

# Der Einsatz einer neuartigen Peroxidase aus dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* am Beispiel der enantioselektiven Sulfoxidation

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock



vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin Annett Horn

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0181-1

1. Gutachter:

Prof. Dr. Udo Kragl  
Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Martin Hofrichter  
Internationales Hochschulinstitut Zittau

Tag der mündlichen Prüfung:

14.09.2009

Tag der Verteidigung:

13.10.2009

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2005 bis Juni 2009 am Lehrstuhl der Technischen Chemie der Universität Rostock unter der Leitung von Herrn Professor Dr. U. Kragl angefertigt.

Die lehrreichen und vielseitigen Jahre meiner Promotion möchte ich nicht missen, auch wenn es manchmal nicht reibungslos lief. In dieser Zeit haben mir viele Personen helfend, motivierend und inspirierend beiseite gestanden. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Als aller erstes gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. U. Kragl für die Überlassung des Promotionsthemas, für das Vertrauen der freien Bearbeitung, die gebotenen Möglichkeiten bei der Durchführung der Arbeit und die stets positive Betrachtung der Dinge, die mich immer wieder motivieren konnte.

Herrn Prof. Dr. M. Hofrichter, Herrn Dr. René Ullrich und Frau Prof. Dr. K. Scheibner danke ich für die freundliche Kooperation innerhalb des Verbundprojektes.

Mein Dank gilt auch Herrn K. Peters von der JenaBios GmbH, der mir bei Bedarf stets schnell frisches AaP-Rohextrakt zur Verfügung stellte.

Dem BMBF-Projekträger danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens.

Ich danke dem perfekten Zusammenspiel von Frau Dr. Daniela Hameister, Herr Dr. Thomas Schmidt, Sabine Illner, Anett Grunenberg und Alexander Witt, für die kritische und hilfreiche Durchsicht dieser Arbeit und wertvollen Tipps, für die viel Mühe und Zeit investiert wurden.

Ich hatte das Glück in einer großen und geselligen Arbeitsgruppe mit vielen netten Kollegen zu arbeiten, mit denen es in kurzweiligen Kaffeepausen eine Vielfalt an „Laborthemen“ zu besprechen gab. Ich danke allen Mitarbeitern, Diplomanden und Doktoranden für das angenehme Arbeitsklima, für die hilfreichen Ratschläge bei Fragestellungen und den lustigen Arbeitsgruppenfeiern und -ausflügen.

Frau Freitag, die immer gut gelaunte „Laborfee“ der Technischen Chemie, möchte ich für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung in der Organisation von Chemikalien und Laborgeräten danken.

Bei Herrn Dr. Ruth möchte ich mich für die Unterstützung bei analytischen und technischen Fragestellungen bedanken.

Der „meeting in may group“ (Daniela, Vera, Katja, Julia, Susanne, Sandra, Jan), Sabine, Anett und Ines danke ich für die zahlreichen freundschaftlichen Gespräche und Erlebnisse. Mit euch war es eine wunderbare Zeit!

Bei meinen lieben Eltern bedanke ich mich für all ihre Fürsorge und den bedingungslosen Rückhalt, den sie mir entgegenbrachten.

Mein abschließendes Dankeswort richte ich an meinen Alexander. Danke, dass du mir mit deiner Liebe in allen Lebenslagen beiseite stehst und immer Verständnis für meine Lage hast. Du hast mir immer zur Zuversicht verholfen und dafür gesorgt, dass sich so manches Problemchen schnell wieder relativiert hat.

## Kurzfassung

In der vorliegenden Dissertation konnte die neuartige *Agrocybe aegerita* Peroxidase (*AaP*) erfolgreich als enantioselektiver Biokatalysator in der Synthese optisch aktiver Sulfoxide charakterisiert und etabliert werden. Das (*R*)-Enantiomer entsteht dabei im hohen Überschuss (ee-Wert > 80 %). Neben der asymmetrischen Oxidation der Alkylarylsulfide katalysiert die *AaP* auch die enantioselektive Weiteroxidation der Sulfoxide zu den Sulfonen. Diese enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung trägt zusätzlich zur Erhöhung des Enantiomer-überschuss der (*R*)-Alkylarylsulfoxide bei, so dass ee-Werte > 99 % erreicht werden.

Als Kosubstrat benötigt die *AaP* ausschließlich Peroxide, wobei Wasserstoffperoxid das effektivste ist.

Das hohe Potential der *AaP* für den Einsatz in der industriellen Biokatalyse, konnte durch die Verwendung organischer Lösungsmittel, durch die Immobilisierung des Enzyms und die Stabilität gegenüber seinem Kosubstrat bestätigt werden.

## Abstract

In this dissertation the novel *Agrocybe aegerita* peroxidase (*AaP*) has been successfully characterized and established as an enantioselective biocatalyst in the synthesis of optically active alkyl aryl sulfoxides. The oxidation of the alkyl aryl sulfides yielding in high enantiomeric excess of the (*R*)-enantiomer (e.e. > 99 %). It was found that the enantiomeric excess of the (*R*)-sulfoxides obtained with the *AaP* is due to the asymmetric oxidation of the sulfides with the contribution from a kinetic resolution of the sulfoxides formed.

