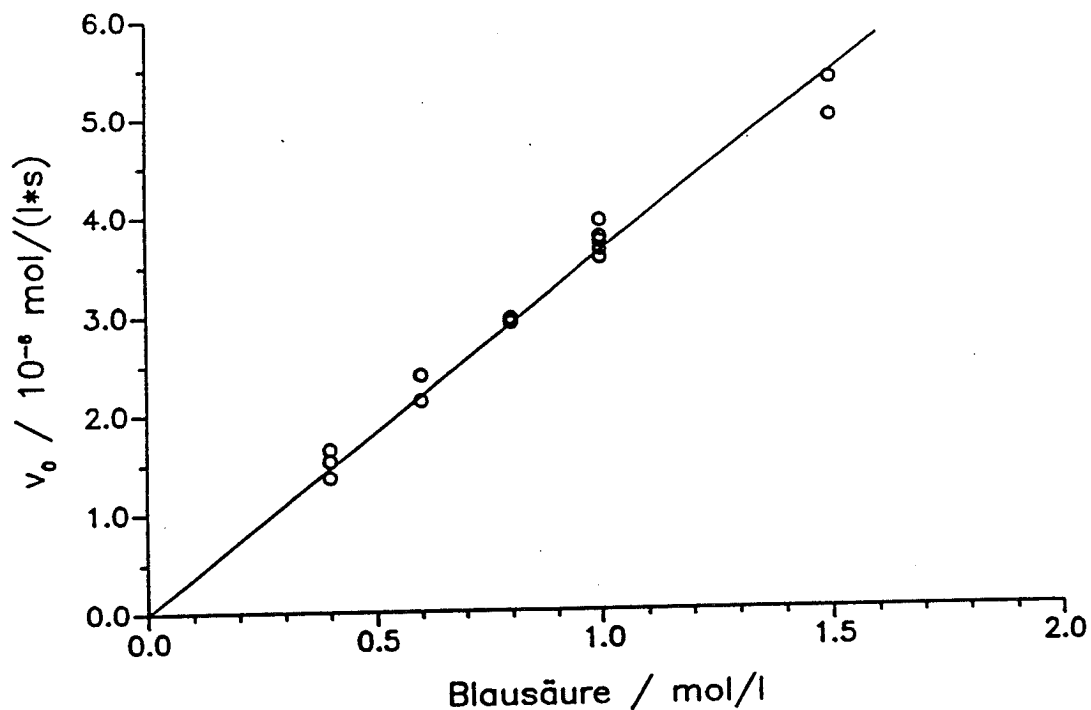


Abbildung 2.26: Abhängigkeit der Mandelsäurenitrilbildung von der HCN-Konzentration in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 und bei 20°C

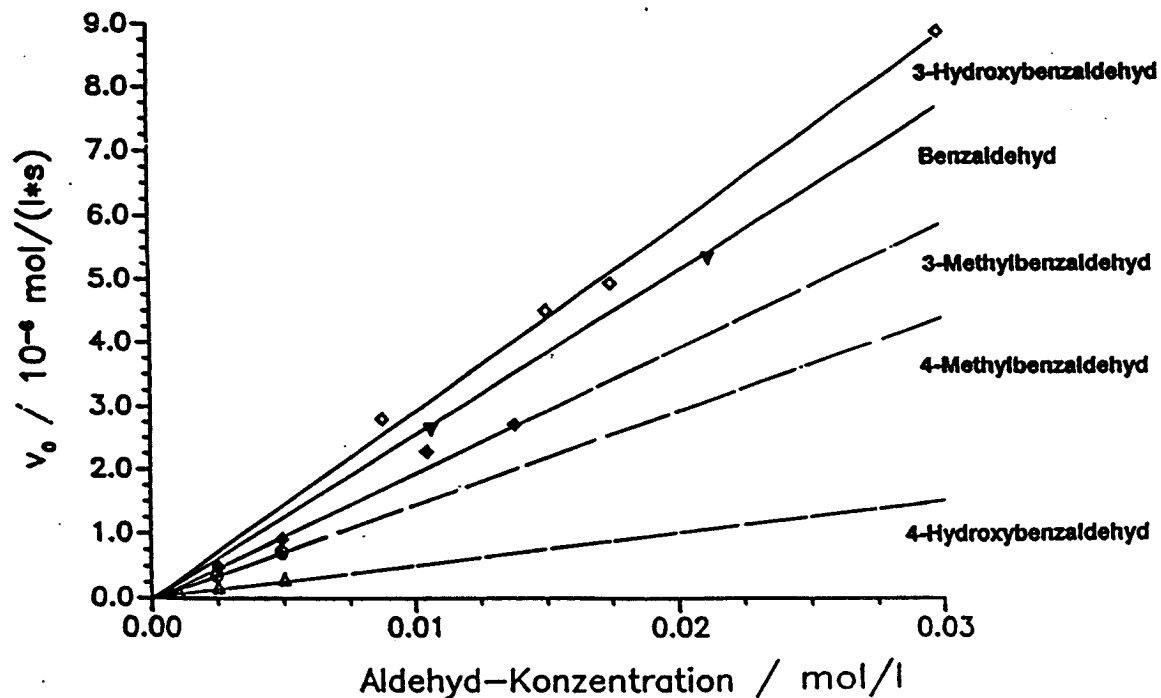
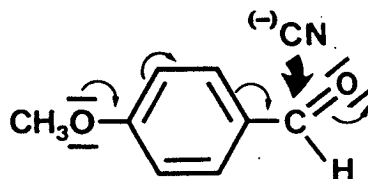


Abbildung 2.27: Abhängigkeit der Cyanhydrinbildung von der Aldehydkonzentration in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 und bei 20°C

2.5.4.3 Quantitative Deutung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Hammett-Beziehung

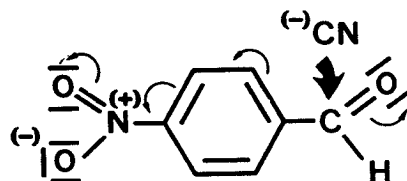
Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber nicht nur von der Konzentration der Reaktanden abhängig, sondern auch in weitem Umfang von der Struktur und dem Substitutionsmuster der Aldehyde. Aldehyde, bei denen Substituenten durch +I-(Induktion)- und/oder +M-(Mesomerie)-Effekte die Elektronendichte am Reaktionszentrum erhöhen, reagieren deutlich langsamer als der Benzaldehyd. Substituenten mit -I- und -M-Effekten erniedrigen die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff; solche Aldehyde reagieren schneller.

z.B.: para-Methoxybenzaldehyd



Substituenten, die einen +I- oder +M-Effekt ausüben, erniedrigen die Reaktivität der Verbindung gegenüber einem nukleophilen Reagenz.

z.B.: para-Nitrobenzaldehyd



Substituenten, die einen -I- oder -M-Effekt ausüben, erhöhen die Reaktivität der Verbindung gegenüber einem nukleophilen Reagenz.

Abbildung 2.28: Substituenteneinfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Dieser Einfluß der Substituenten ist nicht überraschend und auch schon vielfach untersucht. Grundlegend sind hier vor allem die Arbeiten von L. P. Hammett (L. P. Hammett). Besonders untersucht ist die Verseifung verschiedener substituierter

Benzoessäureethylester. Hammett und andere konnten zeigen, daß die Geschwindigkeitskonstanten der Verseifung linear mit den Logarithmen der Dissoziationskonstanten der substituierten Benzoessäuren in Verbindung stehen. Auf Grund dieser und weiterer empirischer Untersuchungen fand man, daß sich nukleophile und elektrophile Reaktionen von meta- und parasubstituierten Benzolderivaten oft quantitativ durch eine Gleichung beschreiben lassen, nämlich die Hammett-Gleichung (L. P. Hammett; H. H. Jaffè, 1953):

$$\log k = \log k^0 + p \cdot \sigma \quad (3)$$

mit: k = Geschwindigkeitskonstante
 k^0 = Geschwindigkeitskonstante für die unsubstituierte Verbindung
 p = Reaktionskonstante
 σ = Substitutionskonstante

Diese Gleichung beschreibt eine Vielzahl von organischen Reaktionen an meta- und parasubstituierten Benzolderivaten und kann außer auf die Geschwindigkeitskonstanten auch auf die Gleichgewichtskonstanten von Reaktionen angewendet werden. Sie besagt, daß die logarithmische relative Geschwindigkeit oder Gleichgewichtslage einer Reaktion - bezogen auf die unsubstituierte Standardverbindung - einem Substitutionsparameter, der Substitutionskonstante σ , und einem Reaktionsparameter, der Reaktionskonstante p , proportional ist. Die Substitutionskonstanten sind Maße für die elektronischen Effekte von Substituenten. Sie geben die Summe ihrer Induktions- und Mesomerieeffekte wieder und erhalten ein positives Vorzeichen, wenn sie das Reaktionszentrum relativ zur unsubstituierten Standardverbindung positivieren, ein negatives Vorzeichen, wenn sie das Reaktionszentrum negativieren. Die σ -Werte selbst sind aus einer Vielzahl von Reaktionsuntersuchungen, insbesondere aus den oben erwähnten Verseifungsreaktionen, empirisch bestimmt worden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Wert einiger Substitutionskonstanten:

Substituent	σ_m	σ_p	Substituent	σ_m	σ_p
CH ₃	-0,07	-0,16	OH	0,13	-0,38
C(CH ₃) ₃	-0,10	-0,20	OCH ₃	0,11	-0,28
C ₆ H ₅	0,06	-0,01	OCOCH ₃	0,39	0,31
CF ₃	0,43	0,54	SH	0,25	0,15
COCH ₃	0,38	0,50	SCH ₃	0,15	0,00
CO ₂ H	0,37	0,45	SO ₂ CH ₃	0,60	0,72
CN	0,61	0,70	F	0,34	0,06
NH ₂	0,00	-0,57	Cl	0,37	0,22
N(CH ₃) ₂	-0,15	-0,63	Br	0,39	0,22
NO ₂	0,71	0,78	I	0,35	0,21

Tabelle 2.5: Ausgewählte Substitutionskonstanten
(aus: N. B. Chapman and J. Shorter, 1978)

Die Hammett-Gleichung ist nicht anwendbar, wenn außer den elektronischen Effekten der Substituenten auch andere, zum Beispiel sterische, auf das Reaktionszentrum einwirken, wie bei ortho-substituierten Benzolderivaten und bei aliphatischen Verbindungen.

Anwendbar ist die Hammett-Gleichung - mit diesen Einschränkungen - zur Voraussage von Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten vieler organischer Reaktionen. Sie ist somit zur Abschätzung von Aktivierungsenergien und freien Enthalpien einer Reaktion geeignet. Denn mit

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

gelangt man über die Kenntnis der Gleichgewichtskonstanten zur freien Standardenthalpie einer Reaktion. Mit der Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten läßt sich analog die Aktivierungsenthalpie einer Reaktion nach folgenden Gleichungen bestimmen:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (5)$$

und

$$k = kT/h * \exp(S /R) \exp(- H/RT) \quad (6)$$

mit:

- k = Boltzmann-Konstante
- h = Planksches Wirkungsquantum
- G = Freie Enthalpie
- H = Enthalpie
- S = Entropie
- T = Temperatur
- R = Allgemeine Gaskonstante

Wenn sich nun ein Reaktionstyp durch diese linearen Beziehungen beschreiben läßt, erhält man auf elegante Weise einen Einblick in den Reaktionsablauf und die thermodynamischen Grundlagen der Reaktion.

Auch die Cyanhydrinsynthese folgt dieser Beziehung. Jedoch lassen sich die vorhandenen Ergebnisse nicht auf das hier anstehende Problem übertragen, da die bekannten Untersuchungen entweder in ungepufferten wäßrigen Lösungen oder in rein organischen Solventien durchgeführt wurden (J. W. Baker and W. L. Bright).

Auch die Interpretation der hier ermittelten Geschwindigkeitskonstanten auf der Basis der Hammett-Gleichung verdeutlicht, daß sich die erhaltenen Werte gut quantitativ erfassen lassen und daß die Reaktivitäten der Aldehyde in der Cyanhydrinsynthese unter diesen Bedingungen in einem linearen logarithmischen Verhältnis zueinander stehen.

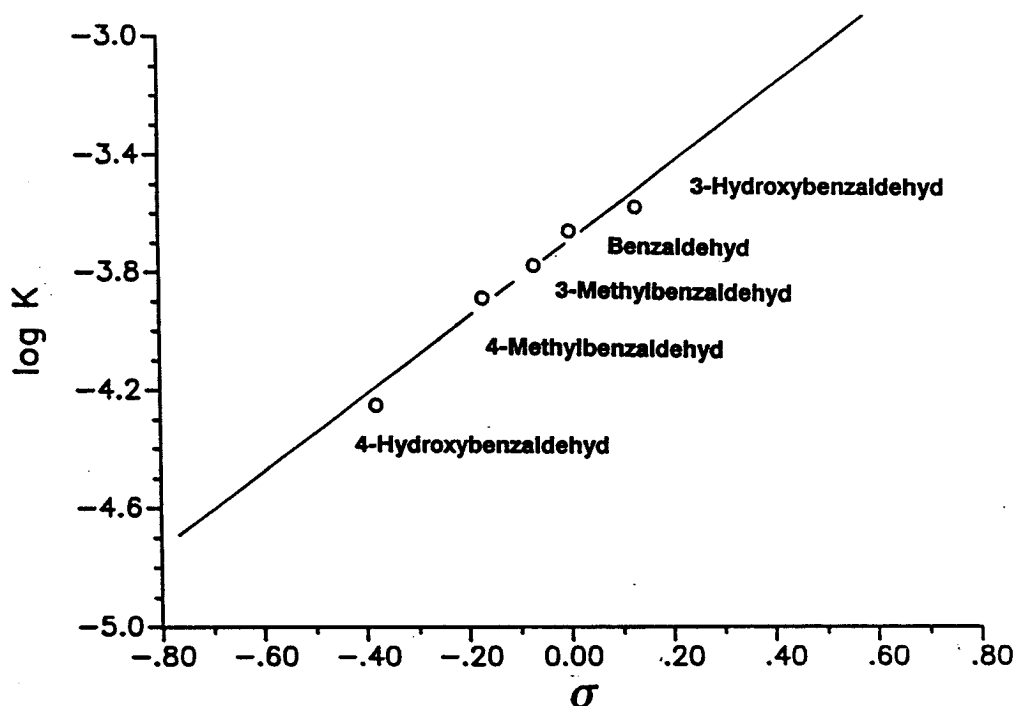


Abbildung 2.29: Lineare Beziehung der Geschwindigkeitskonstanten

In Abbildung 2.29 ist der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen die Substitutionskonstanten (siehe Tabelle 2.5) aufgetragen. Mit der so ermittelten Reaktionskonstanten ρ aus der Steigung der Geraden lassen sich nun die Geschwindigkeitskonstanten von anderen meta- und para-substituierten Aldehyden rechnerisch und graphisch approximieren.

2.5.4.4 pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinsynthese

Mit der linearen logarithmischen pH-Abhängigkeit ist auch eine Aussage über die Geschwindigkeitskonstanten in dem untersuchten pH-Bereich möglich.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die errechneten Geschwindigkeitskonstanten. Die in der Tabelle aufgeführten Werte basieren auf den experimentell bestimmten Konstanten bei pH 3,75. Diese wurden auf die angegebenen pH-Werte umgerechnet. Der jeweilige Faktor ergibt sich dabei aus den in Abbildung 2.24 (Seite 49) angeführten Reaktionsgeschwindigkeiten nach der Beziehung

$$F = \frac{v_O(\text{pH } x)}{v_O(\text{pH } 3,75)} \quad (7)$$

<u>Substituierte Benzaldehydderivate (R =)</u>						
		meta-OH	-H	meta-CH ₃	para-CH ₃	para-OH
pH	Faktor	$k \cdot 10^{-6} \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{s})$				
5,25	10,49	2727	2286	1720	1270	641
5,00	8,28	2154	1806	1358	1052	511
4,50	4,44	1155	986	728	564	269
4,00	1,81	469	393	296	229	108
3,75	1,00	260	218	164	127	61
3,50	0,60	156	131	98	76	37
3,25	0,40	104	87	65	50	24
3,00	0,22	57	47	36	27	13
2,75	0,13	32	27	20	15	6

Tabelle 2.6: Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinbildung in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 bei 20°C

2.5.4.5 Temperaturabhängigkeit der Cyanhydrinsynthese

Bei pH 3,75 wurde auch die Temperaturabhängigkeit der Mandelsäurenitrilsynthese ermittelt. Hierzu wurden die Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und mit Hilfe der Arrhenius-Beziehung ausgewertet.

$$k = k_{\max} * \exp \{-E_a/(R*T)\} \quad (8)$$

mit: k = Geschwindigkeitskonstante (s⁻¹)
 $k_{\max}$ = "Frequenzfaktor" (s⁻¹)
 E_a = Aktivierungsenergie (J/mol)
 R = allgemeine Gaskonstante ((8,314 J/(K*mol))
 T = Temperatur (K)

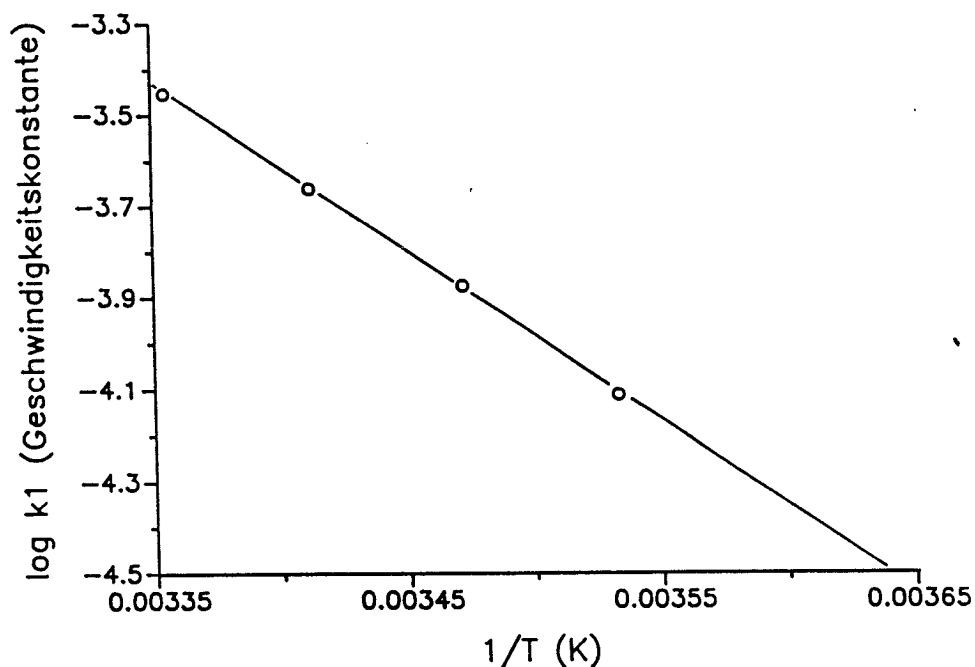


Abbildung 2.30: Temperaturabhängigkeit der Mandelsäurenitrilbildung

Aus der ermittelten Temperaturabhängigkeit errechnet sich eine Aktivierungsenergie von 72,8 kJ/mol für die Mandelsäurenitrilbildung.

Durch die gleichsinnige Reaktivität der Aldehyde kann man davon ausgehen, daß die Temperaturabhängigkeit der anderen Aldehyde, die der Hammett-Beziehung folgen, gleich sein muß. Legt man die Temperaturabhängigkeit der Mandelsäurenitrilbildung zugrunde und berücksichtigt man die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten der Aldehyde bei pH 3,75, so lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten für beliebige Temperaturen und Aldehyde - sofern sie der oben beschriebenen Hammett-Beziehung genügen - nach folgender Gleichung berechnen:

$$\log(k_{T=X}) = K * 1/T + S \quad (9)$$

mit: T = Temperatur (K)

K = Konstante (siehe Text) - 3692,15

S = Summand (siehe Text)

Hierbei ist K die Steigung, die sich aus der Geradengleichung der Temperaturabhängigkeit der Mandelsäurenitrilbildung errechnet (Abbildung 2.30). Sie ist für die untersuchten Aldehyde identisch, da diese die gleiche Temperaturabhängigkeit zeigen müssen. Graphisch zeigt sich das daran, daß bei der Auftragung von $\log k$ gegen die reziproke Temperatur die Kurven parallel verlaufen. Der Summand S berücksichtigt die unterschiedliche Reaktivität der Aldehyde und läßt sich wie folgt berechnen:

$$S = A - \{\log k_{(T20)}(\text{Benzaldehyd}) - \log k_{(T20)}(\text{Aldehyd X})\} \quad (10)$$

Summand	Aldehyd
8,94	Benzaldehyd
9,00	meta-Hydroxybenzaldehyd
8,38	para-Hydroxybenzaldehyd
8,81	meta-Methylbenzaldehyd
8,72	para-Methylbenzaldehyd

Tabelle 2.7: Summanden zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten

Dabei ist der Wert des $\log k_{(T20)}$ für die in der obigen Tabelle aufgeführten Aldehyde experimentell bestimmt. Für andere Aldehyde läßt er sich aus der in Abbildung 2.29 (Seite 58) gezeigten Geraden, die auf der Hammett-Beziehung beruht, ablesen. Die Konstante A, die sich aus der Geradengleichung für die Temperaturabhängigkeit der Mandelsäurenitrilbildung ergibt, hat den Wert 8,93871. Dieser Wert ist aldehydspezifisch. Aufgrund des parallelen Verlaufs der Geraden kann er jedoch aus den experimentell bestimmten Konstanten bei 20°C nach obiger Gleichung für verschiedene Aldehyde berechnet werden.

Einige Geschwindigkeitskonstanten, die auf der Basis der berechneten Temperaturabhängigkeit bestimmt wurden, sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Temperatur (°C)	25	20	10	2,5
Aldehyd	$k_1 \cdot 10^{-6} \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{s})$			
meta-Hydroxybenzaldehyd	421	259	92	41
Benzaldehyd	353	217	77	34
para-Methylbenzaldehyd	265	163	58	25
para-Hydroxybenzaldehyd	100	61	22	9

Tabelle 2.8: Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinsynthese in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 bei 20°C

2.5.5 Thermodynamik und Kinetik der Spaltreaktion

Bei pH 3,75 wurden dann die Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinspaltung bestimmt. Die Spaltreaktion ist allerdings bei diesem pH-Wert schon so weit unterdrückt, daß sie meßtechnisch bei 20°C nicht mehr erfaßbar ist. Deshalb wurden die Geschwindigkeitskonstanten bei höheren Temperaturen bestimmt und die Konstanten für 20°C nach der Arrhenius-Beziehung aus der Temperaturabhängigkeit der Reaktion errechnet. Gemessen

wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Temperaturen und daraus nach folgender Gleichung die Geschwindigkeitskonstante berechnet:

$$v_2 = k_2 C_{\text{(Cyanhydrin)}} \quad (11)$$

mit: v = Reaktionsgeschwindigkeit
 C = Konzentration des Cyanhydrins
 k_2 = Geschwindigkeitskonstante

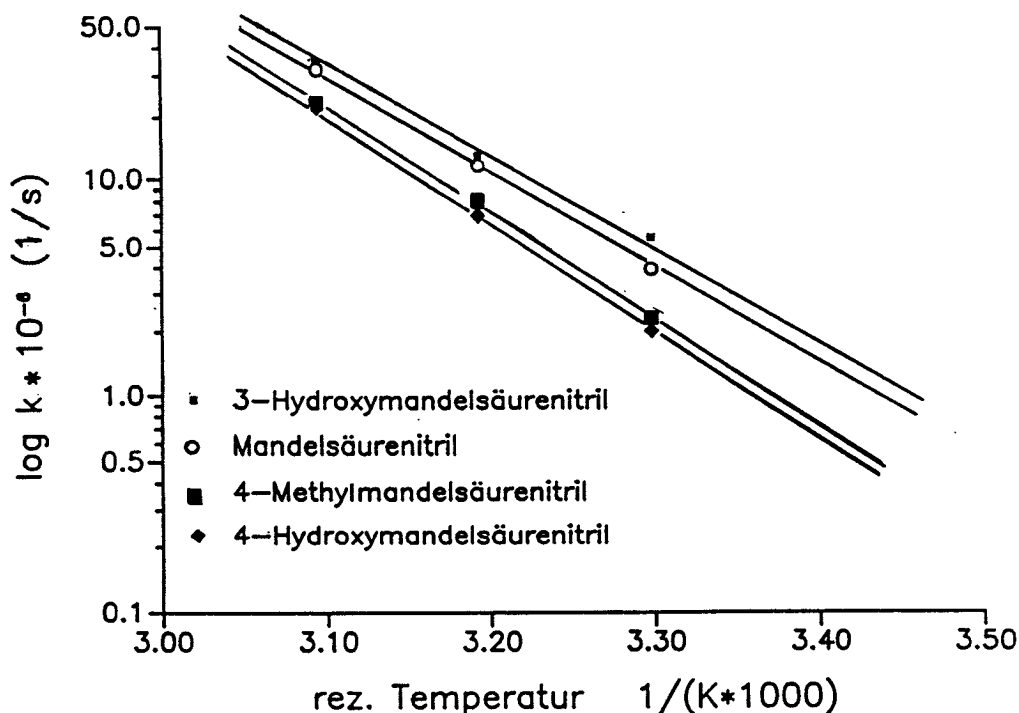


Abbildung 2.31: Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Spaltreaktion gegen die reziproke Temperatur

Während bei der Cyanhydrinbildung die Aldehyde mit größerer positiver Partialladung am Carbonylkohlenstoff eine höhere Affinität gegenüber der Blausäure zeigen, ist bei der Spaltung der gegensätzliche Effekt beobachtbar. Cyanhydrine wie z.B. das para-Hydroxymandelsäurenitril haben eine größere Zerfallskonstante als das Mandelsäurenitril. Die hieraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 2.9 wiedergegeben.