The *AaP* requires solely peroxides as co-substrate, whereas hydrogen peroxide is the most effective.

The application of organic solvent, the immobilization of the *AaP* and a better operational stability towards the peroxide demonstrates the great potential of this novel oxidative enzyme for the industrial biocatalysis.

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Symbole	IV
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielstellung</b>	<b>3</b>
<b>3 Stand der Technik</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Biokatalysatoren</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Oxidationsreaktionen in der Enzymkatalyse</b>	<b>6</b>
3.2.1 Einleitung	6
3.2.2 Oxidoreduktasen	6
3.2.3 Peroxidasen	8
3.2.4 Peroxidase-katalysierte Reaktionen	9
3.2.5 Desaktivierung der Peroxide	13
3.2.6 Selektive Oxidation mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Reduktionsmitteln	15
<b>3.3 <i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase – eine neuartige Haloperoxidase</b>	<b>17</b>
3.3.1 Einleitung	17
3.3.2 Das Substratspektrum	17
3.3.3 Einordnung der <i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase	19
<b>3.4 Chirale Sulfoxide</b>	<b>21</b>
3.4.1 Einleitung	21
3.4.2 Anwendung chiraler Sulfoxide in der asymmetrischen Synthese	23
3.4.3 Darstellung chiraler Sulfoxide	25
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Einleitung</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Die AaP-katalysierte Sulfoxidation</b>	<b>32</b>
4.2.1 Der Einfluss der spontanen Oxidation auf den Enantiomerenüberschuss	32
4.2.2 Die AaP-katalysierte Oxidation zum Sulfon	33
4.2.3 Die Erhöhung des ee-Wertes durch die enzymkatalysierte Überoxidation	34
4.2.4 Der Mechanismus der Sauerstoffübertragung	36
4.2.5 Die Standstabilität der AaP	37
<b>4.3 Die pH-Abhängigkeit der Thioanisoloxidation</b>	<b>38</b>
4.3.1 Der Einfluss der Pufferart und Pufferkonzentration auf die Enzymaktivität	38
4.3.2 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität	39
4.3.3 Der Einfluss des pH-Wertes auf den Gesamtumsatz der AaP-katalysierten Thioanisoloxidation	39
<b>4.4. Die Rolle des Oxidationsmittels</b>	<b>41</b>
4.4.1 Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel	41
4.4.2 TBHP als Oxidationsmittel	48
4.4.3 Peressigsäure als Oxidationsmittel	53
<b>4.5 Selektive Oxidation mit molekularem Sauerstoff unter Anwesenheit eines Reduktionsmittels</b>	<b>54</b>
4.5.1 Einleitung	54
4.5.2 Die Oxidation von Thioanisol mit Sauerstoff in Anwesenheit von Ascorbinsäure	54
4.5.3 Die Stabilität der <i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase gegenüber der Ascorbinsäure	57
<b>4.6 Der Zusatz von Co-Solventien</b>	<b>58</b>
4.6.1 Einleitung	58
4.6.2 Der Einfluss wassermischbarer Lösungsmittel auf die Enzymaktivität	58
4.6.3 Der Einsatz von Co-Solventien in der AaP-katalysierten Sulfoxidation	60
<b>4.7 Die Immobilisierung der AaP an feste Träger</b>	<b>63</b>