Temperatur (°C):	25	20	10	2,5
k ₂ = Geschwindigkeitskonstante	(l/mol*s*10 ⁻⁶)			
Substituiertes Mandel- säurenitril (R =)				
meta-OH	0,98	0,55	0,15	0,06
-H	1,54	0,84	0,23	0,08
para-CH ₃	2,17	1,20	0,34	0,12
para-OH	3,62	1,99	0,55	0,20

Tabelle 2.9: Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrinspaltung
in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75

Mit der Arrhenius-Beziehung (8) errechnet sich aus den obigen Geschwindigkeitskonstanten für die Mandelsäurenitrilspaltung eine Aktivierungsenergie von 86,9 kJ/mol.

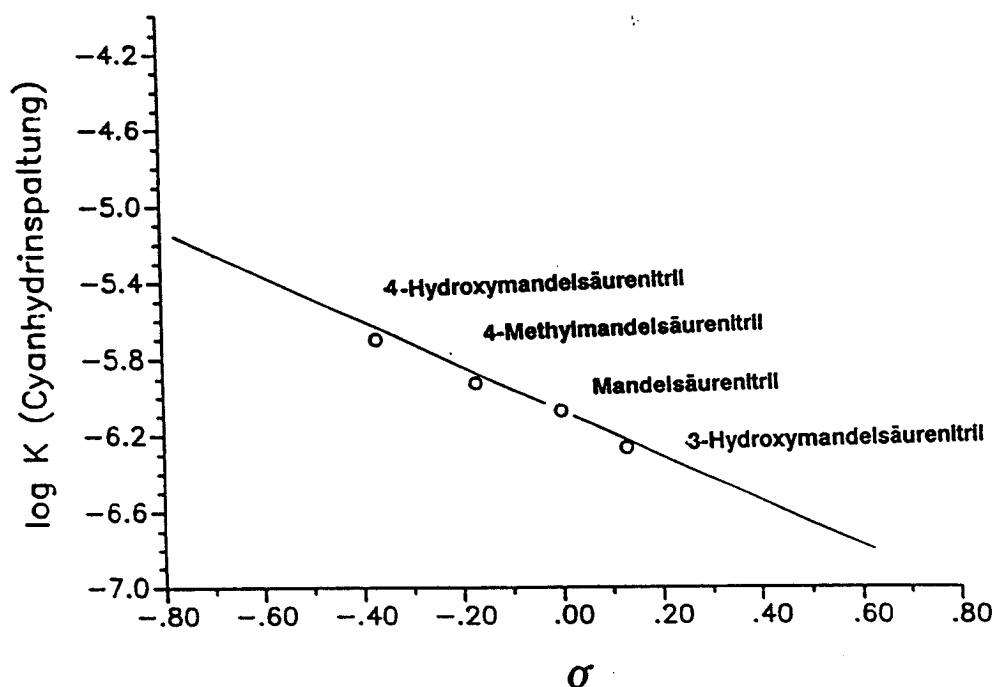


Abbildung 2.32: Lineare Beziehung der Geschwindigkeits-
konstanten

Auch die logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten wurden mit der Hammett-Gleichung untersucht. Wie bei der Cyanhydrinbildung ist auch bei der Spaltreaktion die Linearität mit guter Präzision erfüllt, wie Abbildung 2.32 verdeutlicht.

Deshalb lassen sich auch die Geschwindigkeitskonstanten der Spaltreaktion in dem untersuchten pH-Bereich auf der Grundlage der auf Seite 50 beschriebenen linearen logarithmischen pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten berechnen.

pH	Faktor	Substituiertes Mandelsäurenitril (R =):			
		meta-OH	-H	para-CH ₃	para-OH
		Geschwindigkeitskonstante $k_2 \cdot 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$			
5,25	14,4	7,89	12,05	17,27	28,66
5,00	7,0	3,84	5,86	8,39	13,93
4,50	4,3	2,36	3,60	5,15	8,56
4,00	1,3	0,71	1,09	1,56	2,59
3,75	1,0	0,55	0,84	1,20	1,99

Tabelle 2.10: Geschwindigkeitskonstanten der Cyanhydrin-spaltung in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 bei 20°C

2.5.6 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

Durch die Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten wird es möglich, die Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion zu bestimmen. Denn mit dem Massenwirkungsgesetz folgt:

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{C_P}{C_A \cdot C_B} \quad (12)$$

Wie aus der Tabelle 2.11 ersichtlich, sind die Gleichgewichtskonstanten ebenso wie die Geschwindigkeitskonstanten in weitem Ausmaß von den Substituenten und dem Substitutionsmuster der Aldehyde bzw. des Cyanhydrins abhängig.

Blausäure und Aldehyd	K (l/mol)
meta-Hydroxybenzaldehyd	480
Benzaldehyd	273
para-Methylbenzaldehyd	105
para-Hydroxybenzaldehyd	27,6

Tabelle 2.11: Gleichgewichtskonstanten in der Cyanhydrinsynthese in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 bei 20°C

Cyanhydrine, deren korrespondierende Aldehyde eine geringe Cyanhydrinbildungstendenz besitzen, weisen ihrerseits aber eine zunehmend größer werdende Zerfallskonstante auf, so daß auch die Gleichgewichtskonstante in diesem Maße abnimmt. Erwartungsgemäß folgen deshalb auch die Gleichgewichtskonstanten der Hammett-Beziehung.

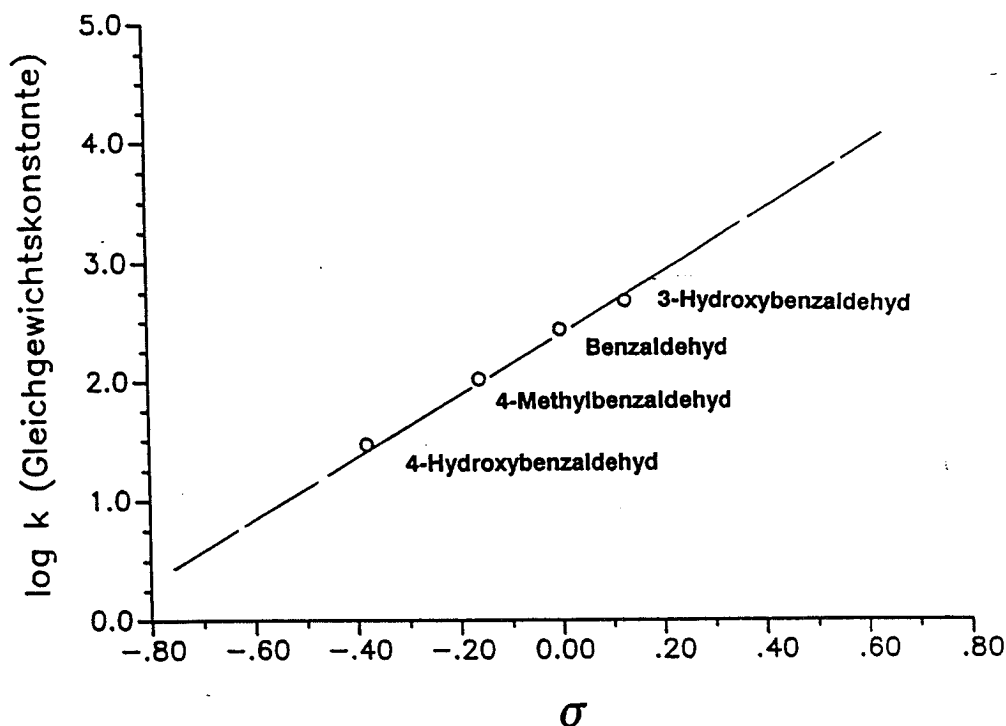


Abbildung 2.33: Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Substitutionskonstanten

Die große Differenz der Gleichgewichtskonstanten ist ein Aspekt, der berücksichtigt werden muß, wenn Aldehyde mit Blausäure umgesetzt werden. Nur mit deren Kenntnis ist es möglich, ein vernünftiges Verhältnis von Aldehyd und HCN zu wählen, so daß hohe chemische Umsätze erreicht werden. Für gleiche Umsätze sind je nach Aldehyd unterschiedliche HCN-Konzentrationen zu wählen.

Die errechneten Umsätze für verschiedene Aldehyde mit gleicher Ausgangskonzentration (50 mM) in Abhängigkeit von der HCN-Konzentration sind in Abbildung 2.34 zu erkennen:

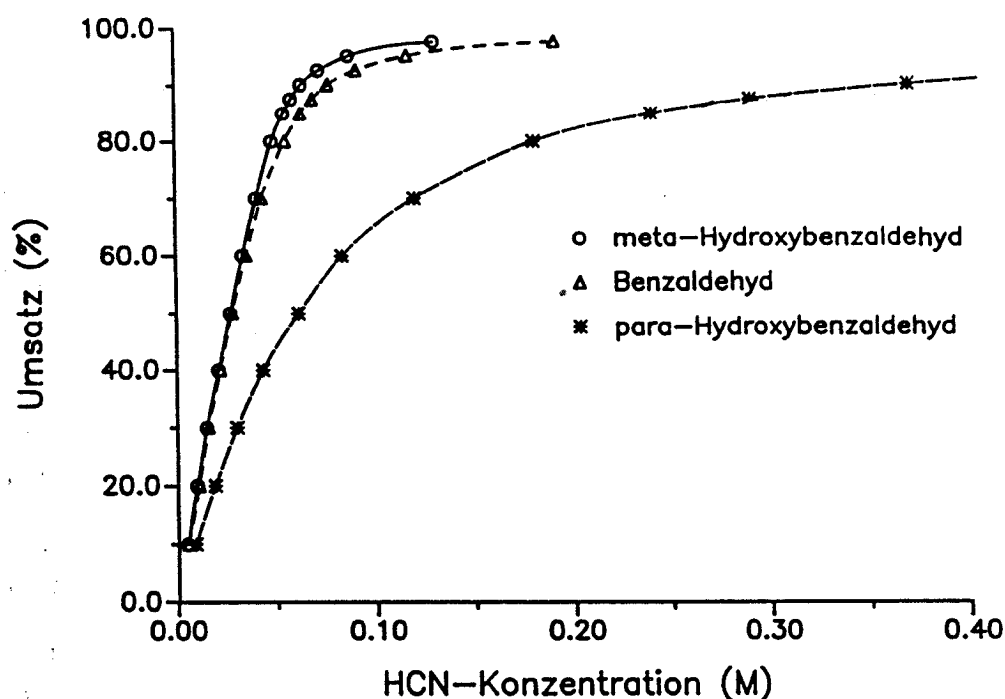


Abbildung 2.34: Reaktionsumsatz in Abhängigkeit von der HCN-Konzentration

Beispielsweise sind für einen 90%igen Umsatz 64 mM HCN nötig, wenn der meta-Hydroxybenzaldehyd umgesetzt wird, 78 mM für den Benzaldehyd und 366 mM HCN, wenn der para-Hydroxybenzaldehyd zu 90% abreagieren soll. Würden alle drei mit 64 mM HCN umgesetzt, erhielte man 90% Umsatz für den meta-Hydroxybenzaldehyd, 86% für den Benzaldehyd und nur 53% Umsatz für den para-Hydroxybenzaldehyd. Diese Beispiele verdeutlichen, wie wichtig es ist, die thermodynamischen und kinetischen Daten zu kennen, um die Reaktion in die gewünschte Richtung lenken zu können.

2.5.7 Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Temperatur

Wie die Geschwindigkeitskonstanten sind auch die Gleichgewichtskonstanten von der Temperatur abhängig. Die Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie und damit der Gleichgewichtskonstanten beschreibt die van't Hoffsche-Reaktionsisobare:

$$\frac{\delta \ln K}{\delta T} = \frac{\Delta H^{\circ}}{RT^2} \quad (13)$$

Die Gleichung zeigt, daß die Gleichgewichtskonstante mit wachsender Temperatur bei exothermen Reaktionen abnimmt, bei endothermen Reaktionen hingegen zunimmt.

Die Cyanhydrinsynthese ist eine exotherme Reaktion, also sollten die Gleichgewichtskonstanten zu tieferen Temperaturen hin zunehmen. Berechnet man auf der Basis der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene Temperaturen die Gleichgewichtskonstanten, erhält man folgende Ergebnisse:

	Substituierter Benzaldehyd (R =)			
	R= meta-OH	-H	meta-CH ₃	para-OH
Temperatur (°C)	Gleichgewichtskonstante K (l/mol)			
25,0	426	230	94	27,7
20,0	480	273	105	31,2
10,0	618	334	132	40,2
2,5	756	408	151	49,4

Tabelle 2.12: Gleichgewichtskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75

Diese Werte stimmen in guter Näherung mit den erhaltenen chemischen Umsätzen der enzymatischen Synthesen (Kap. 2.11) überein. Darüber hinaus wurden diese errechneten Werte nochmals für den para-Hydroxybenzaldehyd experimentell verifiziert. Da die spontane Cyanhydrinbildung und Gleichgewichtseinstellung unter diesen Bedingungen nur sehr langsam verläuft und möglicherweise durch Verdunsten der Blausäure die Ergebnisse verfälscht werden könnten, wurden die Ansätze mit Oxynitrilase aus *S. bicolor* versetzt, so daß sich das Gleichgewicht innerhalb weniger Minuten einstellte.

Der Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt: Para-Hydroxybenzaldehyd mit einer Endkonzentration von 18,2 mM und HCN mit 182 mM Endkonzentration wurden bei pH 3,75 mit Oxynitrilase versetzt. Anschließend wurde der Ansatz in einer gekühlten Küvette bei 2,5°C in einem Photometer bei 284 nm verfolgt. Nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung (konstante Absorption) wurde der Ansatz in der Küvette zuerst auf 10°C, dann auf 20°C und schließlich wieder über 10°C auf 2,5°C temperiert. Aus den erhaltenen Absorptionswerten errechnen sich über die Konzentrationsänderung des Aldehyds die Gleichgewichtskonstanten von 49,6 bei 2,5°C, 35,2 bei 10°C und 26,6 für 20°C. Diese Werte stimmen mit erstaunlicher Genauigkeit mit den berechneten Konstanten in Tabelle 2.12 überein.

Dieser Temperatureinfluß auf die Gleichgewichtskonstante ist besonders für diejenigen Cyanhydrinsynthesen von Interesse, bei denen das Gleichgewicht weniger auf seiten der Produkte liegt, wie zum Beispiel bei dem para-Hydroxymandelsäurenitril. Bei diesen Synthesen ist es möglich, durch Temperaturreduktion die notwendige Konzentration der Blausäure für einen gegebenen Umsatz drastisch zu verringern. Zum Beispiel benötigt man für einen 90%igen Umsatz einer 50 mM para-Hydroxybenzaldehyd-Lösung 366 mM HCN bei 20°C, 300 mM bei 10°C und schließlich nur noch 226 mM HCN für 2,5°C.

Dieser Temperatureinfluß ist aus mehreren Gründen beachtenswert. Zum einen ist natürlich die spontane Reaktion bei tieferen Temperaturen verringert. Zum anderen benötigt man für gleiche Umsätze bei tieferen Temperaturen eine geringere HCN-Konzentration. Dadurch könnte die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte wesentlich vereinfacht werden, da weniger von der toxischen Blausäure aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden müßte.

2.5.8 Einfluß der Konzentrationen auf den Gleichgewichtsumsatz

Ein gewisser Nachteil der Cyanhydrinsynthese im wäßrigen Medium ist die begrenzte Löslichkeit der Substrate, insbesondere der aromatischen Aldehyde. Dies hat zur Folge, daß nicht die ökonomischsten Synthesebedingungen gewählt werden können. Denn je nach Gleichgewichtskonstante führen die Reaktionen nur in Gegenwart hoher Blausäurekonzentrationen zu befriedigenden Umsätzen. Bei höheren Aldehydkonzentrationen wird der relative Anteil der Blausäure, der für einen gegebenen Umsatz benötigt wird, immer geringer. Denn nach dem Massenwirkungsgesetz gilt:

$$K = \frac{C_C}{C_A * C_B} \quad (14)$$

Im Gleichgewicht ist

$$\begin{aligned} C_C &= C_{Ao} * U \\ C_A &= C_{Ao} * (1 - U) \\ C_B &= C_{Bo} - (C_{Ao} * U) \end{aligned}$$

Damit folgt

$$K = \frac{C_{Ao} * U}{C_{Ao} * (1-U) * \{C_{Bo} - (C_{Ao} * U)\}}$$

$$K \{C_{Bo} - (C_{Ao} * U)\} = \frac{U}{(1 - U)}$$

$$K * C_{Bo} - K * C_{Ao} * U = \frac{U}{(1 - U)}$$

$$K * C_{Bo} = \frac{U}{(1 - U)} + K * C_{Ao} * U$$

$$C_{Bo} = \frac{U}{(1 - U) * K} + C_{Ao} * U \quad (15)$$

mit: $C_A; C_B; C_C$ = Gleichgewichtskonzentration
 $C_{Ao}; C_{Bo}; C_{Co}$ = Anfangskonzentration
 U = Umsatz
 K = Gleichgewichtskonstante

Man erhält für die Konzentration C_{Bo} (hier HCN) zwei additive Terme. Der erste ist dabei nicht von der Ausgangskonzentration C_{Ao} (hier Aldehyd) abhängig, sondern nur von dem Umsatz und der Gleichgewichtskonstanten. Er repräsentiert die Konzentration C_B , die für einen Umsatz notwendig ist, und ist die Konzentration, die im Gleichgewicht im Nenner des Massenwirkungsgesetzes steht, also selbst nicht zum Produkt abreagiert. Der zweite Term $C_{Ao} \cdot U$ hingegen ist nicht von der Gleichgewichtskonstanten, sondern nur von der Ausgangskonzentration C_{Ao} und vom Umsatz abhängig und ist die Konzentration, die von C_{Bo} tatsächlich nach C_C umgesetzt wird.

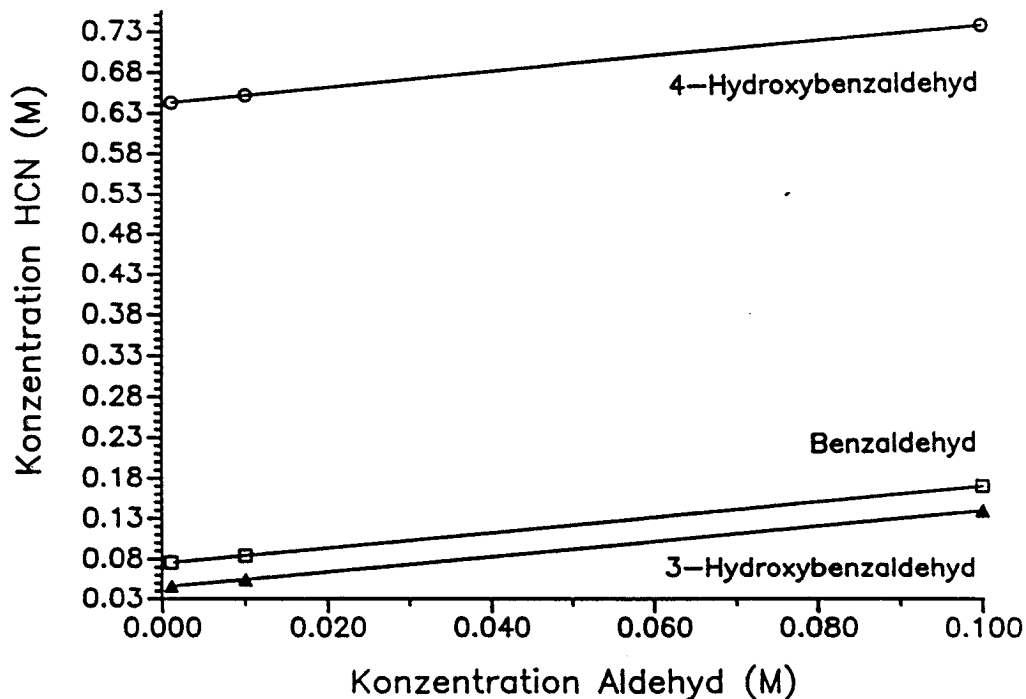


Abbildung 2.35: Berechnete Abhängigkeit eines 95%igen Reaktionsumsatzes von der HCN- und der Aldehydkonzentration

Deutlich ist zu erkennen, daß mit steigender Konzentration des Aldehyds der Anteil der Blausäure gegenüber dem Anteil des Aldehyds geringer wird. So benötigt man für den 90%igen Umsatz von 1 mM para-Hydroxybenzaldehyd ca. 311 Äquivalente HCN, hingegen weniger als 4 Äquivalente, wenn 125 mM umgesetzt werden.

Für Aldehyde wie den Benzaldehyd oder meta-Hydroxybenzaldehyd, deren Gleichgewichtskonstanten wesentlich größer sind, ist der Einfluß der Konzentration weniger einschneidend. Doch ist es auch bei diesen Aldehyden ökonomischer, mit einer möglichst hohen Konzentration zu arbeiten, wie Abbildung 2.35 verdeutlicht.

2.6 Löslichkeit der Carbonylverbindungen in wäßrigen Lösungssystemen

Um unter möglichst effizienten Synthesebedingungen zu arbeiten, wurde die Löslichkeit verschiedener Aldehyde zunächst in reinem Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C bestimmt. Anschließend wurde der Einfluß von wassermischbaren Cosolvenzen, insbesondere Ethanol, auf die Löslichkeit hin untersucht. Die Abbildung 2.36 zeigt die Löslichkeiten von Benzaldehyd, meta-Methylbenzaldehyd und Vanillin. Die entsprechende Tabelle zu den Löslichkeiten dieser und anderer Aldehyde ist auf Seite 139 zu sehen.

Polarere Aldehyde, wie hydroxysubstituierte, zeigen erwartungsgemäß höhere Löslichkeiten als unpolarere, wie z.B. methylsubstituierte Benzaldehydderivate. Der Einfluß des Ethanols ist bei allen untersuchten Aldehyden tendenziell gleich. Erst bei relativ hohen Konzentrationen (ab ca. 30%igem Ethanolanteil) steigt die Löslichkeit wesentlich an.

Andere wassermischbare Solvenzen wie DMF, DMSO und Isopropanol zeigen im wesentlichen den gleichen Solubilisierungseffekt. Mit Zusatz von diesen Lösungsmitteln ließen sich keine größeren Mengen von Aldehyden in wäßrigen Systemen lösen als durch die Zugabe von Ethanol.

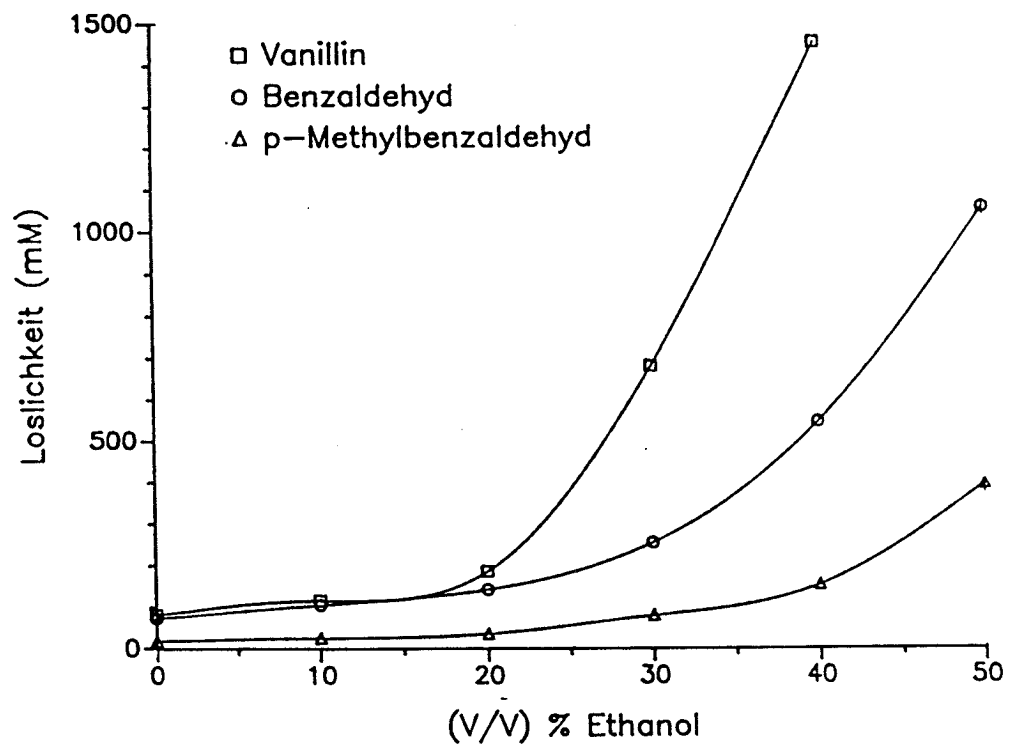


Abbildung 2.36: Löslichkeiten von aromatischen Aldehyden in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 und in wäßrig-ethanolischen Mischsystemen bei 20°C

2.7 Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Cyanhydrinsynthese

Die kinetischen Konstanten der enzymatischen Cyanhydrinsynthese wurden in gleicher Weise wie die der spontanen Reaktion ermittelt.