4.7.1	Einleitung	63
4.7.2	Kovalente Immobilisierung der AaP auf Glasperlen	63
4.7.3	Adsorption der AaP an Anionenaustauscher-Harze	64
4.7.4	Einschluss der AaP in natürliche Träger	66
4.7.5	Einschluss der AaP in Polydimethylsiloxan	67
<b>4.8</b>	<b>Das Substratscreening</b>	<b>75</b>
<b>4.9</b>	<b>Die Produktisolierung</b>	<b>79</b>
<b>4.10</b>	<b>Andere Oxidationsreaktionen katalysiert durch die AaP</b>	<b>81</b>
4.10.1	Die Halogenierung von Phenol	81
4.10.2	Die Oxidation von Benzylalkoholen	83
4.10.3	Die Oxidation von Indol	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Methoden</b>	<b>93</b>
<b>7.1</b>	<b>HPLC-Analytik: Alkylarylsulfide – chirale Alkylarylsulfoxide</b>	<b>93</b>
<b>7.2</b>	<b>Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten</b>	<b>93</b>
<b>7.3</b>	<b>Photometrische Assays</b>	<b>94</b>
7.3.1	Standardassay – Die Oxidation von Veratrylalkohol	94
7.3.2	Thioanisol-Assay	94
<b>7.4</b>	<b>Die Bestimmung der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten</b>	<b>96</b>
7.4.1	Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid	96
7.4.2	Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisol mit TBHP	98
7.4.3	Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Methylphenylsulfoxid mit Wasserstoffperoxid	98
7.4.4	Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisolanaloga mit Wasserstoffperoxid	99
7.4.5	Die Messung der Sauerstoffentstehung bei der AaP-katalysierten Disproportionierung der Oxidationsmittel	99
<b>7.5</b>	<b>Die AaP-katalysierte Sulfoxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid</b>	<b>100</b>
7.5.1	Variation des pH-Wertes	101
7.5.2	Der Zusatz von Co-Solventien	101
7.5.3	Verwendung anderer Oxidationsmittel	102
7.5.4	Substratscreening	103
<b>7.6</b>	<b>Immobilisierungsmethoden</b>	<b>104</b>
7.6.1	Immobilisierung an aminomodifizierten Glasperlen nach Spohn	104
7.6.2	Immobilisierung an Anionenaustauscher-Harzen	104
7.6.3	Einschluss in Natrium-Alginat	105
7.6.4	Die Herstellung und Anwendung PDMS-immobilisierter AaP	105
<b>7.7</b>	<b>Die Produktisolierung</b>	<b>106</b>
<b>7.8</b>	<b>Quantitative Bestimmung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>107</b>
<b>7.9</b>	<b>Überprüfung des Reaktionsmechanismus mit Hilfe von H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub></b>	<b>107</b>
<b>7.10</b>	<b>Andere Oxidationsreaktionen katalysiert durch die AaP</b>	<b>108</b>
7.10.1	Analytik	108
7.10.2	Halogenierung von Phenol	109
7.10.3	Oxidation von Benzylalkoholen	109
7.10.4	Oxidation von Indol, Benzofuran und Benzothiophen	109
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>120</b>
<b>9.1</b>	<b>Definitionen</b>	<b>120</b>

<b>9.2</b>	<b>Abbildungen</b>	<b>123</b>
<b>9.3</b>	<b>Die Berechnung der Enzymkonzentration</b>	<b>123</b>
<b>9.4.</b>	<b>Permanganometrische Titration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>124</b>
<b>9.5</b>	<b>Herstellung der Reaktionsmedien</b>	<b>125</b>
<b>9.6</b>	<b>Chemikalienliste</b>	<b>126</b>
<b>9.7</b>	<b>Geräteliste</b>	<b>128</b>

## Verzeichnis der Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
[AaP]	Konzentration der <i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase	mol·L <sup>-1</sup>
c	Konzentration	mol·L <sup>-1</sup>
d	Schichtdicke	cm
E	Extinktion	-
ee-Wert	Enantiomerenüberschuss, ee-Wert = (n <sub>1</sub> -n <sub>2</sub> )/(n <sub>1</sub> +n <sub>2</sub> )	%
ε	molarer Extinktionskoeffizient	L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
η	Ausbeute	%
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl	s <sup>-1</sup>
k <sub>i</sub>	Inhibierungskonstante	mol·L <sup>-1</sup>
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante	mol·L <sup>-1</sup>
k <sub>p</sub>	Produktinhibierungskonstante	mol·L <sup>-1</sup>
λ	Wellenlänge	nm
m <sub>p</sub>	Masse des Produktes	g
n <sub>Kat</sub>	Stoffmenge des Katalysators	mol
n <sub>p</sub>	Stoffmenge des Produktes	mol
n <sub>S</sub>	Stoffmenge des Substrates	mol
pH	-log <sub>10</sub> ([H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> ])	-
pI	isoelektrischer Punkt	-
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
τ	Verweilzeit	d
ttn	Zyklenzahl (total turnover number)	-
U	Umsatz	%
V <sub>max</sub>	maximale Enzymaktivität bezogen auf ein Substrat	μmol·min <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup>
V <sub>R</sub>	Reaktionsvolumen	L

## Verzeichnis der Abkürzungen

a	annus ( <i>lat.</i> ): Jahr; Dimensionsangabe der Zeit
AaP	<i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat)
7-ACA	7-Aminocephalosporanic acid ( <i>engl.</i> ): 7-Aminocephalosporinsäure
app.	apparent ( <i>engl.</i> ): scheinbar
AS	Ascorbinsäure
ATP-ase	Adenosintriphosphatasen
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	1-Butyl-3-methylimidazolium- <i>tetra</i> -fluoroborat
BVMO	Bayer-Villiger-Monooxygenase
bzw.	beziehungsweise
CcP	Cytochrom c Peroxidase
CHP	Cumolhydroperoxid
CMO	Cyclohexanon Monooxygenase
CPO	Chlorperoxidase aus <i>Caldariomyces fumago</i>
d	dies ( <i>lat.</i> ): Tag; Dimensionsangabe der Zeit
DET	Diethyltatrat
DHFA	dihydroxyfumaric acid ( <i>engl.</i> ): Dihydroxyfumarsäure
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPE	Diisopropylether



DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	Dioxygenasen
EC-Nummern	Enzyme Commission numbers
[ECOENG 41M]	1-Butyl-3-methylimidazolium-2-(2-methoxyethoxy)ethylsulfat
[ECOENG 500]	PEG-5 Cocomoniummethosulfat
[ECOENG 212]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat
EG	Ethylenglycol
[EMIM][TOS]	1-Ethyl-3-methylimidazoliumtosylat
et al.	et alii ( <i>lat.</i> ): und andere
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDC	2,5-Furandicarboxaldehyd
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gaschromatographie
Glg.	Gleichung
h	hora ( <i>lat.</i> ): Stunde; Dimensionsangabe der Zeit
HAPMO	4-Hydroxyacetophenon Monooxygenase aus <i>P. fluorescences</i>
HFCA	5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylsäure
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HRP	horseradish peroxidase ( <i>engl.</i> ): Meerrettichperoxidase
IL	ionic liquid ( <i>engl.</i> ): ionische Flüssigkeiten
k.A.	keine Angabe
KBr	Kaliumbromid
LM	Lösungsmittel
LPO	Lactoperoxidase
<b>M</b>	Textverweis auf Methode
M	molar, mol·L <sup>-1</sup>
mM	millimolar, mmol·L <sup>-1</sup>
min	pars minuta prima ( <i>lat.</i> ): Minute, Dimensionsangabe der Zeit
MO	Monooxygenase
MP-11	Microperoxidase-11
MPGM	3-(4-Methoxyphenyl)-epoxy-propionsäuremethylester
MPS	Methylphenylsulfid
MPSO	Methylphenylsulfoxid
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n.d.	nicht detektierbar
OM	Oxidationsmittel
p.a.	pro analysis ( <i>engl.</i> ): zur Analyse; höchster Reinheitsgrad
PAMO	Phenylaceton Monooxygenase
PEG	Polyethylenglycol
PPC	Propylencarbonat
PPI	Protonenpumpen-Inhibitoren
<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> NEt	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
s	pars minuta secunda ( <i>lat.</i> ): Sekunde; Dimensionsangabe der Zeit
s.	siehe
s.o.	siehe oben
spez.	spezifisch

Sub	Substrat
Tab.	Tabelle
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEG	Triethylenglycol
THF	Tetrahydrofuran
Ti(O <i>i</i> -Pr) <sub>4</sub>	Titan(IV)-isopropylat
u.a.	unter anderem, unter anderen
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
z.B.	zum Beispiel

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen [Faber 2004].	2
Abb. 2.1.	Zielsetzung.	3
Abb. 3.1.	Die Verteilung der Biokatalysatoren nach den Enzymklassen in der Industriellen Biotechnologie.	5
Abb. 3.2.	Einteilung der Oxidoreduktasen.	6
Abb. 3.3.	Reaktionsschema der Dehydrogenase-Katalyse.	6
Abb. 3.4.	Oxidase-katalysierte Oxidationsreaktion.	7
Abb. 3.5.	Die Einführung von Sauerstoff katalysiert durch Monooxygenasen (MO) und Dioxygenasen (DO).	7
Abb. 3.6.	Die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Substraten mit Wasserstoffperoxid.	7
Abb. 3.7.	Eisenprotoporphyrin IX – prosthetische Gruppe, mit Cystein als axialer Ligand.	8
Abb. 3.8.	Der katalytische Mechanismus der Häm-Peroxidasen.	9
Abb. 3.9.	Oxidative Dehydrierung.	10
Abb. 3.10.	Die Halogenierung organischer Substrate.	10
Abb. 3.11.	Sauerstoffinsertionsreaktion.	11
Abb. 3.12.	Peroxidase-katalysierte Einführung eines Sauerstoffatoms in organische Substrate.	11
Abb. 3.13.	Die Oxidation von 5-Hydroxymethylfurfural katalysiert durch die CPO [van Deurzen 1996].	11
Abb. 3.14.	Die CPO-katalysierte Oxidation von 4-Chloroanilin zu 4-Chlornitrobenzol über die Bildung von 4-Chlorphenylhydroxylamin.	12
Abb. 3.15.	Die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid.	12
Abb. 3.16.	Die Disproportionierung von Hydroperoxiden (R = H oder Alkyl) in der Katalasetyp-Reaktion von Peroxiden.	13
Abb. 3.17.	Bildung der Compound III nach [van Deurzen 1996].	13
Abb. 3.18.	Erzeugung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> über die Glucose-Oxidase-katalysierte Oxidation von Glucose.	15
Abb. 3.19.	Autoxidation von DHFA nach [van de Velde 1999].	16
Abb. 3.20.	Der Südliche Ackerling ( <i>Agrocybe aegerita</i> ).	17
Abb. 3.21.	Ausgewählte Substrate der AaP [Ullrich 2004].	18
Abb. 3.22.	Chirales Zentrum der pyramidalen Sulfinylverbindungen.	21
Abb. 3.23.	Sulfinyl-substituierte Benzimidazole in der Anwendung als Protonenpumpenhemmer (PPI).	22
Abb. 3.24.	Biologisch aktive Sulfoxidverbindungen.	22
Abb. 3.25.	Häufig verwendete chirale Sulfoxidauxiliare.	23