Die Versuche wurden mit den aufgereinigten Enzymen durchgeführt. Die Messungen an der (S)-Oxynitrilase aus *S. bicolor* wurden mit der entsalzten Enzympräparation, die nach der Aussalzchromatographie erhalten wurde, durchgeführt, die Messungen an der (R)-Oxynitrilase aus *P. amygdalus* mit der nach der Gelchromatographie erhaltenen Präparation.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Reaktion für das jeweilige Enzym mit dem natürlichen Substrat in 45 mM Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C durchgeführt.

2.7.1 pH-Abhängigkeit der Oxynitrilasen

Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Enzyme wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Cyanhydrinbildung gemessen.

Die (S)-Oxynitrilase hat ein breites Optimum bei einem pH, der etwas unterhalb von 5,0 liegt. Sowohl zu tieferen wie auch zu höheren pH-Werten hin nimmt die Aktivität langsam ab. Bei pH 3,25 hat das Enzym noch ca. 30% der maximalen Aktivität. Zu höheren pH-Werten hin scheint das Optimum noch flacher abzufallen; es läßt sich jedoch wegen der gleichzeitig ablaufenden spontanen Reaktion nur ungenau angeben. Das pH-Profil der (R)-Oxynitrilase folgt im wesentlichen der Reaktionsgeschwindigkeit der nicht-enzymatischen Reaktion. Folglich nimmt die Aktivität zu acideren pH-Bereichen hin ab, während sie sich zu alkalischeren Bereichen hin asymptotisch einem Grenzwert nähert (W. Becker et al., 1966).

In dem für die asymmetrische Cyanhydrinsynthese relevanten Bereich unterhalb von pH 4,5 weisen beide untersuchten Enzyme genügend Aktivität auf, um die enzymatische Synthese durchzuführen, wenngleich die Maxima oberhalb dieses Bereichs liegen.

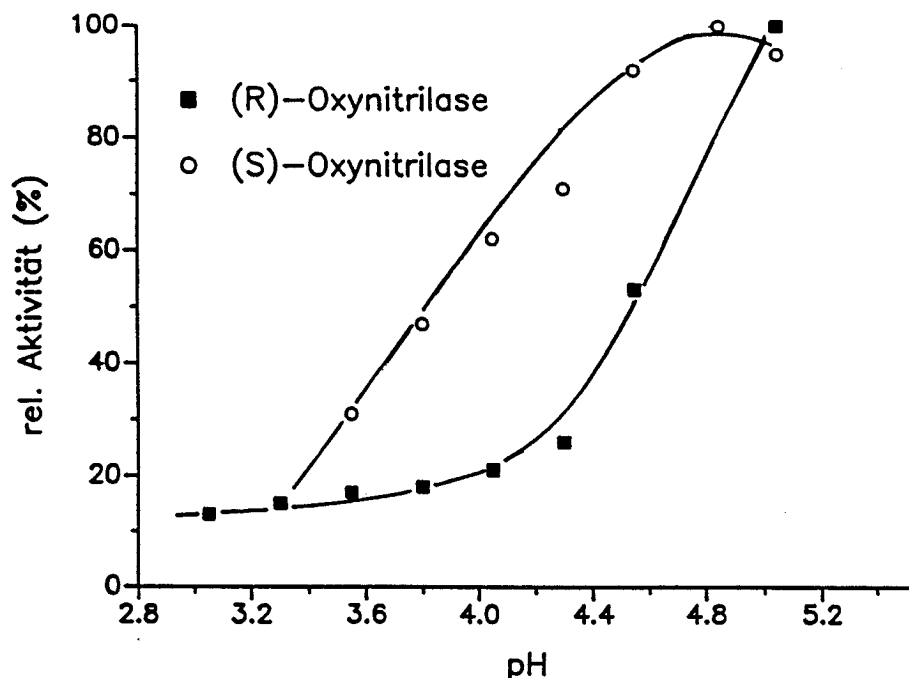


Abbildung 2.37: pH-Abhängigkeit der Oxynitrilasen in 45 mM Natriumcitratpuffer bei 20°C

2.7.2 Substratabhängigkeit der untersuchten Oxynitrilasen

Bei pH 3,75 wurden die kinetischen Konstanten beider Enzyme für die Spalt- und die Synthesereaktion bestimmt. Zunächst wurden die physiologischen Substrate getestet, dann die Enzym-Substrat-Beziehung zu anderen aromatischen Aldehyden.

Durch Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden die $v_{\max}$ -, K_m - und K_i -Werte ermittelt. Für die Berechnung der Konstanten wurde die Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde gelegt. Die enzymatische Synthese wird danach durch Gleichung (16) beschrieben (Cornish-Bowden):

$$v_3 = v_{\max}^{AB} * \frac{C_{(A)}}{K_m^A * (1 + C_{(P)}/K_i^P) + C_{(A)}} * \frac{C_{(B)}}{K_m^B + C_{(B)}} \quad (16)$$

mit: v_3 = Geschwindigkeit der enzymkatalysierten
Synthese (kat/l)
 $v_{\max}^{AB}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit der
Synthese (kat/l)
 $C_{(A)}$ = Konzentration des Aldehyds (mol/l)
 $C_{(B)}$ = Konzentration HCN (mol/l)
 $C_{(P)}$ = Konzentration des Cyanhydrins (mol/l)
 K_m^A = Michaelis-Menten-Konst. f. den Aldehyd (mol/l)
 K_m^B = Michaelis-Menten-Konst. f. HCN (mol/l)
 K_i^P = Inhibierungskonst. f. das Cyanhydrin (mol/l)

Die enzymatische Spaltreaktion folgt Gleichung (17):

$$v_4 = v_{\max}^P * \frac{C_{(P)}}{K_m^P * (1 + C_{(A)}/K_i^A) + C_{(P)} * (1 + C_{(B)}/K_i^B)} \quad (17)$$

mit: v_4 = Geschwindigkeit der enzymkatalysierten
Spaltung (kat/l)
 $v_{\max}^P$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit der
Spaltung (kat/l)
 $C_{(A)}$ = Konzentration des Aldehyds (mol/l)
 $C_{(B)}$ = Konzentration HCN (mol/l)
 $C_{(P)}$ = Konzentration des Cyanhydrins (mol/l)
 K_m^P = Michaelis-Menten-Konst. f. d. Cyanhydrin (mol/l)
 K_i^A = Michaelis-Menten-Konst. f. den Aldehyd (mol/l)
 K_i^B = Inhibierungskonst. für HCN (mol/l)

Die so bestimmten Parameter sind in Tabelle 2.13 zusammen-
gefaßt:

	(R)-Oxynitrilase ^{*)}	(S)-Oxynitrilase
$v_{\max}$ (Synthese)	$16,70 \cdot 10^{-3}$ kat/l	$14,0 \cdot 10^{-4}$ kat/l
K_m (Aldehyd)	$0,46 \cdot 10^{-3}$ M	$0,61 \cdot 10^{-3}$ M
K_m (Blausäure)	$711 \cdot 10^{-3}$ M	$264 \cdot 10^{-3}$ M
K_i (Cyanhydrin)	$7,19 \cdot 10^{-3}$ M	$1,70 \cdot 10^{-3}$ M
Aktivität(Synthese)	$8,79 \cdot 10^{-3}$ kat/g 527 U/mg	$2,55 \cdot 10^{-3}$ kat/g 153 U/mg
$v_{\max}$ (Spaltung)	$2,39 \cdot 10^{-3}$ kat/l	$4,44 \cdot 10^{-4}$ kat/l
K_m (Cyanhydrin)	$1,05 \cdot 10^{-3}$ M	$1,74 \cdot 10^{-3}$ M
K_i (Aldehyd)	$0,37 \cdot 10^{-3}$ M	$0,32 \cdot 10^{-3}$ M
K_i (HCN)	$72,50 \cdot 10^{-3}$ M	$17,30 \cdot 10^{-3}$ M
Aktivität(Spaltung)	$1,26 \cdot 10^{-3}$ kat/g 75,6 U/mg	$0,80 \cdot 10^{-3}$ kat/g 48 U/mg

Tabelle 2.13: Kinetische Konstanten der (R)- und (S)-Oxynitrilase in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75

^{*)} Die Konstanten der (R)-Oxynitrilase sind entnommen aus: U. Kragl, 1988

Obwohl beide Enzyme - wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben - deutlich andere proteinchemische Eigenschaften besitzen, zeigen sie sehr ähnliche kinetische Konstanten. So haben beide Enzyme die größte Affinität zu dem jeweiligen Aldehyd, die kleinste zur Blausäure. Die enzymatische Synthese ist unter den gegebenen Bedingungen bei der (R)-Oxynitrilase ca. 8mal und bei der (S)-Oxynitrilase 3mal schneller als die Spaltreaktion. Die Spalt-

reaktion ist außerdem bei beiden Enzymen stark kompetitiv inhi-
biert, weil die Konstanten K_i der Aldehyde kleiner sind als die
Konstanten K_m der Cyanhydrine.

Die Umsetzungen von nicht-natürlichen Aldehyden mit den beiden
Enzymen sind in den Tabellen 2.14 und 2.15 dargestellt. Während
die Enzyme zu ihren natürlichen Substraten sehr ähnliche
Beziehungen aufweisen, differiert ihre Affinität zu nicht-phy-
siologischen Aldehyden. Zum einen besitzen die beiden Enzyme
ein deutlich verschiedenes Substratspektrum. Zum anderen ist im
jeweiligen Vergleich zum physiologischen Aldehyd ihre Beziehung
zu den anderen Aldehyden unterschiedlich.

Substrat	K_m	v_{max}
Benzaldehyd	15 * 10^{-3} M	2,6 U/mg
para-Hydroxybenzaldehyd	0,61 * 10^{-3} M	153 U/mg
meta-Hydroxybenzaldehyd	1,3 * 10^{-3} M	146 U/mg
meta-Methylbenzaldehyd	8,4 * 10^{-3} M	14,5 U/mg

Tabelle 2.14: Affinität der (S)-Oxynitrilase zu verschiedenen
Aldehyden

Substrat	K_m	v_{max}
Benzaldehyd	0,46 * 10^{-3} M	527 U/mg
para-Hydroxybenzaldehyd	0,29 * 10^{-3} M	3 U/mg
meta-Hydroxybenzaldehyd	0,84 * 10^{-3} M	34 U/mg
para-Methylbenzaldehyd	0,55 * 10^{-3} M	74 U/mg
meta-Methylbenzaldehyd	0,63 * 10^{-3} M	124 U/mg

Tabelle 2.15: Affinität der (R)-Oxynitrilase zu verschiedenen
Aldehyden

Für alle getesteten Aldehyde bewegen sich bei der (R)-Oxynitrilase die K_m -Werte in der Größenordnung des K_m -Wertes des Benzaldehyds, während bei der (S)-Oxynitrilase die Affinität zu anderen Aldehyden deutlich geringer ist. Insbesondere sind die K_m -Werte von den nicht hydroxy-substituierten Benzaldehyden deutlich größer (Tabelle 2.14). Der meta-Hydroxybenzaldehyd hat hingegen eine ähnliche K_m -Konstante wie der para-Hydroxybenzaldehyd und wird auch fast ebenso schnell umgesetzt. Dies könnte darauf hin deuten, daß die Alkoholfunktion im Molekül möglicherweise unabhängig vom Substitutionsmuster einen entscheidenden Einfluß im Katalysemechanismus ausübt.

Bei der (R)-Oxynitrilase zeigen Substrate mit solchen polaren Substituenten deutlich geringere Umsatzraten als unpolare, wie z.B. die methylsubstituierten Aldehyde. Dabei werden die para-substituierten Benzaldehyde allgemein weniger gut umgesetzt als die meta-substituierten. Der para-Hydroxybenzaldehyd wird ausgesprochen schlecht, der para-Nitro- und der para-Dimethylaminobenzaldehyd werden - wie in der Literatur berichtet wird (W. Becker et al., 1966) - gar nicht von dem Enzym umgesetzt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß Substrate mit polaren Substituenten allgemein schlecht von der (R)-Oxynitrilase umgesetzt werden, besonders aber solche mit Substituenten in para-Stellung.

Weiterhin ist bemerkenswert, daß die durch das Substitutionsmuster bedingten elektronischen Verhältnisse am Carbonylkohlenstoff zwar in weitem Ausmaß die Reaktivität der Aldehyde in der nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese bestimmen, jedoch keinen oder nur einen untergeordneten Einfluß auf die enzymatischen Umsatzraten aufweisen.

So wird von der (S)-Oxynitrilase der chemisch eher reaktions-träge para-Hydroxybenzaldehyd genauso gut umgesetzt wie der reaktive meta-Hydroxybenzaldehyd. Ebenso wird im Vergleich von meta-Methylbenzaldehyd und dem reaktiveren Benzaldehyd der zuletzt Genannte schlechter umgesetzt.

Ähnlich sind die Verhältnisse bei der (R)-Oxynitrilase. Alle getesteten substituierten Aldehyde werden schlechter umgesetzt

als der Benzaldehyd - unabhängig vom elektronischen Einfluß auf den Carbonylkohlenstoff.

Bei beiden Enzymen besteht also keine direkte Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Fähigkeit der Substituenten, die Carbonylfunktion zu polarisieren. Vielmehr scheint die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit durch die räumliche Veränderung der Substrate beeinflußt zu werden. Auch die Polarität des Substituenten selbst scheint die Affinität des Substrats zu den Enzymen zu beeinflussen. Lipophile Substrate werden offensichtlich besser von der (R)-, polare besser von der (S)-Oxynitrilase umgesetzt.

2.7.3 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Cyanhydrin-synthese

Weiterhin wurde bei pH 3,75 die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Cyanhydrinbildung bestimmt. In Abbildung 2.38 sind die logarithmierten relativen Umsatzgeschwindigkeiten der enzymatischen Cyanhydrinbildung und die spontane Mandelsäurenitrilbildung gegen die reziproke Temperatur aufgetragen.

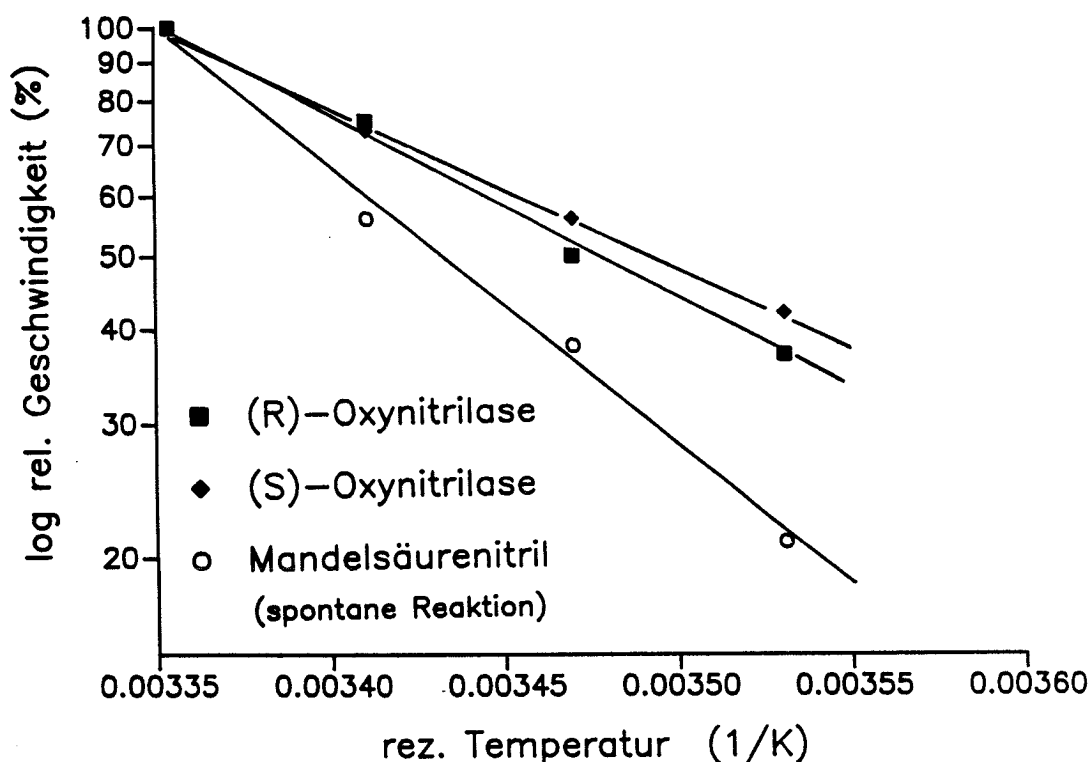


Abbildung 2.38 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Cyanhydrinbildung

Nach der Arrhenius-Gleichung berechnen sich die Aktivierungsenergien wie folgt:

(R)-Oxynitrilase:	46,4 kJ/Mol
(S)-Oxynitrilase:	43,1 kJ/Mol
spontane Reaktion:	72,8 kJ/Mol.

Die Aktivierungsenergien der enzymatischen Synthese sind also

deutlich kleiner als die der spontanen Reaktion. Bei der Konkurrenz zwischen spontaner und enzymatischer Cyanhydrinbildung ist die enzymatische Reaktion zu tieferen Temperaturen hin begünstigt, so daß man hier unter sonst gleichen Konditionen höhere optische Reinheiten der Cyanhydrine erhalten sollte.

Experimentell lassen sich diese rechnerischen Ergebnisse allerdings nur unzureichend nachvollziehen. Das ist zum einen sicherlich darin begründet, daß bei diesem pH-Wert die enzymatische Reaktion über den ganzen Temperaturbereich hinweg überaus dominant ist, so daß überhaupt nur differentielle Verbesserungen der optischen Reinheit möglich sind. Zum anderen ändert sich mit der Temperatur auch die Gleichgewichtskonstante des Reaktionssystems - wie in 2.5.7 beschrieben -, so daß eine Veränderung des Reaktionssystems eintritt, deren Einfluß auf die optische Reinheit der Cyanhydrine, insbesondere in diesem Grenzbereich, nur schwer abzuschätzen ist. Weiterhin ist auch eine partielle Racemisierung während der Derivatisierung der Cyanhydrine nicht vollständig auszuschließen, obwohl sie - wenn überhaupt - nur in geringem Ausmaß verlaufen kann. Alle diese Effekte zusammengenommen machten es unmöglich, den Einfluß der Reaktionstemperatur auf die optische Reinheit der enzymatischen Produkte deutlich zu belegen.

2.8 Einfluß von wassermischbaren Cosolvenzien auf die Aktivität

Aldehyde sind - wie in Kapitel 2.6 gezeigt - in rein wäßrigen Lösungssystemen nur begrenzt löslich. Ihre Löslichkeit kann aber durch wassermischbare Cosolvenzien erhöht werden. Dieser Zusatz führt jedoch in der Regel dazu, daß Enzyme sowohl an Aktivität als auch an Stabilität verlieren. Gleichwohl ist es erstrebenswert, bei einer möglichst hohen Substratkonzentration zu arbeiten, da hierdurch die Effektivität der Synthese erhöht wird. Deshalb ist zu prüfen, in welchem Verhältnis die vermehrte Wirksamkeit der Synthese auf der einen Seite zu der gleichzeitigen Aktivitäts- und Stabilitätsminderung der Enzyme auf der anderen Seite steht. Erst dann kann die Frage entschieden werden, ob durch den Einsatz von Cosolvenzien die Produktivität gesteigert werden kann (Laane 1987a; 1987b).

Als Zusatz zu wäßrigen Reaktionssystemen eignen sich nur polare, mit Wasser mischbare Lösungsmittel. Im folgenden wird die Wechselwirkung einiger Solvenzien mit den Oxynitrilasen dargestellt.

	(R)-Oxynitrilase	(S)-Oxynitrilase
	Aktivität (%)	
Puffer	100	100
Ethanol	72	48
Isopropanol	68	42
DMF	14	17
DMSO	34	34
Dioxan	24	24

Tabelle 2.16: Relative Aktivität bei Zusatz von 10 v/v der Cosolvenzien

Untersucht wurde der Einfluß der Cosolvenzien auf die Spaltreaktion der Enzyme bei pH 3,75. In Tabelle 2.16 ist die relative Aktivität bei Zusatz von 10 v/v verschiedener Lösungsmittel aufgelistet, und Abbildung 2.39 zeigt den Einfluß von unterschiedlichen Mengen Ethanol.

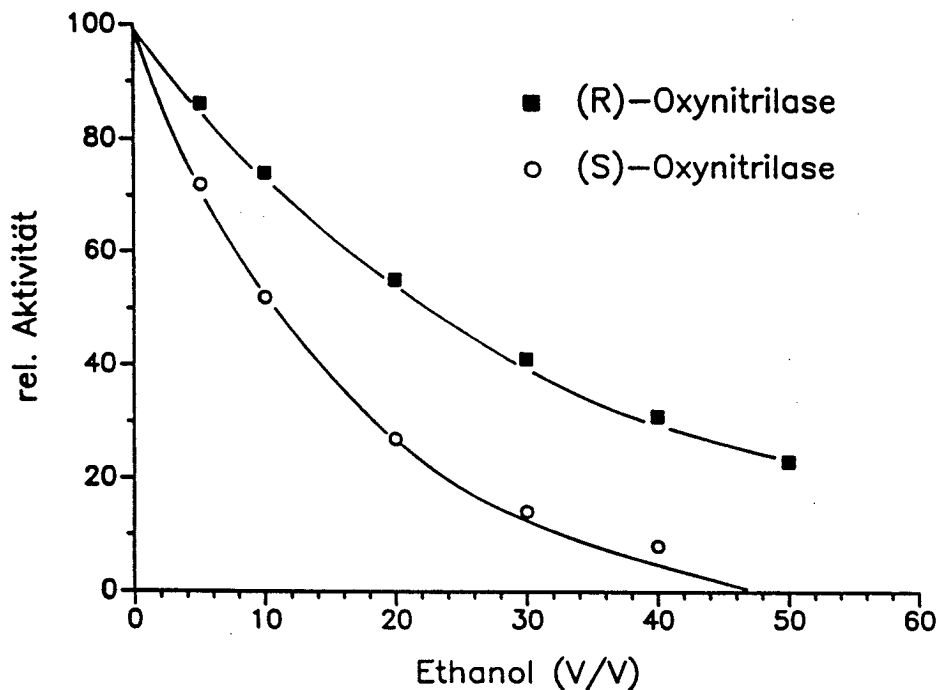


Abbildung 2.39: Der Einfluß von Ethanol auf die Enzymaktivität

Wie die Daten zeigen, werden beide Enzyme schon durch diese vergleichsweise geringen Mengen von Cosolvenzien inhibiert. DMF, Dioxan und DMSO hemmen beide Enzyme am meisten. Ethanol und Propanol weisen dagegen einen geringeren Effekt auf. Bei den meisten Lösungsmitteln ist dabei der Einfluß auf die Aktivität für die (S)-Oxynitrilase weitaus größer als für die (R)-Oxynitrilase. Nur DMF, das beide Enzyme am meisten inhibiert, hat bei der (R)-Oxynitrilase einen noch stärker hemmenden Effekt.

2.9 Einfluß des Reaktionsmediums auf die Stabilität der Enzyme

Überprüft wurde der Einfluß von pH-Wert, Temperatur und prozentualen Lösungsmittelzusatz auf die Stabilität der Enzyme. Hierzu wurden die Enzyme mit einer Proteinkonzentration von 0,19 mg/ml für die (R)- und von 0,08 mg/ml für die (S)-Oxynitrilase unter den unten angegebenen Bedingungen steril inkubiert. In einem Zeitintervall von 21 Tagen wurde die Desaktivierung der Enzymaktivitäten über den jeweiligen Standardspalttest verfolgt. Dieser wurde in der Regel einmal täglich durchgeführt. Bei schnellerer Desaktivierung der Enzyme wurden die Tests mehrmals täglich durchgeführt.

pH	(R)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)	(S)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)
4,5	>400	242
4,0	192	246
3,75	147	230
3,5	127	234
3,25	96	n.b.

Tabelle 2.17: Enzymstabilitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert in 50 mM Natriumcitratpuffer bei 20°C

pH	(R)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)	(S)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)
4,5	274	202
4,0	68	212
3,75	45	189
3,5	10	190
3,25	<10	192

Tabelle 2.18: Enzymstabilitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert in 50 mM Natriumcitratpuffer und 10 v/v Ethanol bei 20°C

v/v Ethanol	(R)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)	(S)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)
0	147	230
10	45	189
20	15	117
30	10	117

Tabelle 2.19: Enzymstabilitäten in Abhängigkeit vom v/v Ethanolanteil in 50 mM Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C

Cosolvent 10 v/v	(R)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)	(S)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)
Ethanol	45	189
Isopropanol	52	143
Dioxan	17	117
DMF	12	112
DMSO	61	119

Tabelle 2.20: Enzymstabilitäten in Abhängigkeit vom Cosolventen (10 v/v) in Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C

Benzaldehyd (mM)	(R)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)	(S)-Oxynitrilase Halbwertzeiten (Stunden)
0	147	n.b.
15	46	n.b.
30	32	n.b.
60	7	n.b.

Tabelle 2.21: Enzymstabilitäten in Abhängigkeit von der Benzaldehydkonzentration in 50 mM Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C

Die in den Tabellen aufgeführten Halbwertzeiten geben einen Eindruck von der Stabilität der Enzyme. Beide Enzyme verlieren danach zu acideren Bedingungen hin an Stabilität (siehe Tabelle 2.17). Bei der (R)-Oxynitrilase ist dieser Effekt jedoch wesentlich ausgeprägter als bei der (S)-Oxynitrilase. Mit einer Halbwertzeit von 96 Stunden beträgt die Stabilität der (R)-Oxynitrilase bei pH 3,25 ca. 25% von derjenigen bei pH 4,5. Für die (S)-Oxynitrilase ist in dem gemessenen pH-Bereich kein Stabilitätsmaximum auszumachen, da die ermittelten Halbwertzeiten nur um ca. 10% differieren.