Abb. 3.26.	Schematische Darstellung der Reaktion eines Carbanions mit einem Elektrophil.	23
Abb. 3.27.	Synthese chiraler Alkohole durch Reduktion von $\beta$ -Ketosulfoxiden.	24
Abb. 3.28.	Unterschiedliche chirale Oxaziridine.	25
Abb. 3.29.	Chirale Oxaziridine als Oxidationsmittel in der enantioselektiven Synthese von Sulfoxiden.	25
Abb. 3.30.	Die asymmetrische Oxidation des Sulfids <b>16</b> mit Cumolhydroperoxid zu Esomeprazol.	26
Abb. 3.31.	(Salen)Mn(III)-Katalysatoren von Jacobsen und Katsuki.	27
Abb. 3.32.	Porphyrringerüst.	27
Abb. 3.33.	Andersen-Methode zur Synthese chiraler Sulfoxide [Fernández 2003].	28
Abb. 4.1.	Die <i>AaP</i> -katalysierte enantioselektive Sulfoxidation aromatischer Sulfide mit Wasserstoffperoxid zu Alkylarylsulfoxiden.	31
Abb. 4.2.	Die spontane Oxidation aromatischer Sulfide.	31
Abb. 4.3.	Die <i>AaP</i> -katalysierte Sulfoxidation von Methylphenylsulfid mit Wasserstoffperoxid.	32
Abb. 4.4.	a: Der Umsatz von 5 mM racemischen Methylphenylsulfoxids mit $1,5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ Wasserstoffperoxid: enzymkatalysiert $\blacklozenge$ ( <i>(R)</i> -Enantiomer $\blacksquare$ , ( <i>(S)</i> -Enantiomer $\square$ ) und nicht katalysiert $\blacktriangledown$ . b: Die Erhöhung des Enantiomerenüberschusses durch die enzymatisch kinetische Racematspaltung in der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation von 5 mM Methylphenylsulfoxid; bei 25 °C und pH 6,8 ( <b>M 7.5 g, h</b> ).	34
Abb. 4.5.	Reaktionsverlauf (Thioanisol $\bullet$ , ( <i>(R)</i> -Methylphenylsulfoxid $\blacksquare$ , ( <i>(S)</i> -Methylphenylsulfoxid $\square$ , Methylphenylsulfon $\blacklozenge$ ) der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidationsreaktion ( <b>M 7.5 a</b> ) in Phosphat-Citrat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C.	35
Abb. 4.6.	Angenommene Mechanismen zur Reduktion der Compound I durch ein Substrat (S) zur nativen Peroxidase [Kobayashi 1987, van Deurzen 1996].	36
Abb. 4.7.	Der Einfluss der Puffersalze verschiedener Puffer (pH 7) auf die Enzymaktivität in der Sulfoxidation von Thioanisol ( <b>M 7.3.2.4</b> ).	38
Abb. 4.8.	Der Einfluss der Pufferkonzentration des Zitronensäure-Phosphat-Puffers (pH 6,8) auf die Enzymaktivität in der Sulfoxidation von Thioanisol ( <b>M 7.3.2.4</b> ).	38
Abb. 4.9.	Die pH-Abhängigkeit der <i>AaP</i> bei der Sulfoxidation von Thioanisol ( <b>M 7.3.2.3</b> ).	39
Abb. 4.10.	Der Umsatz der nicht katalysierten Sulfoxidation von 10 mM Thioanisol mit 10 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ bei 25 °C ( <b>M 7.5.1</b> ).	40
Abb. 4.11.	Ping-Pong-Mechanismus in der Kopplung der Substrate mit dem aktiven Zentrum des Enzyms [Segel 1993].	41
Abb. 4.12.	Der Einfluss der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auf die Enzymaktivität in der Oxidationsreaktion von 0,1 mM Thioanisol im Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,8 bei 25 °C ( <b>M 7.4.1.2</b> ).	42
Abb. 4.13.	Variation der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei der Oxidation von 1 mM Thioanisol vermittelt von 360 nM <i>AaP</i> .	44
Abb. 4.14.	Der Enantiomerenüberschuss in der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidationsreaktion von 1 mM Thioanisol mit unterschiedlichen $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ( <b>M 7.5 a</b> ).	44
Abb. 4.15.	Reaktionsmechanismus der Zersetzung von $\text{H}_2\text{O}_2$ nach [Sun 1994, van Deurzen 1996].	45
Abb. 4.16.	Die Bildung von Sauerstoff bei der Zersetzung von 1 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ katalysiert durch 72 nM <i>AaP</i> ( <b>M 7.4.5.1</b> ).	46
Abb. 4.17.	Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der $\text{H}_2\text{O}_2$ -	