Bei optimalen (d.h. höheren) pH-Werten scheint die (R)-Oxynitrilase eine größere Stabilität als die (S)-Oxynitrilase zu besitzen. Dagegen ist letztere durch die wesentlich geringere pH-Abhängigkeit bei tieferen pH-Bereichen stabiler.

Überraschend ist auch der Einfluß von Cosolvenzien auf die Stabilität der Enzyme. Während - wie oben in Tabelle 2.16 gezeigt - die (S)-Oxynitrilase schon von geringen Mengen der Lösungsmittel stark inhibiert wird, ist der Einfluß dieser Lösungsmittel auf die Stabilität des Enzyms weniger groß (siehe Tabellen 2.19 und 2.20). Über den ganzen getesteten pH-Bereich hinweg ist die Stabilität bei einem Zusatz von 10 v/v Ethanol um ca. 20% geringer als ohne Lösungsmittelzusatz. Bei Zusatz von 20 und 30 v/v Ethanol ist die Halbwertzeit bei pH 3,75 dann nur noch halb so groß. Bei der (R)-Oxynitrilase hingegen ist der destabilisierende Effekt des Ethanols vom pH-Wert abhängig. So ist die Stabilität bei 10 v/v Ethanolzusatz bei pH 4,5 halb so groß und beträgt bei pH 3,25 nur noch 1/10. Auch ein Zusatz von mehreren Anteilen Ethanol wirkt sich bei pH 3,75 auf die (R)-Oxynitrilase destabilisierender aus als auf die (S)-Oxynitrilase.

Auch die Art des Lösungsmittels hat einen Einfluß auf die Stabilität der Enzyme. Hier zeigen die Lösungsmittel einen vergleichbaren Effekt wie bei der Inhibierung: DMF und Dioxan destabilisieren besonders.

Einen außerordentlich hohen Desaktivierungsgrad übt der Benzaldehyd auf die (R)-Oxynitrilase bei pH 3,75 auf. Tabelle 2.21

dokumentiert, wie schnell das Enzym bei verschiedenen Konzentrationen von Benzaldehyd desaktiviert. Schon bei einer Konzentration von 15 mM Benzaldehyd beträgt die Halbwertszeit nur noch 31% und bei 60 mM Benzaldehydkonzentration sogar nur noch 7% der maximalen Stabilität des Enzyms. Daraus folgt, daß die Stationärkonzentration im Reaktor möglichst gering gehalten werden sollte.

2.10 Ergebnisse der Optimierung des Reaktionssystems

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß das gesetzte Ziel, d.h. die Unterdrückung der spontanen Cyanhydrinbildung unter gleichzeitiger Ausbildung der enzymatisch gebildeten Cyanhydrine, in weitem Umfang erreichbar ist. Als wirksamstes Mittel stellte sich eine pH-Wert-Minderung des Reaktionsmediums dar, da hierdurch die spontane Reaktion unterdrückt und somit der Anteil der enzymatischen Reaktion am Gesamtumsatz erhöht werden kann.

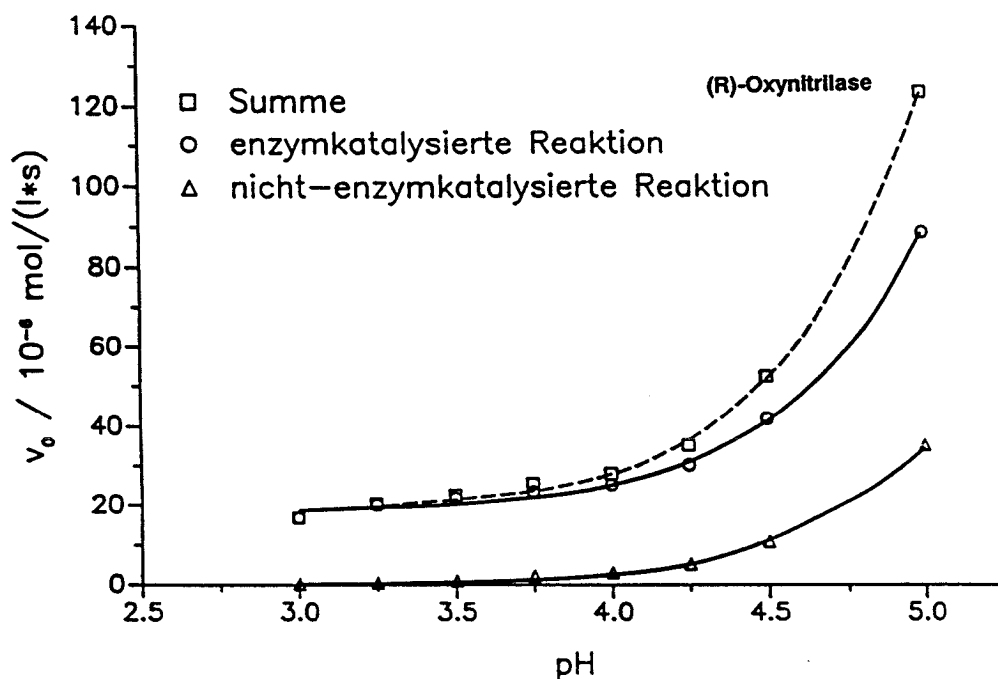


Abbildung 2.40: Anteile der enzymatischen und der nicht-enzymatischen (R)-Mandelsäurenitrilbildung

Dabei ist zu beachten, daß die Aldehyde eine sehr unterschiedliche Neigung zur Blausäureaddition besitzen. Diese Affinität bestimmt, wie weit der pH-Wert abzusinken ist, so daß die enzymatische Reaktion nahezu allein den Umsatz trägt.

Die Affinität der Aldehyde zur Blausäureaddition bestimmt darüber hinaus auch die Gleichgewichtslage des Reaktionssystems. Da neben dem Erreichen eines hohen ee-Wertes auch ein hoher chemischer Umsatz erstrebenswert ist, muß man die Gleichgewichtskonstante kennen oder aber zumindest abschätzen können. Denn das Verhältnis von Aldehyd und HCN ist so zu wählen, daß zwar ein hoher Umsatz erfolgt, andererseits aber nicht durch eine zu hohe HCN-Konzentration die spontane Cyanhydrinbildung mehr als nötig aktiviert wird.

Durch Temperaturerniedrigung läßt sich das Gleichgewicht der Reaktion mehr auf die Seite des Cyanhydrins schieben. Hierdurch kann die Blausäurekonzentration für einen gleich hohen Umsatz verringert werden.

Diese Kernpunkte bestimmen die optimalen Reaktionsparameter. Die enzymatische Reaktion muß diesen Bedingungen unterworfen werden. Hierbei dürfen enzymatische Optima, wie pH, Temperatur und Enzymstabilität, nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Allerdings ist zu beachten, daß die Enzyme zu acideren pH-Bereichen hin an Aktivität und an Stabilität verlieren, wobei der Stabilitätsverlust für die (R)- größer als für die (S)-Oxynitrilase ist. Daher ist ein möglichst hoher pH-Wert anzustreben.

Neben den erwähnten Parametern spielt auch die Konzentration der Reaktanden eine wesentliche Rolle. Zum einen führt eine möglichst hohe Substratkonzentration zu ökonomischerer Arbeitsweise. Zum anderen ist die enzymatische Cyanhydrinbildung bei geringen Konzentrationen gegenüber der nicht-enzymatischen bevorzugt, so daß unter solchen Bedingungen höhere optische Reinheiten zu erzielen sind.

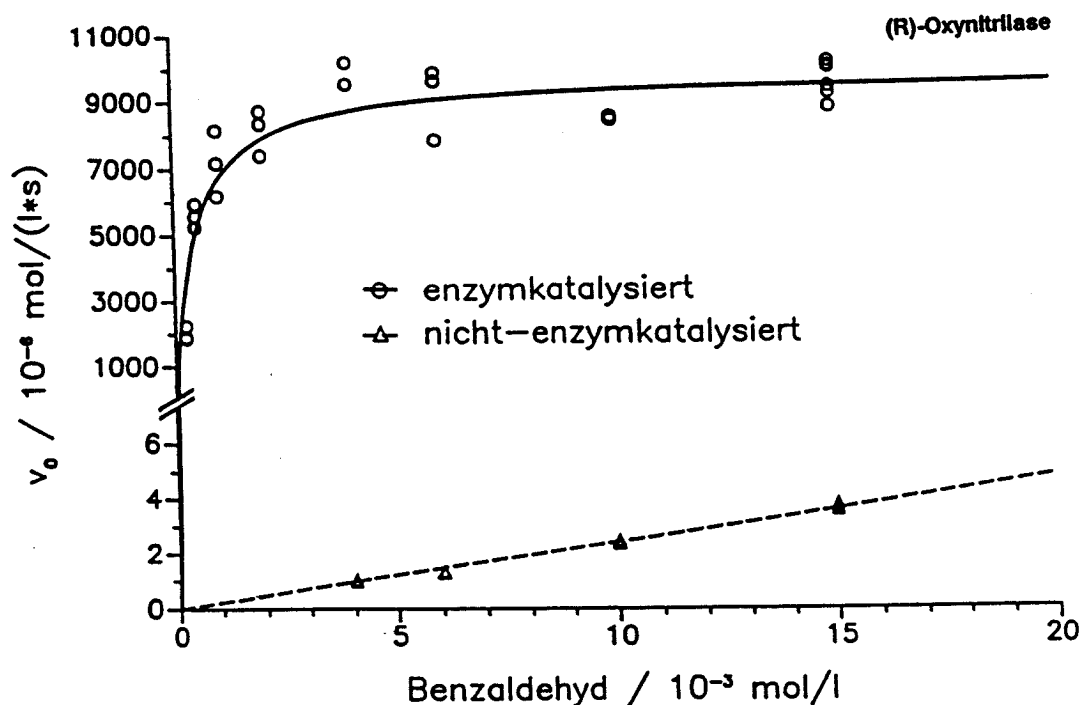


Abbildung 2.41: Abhängigkeit der enzymatischen und der nicht-enzymatischen Mandelsäurenitrilbildung von der Benzaldehydkonzentration in 45 mM Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 und 20°C

Da die Enzyme durch die Zugabe von Cosolvenzien sowohl an Aktivität als auch an Stabilität verlieren und erst mit mehr als 30% v/v an Lösungsmitteln eine wesentlich größere Löslichkeit zu erzielen ist, sollte vorwiegend ohne jeglichen Zusatz von Lösungsmitteln gearbeitet werden. Dies ist auch deshalb anzuraten, weil die Löslichkeit vieler Aldehyde zwischen 80 - 120 mM für eine produktive Synthese durchaus ausreichend ist und bei diesem Konzentrationsniveau die enzymatische Synthese gegenüber der nicht-enzymatischen überaus dominant ist, so daß unter diesen Bedingungen hohe Enantiomenüberschüsse zu erwarten sind.

2.11 Synthesen mit der (R)- und (S)-Oxynitrilase

2.11.1 Diskontinuierliche Synthesen

Die enzymatischen Synthesen wurden bei 20°C in rein wäßrigem Natriumcitratpuffer mit den aufgereinigten Enzymen durchgeführt. Die Aktivität der (R)-Oxynitrilase betrug 277 U/ml, die der (S)-Oxynitrilase 84 U/ml für die Synthesereaktion bei pH 3,75 und 20°C, bezogen auf den jeweiligen natürlichen Aldehyd.

Die Reaktionen wurden dabei bei einem pH-Wert durchgeführt, bei dem die nicht-enzymatische Reaktion weitgehend unterdrückt ist. Die Konzentration von Aldehyd und Blausäure, beziehungsweise deren Verhältnis zueinander, wurde, wenn nicht anders erwähnt, für einen 95%igen Umsatz dosiert. Zur Berechnung dieser Konzentrationen wurden die ermittelten Gleichgewichtskonstanten (vgl. Kapitel 2.5.6) zugrunde gelegt. In einem Gesamtvolumen von ca. 10 ml wurden 0,5 mmol des Aldehyds umgesetzt. Die Synthesen der Toluolmandelsäurenitril-Derivate wurden wegen der geringeren Löslichkeit der Aldehyde in einem Gesamtvolumen von 20 ml durchgeführt.

Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, daß die Reaktion in 15 bis 45 Minuten beendet war. Zur Bestimmung der Reaktionszeit wurden die ermittelten $v_{\max}$ -Werte der Aldehyde zugrunde gelegt, oder sie wurden durch weitere Vorversuche ermittelt.

Der jeweilige pH-Wert des Reaktionsmediums richtete sich dabei nach der Reaktivität des Aldehyds in der spontanen Cyanhydrinsynthese. Obschon die spontane Cyanhydrinsynthese bei tiefen pH-Werten meßtechnisch nicht mehr zu erfassen ist, muß man sie dennoch beachten, wenn durch die enzymatische Reaktion optisch sehr reine Cyanhydrine dargestellt werden sollen.

Eine rechnerische Abschätzung für die Mandelsäurenitrilsynthese verdeutlicht dies. Grundlage für diese Berechnung ist ein Reaktionsansatz von 10 ml Gesamtvolumen bei 20°C und pH 3,25, der 50 mM Benzaldehyd und 200 mM HCN enthält. Ein solcher Ansatz führt nur dann zu einem ee-Wert von 99%, wenn weniger

als 0,5% des unerwünschten Enantiomeren während der Reaktion entsteht. Da aus der spontanen Cyanhydrinbildung (R)- und (S)-Enantiomere hervorgehen, kann die chemische Reaktion 1% der Gesamtreaktion ausmachen.

$$ee = 99\% = \frac{472,625 \mu\text{mol} - 2,375 \mu\text{mol}}{475 \mu\text{mol}} * 100\% \quad (18)$$

Durch die spontane Reaktion könnten dann 2mal 2,375 also 4,75 μmol racemisches Mandelsäurenitril gebildet werden. Legt man die Geschwindigkeitskonstante von $87 * 10^{-6} \text{ l}/(\text{mol} * \text{s})$ und die Anfangskonzentrationen zugrunde, würden in 1 Minute in 10 ml Reaktionsvolumen 0,522 μmol (R/S)-Mandelsäurenitril entstehen. Somit wären nach ca. 9 Minuten 4,75 μmol Mandelsäurenitril durch die spontane Reaktion entstanden.

$$v_1 = k_1 * c_{(\text{Aldehyd})} * c_{(\text{HCN})} \quad (19)$$

$$\begin{aligned} v_1 &= 0,87 * 10^{-6} * 0,05 * 0,2 \quad \text{mol}/(\text{l} * \text{s}) \\ &= 0,522 \quad \mu\text{mol}/(10\text{ml} * \text{min}) \end{aligned} \quad (20)$$

$$4,75 \mu\text{mol} / 0,522 \mu\text{mol}/\text{min} = 9,09 \text{ min}^{-1} \quad (21)$$

Da die nicht-enzymatische Reaktion unter diesen Bedingungen aber im wesentlichen von der Aldehydkonzentration abhängt, muß die Differenz, die im Laufe der Reaktion entsteht, berücksichtigt werden.

Betrachtet man hierzu den Konzentrationsverlauf in einem enzymatischen Ansatz, so erkennt man, daß die Aldehydkonzentration in der ersten Hälfte der Reaktion nahezu linear abnimmt. Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt die Umsatzgeschwindigkeit stetig ab. Dies ist verständlich, da die enzymatische Reaktion infolge der größer werdenden Konzentration des Mandelsäurenitrils stärker inhibiert wird. Aus diesem typischen Reaktionsverlauf kann man nun die mittlere Aldehydkonzentration bis zum Gleichgewichtsumsatz berechnen, indem man bei dem in Abbildung

2.42 dargestellten Verlauf der Aldehydkonzentration die Fläche unterhalb der Kurve bestimmt und diese dann über die Reaktionszeit mittelt.

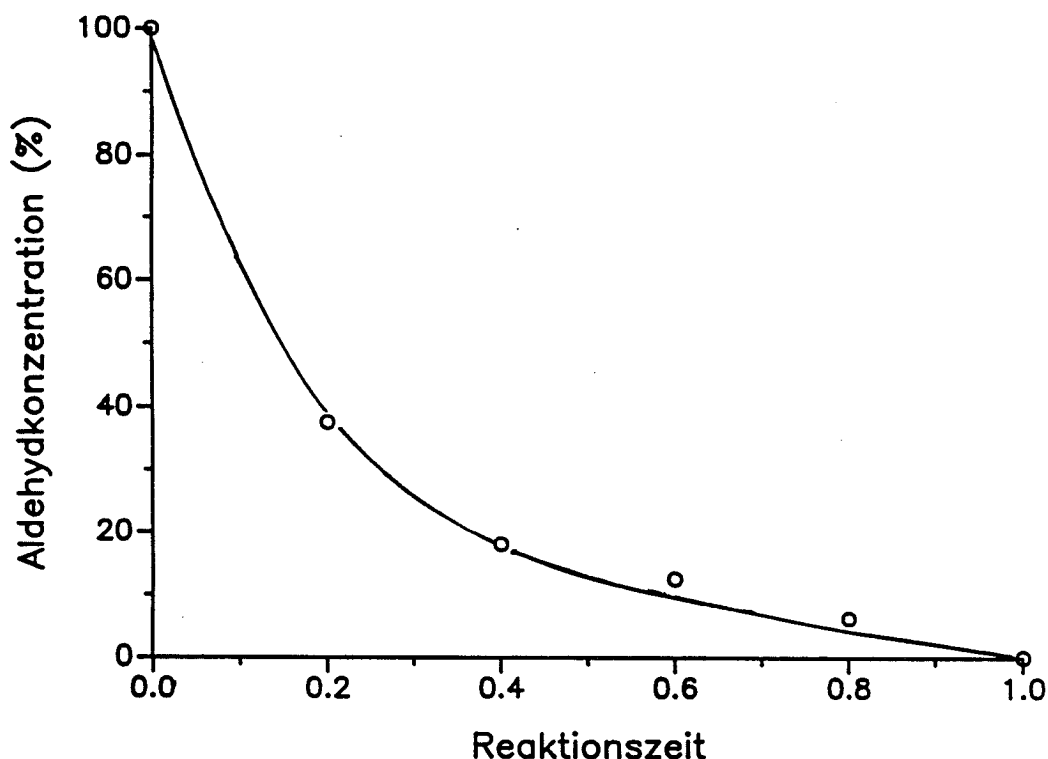


Abbildung 2.42: Konzentrationsverlauf in der enzymatischen (R)-Mandelsäurenitrilsynthese

Hieraus ergibt sich, daß die mittlere Konzentration des Aldehyds ca. 30% seiner Ausgangskonzentration ausmacht. Berücksichtigt man dies nun bei der Berechnung der nicht-enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit, so zeigt sich, daß 1% von der Gesamtreaktion nicht bereits nach 9, sondern ca. erst nach 30 Minuten durch die spontane Reaktion gebildet werden kann. Mit anderen Worten: Um einen ee-Wert zu erzielen, der gleich oder größer als 99% ist, muß die Reaktion bei pH 3,25 und 20°C innerhalb von 30 Minuten bis zum Gleichgewicht abgereagiert sein.

Solch ein Reaktionsverlauf sollte nicht nur typisch für die (R)-Mandelsäurenitrilbildung sein, sondern auch für alle weiteren Aldehyde, die eine ähnliche Beziehung wie das Reaktionspaar Benzaldehyd/Mandelsäurenitril zum Enzym aufweisen. Die wesentliche Voraussetzung hierbei ist, daß der K_m -Wert des Aldehyds

relativ klein ist und der K_m - und der K_i -Wert der Produkte größer als dieser sind.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte führten dann auch die Umsetzungen des Benzaldehyds sowohl mit der (R)- als auch mit der (S)-Oxynitrilase, entsprechend den oben durchgeführten Modellrechnungen, zu den entsprechenden chiralen Cyanhydrinen mit hohen ee-Werten.

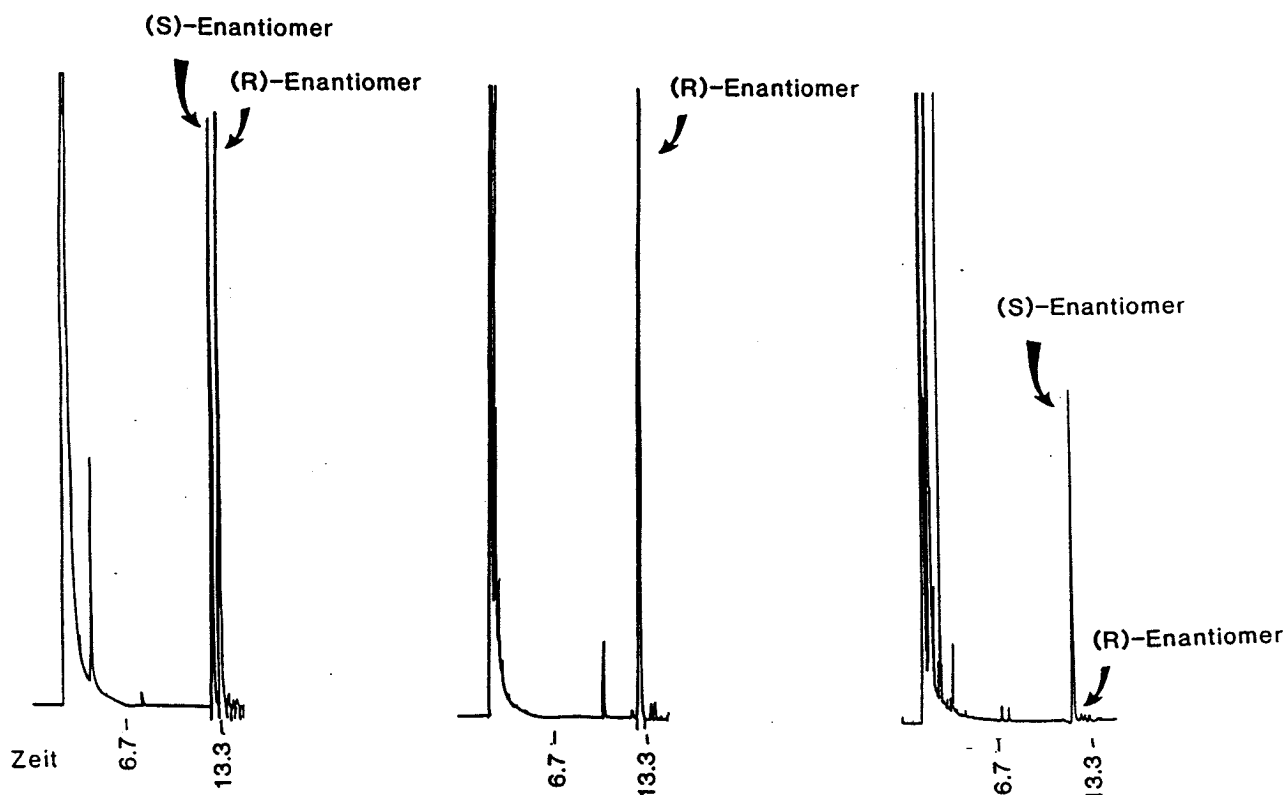


Abbildung 2.43.: Gaschromatographische Bestimmung des ee-Wertes von Mandelsäurenitril

Der etwas schlechtere ee-Wert des (S)-Mandelsäurenitrils ist dabei sicherlich auf die vergleichsweise geringe Affinität des Benzaldehyds zu der (S)-Oxynitrilase ($K_m = 15 \text{ mM}$) zurückzuführen. Dies hat zur Folge, daß die Umsetzung zum Ende hin wesentlich langsamer verläuft. Daraus resultiert weiterhin, daß die Reaktion nach ca. 80% des Umsatzes nur noch unwesentlich voranschreitet. Deshalb wurden die Umsetzungen bei diesem Umsatzgrad, also vor der Einstellung des chemischen Gleichge-

wichtsumsatzes, abgebrochen.

Neben dem Benzaldehyd wurden weitere aromatische Aldehyde umgesetzt. Zur Abschätzung eines geeigneten pH-Wertes wurden zum einen die enzymatischen Umsetzungen mit dem Benzaldehyd, zum anderen die lineare Reaktivität in der spontanen Cyanhydrinsynthese, die durch die Hammett-Beziehung beschrieben wird, zugrunde gelegt.

Hierzu wurden diejenigen pH-Werte, bei denen die verschiedenen Aldehyde die gleiche Geschwindigkeitskonstante aufweisen wie der Benzaldehyd bei pH 3,25, gegen die Substitutionskonstante aufgetragen.