	Konzentration (M 7.4.5.1).	46
Abb. 4.18.	Die Abnahme der <i>AaP</i> -katalysierten Sauerstoffbildung mit zunehmendem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gehalt (M 7.4.5.2).	47
Abb. 4.19.	Der Einfluss von Thioanisol bei der initialen Bildung von Sauerstoff bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid durch 72 nM <i>AaP</i> (M 7.4.5.3).	48
Abb. 4.20.	<i>Tert</i> -Butylhydroperoxid.	48
Abb. 4.21.	Enantioselektive Oxidation von Thioanisol mit TBHP katalysiert durch <i>AaP</i> .	49
Abb. 4.22.	Der Einfluss der TBHP-Konzentration in der <i>AaP</i> -vermittelten Oxidation von 0,1 mM Thioanisol mit TBHP (M 7.4.2).	49
Abb. 4.23.	Der Umsatz in der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit TBHP in Abhängigkeit von der TBHP-Konzentration nach 0,5 h (□) und 3 h (●) Reaktionszeit (M 7.5.3.1 a).	50
Abb. 4.24.	Links: Der Enantiomerenüberschuss in der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol bei unterschiedlichen TBHP-Konzentrationen im gesamten Reaktionszeitraum. Rechts: Die Entstehung von Methylphenylsulfon in Abhängigkeit von der TBHP-Konzentration nach 3 h (●) und 8 h (□) Reaktionszeit (M 7.5.3.1 a).	50
Abb. 4.25.	Vergleich der Umsätze von 1 mM Thioanisol in der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und TBHP (M 7.5 a, M 7.5.3.1 a).	51
Abb. 4.26.	Die Sauerstoffbildung bei der Disproportionierung von TBHP und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , katalysiert durch 72 nM <i>AaP</i> (M 7.4.5.4).	52
Abb. 4.27.	Die <i>AaP</i> -katalysierte Sulfoxidation von Thioanisol mit Peressigsäure.	53
Abb. 4.28.	Die enantioselektive Oxidation von Thioanisol mit dem Luftsauerstoff-Ascorbinsäure-System katalysiert durch <i>AaP</i> .	55
Abb. 4.29.	Umsatz und Ausbeute der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit Ascorbinsäure (0,01 – 75 mM) nach 1 h (□) und 3 h (●) Reaktionszeit (M 7.5.3.3 a).	55
Abb. 4.30.	Der Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration auf die Bildung von Methylphenylsulfon (●) und die Enantioselektivität (□) nach 8 h Reaktionszeit (M 7.5.3.3 a).	55
Abb. 4.31.	Die Ausbeute an Produkten bei der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation von Thioanisol mit unterschiedlichen Oxidationssystemen unter gleichen Bedingungen (M 7.5.3.4).	57
Abb. 4.32.	Der Einfluss von 5 % (v/v) Lösungsmittel (von links: Abnahme der Polarität) auf die Enzymaktivität im Veratrylalkohol-Assay (M 7.3.1.1).	59
Abb. 4.33.	Die verwendeten Co-Solventien.	59
Abb. 4.34.	Der Einfluss von 5 % (v/v) Lösungsmittel im Thioanisol-Assay (M 7.3.2.5).	59
Abb. 4.35.	Der Umsatz in Abhängigkeit des Co-Solvent-Gehaltes nach 13,5 h (M 7.5.2 a, b).	60
Abb. 4.36.	Der Enantiomerenüberschuss in Abhängigkeit des Co-Solvent-Gehaltes nach 13,5 h (M 7.5.2 a und b).	60
Abb. 4.37.	Der Effekt des TEG-Gehaltes auf die Sulfoxidation von 1 mM Thioanisol mit 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> katalysiert durch 360 nM <i>AaP</i> (M 7.5.2 c).	61
Abb. 4.38.	Der Effekt des <i>t</i> -Butanol-Gehaltes auf die Sulfoxidation von 1 mM Thioanisol mit 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> katalysiert durch 360 nM <i>AaP</i> (M 7.5.2 c).	61
Abb. 4.39.	Die Immobilisierung der <i>AaP</i> an die aminomodifizierten Glasperlen TRISOPERL <sup>®</sup> über die Verknüpfung durch Glutardialdehyd (M 7.6.1).	64
Abb. 4.40.	Die Summe der Enzymaktivität der Überstands-, Wasch- und Aufbewahrungslösung im Verhältnis zur eingesetzten Enzymaktivität (M 7.6.2).	65