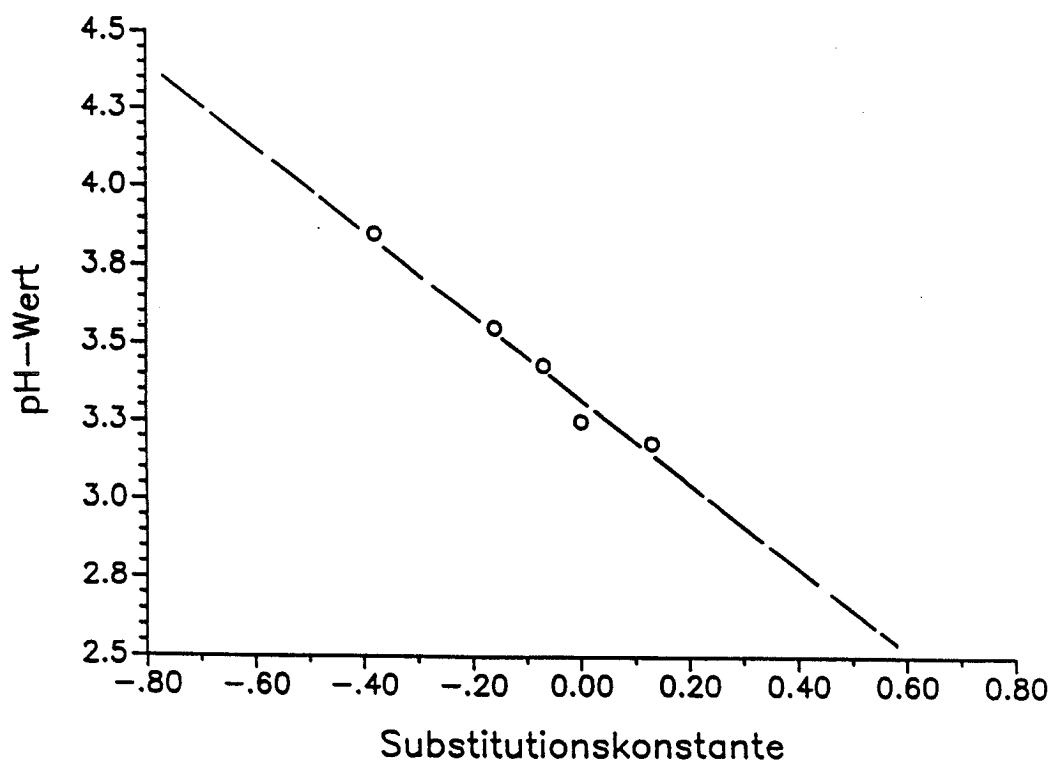


Abbildung 2.44: Ermittlung des geeigneten pH-Wertes für die Umsetzung verschiedener aromatischer Aldehyde bei 20°C in Natriumcitratpuffer

Bei diesen oder bei etwas tieferen pH-Werten wurden dann die aromatischen Aldehyde nach dem Konzept, das für die Mandelsäurenitrilsynthese beschrieben wurde, umgesetzt.

Bei sehr unreaktiven Aldehyden, wie dem para-Hydroxybenzaldehyd, wurden die Reaktionsbedingungen allerdings nicht an einen 95%igen Umsatz angepaßt, der ca. 675 mM HCN (!) erfordern würde, sondern an einen 85%igen, für den man nicht mehr als 300 mM HCN benötigt.

Die Tabellen zeigen die erhaltenen ee-Werte, den chemischen Umsatz und den gewählten pH-Wert für die jeweilige Reaktion.

Carbonylverbindung	pH	Ausbeute (%)	Enantiomerenüberschuß (%)
Benzaldehyd	3,25	80	96
3-Hydroxybenzaldehyd	3,20	87	98
4-Hydroxybenzaldehyd	3,75	83	99
3-Methylbenzaldehyd	3,25	80	96
Furfuralaldehyd	4,00	kein Umsatz	
Acetaldehyd	3,25	kein Umsatz	
(R/S)-3-Methylcyclohexanon	4,50	kein Umsatz	

Tabelle 2.22: Diskontinuierliche Reaktionen mit der (S)-Oxynitrilase

Carbonylverbindung	pH	Ausbeute (%)	Enantiomerenüberschuß (%)
Benzaldehyd	3,25	93	<99
3-Hydroxybenzaldehyd	3,25	90	98
4-Hydroxybenzaldehyd	3,75	*)	
3-Methylbenzaldehyd	3,25	80	98,5
Furfuraldehyd	4,00	90	99
Acetaldehyd	3,25	73	76
(R/S)-3-Methylcyclohexanon	4,50	83	n.b.

*) Die (R)-Oxynitrilase wird von dem 4-Hydroxybenzaldehyd schnell desaktiviert, so daß kein vollständiger Umsatz erreicht werden konnte.

Tabelle 2.23: Diskontinuierliche Reaktionen mit der (R)-Oxynitrilase

Neben den aromatischen Aldehyden wurden mit der (R)-Oxynitrilase weitere, nicht-aromatische Carbonylverbindungen bei tieferen pH-Werten umgesetzt.

Da von diesen weder die Geschwindigkeitskonstanten noch die Gleichgewichtskonstanten unter diesen Bedingungen bekannt sind und ihre Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit auch nicht zu leisten war, konnte die Reaktivität dieser Verbindungen in der Cyanhydrinsynthese nur qualitativ abgeschätzt werden.

Aliphatische Aldehyde, wie z.B. der Acetaldehyd, besitzen eine größere Affinität zur Blausäure als der Benzaldehyd. Das Gleichgewicht von Acetaldehyd und HCN liegt im wäßrigen Medium ganz auf der Seite des Milchsäurenitrils ($K = 17700$) (G. Schlesinger).

Im Gegensatz zu den aliphatischen Aldehyden sollte die Reaktivität des Furfurals geringer sein als die des Benzaldehyds. Beide haben zwar ähnliche sterische Voraussetzungen, jedoch weist der Heterocyclus einen größeren +M-Effekt auf als der Benzolrest, so daß die Carbonylfunktion weniger polarisiert ist

und damit eine geringere Affinität zur HCN aufweisen sollte.

Die Ergebnisse der enzymatischen Cyanhydrinsynthese bestätigen dies. Das (R)-Furfuralcyanhydrin erhielt man schon bei pH 4 mit einem ee-Wert von 99%. Im Gegensatz hierzu konnte das (R)-Milchsäurenitril nur mit einem ee-Wert von 76% bei pH 3,25 dargestellt werden.

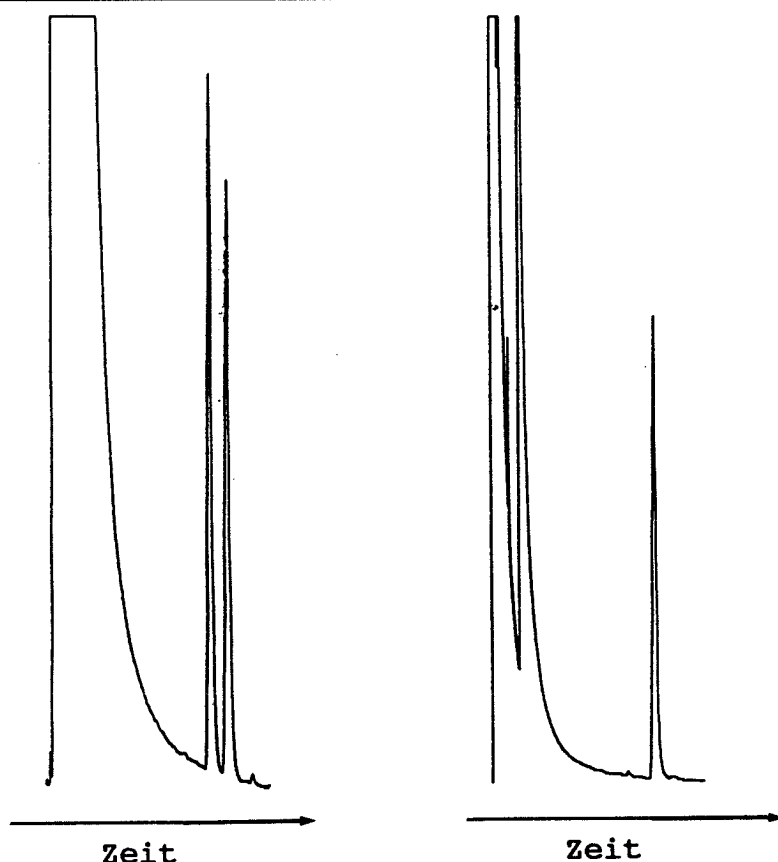


Abbildung 2.45: Gaschromatographische Enantiomerenbestimmung des (R)-Furfuralcyanhydrins über den diastereomeren (R)-MTPA-Ester

Neben den aufgeführten Aldehyden wurde weiterhin versucht, Ketone mit den beiden Oxynitrilasen umzusetzen. Es wurden das 2-Cyclohexanon, Acetophenon, Ethylmethylketon und (R/S)-3-Methyl-Cyclohexanon polarimetrisch bei pH 4,5 getestet. Eine optische Induktion konnte allein bei der Umsetzung des (R/S)-3-Methyl-Cyclohexanon mit der (R)-Oxynitrilase beobachtet werden. Mit 200 mM HCN und 50 mM Keton erhält man schon bei pH 4,00 die höchste optische Induktion bei einer Reaktionszeit von ca. 90

Minuten. Umsetzungen bei tieferen pH-Werten erbrachten keine Erhöhung des Drehwertes. Da die Bestimmung der optischen Reinheit des Syntheseprodukts weder über das entsprechende Ethanolamin noch durch die Derivatisierung mit "Mosher's-Chlorid" gelang, kann allerdings keine eindeutige Aussage über die exakte Stereochemie der Umsetzung und damit über die optische Reinheit gemacht werden.

2.11.2 Kontinuierliche Synthesen

In den zuvor beschriebenen diskontinuierlichen Synthesen ist zwar die Darstellung von optisch hochaktiven Cyanhydrinen möglich, doch der Verbrauch des Biokatalysators ist beträchtlich, da er bei dieser Arbeitsweise nur für einen Syntheseansatz nutzbar ist.

Eine wesentlich bessere Ausnutzung der Enzymaktivität ist in kontinuierlicher Arbeitsweise möglich. Für die hier bearbeitete Reaktion bietet sich insbesondere der Enzym-Membran-Reaktor (EMR) an. Gerade dieser Reaktortyp - ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor mit Katalysatorrückhaltung - besitzt durch seine charakteristischen Betriebspunkte gegenüber anderen Reaktortypen wesentliche reaktionstechnische Vorteile für die Lösung des anstehenden Problems.

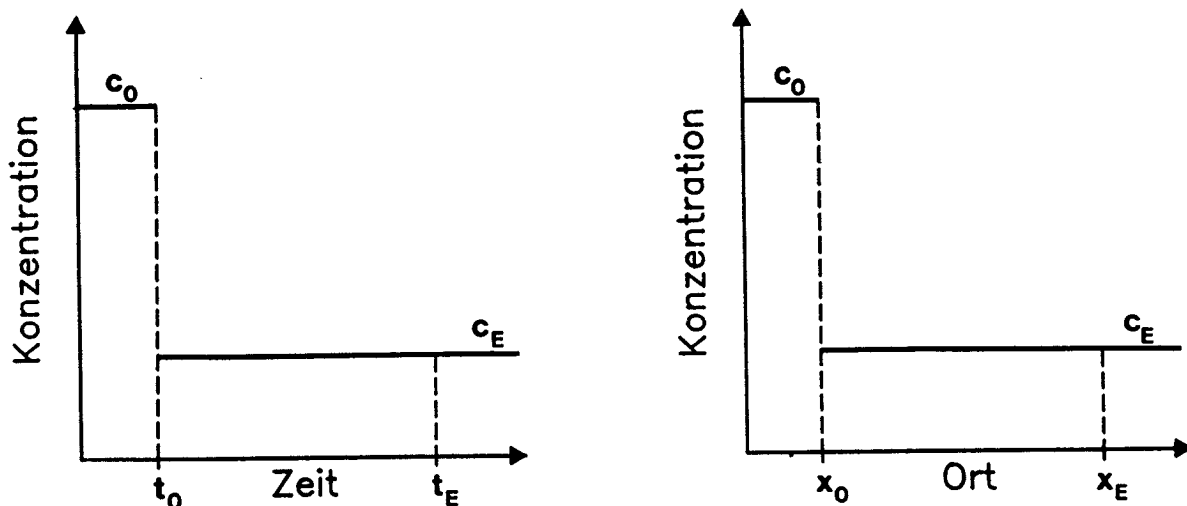


Abbildung 2.46: Verlauf der Konzentration bezüglich Zeit und Ort im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor

Wie die Abbildung verdeutlicht, fallen die Konzentrationen der Produkte bei Eintritt in den Reaktor unstetig auf die Auslaufkonzentration ab. Hierdurch sind die Konzentrationen der Reaktanden, insbesondere des Aldehyds, auf sehr niedrigem Niveau. Infolgedessen verläuft die spontane Reaktion - der Reaktionskinetik entsprechend - sehr langsam, während die Enzyme für viele Substrate schon bei sehr kleinen Konzentrationen im $v_{\max}$ -Bereich ($K_m < 1 \text{ mM}$) sind.

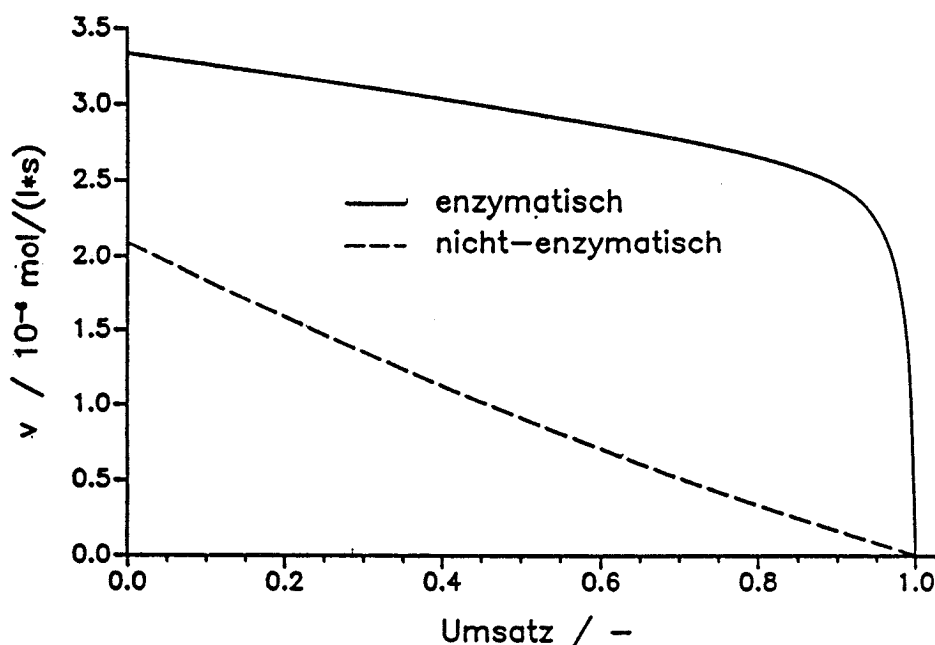


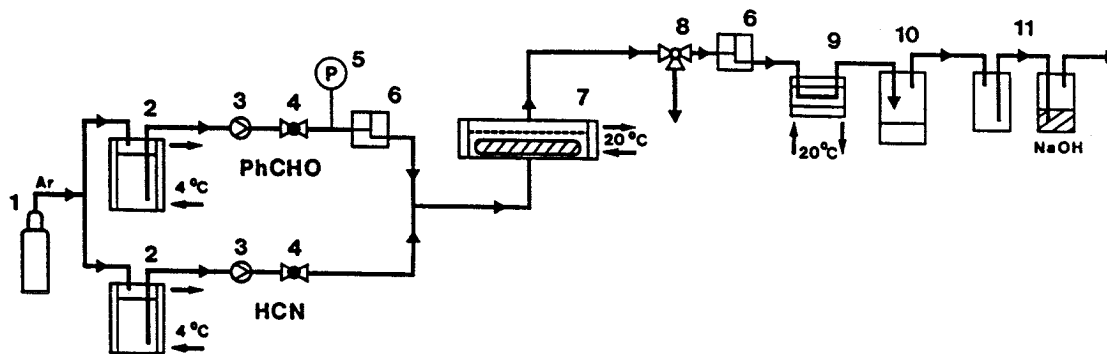
Abbildung 2.47: Berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten als Funktion des Umsatzes

Durch diese reaktionstechnische Maßnahme wird es möglich, die spontane Reaktion neben der enzymatischen um ein weiteres zu diskriminieren. Dies führt dazu, daß die Darstellung von optisch reinen Cyanhydrinen bei höheren pH-Werten als bei der diskontinuierlichen Synthese möglich ist. Neben der besseren Enzymnutzung gewinnt der kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktor (CSTR) also auch hierdurch an besonderer Qualität für die Produktion von chiralen Cyanhydrinen.

2.11.2.1 Produktionsanlagen

Die kontinuierlichen Reaktionen wurden mit der nativen (R)-Oxynitrilase^{*)} und der an Eupergit C fixierten (S)-Oxynitrilase durchgeführt.

Die Umsetzung mit dem löslichen Enzym wurde in einem Flachmembranreaktor (Kula et al. 1987b) mit einer Ultrafiltrationsmembran zur Zurückhaltung des Enzyms ausgeführt. Eine 10 ml Ultrafiltrationsanlage von der Firma Filtron mit hängendem Magnetrührkern diente als Reaktor für die Umsetzung mit der immobilisierten (S)-Oxynitrilase.



- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| 1 Argonversorgung | 7 Enzym-Membran-Reaktor |
| 2 Substratgefäß | 8 Dreiwegehahn |
| 3 Dosierpumpe | 9 Polarimeterdurchflußküvette |
| 4 Drosselventil | 10 Produktgefäß |
| 5 Druckaufnehmer | 11 Gaswaschflasche zur |
| 6 Blasenfalle | Entfernung der Blausäure |

Abbildung 2.48: Fließbild der Produktionsanlage

^{*)}Die kontinuierliche (R)-Mandelsäureproduktion wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Chem. U. Kragl durchgeführt.

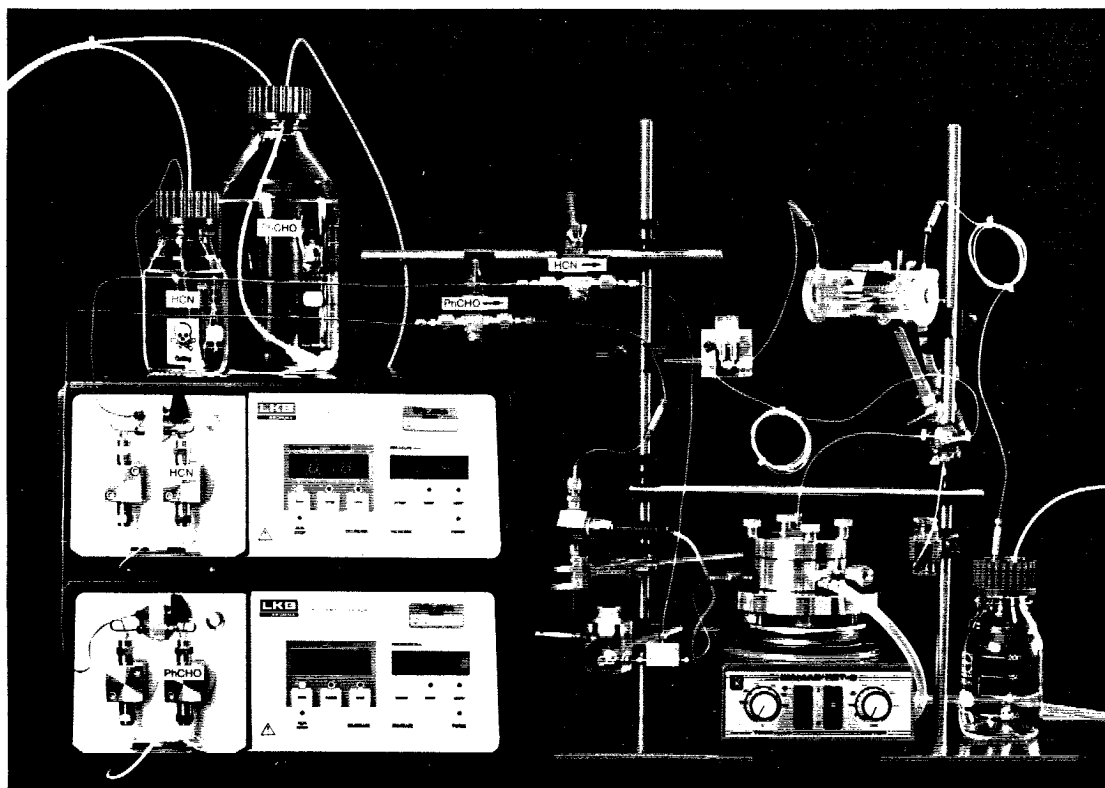


Abbildung 2.49: Photographie der Produktionsanlage

Wegen der leichten Flüchtigkeit der Blausäure einerseits und der möglichen Oxydation des Benzaldehyds durch Luftsauerstoff andererseits sind die Substrate auf 4°C gekühlt und mit Argon gegen die Umgebung abgeschlossen. Die Substrate werden durch zwei HPLC-Pumpen gefördert und erst kurz vor dem Eintritt in den Reaktor durch ein T-Stück gemischt, so daß die nicht-enzymatische Reaktion minimiert wird. Die im Benzaldehydzulauf integrierte Blasenfalle unmittelbar vor dem T-Stück dient zur Dosierung des Enzyms über ein Septum. Der Reaktor selbst hat ein Volumen von 10 ml und ist auf 20°C temperiert. Das Reaktionsgemisch im Inneren des Reaktors wird mit einem Magnetrührkern (400 rpm) gerührt. Das Enzym wird mit einer Ultrafiltrationsmembran des Typs BMK-100 von der Firma Berghoff im Reaktor zurückgehalten. Der Produktstrom wird nach Verlassen des Reaktors zur Bestimmung des Umsatzes durch eine Polarimeter-Küvette geleitet und dann in dem Produktgefäß gesammelt. Hieraus wurde das Cyanhydrin mit Chloroform oder Diethylether in diskontinuierlicher Weise extrahiert und wie beschrieben aufgearbeitet (s.: "Experimenteller Teil", Seite 141).

2.11.2.2 Produktion

Mit den Enzymen wurde jeweils das natürliche Substrat bei pH 3,75 und 20°C umgesetzt.

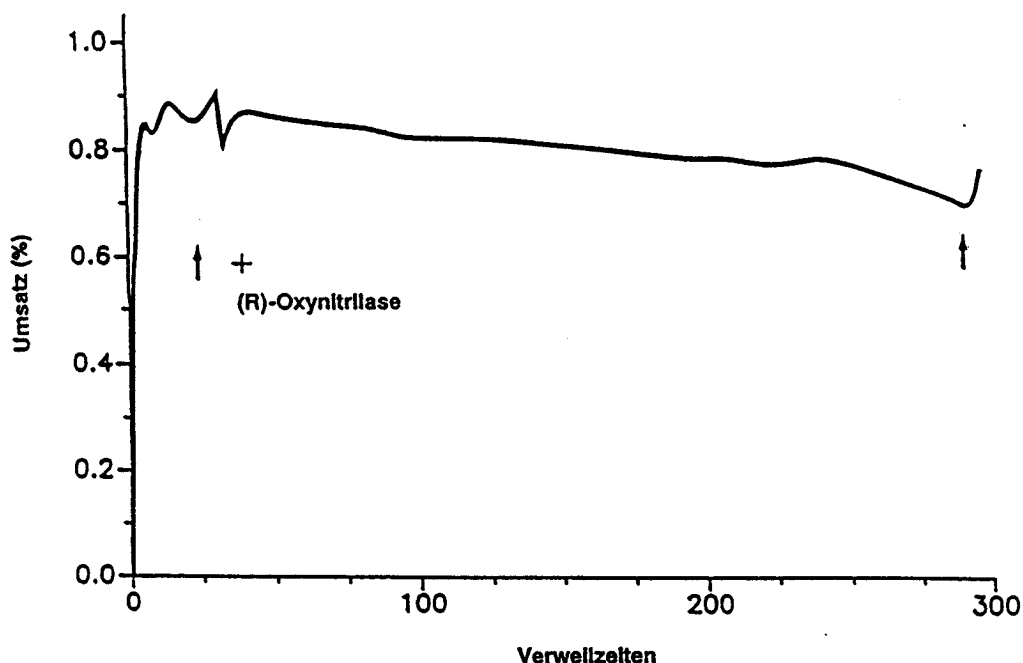


Abbildung 2.50: Kontinuierliche Produktion von
(R)- Mandelsäurenitril

Charakteristische Reaktionsdaten:

Benzaldehyd:	59	mM	
HCN:	202	mM	
Na-Citrat:	45	mM	pH 3,75
Verweilzeit:	3,8	min	
Enzymkonzentration:	0,95	g/l	
Enzymdesaktivierung:	ca. 8	%/d	
Enantiomerenüberschuß:	99	%ee	
Raum-Zeit-Ausbeute:	2380	g/(l*d)	

Tabelle 2.24: Daten zur kontinuierlichen
(R)-Mandelsäurenitrilproduktion

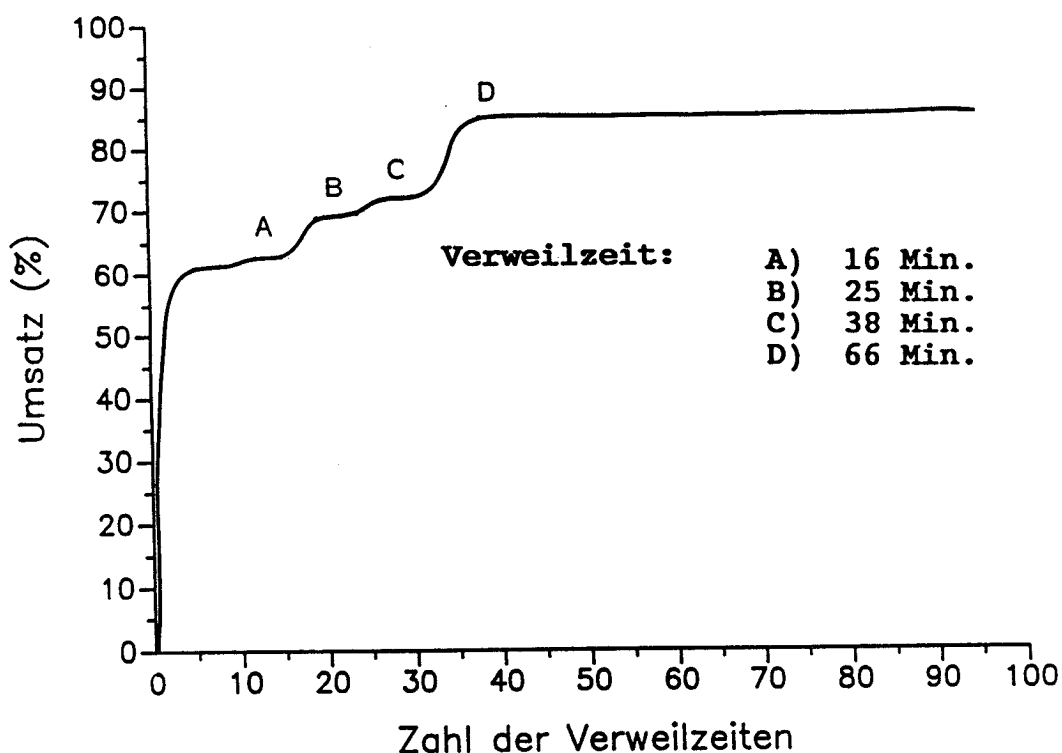


Abbildung 2.51: Kontinuierliche Produktion von (S)-para-Hydroxymandelaldehydnitril

Charakteristische Reaktionsdaten:

para-Hydroxybenzaldehyd:	21	mM	
HCN:	400	mM	
Na-Citrat:	45	mM	pH 3,75
Verweilzeit:	3960	sec	
Katalysatorkonzentration:	0,15	g/ml	
Laufzeit:	72	h	
Enzymdesaktivierung:	ca. 3	%/d	
Reaktionsumsatz:	85	%	
Enantiomerenüberschuß:	98	%	
Raum-Zeit-Ausbeute:	57,9	g/(l*d)	

Tabelle 2.25: Daten zur kontinuierlichen (S)-para-Hydroxymandelaldehydnitril-Produktion

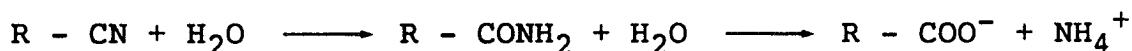
In beiden Experimenten gelang es, die entsprechenden Cyanhydrine in hoher optischer Reinheit darzustellen. Dabei konnte die Produktion des (R)-Mandelsäurenitrils in einer ausgesprochen großen Raum-Zeit-Ausbeute von 2380 g/(l*d) erzielt werden. Diese Ausbeute wird durch die hohe Enzymkonzentration und die damit verbundenen kleinen Verweilzeiten möglich. Im Kontrast hierzu steht die eher geringe Raum-Zeit-Ausbeute bei der Bildung von (S)-para-Hydroxymandelsäure. Diese ist dadurch bedingt, daß der immobilisierte Biokatalysator nur in geringerer Konzentration in den Reaktor einzubringen war und daß die Verweilzeit dadurch entsprechend vergrößert werden mußte, um zu dem angestrebten Gleichgewichtszustand zu gelangen. Außerdem war eine Reduktion der Aldehydkonzentration notwendig, um der Produktinhibierung entgegenzuwirken.

Obschon die Produktion mit der (S)-Oxynitrilase nicht so optimiert ist wie die Reaktion mit der (R)-Oxynitrilase, verdeutlichen die Experimente, daß es mit beiden Enzymen prinzipiell möglich ist, die entsprechenden chiralen Cyanhydrine in kontinuierlicher Arbeitsweise mit hoher optischer Reinheit und gutem chemischem Umsatz zu produzieren.

3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden das Synthesepotential sowie die technische Anwendbarkeit der enzymatischen Cyanhydrinsynthese bearbeitet.

Zuerst wurde ein Screening nach mikrobiellen Oxynitrilase-Produzenten durchgeführt. Hierbei wurden Organismen isoliert, die in der Lage waren, Nitrile enzymatisch über das entsprechende Amid zur Säure zu hydrolysieren.



Eine Oxynitrilase-Aktivität konnte nicht gefunden werden.

Weiterhin wurden pflanzliche Oxynitrilasen aufgereinigt und mit ihnen das vorliegende Thema bearbeitet. Aus Mandeln (*P. amygdalus*) und aus der Mohrenhirse (*S. bicolor*) wurde jeweils eine Oxynitrilase isoliert.

Während von der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* bereits bekannt war, daß mit ihr (R)-Cyanhydrine darstellbar sind, konnten mit der Oxynitrilase aus *S. bicolor* erstmals in dieser Arbeit (S)-Cyanhydrine synthetisiert werden.

Neben der asymmetrischen Blausäureaddition verläuft für gewöhnlich auch die zu racemischen Produkten führende nicht-katalysierte Reaktion. Wenn Produkte mit hoher optischer Reinheit gewünscht werden, ist es daher notwendig, diese spontane Reaktion zu diskriminieren. Ziel dieser Arbeit war es nun, ein wäßriges System zu etablieren, in dem die Synthese nahezu allein durch die Enzymreaktion getragen wird, so daß hohe ee-Werte erzielbar sind.

Durch kinetische und thermodynamische Untersuchungen der enzymatischen und nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese wurde die Grundlage zur Optimierung der Reaktionen geliefert.

Bekannterweise beruht die spontane Blausäureaddition im wesentlichen auf dem nukleophilen Angriff des Cyanids auf den Carbonylkohlenstoff. Das Cyanid-Anion steht aber auch in einem pH-Wert-abhängigen Gleichgewicht mit der undissoziierten Blausäure, so daß die "aktive" Cyanid-Konzentration hierüber lenkbar sein sollte.

Tatsächlich erwies es sich als möglich, über eine pH-Wert-Änderung den Anteil der enzymatischen Reaktion gegenüber der spontanen Cyanidaddition zu vergrößern, so daß die optische Reinheit der Cyanhydrine wesentlich erhöht werden kann.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden dann bei pH 3,75 die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten von mehreren, vorwiegend aromatischen Aldehyden sowie die Beziehung der Substrate zu den Enzymen bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß Aldehyde, deren positive Ladung am Carbonylkohlenstoff durch elektronenliefernde Substituenten partiell ausgeglichen werden kann, weniger schnell reagieren, da der nukleophile Angriff des Cyanids erschwert wird. Eine partielle Kompensierung der Ladung ist durch +M- und/oder +I-Effekte möglich. Gegenteilige Effekte erleichtern den Angriff des Cyanids. Da weiterhin festgestellt wurde, daß diese unterschiedliche Reaktivität der aromatischen Aldehyde in einem linearen logarithmischen Verhältnis zueinander stehen (Hammett-Beziehung), lassen sich nunmehr die thermodynamischen und kinetischen Parameter für viele aromatische Aldehyde über den aciden pH-Bereich und den relevanten Temperaturbereich berechnen.

In derart optimierten Reaktionssystemen gelang es, im wäßrigen Medium mit der Oxynitrilase aus *S. bicolor* optisch hochaktive (S)-Cyanhydrine (U. Niedermeyer et al. 1988a) und mit der Oxynitrilase aus *P. amygdalus* (R)-Cyanhydrine mit hohen ee-Werten darzustellen (U. Niedermeyer et al. 1988b).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß es mit beiden Enzymen möglich ist, chirale Cyanhydrine in kontinuierlicher Arbeitsweise zu produzieren. Beispielsweise konnte mit der (R)-Oxynitrilase unter optimierten Bedingungen im Enzym-Membran-Reaktor (R)-Mandelsäurenitril in einer Raum-Zeit-Ausbeute von

2380 g/(l*d) und in einer optischen Reinheit von über 99% ee produziert werden.

4. Experimenteller Teil

4.1 Analytische Methoden und Geräte

4.1.1 Gaschromatographie

Zur analytischen Gaschromatographie diente ein Shimadzu Gaschromatograph GC-9A mit Flammenionisationsdetektor und Integrator Shimadzu C-R3A.

Die verwendeten Phasen waren:

- Säule A: Fused-Silica (L)-Chirasil-Val 25m * 0,32mm
 - Säule B: Fused-Silica OV1 10m * 0,32mm,
 - Säule C: Porapak Q 2,5m * 3mm.
- (alle stationären Phasen wurden von der Firma Macherey-Nagel, Düren bezogen)

4.1.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ der Firma Merck benutzt.

Als Laufmittel dienten:

- Methanol/Chloroform/Ammoniak/Eisessig 35:15:10:1 (1)
- Ethanol/Chloroform/Ammoniak/Wasser 35:20:10:1 (2)

Zur Entwicklung der Platten wurden folgende Methoden verwendet:

- 0,05%ige Lösung Rhodamin B in Ethanol (1)
- 0,05%ige Lösung KMnO₄ (2)
- 0,05%ige Lösung Bromkresol in Ethanol (3)
- Jod-Kammer (4)
- UV-Licht 254 nm (5)

4.1.3 Spektroskopische Geräte

Die Spektren der beschriebenen Verbindungen wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

- ^1H -NMR-Spektren : EM 390 Varian (90 MHz)
VXR 300 Varian (300 MHz)
- IR-Spektren : Unicam SP 1000 Infrared Spectrophotometer
- UV-Spektren : Spectrophotometer Shimadzu UV 140-02 und Shimadzu UV 160
- MS-Spektren : Finnigan 4510 GC-MS-System

4.1.4 Weitere technische Hilfsmittel

Außerdem gelangten die folgenden Geräte zur Anwendung:

- Compur 4120 Stattox mit Fernmeßkopf HCN, Bayer Diagnostik und Elektronik, München;
- Elektrophorese-Anlage, Desatron 3000/200, Desaga, Heidelberg
- Enzym-Membran-Reaktor, Blasenfalle, Druckaufnehmerhalter, Werkstätten der Kernforschungsanlage Jülich, Jülich;
- FPLC-Anlage, mit Liquid Chromatography Controller 500, P-500 Pumpen und UV-Monitor UV-1, Pharmacia LKB GmbH, Freiburg;
- 2-Kanalschreiber SE 120, Brown Boveri, Wien;
- Mikroprozessor-pH-Meter 763, Knick, Berlin
- Piezoresistiver Absolutdruckaufnehmer 4043A10 mit Verstärker 4610 A, Kistler Instruments GmbH, Ostfildern-Nellingen
- Polarimeter 241 MC, Perkin Elmer, Überlingen;
- Schlauchpumpen P-1, Pharmacia LKB GmbH, Freiburg;
- Twinreader-Photometer, Titertek, Finnland
- Ultrafiltrationsmodul CEC 1 mit Membran YM 30 und YM 10, Amicon GmbH, Witten.

4.1.5 Verwendete Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden entweder von den Firmen Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm, und Aldrich - Chemie GmbH, Steinheim, der Firma Merck, Darmstadt, oder der Firma Sigma, München, bezogen.

Die Trennmedien zur chromatographischen Reinigung der Proteine stammten von dem Unternehmen Pharmacia LKB GmbH, Freiburg.

Die Mandelkleie (*Placenta Amygdalarum amararum pulv.*) wurde von Caesar & Loretz, Hilden, bezogen.

Der Hirsesamen (*S. bicolor*) war ein Geschenk der Firma Semundo Saatzucht GmbH, Rellingen.

4.2 Screening nach mikrobiellen Oxynitrilase-Produzenten

Verdünnungen verschiedener Proben von 1:2 bis 1:10⁵ wurden im "direct plating" auf feste Minimalmedien (M₁) ausplattiert. Hierzu parallel wurden 100 ml-Kolben mit 20 ml Medium beimpft und bei 28°C und 100 rpm bis zu 14 Tage lang geschüttelt. Nachdem die Flüssiganreicherungskulturen bewachsen waren, wurden Aliquots auf dem Festmedium ausplattiert. Nach der Koloniebildung wurden diese durch Vereinzelausstrich und wiederholtes Überimpfen gereinigt. Zur Zellanzucht wurden 200 ml Minimalmedium (M₁) in 500 ml Kolben angeimpft und bei 28°C und 100 rpm bis zu 14 Tage lang inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und mit Glasperlen aufgeschlossen. Der Überstand wird von den Glasperlen abgehebert, zentrifugiert und dann direkt für die Enzymtests verwendet.

4.3 Kulturbedingungen

4.3.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert. Die Vitaminlösung wurde separat kaltsterilisiert und die unbehandelten Nitrile wurden unter sterilen Bedingungen zugegeben. Feste Medien enthielten zusätzlich 1,5% Agar.

4.3.2 Minimalmedien zur Anreicherung von Mikroorganismen (M₁)

Verschiedene Selektivstoffe wurden mit den folgenden Supplementen versetzt, mit Aqua dest. auf 1,0 l aufgefüllt und mit konzentrierter KOH-Lösung auf pH 7,1 eingestellt:

Selektivstoff	x	ml
Vitaminlösung	2,000	ml
Spurensalzlösung	1,000	ml
KH ₂ PO ₄	1,500	g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,050	g
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,050	g
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,050	g
Hefeextrakt	0,750	g

Als Selektivstoffe wurden dabei je nach Anreicherungsstrategie zugesetzt:

A)	Lactocyanhydrin	1,000	ml
B)	Propanalcyanhydrin	1,000	ml
C)	Selektivstoff A) oder B)		
	und NH ₄ Cl	1,000	g
D)	Glukose und	5,000	g
	KCN	1,250	g

E) Benzaldehyd und	1,000 g
KCN	1,250 g
F) Selektivstoffe D) und	
NH ₄ Cl	1,000 g
G) Propionnitril	20,000 ml

4.3.3 Minimalmedium zur Zellanzucht (M₂)

Propionnitril	20,000 ml
Vitaminlösung	2,000 ml
Spurensalzlösung	1,000 ml
KH ₂ PO ₄	1,500 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,050 g
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,050 g
CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,050 g

Hefeextrakt 0,750 g

aufgefüllt mit Aqua dest. auf 1,0 l und mit konzentrierter KOH-Lösung auf pH 7,1 eingestellt.

4.3.4 Vollmedium zur Zellanzucht (V₁)

Casein	5,000 g/l
Hefeextrakt	2,500 g/l
Glukose	1,000 g/l
pH	7,1

4.3.5 Vollmedium zur Zellanzucht (V₂)

Casein	5,000 g/l
Hefeextrakt	2,500 g/l
Glukose	1,000 g/l
Propionnitril	20,000 ml/l
pH	7,1

4.3.6 Spurensalzlösung (Schlegel)

ZnSO ₄ *7 H ₂ O	100,0 mg/l
MnCl ₂ *4 H ₂ O	30,0 mg/l
H ₃ BO ₃	300,0 mg/l
CoCl ₂ *6 H ₂ O	200,0 mg/l
CuCl ₂ *2 H ₂ O	10,0 mg/l
NiCl ₂ *6 H ₂ O	20,0 mg/l
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	30,0 mg/l

4.3.7 Vitaminlösung (Schlegel)

Biotin	2,0 mg/l
Nicotinsäure	20,0 mg/l
Thiamin	10,0 mg/l
4-Aminobenzoat	10,0 mg/l
Pantothenat	5,0 mg/l
Pyridoxamin	50,0 mg/l
Cyanocobalmin	20,0 mg/l

4.4 Reinheitskontrolle und Stammhaltung

4.4.1 Reinheit der gescreenten Stämme

Von den Einzelkolonien wurden Vereinzelungsausstriche auf den Festmedien M₂ und V₁ durchgeführt. Ein Stamm wurde als Reinkultur betrachtet, wenn sich auf den beiden Medien keine unterschiedlichen Kolonieförmigkeiten feststellen ließen. Zusätzlich erfolgte eine mikroskopische Kontrolle.

4.4.2 Stammhaltung

Stammkulturen wurden auf Schrägagar und Agarplatten mit propionitrilhaltigem Medium (M_1) 24 Stunden lang bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Alle 8 bis 10 Wochen erfolgte das Überimpfen auf frisches Medium.

4.4.3 Kulturführung

Die Zellkultivierung erfolgte in Schüttelkolben. Die Flüssigmedien wurden entweder direkt von der Agarplatte mit der Impföse oder aus Vorkulturen mit 1-10% (v/v) angeimpft.

4.4.4 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Bestimmung der Biomasse erfolgte durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspensionen bei 660 nm gegen Aqua dest.. Proben, deren Extinktionswerte 0,8 überschritten, wurden mit Aqua dest. verdünnt.

4.4.5 Gewinnung der zellfreien Rohextrakte

Die Zellernte erfolgte in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase der Stämme (OD_{660} : 0,5 - 1,5) durch Zentrifugation der Zellsuspension. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,1) gewaschen und in diesem resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Naßvermahlung mit Glasperlen (ϕ 0,1 mm). Hierzu wurde 1 ml einer 20%igen Zellsuspension mit 2,5 g Glasperlen versetzt und 10 Minuten auf einem Heidolph-Schüttler geschüttelt. Die Abtrennung des Rohextraktes von Zelltrümmern und Glasperlen wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe Kapitel 4.2).

4.5 Bestimmungen der Enzymaktivitäten

4.5.1 Gaschromatographischer Oxynitrilase-Nachweis (im Screening)

0,4 ml einer 62,5 mM Propanalcyanhydrinlösung in 50 mM Acetatpuffer pH 5,25 wird mit 0,1 ml Rohextrakt bei 20°C inkubiert. Nach 2,5 und 12 Stunden werden 0,1 ml Aliquots genommen und in einem kleinen Reagenzglas zweimal mit je 0,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und gaschromatographisch auf Säule B bei 40°C isotherm analysiert.

4.5.2 Polarimetrischer Oxynitrilase-Nachweis (im Screening)

0,5 ml einer 100 mM Propanal/Acetaldehydlösung in 10 mM Acetatpuffer pH 5,25 werden mit 0,5 ml einer 100 mM KCN-Lösung in 90 mM Acetatpuffer pH 5,25 und 0,1 ml Rohextrakt bei 20°C inkubiert. Nach 2 und 5 Stunden kontrolliert man polarimetrisch ($\lambda = 571 \text{ nm}$), ob eine Änderung des Drehwertes eingetreten ist.

4.5.3 Gaschromatographische Bestimmung von Nitrilhydratase-Aktivitäten

20 μl 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, 50 μl 0,029 M Propionnitrillösung, 0,5 μl Methanol (interner Standard) und 50 μl Rohextrakt werden bei 22°C inkubiert. In Zeitabständen wird je 1 μl mit einer 10 μl -Spritze entnommen und direkt gaschromatographisch auf Säule C bei 170°C isotherm analysiert. Man errechnet die Enzymaktivität sowohl aus der Abnahme der Propionnitrilkonzentration als auch aus der zeitlichen Zunahme der Konzentration von Propionsäureamid und Propionsäure.

4.5.4 Gaschromatographische Bestimmung von Amidase-Aktivitäten

20 µl 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,1, 50 µl 0,029 M Propionsäureamidlösung, 0,5 µl Methanol und 50 µl Rohextrakt werden bei 22°C inkubiert. In Zeitabständen wird je 1 µl mit einer 10 µl-Spritze entnommen und direkt gaschromatographisch auf Säule C bei 170°C analysiert. Aus der Abnahme der Propionsäureamidkonzentration sowie aus der Zunahme der Propionsäurekonzentration errechnet man die Enzymaktivität.

4.5.5 Photometrische Aktivitätsbestimmungen für die Oxynitrilase aus *P. amygdalus*

4.5.5.1 "Spalttest"

990 µl einer 2 mM racemischen Mandelsäurenitrillösung (benzaldehydfrei!) in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 10 µl Proteinlösung bei 20°C versetzt. Die Extinktionszunahme wird bei 250 nm in einer Quarzküvette gemessen. Die Aktivität berechnet sich nach:

$$U(\text{ml Proteinlösung}) = \frac{dA/\text{min} * 1,00 * 1000}{\epsilon * d * 0,01}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient (Benzaldehyd) 12350 (1/(cm*mol))

d = Schichtdicke (cm)

4.5.5.2 Enzymatische Cyanhydrinsynthese

890 μ l einer 50 mM Benzaldehydlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 100 μ l einer 5,29 M HCN-Lösung und 10 μ l Proteinlösung bei 20°C versetzt und die Extinktionsabnahme wird bei 280 nm in einer 0,02 cm Küvette gemessen.

$$U(\text{ml Proteinlösung}) = \frac{dA/\text{min} * 1,00 * 1000}{\epsilon * d * 0,01}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient (Benzaldehyd) 1376 (l/mol*cm))

d = Schichtdicke (cm)

4.5.6 Photometrische Aktivitätsbestimmungen für die Oxynitri- lase aus *S. bicolor*

4.5.6.1 "Spalttest"

990 μ l einer 1 mM racemischen para-Hydroxymandelsäurenitrillösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 10 μ l Proteinlösung bei 20°C versetzt und die Extinktionszunahme bei 285 nm in einer Quarzküvette gemessen.

$$U(\text{ml Proteinlösung}) = \frac{dA/\text{min} * 1,00 * 1000}{\epsilon * d * 0,01}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient (para-Hydroxybenzaldehyd) 16530
(l/mol*cm))

d = Schichtdicke (cm)

4.5.6.2 Enzymatische Cyanhydrinsynthese

890 μ l einer 7 mM para-Hydroxybenzaldehydlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 100 μ l einer 5,29 M HCN-Lösung und 10 μ l Proteinlösung bei 20°C versetzt und die Extinktionsabnahme wird bei 285 nm in einer 0,02 cm Küvette gemessen.

$$U(\text{ml Proteinlösung}) = \frac{dA/\text{min} * 1,00 * 1000}{\epsilon * d * 0,01}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient (para-Hydroxybenzaldehyd) 16530
(l/mol*cm))

d = Schichtdicke (cm)

4.6 Proteinbestimmungen

Die BCA-Methode wurde zur Bestimmung des Proteingehaltes während des Screenings, die Bradford-Methode bei der Aufreinigung der Enzyme benutzt.

4.6.1 BCA-Test (P. K. Smith et al.)

Lösung A: 2% Na_2CO_3 , 0,95% NaHCO_3 , 0,16% Natriumtartrat und
1% BCA (Bicinchoninic acid) in 0,1 N Natronlauge

Lösung B: 4% $\text{CuSO}_4 * 5 \text{H}_2\text{O}$

Die Lösungen A und B werden kurz vor dem Gebrauch im Verhältnis von 50:1 gemischt. 10 μ l der zu untersuchenden Proteinlösung werden mit 200 μ l BCA-Reagenz versetzt, geschüttelt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei 562 nm mißt man dann die Adsorption auf Mikrotiterplatten im Photometer "Twinreader" der Firma Titertek, Finnland.

Analog wird die Adsorption von Eichlösungen mit Rinderserumalbumin (0,25, 0,50, 0,75 und 1,0 mg/ml) bestimmt. Die so erhaltenen Werte dienen als Grundlage zur Bestimmung des Proteingehaltes der untersuchten Lösungen.

4.6.2 Bradford-Bestimmung (M. M. Bradford; L. Jaenicke 1984b)

Lösung A: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 werden in 50 ml Ethanol gelöst. Man fügt 100 ml 85%ige Phosphorsäure hinzu und füllt mit Wasser auf 1000 ml auf.

20 µl der Probe werden mit 1 ml des Reagenz vermischt und nach 10 Minuten wird die Extinktion bei 595 nm gemessen. Rinderserumalbumin-Standardproben im Bereich von 10-100 g/ml werden ebenso vermessen und dienen als Grundlage zur Berechnung des Proteingehaltes in den untersuchten Proben.

4.7 SDS-Elektrophorese (L. Jaenicke 1984b; W. J. Williams 1984)

Lösung 1:	Acrylamid	30,0	g
	Bisacrylamid	0,8	g
	dest. Wasser	100,0	ml

Lösung 2:	Tris	0,5	M
	SDS	0,4	%
	pH 6,8 (eingestellt mit HCl)		

Lösung 3:	Tris	1,5	M
	SDS	0,4	%
	pH 8,8 (eingestellt mit HCl)		

Trenngel:	Lösung 1	40,9	ml
	Lösung 3	25,0	ml
	TEMED	0,1	ml
	dest. Wasser	33,0	ml
	10%-iges APS	1,0	ml

Sammelgel:	Lösung 1	13,0	ml
	Lösung 2	25,0	ml
	TEMED	0,1	ml
	dest. Wasser	60,9	ml
	10%-iges APS	1,0	ml

Elektrophoresepuffer:	Tris	0,005	M
	Glycin	0,384	M
	SDS	0,1	%
	pH 8,3		

Probenpuffer:	Tris	0,02	M
	EDTA	0,002	M
	SDS	2	%
	Mercaptoethanol	5	%
	Glycerin	50	%
	Bromphenolblau	0,001	M
	pH 8,0		

Abkürzungen:	Tris	=	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
	SDS	=	Natriumdodecylsulfat
	TEMED	=	N,N,N,N -Tetramethylethylen-diamin
	APS	=	Ammoniumperoxydisulfat
	EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure

Färbelösung:	Coomassie Blue	0,625	g
	Methanol	227	ml
	Eisessig	23	ml

Entfärber:	Eisessig	75	ml
	Methanol	50	ml
	dest. Wasser	875	ml

Eichproteine :	Trypsin	20100 Da
	Lactat-Dehydrogenase	36500 Da
	Glutamat-Dehydrogenase	55400 Da
	Phosphorylase B	97400 Da
	Aldolase	158000 Da

Die Proteinproben werden mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt. Anschließend werden 20 - 50 µl der Proben auf das Gel aufgetragen und 16 Stunden lang mit 70 V getrennt. Danach wird das Gel 1 Stunde lang gefärbt und schließlich mehrere Stunden entfärbt.