Abb. 4.41.	Die Enzymaktivität der <i>AaP</i> immobilisiert auf Anionenaustauscher (M 7.6.2).	66
Abb. 4.42.	Der Einschluss von <i>AaP</i> in Calcium-Alginatperlen (M 7.6.3).	67
Abb. 4.43.	<i>AaP</i> -aktive PDMS-Perlen. Links: Wasserfreie Immobilisierung von <i>AaP</i> -Lyophilisat. Rechts: Statische Emulsion aus gelöster <i>AaP</i> und PDMS (M 7.6.4.1).	68
Abb. 4.44.	Schema der beiden Formen des <i>AaP</i> -Einschlusses. Links: Die wasserfreie Immobilisierung der lyophilisierten <i>AaP</i> . Rechts: Die Immobilisierung der gelösten <i>AaP</i> in Form einer statischen Emulsion (M 7.6.4.1).	68
Abb. 4.45.	Der Einfluss des pH-Wertes der statischen Emulsion auf den ee-Wert in der Oxidation von 10 mM Thioanisol mit $1,5 \text{ mM} \cdot (2 \text{ h})^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ , katalysiert durch immobilisierte <i>AaP</i> in PDMS (M 7.6.4.1).	70
Abb. 4.46.	Die enantioselektive <i>AaP</i> -katalysierte Oxidation von Alkylarylsulfid zum chiralen Alkylarylsulfoxid und Alkylarylsulfon als Folgeprodukt.	75
Abb. 4.47.	Erfolgreich getestete Thioanisolanaloge in der enantioselektiven <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidationsreaktion.	76
Abb. 4.48.	Die <i>AaP</i> -vermittelte Halogenierung von Phenol.	81
Abb. 4.49.	Die Abhängigkeit der <i>AaP</i> -katalysierten Umsetzung von 0,5 mM Phenol mit $1 \text{ mM} \cdot (20 \text{ min})^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ und 10 mM KBr von unterschiedlichen pH-Werten im Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach 40 min Reaktionszeit (M 7.10.2.1).	82
Abb. 4.50.	Entstehung der Produkte in der <i>AaP</i> -katalysierten Bromierung von Phenol in Abhängigkeit von dem pH-Wert.	82
Abb. 4.51.	<i>AaP</i> -katalysierte Oxidation von Benzylalkohol zur Benzolcarbonsäure über die Oxidation des Benzylaldehyds.	83
Abb. 4.52.	Tenidap, ein nichtsteroidales Antirheumatikum zur Behandlung von Arthritis, und Ropinirol, ein Dopaminagonist als Mittel gegen die Parkinson-Krankheit und das Restless-Legs-Syndrom.	85
Abb. 4.53.	CPO-katalysierte Oxidation von Indol zu Oxindol.	85
Abb. 4.54.	Die <i>AaP</i> -katalysierte Oxidation von Indol mit Wasserstoffperoxid.	86
Abb. 4.55.	Die Benzoheterocyclen Benzothiophen und Benzofuran.	86
Abb. 5.1.	Die enantioselektive <i>AaP</i> -katalysierte Oxidation von Alkylarylsulfid zum chiralen Alkylarylsulfoxid und Alkylarylsulfon als Folgeprodukt.	87
Abb. 6.1.	Die Weiterentwicklung des <i>AaP</i> -Einsatzes in der enantioselektiven Sulfoxidation.	91
Abb. 9.1.	Die Bildung und der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes (ES).	120
Abb. 9.2.	Regressionsgerade von racemischem Methylphenylsulfoxid bei 25 °C und einer Wellenlänge von $\lambda = 230 \text{ nm}$ .	122
Abb. 9.3.	Substrat-Abhängigkeit der <i>AaP</i> -Aktivität bei der Sulfoxidation von Thioanisol.	123
Abb. 9.4.	Der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einfluss auf die <i>AaP</i> -Aktivität bei der Sulfoxidation von 0,1 mM Thioanisol.	123
Abb. 9.5.	Die Autoxidation von Ascorbinsäure.	123
Abb. 9.6.	Titerbestimmung der Permanganatlösung mit Natriumoxalat in stark schwefelsaurer Lösung.	124
Abb. 9.7.	Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes in stark schwefelsaurer Lösung mit Kaliumpermanganat.	124