4.8 Enzymaufreinigung und -charakterisierung

Die Aufreinigung und Charakterisierung der (R)- und (S)-Oxynitrilase ist in Kapitel 2.3 auf Seite 25 ff. geschildert worden, so daß die experimentellen Details an dieser Stelle nicht noch einmal beschrieben werden sollen.

Die Charakterisierung der Enzyme erfolgte über die oben dargestellten Enzym-Assays und die ebenfalls beschriebene Protein-Bestimmung nach Bradford.

Die Molekulargewichte der Enzyme wurden mit der SDS-Elektrophorese (Kapitel 4.7 sowie Abbildungen 2.9 und 2.11) und mittels Gelchromatographie bestimmt (Kapitel 2.3.3 sowie Abbildungen 2.12a und 2.12b).

Die Gelchromatographie erfolgte an einer S-200-HR Säule (Höhe: 70 cm; ϕ : 1,6 cm). Der Eluent war 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, der zudem 150 mM NaCl enthielt. Chromatographiert wurde

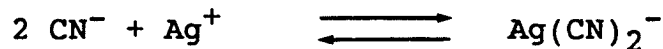
mit einem Fluß von 1 ml/Min.. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit den Referenzsubstanzen:

Cytochrom C (Pferd)	12300 Da
Myoglobin (Wal)	17000 Da
Myoglobin (Pferd)	17800 Da
Rinderserumalbumin	67000 Da
Aldolase	158000 Da
Carboanhydrase	29000 Da
Dextranblau	2000000 Da

4.9 Quantitative Cyanid-Bestimmung (W. J. Williams, 1976)

Lösung A: 0,01 M AgNO₃

Lösung B: 0,01% Dithizon in Aceton



Ausführung:

Die Cyanidprobe wird mit 50 ml 95%igem Ethanol, 1 ml 1M NaOH und 2 ml von Lösung B versetzt. Dann titriert man mit Lösung A. Den Äquivalenzpunkt erkennt man daran, daß überschüssige Silberionen mit dem Indikator (Dithiozon) eine intensive rote Färbung erzeugen.

4.10 Darstellung von Substraten und Referenzsubstanzen

4.10.1 Darstellung der racemischen Cyanhydrine

Mandelsäurenitril

Zur Entfernung des enthaltenen Benzaldehyds werden 5 g käufliches Mandelsäurenitril in 100 ml Ether gelöst und zweimal mit 25 ml Natriumhydrogensulfitlösung (8 Gewichtsprozent) ausgeschüttelt. Anschließend werden die Phasen getrennt. Die organische Phase wird mit 25 ml verdünnter HCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird zweimal mit 50 ml Pentan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das so gereinigte Mandelsäurenitril kristallisiert bei -18°C im Tiefkühlschrank.

Schmelzpunkt: 28°C

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3): 7,4 ppm (m, 5H)
5,35 ppm (s, 1H)
4,2 ppm (s, 1H)

IR-Spektrum (KBr, Film):

3500 cm^{-1} , 2320 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , 1060 cm^{-1}

Synthese der racemischen Cyanhydrine

25 mmol (ca. 3 g) der Aldehyde werden in einem 50 ml Kolben mit etwa 30 ml einer 32%igen Natriumbisulfitlösung versetzt. Diese Mischung wird im Eisbad gekühlt und kräftig gerührt, bis sich ein Brei des Bisulfitadduktes bildet. Dieser wird abfiltriert und einige Male mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend wird der erhaltene Feststoff mit Wasser zu einem Brei angerührt und mit 3 g Kaliumcyanid, das vorher in 25 ml Wasser gelöst wurde, unter Eiskühlung und Rühren versetzt. Danach läßt man noch 15 Minuten nachrühren und extrahiert dann

einige Male gründlich mit Ether. Anschließend wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedampft. Den Rückstand wäscht man zuerst einige Male mit Pentan, trocknet ihn dann im Ölpumpenvakuum und lagert ihn unter teilweiser Kritallisation der Cyanhydrine bei -18°C im Tiefkühlschrank.

ortho-Methylmandelsäurenitril

Ausbeute: 2,75 g (75% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3):

7,1 - 7,4	ppm (m, 4H)
5,35	ppm (s, 1H)
4,4	ppm (s, 1H)
2,35	ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3200 cm^{-1} , 2340 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} , 1080 cm^{-1}

meta-Methylmandelsäurenitril

Ausbeute: 3,01 g (82% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3):

7,1 - 7,4	ppm (m, 4H)
5,65	ppm (s, 1H)
3,5	ppm (s, 1H)
2,35	ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Film):

3500 cm^{-1} , 2320 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} , 1080 cm^{-1}

para-Methylmandelsäurenitril

Ausbeute: 2,8 g (76% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3):

7,2 - 7,5	ppm (m, 4H)
5,55	ppm (s, 1H)
3,5	ppm (s, 1H)
2,4	ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3500 cm^{-1} , 2320 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1215 cm^{-1} , 1090 cm^{-1}

meta-Hydroxymandelsäurenitril

Ausbeute: 3,35 g (95% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum ($\text{DMSO}-d_6$):

9,6	ppm (s, 1H)
7,4 - 7,1	ppm (m, 4H)
5,6	ppm (s, 1H)
3,8	ppm (s, 1H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3300 cm^{-1} , 2320 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1060 cm^{-1}

para-Hydroxymandelsäurenitril

Ausbeute: 2,59 g (75% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum ($\text{TFA}-d_1$):

7,6 - 7,0	ppm (m, 4H)
5,55	ppm (s, 1H)

Die Hydroxymandelsäurenitril-Derivate sind in Chloroform wenig löslich. Darüber hinaus zerfällt das para-Hydroxymandelsäurenitril in polaren Lösungsmitteln wie z.B. DMSO sehr schnell, so daß diese Substanz in Trifluoressigsäure vermessen

wurde. Die bei ca. 3,8 ppm und 9,6 ppm zu erwartenden Hydroxylprotonen fehlen im ^1H -NMR-Spektrum, da sie unter diesen Bedingungen wahrscheinlich vollständig ausgetauscht werden.

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3300 cm^{-1} , 2320 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , 1035 cm^{-1}

Vanillincyanhydrin

Ausbeute: 2,9 g (65% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (DMSO-d_6):

9,2	ppm (s, 1H)
7,1 - 6,7	ppm (m, 3H)
5,6	ppm (s, 1H)
3,8	ppm (s, 3H)
3,5	ppm (s, 1H)

Furfuralcyanhydrin

Ausbeute: 2,85 g (92% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3):

7,5	ppm (m, 1H)
6,5	ppm (m, 2H)
5,55	ppm (s, 1H)
4,1	ppm (s, 1H)

4.10.2 Darstellung der racemischen Ethanolamine durch Reduktion der Cyanhydrine (präparativ)

In einem 100 ml Dreihalskolben mit Magnetrührer, Tropftrichter und einem Rückflußkühler mit Calciumchloridtrockenrohr legt man 230 mg (6 mmol) LiAlH_4 in Ether vor. Unter ständigem Rühren tropft man 10 mmol des entsprechenden Cyanhydrins in trockenem Ether so zu, daß der Ether mäßig siedet. Nach Beendigung des Zutropfens rührt man noch 4 Stunden. Dann kühlt man den Kolben mit Eiswasser und versetzt das Reaktionsgemisch unter Rühren so lange mit Wasser, bis kein Wasserstoff mehr entweicht. Das gebildete Aluminiumhydroxid trennt man durch Filtration ab und

wäscht es mehrmals gründlich mit Ether. Das gesammelte Filtrat wird zweimal mit 20 ml gesättigter Na_2HCO_3 -Lösung und einmal mit 10 ml Wasser gewaschen. Anschließend trocknet man die organische Phase über Na_2SO_4 , filtriert das Na_2SO_4 ab und leitet vorsichtig HCl -Gas in das Filtrat. Das dabei ausfallende Hydrochlorid der Ethanolamine wird ebenfalls abfiltriert. Der Filterkuchen wird mit Ether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

2-Amino-1-(ortho-Methylphenyl)ethanol

Ausbeute: 0,65 g (43% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (TFA-d_1): 7,3 - 7,7 ppm (m, 4H)
 5,75 ppm (m, 1H)
 3,8 ppm (m, 2H)
 2,5 ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3300 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} , 1030 cm^{-1}

2-Amino-1-(meta-Methylphenyl)ethanol

Ausbeute: 0,79 g (52% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (TFA-d_1): 7,1 - 7,4 ppm (m, 4H)
 5,35 ppm (m, 1H)
 3,8 ppm (m, 2H)
 2,4 ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} ,
 1090 cm^{-1}

2-Amino-1-(para-Methylphenyl)ethanol

Ausbeute: 0,54 g (35% der Theorie)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (TFA-d_1): 7,2 - 7,6 ppm (m, 4H)
5,35 ppm (m, 1H)
3,7 ppm (m, 2H)
2,4 ppm (s, 3H)

IR-Spektrum (KBr, Preßling):

3300 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} , 1090 cm^{-1}

4.10.3 Pentafluoracylierung der Ethanolamine zur gaschromatographischen ee-Wert-Bestimmung

5 mg des Ethanolamins werden in 1 ml Methylenchlorid suspendiert und mit 25 μl Pentafluorpropionsäureanhydrid versetzt. Diesen Ansatz läßt man 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Danach wird überschüssiges Pentafluorpropionsäureanhydrid am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen und gaschromatographisch analysiert.

Die Verifizierung der racemischen N,O-Bis-(pentafluorpropionyl)-Derivate erfolgte massenspektroskopisch. Hierzu wurden die Substanzen mit einem GC-MS-System analysiert.

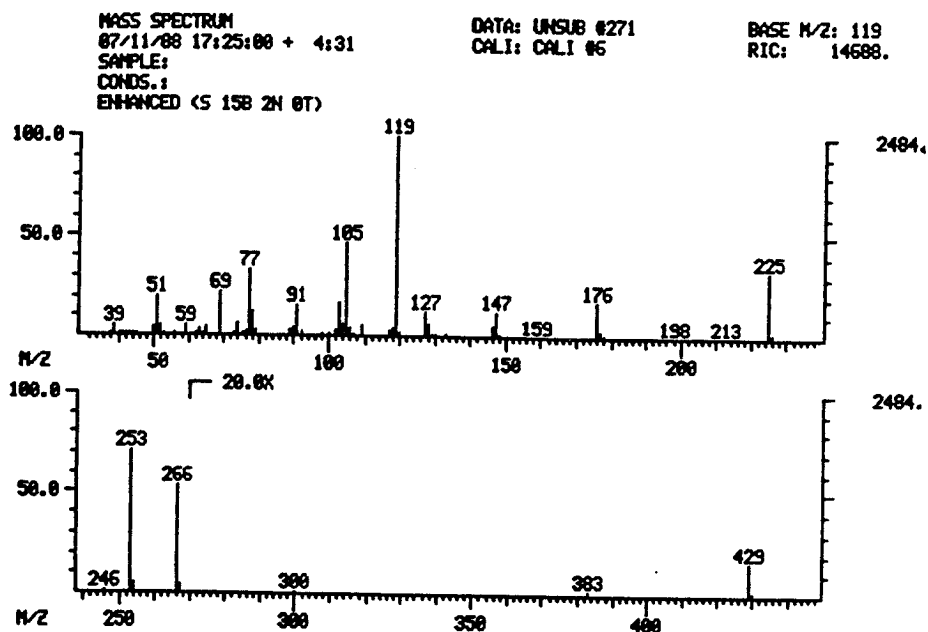


Abbildung 4.1: GC-MS-Spektrum von N,O-Bis-(pentafluoropropionyl)-2-amino-1-(phenyl)-ethanol

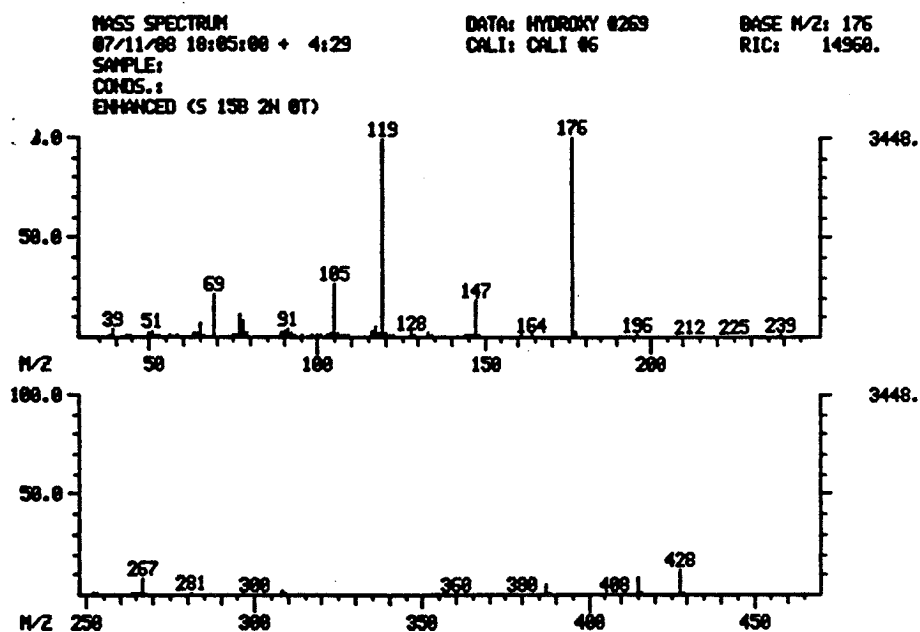


Abbildung 4.2: GC-MS-Spektrum von N,O-Bis-(pentafluoropropionyl)-2-amino-1-(p-hydroxyphenyl)-ethanol

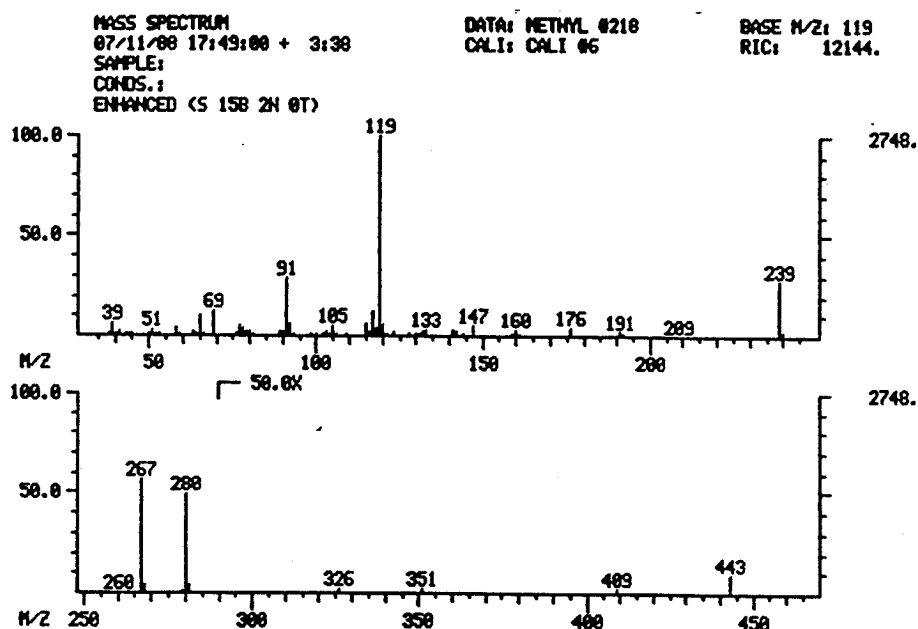


Abbildung 4.3: GC-MS-Spektrum von N,O-Bis-(pentafluorpropionyl)-2-amino-1-(p-methylphenyl)-ethanol

4.10.4 Kombinierte Reduktion und Pentafluoracetylierung der enzymatisch hergestellten Cyanhydrine zur Bestimmung des ee-Wertes

Nach Beendigung der enzymatischen Reaktion wird das gebildete Cyanhydrin mit Chloroform extrahiert. Aliphatische Cyanhydrine und polarere aromatische Cyanhydrine, wie z.B. para-Hydroxymandelsäurenitril, werden mit polareren Lösungsmitteln wie z.B. Ether extrahiert. Nach der Extraktion wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und mit 250 μl einer 1 M Diboranlösung (in Tetrahydrofuran) in 30 Minuten bei Zimmertemperatur reduziert. Nach Hydrolyse des überschüssigen Diborans mit einigen Tropfen Ethanol und Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der erhaltene Aminoalkohol direkt mit 25 μl Pentafluorpropionsäureanhydrid in 1 ml Methylenchlorid bei Raumtemperatur in 2 Stunden acyliert. Anschließend wird überschüssiges Anhydrid am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit Methylenchlorid wieder aufgenommen und gaschromatographisch analysiert.

4.10.5 Bestimmung der optischen Reinheit von Cyanhydrinen über die "Mosher-Derivate"

4.10.5.1 Darstellung des (R)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäurechlorids (R(+)-MTPA-Chlorid)

0,1 g (R)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäure werden in 1 ml Thionylchlorid gelöst und zwei Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend läßt man das Reaktionsgemisch abkühlen und zieht am Rotationsverdampfer das überschüssige Thionylchlorid ab. Um restliche Spuren des Thionylchlorids zu entfernen, wird der Rückstand mehrmals mit Toluol aufgenommen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wieder abgezogen. Schließlich löst man den Rückstand in 1 ml Toluol und lagert das Säurechlorid im Tiefkühlschrank.

4.10.5.2 Darstellung der Cyanhydrin-Mosher-Derivate zur Bestimmung der optischen Reinheit

5 mg des Cyanhydrins werden in 1 ml Chloroform mit 100 μ l der oben dargestellten MTPA-Cl-Lösung (4.10.5.1) und 100 μ l Pyridin bei Raumtemperatur versetzt. Dieses Reaktionsgemisch läßt man dann 6 Stunden stehen, zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab, nimmt mit Methylenchlorid auf und analysiert gaschromatographisch auf Säule B.

4.10.6 Darstellung der Blausäure

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Vigreuxkolonne und Liebigkühler werden ca. 20 g Natriumcyanid vorgelegt und mit 50 ml Wasser gelöst. Zu dieser gut gerührten Lösung tropft man langsam 50 ml 5 M Schwefelsäure. Die hierdurch freiwerdende Blausäure kondensiert in der mit Eis/Kochsalz gekühlten Vorlage. Die Entlüftung der Apparatur wird in Natronlauge eingeleitet, um entweichende Blausäure aufzufangen.

Die erhaltene Blausäure wird zur Entfernung von Wasserspuren über Na_2SO_4 getrocknet und über Na_2SO_4 aufbewahrt. Hierdurch tritt eine gewisse Stabilisierung ein, so daß die durch Polymerisation bedingte Gelbfärbung ausbleibt. Blausäurereste und der Destillationssumpf werden durch Eintragen in alkalische Fe_2SO_4 -Lösung vernichtet (W. Ochterbeck, 1986).

4.10.7 Darstellung von trans-4,5-Dicyanocyclohex-1-en

6,13 g (78 mmol) Fumardinitril und 6,29 g (120 mmol) Butadien werden in 20 ml Toluol bei 100°C für 24 Stunden in einem 150 ml großen Reaktionsautoklaven erhitzt. Der Druck steigt zunächst auf 4 bar an und fällt nach Beendigung der Reaktion auf 1 bar ab. Im Anschluß an die Reaktion wird das Gemisch in einen Einhalskolben überführt und das Toluol abgezogen. Die sich abscheidenden braunen Kristalle werden in Ethanol gelöst, mit etwas Aktivkohle versetzt und wenige Minuten unter Rückfluß aufgeköcht. Diesen Vorgang wiederholt man solange, bis die Lösung farblos ist. Danach wird bis zur Trockne eingedamft. Hierbei kristallisiert das Produkt in feinen weißen Plättchen.

Ausbeute: 5,6g (54,7% der Theorie)

Schmelzpunkt: 126°C (Literatur: 125°C)

90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (Aceton- d_6):

5,75 ppm	(d, 2H)
3,42 ppm	(m, 2H)
2,55 ppm	(m, 4H)

4.10.8 Darstellung von Malonsäuremononitril

21 mmol Chloressigsäure werden in 4 ml Wasser gelöst und allmählich mit Natriumcarbonat neutralisiert. Die gut gerührte Lösung wird bei einer Ölbadtemperatur von 100°C mit 21 mmol Kaliumcyanid versetzt, das in kleinen Portionen hinzugegeben wird. Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung auf 0°C

abgekühlt und mit Salzsäure neutralisiert. Das ausfallende Kaliumchlorid wird abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingengt. Hierbei scheiden sich helle Kristalle ab, die an der Luft zerfließen.

Schmelzpunkt: 63°C (Literatur: 65° - 66°C)

4.10.9 Darstellung von Malonsäuremonoamid

4 g Malonsäuremononitril werden in 16 ml Ethanol mit 0,16 g Schwefelsäure versetzt und 2 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wird abgezogen und die zurückbleibende Flüssigkeit mit 30 ml 28%iger Ammoniaklösung 48 Stunden lang bei 0°C stengelassen. Die Lösung wird anschließend im Wasserstrahlvakuum bis zur Trockne eingedampft. Die zurückbleibenden Kristalle wäscht man mit wenig eiskalter Ammoniaklösung.

4.11 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Aldehyden und Cyanhydrinen

Zur Bestimmung von kinetischen Parametern der Cyanhydrin-synthese wurden die Extinktionskoeffizienten von aromatischen Aldehyden und Cyanhydrinen in 45 mM Natriumcitratpuffer bei pH 3,75 benötigt. Hierzu werden die Substanzen im Puffer gelöst und UV-Spektren im Bereich von 450-220 nm aufgenommen sowie die Extinktionskoeffizienten für die Aldehyde und Cyanhydrine nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (22)$$

E = Extinktion (-)

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (l/(cm*mol))

c = molare Konzentration (mol/l)

d = Länge des Lichtweges in der adsorbierenden Lösung (cm)

= Wellenlänge (cm⁻¹)

Substanz	(1)	$\epsilon(1)$	(2)	$\epsilon(2)$
Benzaldehyd	250	12350	280	1376
Mandelsäurenitril	250	1376	280	16
2-Methylbenzaldehyd	250	12950	293	1680
3-Methylbenzaldehyd	250	12300	289	1600
3-Methylmandelsäurenitril	250	1643	289	23
4-Methylbenzaldehyd	255	12530		
4-Methylmandelsäurenitril	255	520		
3-Hydroxybenzaldehyd	255	7012	316	3035
3-Hydroxymandelsäurenitril	255	812	316	12
4-Hydroxybenzaldehyd	285	16530		
4-Hydroxymandelsäurenitril	285	407		
Vanillin	279	11327	308	9943

Tabelle 4.1: Extinktionskoeffizienten von aromatischen Aldehyden und Cyanhydrinen in 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75

4.12 Bestimmung der Löslichkeit aromatischer Aldehyde in wäßrigen und wäßrig-alkoholischen Systemen

Die aus 45 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 und Puffer-Ethanol (bis 50 v/v) bestehenden Lösungssysteme werden mit dem entsprechenden Aldehyd versetzt und 10 Minuten lang mit Ultraschall behandelt. Für den Fall, daß der Aldehyd vollständig gelöst ist, wird nochmals Aldehyd hinzugegeben und mit Ultraschall behandelt. Dann temperiert man die Proben für eine Stunde auf 20°C, entnimmt Aliquots und bestimmt photometrisch die Konzentration des Aldehyds.

v/v % (Ethanol)	0	10	20	30	40	50
Substanz	Löslichkeit (mM)					
Benzaldehyd	79	104	141	254	545	1053
3-Methylbenzaldehyd	18	25	35	79	152	395
Vanillin	80	115	185	689	n.b.	1450
3-Hydroxybenzaldehyd	122	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
4-Hydroxybenzaldehyd	117	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 4.2: Löslichkeiten von Aldehyden in wäßrigen und wäßrig-alkoholischen Systemen

4.13 Bestimmung kinetischer Daten der enzymatischen und nicht-enzymatischen Cyanhydrinsynthese

4.13.1 pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinsynthese

0,900 ml der Aldehydlösung (50 mM Benzaldehyd, 5 mM p-Hydroxybenzaldehyd) in 45 mM Natriumcitratpuffer werden mit 0,080 ml Wasser, 0,020 ml Enzymlösung oder Wasser und mit 0,005 ml Blausäure versetzt. Die Extinktionsänderung wird bei entsprechender Wellenlänge gemessen.

4.13.2 pH-Abhängigkeit der Cyanhydrinspaltung

0,980 ml Cyanhydrinlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer werden mit 0,020 ml Proteinlösung oder Wasser versetzt. Man mißt die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

4.13.3 Synthese von Cyanhydrinen (Aldehyd-Abhängigkeit)

0,900 ml Aldehydlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 0,020 ml Wasser oder 0,010 ml Wasser und 0,010 ml Enzymlösung versetzt. Anschließend gibt man 0,080 ml 12,5 M Blausäurelösung hinzu und mißt bei geeigneter Wellenlänge die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

4.13.4 Synthese von Cyanhydrinen (Blausäure-Abhängigkeit)

0,300 ml Aldehydlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 0,010 ml Proteinlösung, 0,600 ml Puffer, 0,090-x ml Wasser und mit x ml Blausäurelösung (12,5 M/l) versetzt. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wird gemessen.

4.13.5 Spaltung von Cyanhydrinen

0,980 ml der Cyanhydrinlösung in 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 werden mit 0,020 ml Wasser oder Proteinlösung versetzt. Man mißt die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit.

4.14 Diskontinuierliche Umsetzungen mit der (R)- und der (S)- -Oxynitrilase

(R)-Mandelsäurenitril (Beispiel 1)

53 mg (0,5 mmol) Benzaldehyd werden in 9,4 ml 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,25 gelöst und auf 20°C temperiert. Hierzu gibt man 125 µl Oxynitrilase-Lösung (ca. 0,25 mg) und 475 µl 4,2 M wässriger HCN-Lösung. Man verfolgt die Reaktion polarimetrisch ($\lambda = 578$ nm). Nach 30 bis 45 Minuten stellt sich ein konstanter Drehwert ein, und die Reaktion ist beendet. Danach wird das Reaktionsgemisch viermal mit 10 ml Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wird der Rückstand dreimal mit je 10 ml Pentan gewaschen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Chem. Ausbeute : 61,8 mg (93% der Theorie)
Optische Reinheit : 99% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt als N,O-Bis-Pentafluorpropionyl-2-Amino-1-Phenylethanol-Derivat des Mandelsäurenitrils.

(R)-meta-Methylmandelsäurenitril

Entsprechend Beispiel 1 werden 60 mg (0,5 mmol) meta-Methylbenzaldehyd bei pH 3,25 umgesetzt. Nach ca. 90 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung erfolgt analog Beispiel 1.

Chem. Ausbeute : 59 mg (80% der Theorie)
Optische Ausbeute : 98,5% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

(R)-meta-Hydroxymandelsäurenitril

Entsprechend Beispiel 1 werden 61 mg (0,5 mmol) meta-Hydroxybenzaldehyd bei pH 3,25 mit 450 µl 4,2 M wäßriger HCN-Lösung versetzt und umgesetzt. Nach 30 bis 40 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Isolierung des Cyanhydrins erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Chem. Ausbeute : 67 mg (90% der Theorie)
Optische Reinheit : 98% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

(R)-Furfuralcyanhydrin

Entsprechend Beispiel 1 werden 48 mg (0,5 mmol) Furfuralaldehyd bei pH 4,0 umgesetzt. Nach ca. 30 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Isolierung des Cyanhydrins erfolgt wie beschrieben.

Chem. Ausbeute : 55,3 mg (90% der Theorie)
Optische Reinheit : 99% ee

Zur Bestimmung der optischen Reinheit wird das Cyanhydrin nach D. Elliot et al. mit (R)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenyl-essigsäurechlorid in die diastereomeren Ester überführt und das Diastereomerenverhältnis kapillargaschromatographisch an Säule B ermittelt.

(R)-Milchsäurenitril

Entsprechend Beispiel 1 werden 22 mg (0,5 mmol) Acetaldehyd bei pH 3,25 umgesetzt. Nach ca. 90 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung erfolgt analog Beispiel 1.

Chem. Ausbeute : 26 mg (73% der Theorie)
Optische Ausbeute : 76% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

3-Methylcyclohexanoncyanhydrin

Entsprechend Beispiel 1 werden 56 mg (0,5 mmol) (R/S)3-Methylcyclohexanon bei pH 4,0 umgesetzt. Die Reaktion ist nach 90 Minuten beendet.

Chem. Ausbeute : 57 mg (83% der Theorie)
Optische Ausbeute : n.b.

(S)-para-Hydroxymandelsäurenitril (Beispiel 2)

61 mg (0,5 mmol) para-Hydroxy-Benzaldehyd werden in 9,4 ml 50 mM Natriumcitratpuffer pH 3,75 gelöst und auf 20°C temperiert. Hierzu gibt man 500 µl Oxynitrilase-Lösung und 800 µl 4,2 M wäßriger HCN-Lösung. Man verfolgt die Reaktion polarimetrisch ($\lambda=578$ nm). Nach 15 bis 30 Minuten stellt sich ein konstanter Drehwert ein, und die Reaktion ist beendet. Danach wird das Reaktionsgemisch viermal mit 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Anschließend wird der Rückstand dreimal mit je 10 ml Pentan gewaschen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Chem. Ausbeute : 64,8 mg (87% der Theorie)
 Optische Reinheit : 99% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

(S)-meta-Hydroxymandelsäurenitril

Entsprechend Beispiel 2 werden 61 mg (0,5 mmol) meta-Hydroxybenzaldehyd bei pH 3,25 mit 450 µl 4,2 M wäßriger HCN-Lösung versetzt und umgesetzt. Nach 30 bis 40 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Isolierung des Cyanhydrins erfolgt wie oben in Beispiel 2 beschrieben.

Chem. Ausbeute : 67 mg (90% der Theorie)
 Optische Reinheit : 98% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

(S)-Mandelsäurenitril

Entsprechend Beispiel 2 werden 53 mg (0,5 mmol) Benzaldehyd mit 475 μ l 4,2 M wäßriger HCN-Lösung und 1500 μ l Oxynitrilase-Lösung bei pH 3,25 umgesetzt. Nach ca. 45 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung erfolgt analog Beispiel 1.

Chem. Ausbeute : 53 mg (80% der Theorie)
Optische Ausbeute : 96% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

(S)-meta-Methylmandelsäurenitril

Entsprechend Beispiel 2 werden 60 mg (0,5 mmol) meta-Methylbenzaldehyd bei pH 3,25 umgesetzt. Nach ca. 90 Minuten ist die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung erfolgt analog Beispiel 1.

Chem. Ausbeute : 59 mg (80% der Theorie)
Optische Ausbeute : 96% ee

Die Bestimmung der optischen Reinheit erfolgt gemäß Beispiel 1.

4.15 Kontinuierliche Umsetzungen mit der (R)- und (S)-Oxynitrilase

4.15.1 Kontinuierliche Produktion von (R)-Mandelsäurenitril in dem Enzym-Membran-Reaktor (EMR)

In kontinuierlicher Arbeitsweise wird in einem 10 ml EMR in 72 Stunden ca. 50 g reines R-Mandelsäurenitril produziert. Die Bedingungen und Ergebnisse dieses Experiments sind in Kapitel 2.11.2.2 zusammengefaßt.

4.15.2 Kontinuierliche Produktion von (S)-para-Hydroxymandelsäurenitril im Rührkesselreaktor mit immobilisierter (S)-Oxynitrilase

4.15.2.1 Immobilisierung der (S)-Oxynitrilase an Eupergit C (W. Hartmeier; Röhm)

4 ml (S)-Oxynitrilase-Lösung (260 U) 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 werden mit 1,5 g Eupergit C bei Raumtemperatur versetzt und mit 100 rpm geschüttelt. Nach 6 Stunden sind im Überstand kein Protein und keine (S)-Oxynitrilase-Aktivität mehr meßbar und die Immobilisierung ist beendet. Das Eupergit wird abfiltriert und mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen.

Ausbeute: Eine exakte Charakterisierung und Aktivitätsbestimmung des erhaltenen Katalysators wurde nicht unternommen. Aus dem unten beschriebenen kontinuierlichen Experiment läßt sich jedoch eine Abschätzung der Aktivitätsausbeute durchführen. Danach werden von 1,5 g dieses Katalysator in einer Stunde in 10 ml Reaktionsvolumen ca. 18 mM Aldehyd in einer Stunde umgesetzt. Berücksichtigt man die Produktinhibierung mit ca. 30% so ergibt sich eine Aktivität von 80 U/1,5 g Katalysator. Das sind ca. 30% der eingesetzten Gesamtaktivität.

Das immobilisierte Enzym lagert man bei 4°C im Kühlschrank.

4.15.2.2 Produktion

In kontinuierlicher Arbeitsweise wurde mit diesem immobilisierten Enzym in einem 10 ml Reaktor über 72 Stunden mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 57,9 g/(l*d) (S)-para-Hydroxymandelsäurenitril produziert. Die Bedingungen und Ergebnisse dieses Versuchs sind in Kapitel 2.11.2.2 beschrieben.

4.16. Arbeiten zum Substratspektrum der Nitrilhydratasen und Amidasen

Eine 50 mM Substratlösung in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 wird mit dem gleichen Volumenanteil des Rohextraktes bei Raumtemperatur versetzt. Anschließend läßt man den Reaktionsansatz bis zu 24 Stunden stehen. Nach 5, nach 10 und nach 24 Stunden bestimmt man die Reaktionsprodukte dünnschichtchromatographisch (E. Stahl).

Substrat: Malonsäuredinitril

Zur chromatographischen Analyse trägt man 4 µl des Ansatzes auf die DC-Platte auf und chromatographiert mit Laufmittel (1). Die DC-Platte wird nach Methode (1) entwickelt und unter UV-Licht (254 nm) (Methode (5)) ausgewertet. Dicarbonsäuren können durch Bromkresol (Methode (3)) identifiziert werden (grüne Flecken).

R _f -Werte:	Malonsäuredinitril	0,92
	Malonsäuremononitril	0,90
	Malonsäureamidnitril	0,85
	Malonsäurediamid	0,72
	Malonsäuremonoamid	0,55
	Malonsäure	0,18

Substrat: Fumarsäuredinitril

Man analysiert dünnschichtchromatographisch unter Verwendung von Laufmittel (2) und entwickelt die Platte mit wäßriger 0,05%iger KMnO_4 -Lösung (Methode (2)).

R_f -Werte:	Fumarsäuredinitril	0,93
	Fumarsäuremononitril	0,84
	Fumarsäureamidnitril	0,70
	Fumarsäurediamid	0,64
	Fumarsäuremonoamid	0,56
	Fumarsäure	0,16

Substrat: trans-4,5-Dicyanocyclohex-1-en

Die Analysebedingungen sind analog zu denjenigen, die beim Substrat Fumarsäuredinitril beschrieben sind.

R_f -Werte:	trans-4,5-Dicyanocyclohex-1-en	0,94
	trans-4,5-Monocarbonsäuremono-	
	nitrilcyclohex-1-en	0,84
	trans-4,5-Monoamidmononitril-	
	cyclohex-1-en	0,70
	trans-4,5-Diamidcyclohex-1-en	0,62
	trans-4,5-Monocarbonsäuremono-	
	amid	0,48
	trans-4,5-Dicarbonsäurecyclo-	
	hex-1-en	0,17

5. Literaturverzeichnis

- Albers, H.; Albers, E.; 1954:**
Modellversuche zur asymmetrischen Synthese
Z. Naturforschg. 9b, 122, 133
- Anhoury, M.-L.; Crooy, P.; De Neys, R.; Eliaers, J.; 1974:**
A simple and mild method for reducing cyanohydrins to
amino-alcohols
Journal of the Chemical Society London,
Perkin Trans. I 1974, 1015-1017
- Arnaud, A.; Galzy, P.; Jallageas, J.-C.; 1976:**
Amidase Activity of Some Bacteria,
Folia Microbiologica (Praha), 21, 178-184
- Asada, S.; Kobayashi, Y.; Inoue, S.; 1985:**
Asymmetric addition of hydrogen cyanide to aliphatic
aldehydes catalyzed by a synthetic cyclic peptide,
cyclo[(S)-phenylalanyl-(S)-histidyl]
Makromolekulare Chemie 186, 1755-1762
- Asano, Y.; Tani, Y.; Yamada, H.; 1980:**
A new Enzyme "Nitrile Hydratase" which Degrades Aceto-
nitril in Combination with Amidase
Agric. Biol. Chem. 44, 2251
- Baker, J. W.; Bright, W. L.; 1949:**
Mechanism of Aromatic Side-chain Reactions with
special Reference to the polar Effects of Substituents
Journal of the American Chemical Society, 1089
- Becker, W.; Benthin, U.; Eschenhof, E.; Pfeil, E.; 1963:**
Zur Kenntnis der Cyanhydrinsynthese
Biochemische Zeitschrift 337, 156-166
- Becker, W.; Pfeil, E.; 1966a:**
Continuous synthesis of optically active
 α -Hydroxynitriles
Journal of the American Chemical Society 88, 4299-4300
- Becker, W.; Pfeil, E.; 1966b:**
Über das Flavinenzym D-Oxynitrilase
Biochemische Zeitschrift 346, 301-321
- Beilstein, E.; III 2; 1960:**
Handbuch der organischen Chemie, 61ff: Blausäure
Springer Verlag, Berlin
- Bovè, C.; Conn, E. E.; 1961:**
Metabolism of aromatic compounds in higher plants. II.
Purification and properties of the oxynitrilase of
Sorghum vulgare.
J. Biol. Chem. 236, 207-210

- Bradford, M. M.; 1976:
A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the
principle of protein-dye binding
Analytical Biochemistry 72, 248-254
- Cahn, R. S.; Ingold, C.; Prelog, V.; 1966:
Spezifikation der molekularen Chiralität
Angewandte Chemie 78, 413-447
- Chapman, N. B.; Shorter, J.; 1978:
Correlation Analysis in Chemistry - Recent Advances
Plenum, New-York
- Castric, P. A.; 1981:
The Metabolism of Hydrogen Cyanide by Bacteria
in: Cyanide in Biology,
Vennesland, B.; Knowles, C.J.; Conn, E.E.; Westley, J.;
Wissing, F.; (eds.)
Academic Press, 233-262,
London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco
- Ching, W.-M.; Kallen, R.; 1978:
Mechanism of carbanion addition to carbonyl compounds.
Equilibria and kinetics of substituted cyanohydrin
cleavage and formation in aqueous solution
Journal of the American Chemical Society 100,
6119-6124
- Conn, E. E.; 1980:
Cyanogenic Glycosides
Encycl. Plant Physiol. New Series, 461-492
- Cornish-Bowden, A.; 1981:
Fundamentals of enzyme kinetics
Butterworths, London
- Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S.; 1969:
 α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic Acid, a
Versatile Reagent for the Determination of
Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines
Journal of Organic Chemistry 34, 2534-2549
- Davis, R. H.; Nahrstedt, A.; 1986:
Uptake of linamarin and lotaustralin from their
foodplants by larvae of *Zygaena trifolii*
Phytochemistry 25, 2299-2302
- Effenberger, F.; Burkard, U.; Willfahrter, J.; 1983:
 α -Hydroxycarbonsäureester - Edukte zur racemisierungs-
freien Synthese von N-substituierten α -Aminosäuren
Angewandte Chemie 95, 50
- Effenberger, F.; Ziegler, T.; Förster, S.; 1987:
Enzymkatalysierte Cyanhydrin-Synthese in organischen
Lösungsmitteln
Angewandte Chemie 99, 491-492

- Elliot, J. D.; Choi, V. M. F.; Johnson, W. S.; 1983:
Asymmetric Synthesis via Acetal Templates
Journal of Organic Chemistry 48, 2294-2295
- Enders, D.; Hoffmann, R.; 1985:
Asymmetrische Synthese
Chemie in unserer Zeit 19, 177-190
- Enzyme Nomenclature; 1984:
Recommendations of the Nomenclature Committee
of the International Union of Biochemistry
Academic Press, New York
- Frank, H.; Nicholson, G.; Bayer, E.; 1978:
Gas chromatographic - mass spectrometric analysis of
optically active metabolites and drugs on a novel
chiral stationary phase
Journal of Chromatography 146, 197-206
- Fukuda, Y.; Harada, T.; Izumi, Y.; 1973:
Formation of L- α -Hydroxynitriles by Torulopsis
candida GN 405,
Journal of Fermentation Technology, 51, 393-397, (1973)
- Gerstner, E.; Maetzke, V.; Pfeil, E.; 1968:
Zur chemischen und biologischen Systematik der Rosaceen
Naturwissenschaften 55(12), 561-563
- Godtfredsen, S. E.; Ingvorsen, K.; Yde, B.; Andresen, O.:
The Scope of Biocatalysts in Organic Chemical
Processing,
in: Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis,
Schneider, M.P. (ed.)
- Gountzos, H; Jackson, R.; Harrington, K. J.; 1986:
Asymmetric Hydrocyanation of Aldehydes in Crystalline
 β -Cyclodextrin Complexes
Aust. J. Chem. 39, 1135
- Hammett, L. P.; 1973:
Physikalische Organische Chemie
Verlag Chemie, Weinheim
- Harries, R.; Knowles, C. J.; 1983:
Isolation and Growth of a Pseudomonas Species that
Utilizes Cyanide as a Source of Nitrogen
Journal of General Mikrobiology 129, 1005-1011
- Hartmeier, W.; 1986:
Immobilisierte Biokatalysatoren
Springer Verlag, Berlin
- Hegnauer, R.; 1986:
Chemotaxonomie der Pflanzen VII, 345
Birkhäuser, Basel

Hirschmann, H.; 1964:

Newer Aspects of Enzymatic Stereospecificity
in: Comprehensive Biochemistry, Vol. 12, 236
Florkinand, M.; Stotz, E. H.; (eds.)
Elsevier Publishing Company, Amsterdam

Hook, R. H.; Robinson, W. G.; 1964:

Ricinine Nitrilase
J. Biol. Chem. 239, 4263

Houben-Weyl; 1981:

Methoden der organischen Chemie; Reduktion, Teil 2
Thieme Verlag, Stuttgart, 118

Huang, F. C.; Lee, L. F. H.; Mittal, R. S. D.; Ravikumar, P. R.; Chan, J. A.; Sih, C. S.; 1976:

Preparation of (R)- and (S)- Mevalonic Acids
Journal of the American Chemical Society 97, 4144

Hustedt, H.-H.; Pfeil, E.; 1961:

Zur Kenntnis der Cyanhydrinsynthese
Liebigs Annalen der Chemie 640, 15-28

IUPAC; 1979:

Nomenclature of organic chemistry, 473-490,
section E: stereochemistry
Pergamon Press, New York

Jaenicke, L.; Preun, J; 1984a:

Chemical modification of hydroxynitrile lyase by
selective reaction of an essential cysteine-SH group
with α,β -unsaturated propiophenones as pseudo-
substrates
European Journal of Biochemistry 138, 319-325

Jaenicke, L.; 1984b:

Einführung in die Praxis des Biochemikers
Institut für Biochemie, Universität zu Köln

Jaffè, H. H.; 1953:

A Reexamination of the Hammett-Equation
Chem. Rev. 53, 191-262

Jakovac, I. J.; Goodbränd, H. B.; Lok, K. P.; Jones, J. B.; 1982:

Preparations of Enantiomerically Pure Chiral Lactones
via Stereospecific Horse Liver Alcohol Dehydrogenase
Catalyzed Oxidation of Monocyclic Meso Diols
Journal of the American Chemical Society 104, 4659-4665

Jones, J. B.; 1986:

Enzymes in organic synthesis
Tetrahedron 42, 3351-3403

Jorns, M. S.; 1985:

Solvent accessibility to flavin in oxynitrilase
Biochimica et Biophysica Acta 830, 30-35

- Jorns, M. S.; 1980:**
Studies on the kinetics of cyanohydrin synthesis and cleavage by the flavoenzyme oxynitrilase
Biochimica et Biophysica Acta 613, 203-209
- Julia, S.; Ginebreda, A.; 1979:**
Asymmetric Induction by Phase-Transfer Catalysis using chiral catalysts
Tetrahedron Lett., 2171
- Kagan, H. B.; 1977:**
Organische Stereochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Knowles, C. J.; 1976:**
Microorganisms and Cyanide
Bacteriological Reviews 40, 652-680
- Kolbe, W.:**
Annalen der Chemie 131, 348
- König, W.; Benecke, I.; Sievers, S.; 1982:**
New procedure for gas chromatographic enantiomer separation; application to chiral amines and hydroxy acids
Journal of Chromatography 238, 427-432
- Koppenhoefer, B.; Allmendinger, H.; Nicholson, G.; Bayer, E.; 1983:**
Direct resolution of enantiomers of 2- and 3-hydroxy acid alkyl esters by fused-silica capillary gas chromatography
Journal of Chromatography 260, 63-73
- Kragl, U.; 1988:**
Reaktionstechnische Untersuchungen zur Enzymkatalysierten Cyanhydrinsynthese
Diplomarbeit, Universität Bonn
- Kula, M.-R.; 1987a:**
Enzyme für die Industrie (Autor: Schmidt, M.)
Chemische Rundschau vom 13. März 1987
- Kula, M.-R.; Wandrey, Chr.; 1987b:**
Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane-Reactor with Simultaneous NADH Regeneration
Meth. Enzymology Vol. 136, 9-21
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; 1987a:**
Rules for optimization of biocatalysts in organic solvents
Biotechnology and Bioengineering 30, 81-87

- Laane, C.; Boeren, S.; Hilhorst, R.; Veeger, C.; 1987b:**
 Optimization of biocatalysts in organic media
 in: Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D.:
 Biocatalysis in organic media
 Elsevier, Amsterdam
- Ladenburg, K.; Folkers, K.; Major, R. T.; 1936:**
 The synthesis of 3-hydroxy-2-(3)-benzofuranone and
 of 4-hydroxymandelic acid
 Journal of the American Chemical Society 58, 1292-1294
- Lehninger, A. L.; 1983:**
 Biochemie
 Verlag Chemie, Weinheim
- Matsuo, T.; Nishioka, T.; Hirano, M. et al.; 1980:**
 Recent topics in the chemistry of synthetic pyrethroids
 containing certain secondary alcohol moieties
 Pesticide Science 11, 202-218
- Mao, Ch.; Anderson, L.; 1967:**
 Cyanogenesis in *Sorghum vulgare*
 Phytochemistry 6, 473-483
- Morrison, J. D.; 1983-1985:**
 Asymmetric synthesis Volume 1-5
 Academic Press, New York
- Morrison, J. D.; Mosher, H. S.; 1971:**
 Asymmetric organic reactions
 Prentice-Hall, Englewood Cliffs
- Morrison, R. T.; Boyd, R. N.; 1978:**
 Lehrbuch der Organischen Chemie
 Verlag Chemie, Weinheim 1978
- Nahrstedt, A.; 1973:**
 Cyanogene Glykoside in höheren Pflanzen
 Pharmazie in unserer Zeit 2, 147-155
- Nahrstedt, A.; 1988:**
 Flachs, Hornklee, Widderchen und Blausäure
 Biologie in unserer Zeit 4, 105-109
- Niedermeyer, U.; Kula, M.-R.; 1988:**
 Verfahren zur Herstellung von (S)-Cyanhydrinen
 Patentanmeldung 14.7.1988, P 38 23 866.7
- Niedermeyer, U.; Kragl, U.; Wandrey, C.; Kula, M.-R.; 1988:**
 Enzymatische Verfahren zur Herstellung von optisch
 aktiven Cyanhydrinen
 Patentanmeldung 29.1.1988, P 38 02 624.4-42
- Ochterbeck, W.; 1986:**
 Entsorgung von Laborabfällen
 GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 30, 193-199

Ogston, A. G.; 1948:

Interpretation of Experiments of Metabolic Processes
using Isotopic Tracer Elements
Nature, 162, 963

Organikum; 1981; Autorenkollektiv

VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (DDR)

Prelog, V.; Wilhelm, M.; 1954:

Der Reaktionsmechanismus und der sterische Verlauf der
asymmetrischen Cyanhydrinsynthese
Helvetica Chimica Acta 192, 1634-1660

Ret  y, J.; 1979:

Stereospezifität von Enzymen
Chemie in unserer Zeit 13, 65-77

R  hm Pharma; 1987:

Produktinformation und Datenblätter zu Eupergit C
und Eupergit C 250 L
R  hm Pharma, Darmstadt

Rosenthaler, L.; 1908:

Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen
Biochemische Zeitschrift 14, 238-253

Roth, H.; Kleemann, A.; 1982:

Pharmazeutische Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Schlegel, H. G.; 1985:

Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Schlesinger, G.; Miller, S. T.; 1973:

Equilibrium and Kinetics of Glyconitrile Formation in
Aqueous Solution
Journal of the American Chemical Society 95, 3729-3735

Schneider, M.; Engel, N.; Boensmann, H.; H  nicke, P.;

Heimann, G.; G  risch, H.; 1975:
Enzymatische Synthesen chiraler Bausteine aus
prochiralen meso-Substraten
Angew. Chemie, 96; 52 und 54f.

Schurig, V.; 1983:

Gas chromatographic methods
in: Morrison, J. D.; 1983:
Asymmetric synthesis, Volume 1, 59-86,
Academic Press, New York

Schurig, V.; 1984:

Gaschromatographische Enantiomerentrennung an
metallkomplexfreien Station  rphasen
Angewandte Chemie 96, 733-752

- Scopes, R. K.; 1987:**
Protein Purification
Springer Verlag, Berlin
- Seely, M. K.; Criddle, R. S.; Conn, E. E.; 1966:**
The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants
Journal of Biological Chemistry 241, 4457-4462
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermason, G. T.; Mallia, A. K.;
Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.;
Gocke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C.; 1985:**
Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid
Anal. Biochem., 150, 76-85
- Stahl, E.; 1967:**
Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch
Springer Verlag, Berlin
- Wang, M.-T.; Imai, K.; Yoshioka, M.; Tamura, T.; 1975:**
Gas-Liquid Chromatographic and Mass Fragmentographic
Determination of Catecholamines in Human Plasma
Clinica Chimica Acta 63, 13-19
- Whitesides, G.; Wong, C.-H.; 1985:**
Enzyme in der organischen Synthese
Angewandte Chemie 97, 617-638
- Williams, W. John; 1976:**
Handbook of Anion Determination
Butterworth, London, Boston
- Williams, W. John; Wilson, K.; 1984:**
Methoden der Biochemie
Thieme, Stuttgart, New-York
- Yamada, H.; Shimizu, S.; 1988:**
Mikrobielle und enzymatische Verfahren zur
Produktion biologisch und chemisch wertvoller
Verbindungen
Angew. Chemie 100, 640-661