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 3.1.	Die sechs Enzymhauptklassen und katalysierte Reaktionsart.	4
Tab. 3.2.	Beispiele für die industrielle Anwendung von Biokatalysatoren [Liese 2006].	5
Tab. 3.3.	Kinetische Parameter in der <i>AaP</i> -katalysierten Oxidation unterschiedlicher Substrate [Ullrich 2004, 2008, Kluge 2009].	19
Tab. 3.4.	Vergleich verschiedener Häm-Peroxidasen in der Sulfoxidation von Thioanisol [van Deurzen 1996].	29
Tab. 3.5.	Asymmetrische Oxidation von Sulfiden durch Ganz-Zell-Biokatalyse.	30
Tab. 4.1.	Der Vergleich der gereinigten <i>AaP</i> mit dem nicht gereinigten <i>AaP</i> -Lyophilisat in der Umsetzung von 5 mM Thioanisol nach 5,5 h Reaktionszeit ( <b>M</b> 7.5 a).	32
Tab. 4.2.	Die Ausbeuten des ( <i>S</i> )-Enantiomers aus der spontanen Oxidation und der enzymkatalysierten Oxidation (360 nM <i>AaP</i> ) von Thioanisol unter identischen Reaktionsbedingungen ( <b>M</b> 7.5 a, f).	33
Tab. 4.3.	Michaelis-Menten-Konstanten und Spezifitätskonstanten der Substrate aus der Modellreaktion ( <b>M</b> 7.4.1.1, 7.4.3).	35
Tab. 4.4.	Wechselzahl und Spezifitätskonstante einiger besonders effizienter Enzyme.	36
Tab. 4.5.	Der Einfluss verschiedener Medien auf die Standstabilität der nativen <i>AaP</i> ( <b>M</b> 7.3.2.6).	37
Tab. 4.6.	Umsatz und Enantiomerenüberschuss von 10 mM Thioanisol katalysiert durch 72 nM <i>AaP</i> nach 29,08 h Reaktionszeit bei unterschiedlichen pH-Werten ( <b>M</b> 7.5.1).	39
Tab. 4.7.	Der $K_m$ -Wert und die Spezifitätskonstante anderer Peroxidasen in der Disproportionierung von $H_2O_2$ im Vergleich mit den Werten der <i>AaP</i> .	46
Tab. 4.8.	Michaelis-Menten-Konstanten und katalytische Effizienz der Oxidationsmittel in der Sulfoxidationsreaktion mit Methylphenylsulfid ( <b>M</b> 7.4.1.2, 7.4.2).	49
Tab. 4.9.	Die ee-Werte der Sulfoxidation mit $H_2O_2$ und TBHP im Vergleich ( <b>M</b> 7.5 a, <b>M</b> 7.5.3.1 a).	52
Tab. 4.10.	Die <i>AaP</i> -katalysierte Oxidation von 5 mM Thioanisol mit $1,5 \text{ mM} \cdot (2 \text{ h})^{-1}$ Peressigsäure im Vergleich zur Oxidation mit $1,5 \text{ mM} \cdot (2 \text{ h})^{-1}$ Wasserstoffperoxid ( <b>M</b> 7.5.3.2).	53
Tab. 4.11.	Vergleich der <i>AaP</i> -katalysierten Thioanisolumsetzung mit unterschiedlichen Oxidationssystemen ( <b>M</b> 7.5.3.4).	56
Tab. 4.12.	Die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit $0,75 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ $H_2O_2$ oder TBHP im Puffer katalysiert mit $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ immobilisierter <i>AaP</i> ( <b>M</b> 7.6.4.2 a, b).	69
Tab. 4.13.	Die Oxidation von 0,5 mM Thioanisol mit $0,75 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ $H_2O_2$ bzw. TBHP, katalysiert durch 360 nM <i>AaP</i> , in organischen Lösungsmitteln ( <b>M</b> 7.6.4.2 c).	71
Tab. 4.14.	Die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit $0,75 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ $H_2O_2$ oder TBHP in n-Heptan katalysiert mit $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ immobilisierter <i>AaP</i> ( <b>M</b> 7.6.4.2 a, b).	72
Tab. 4.15.	Die Oxidation von 2,5 mM Thioanisol mit $0,75 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ OM katalysiert durch $0,05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ <i>AaP</i> eingeschlossen in PDMS als statische Emulsion ( <b>M</b> 7.6.4.2 e).	73
Tab. 4.16.	Umsatz und Enantiomerenüberschuss in der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden mit $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ Wasserstoffperoxid nach 0,5 h Reaktionszeit ( <b>M</b> 7.5.4 a).	76
Tab. 4.17.	Die $K_{m,app}$ -Werte und Spezifitätskonstanten ausgewählter Alkylarylsulfide in der Oxidation mit Wasserstoffperoxid ( <b>M</b> 7.4.4).	78
Tab. 4.18.	Umsatz und Enantiomerenüberschuss in der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidation	

	von 1 mM Alkylarylsulfiden mit 5 mM Ascorbinsäure und Sauerstoff (M 7.5.4 b).	78
Tab. 4.19.	Der Umsatz von 0,5 mM Benzylalkohol in der Oxidation mit $0,4 \cdot (20 \text{ min})^{-1}$ mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> katalysiert durch 25 nM <i>AaP</i> nach 50 min Reaktionszeit (M 7.10.3).	83
Tab. 5.1.	Michaelis-Menten-Konstanten und Spezifitätskonstanten ausgewählter Substrate der <i>AaP</i> -katalysierten Sulfoxidation und Disproportionierung von Wasserstoffperoxid im Vergleich zur CPO.	88
Tab. 7.1.	Gewählte Wellenlänge zur Identifizierung mit dem UV-Detektor.	93
Tab. 7.2.	Molare Extinktionskoeffizienten bei 25 °C .	93
Tab. 7.3.	Enzymaktivitäten der verschiedenen gefriergetrockneten Enzymchargen.	95
Tab. 7.4.	Reaktionsbedingungen während der enzymkatalysierten Thioanisoloxidation mit Wasserstoffperoxid im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.	101
Tab. 7.5.	Reaktionsbedingungen während der katalysierten und nicht katalysierten Oxidation von racemischen Methylphenylsulfoxid mit Wasserstoffperoxid im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.	101
Tab. 7.6.	Reaktionsbedingungen während der enzymkatalysierten Thioanisoloxidation mit Wasserstoffperoxid unter dem Einfluss wassermischbarer organischer Lösungsmittel im Phosphat-Citrat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.	102
Tab. 7.7.	Reaktionsbedingungen bei der Verwendung von TBHP als Oxidationsmittel im Phosphat-Citrat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C.	102
Tab. 7.8.	Reaktionsbedingungen bei der Verwendung von Peressigsäure als Oxidationsmittel im Phosphat-Citrat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C.	102
Tab. 7.9.	Die Reaktionsbedingungen in der Oxidation von Thioanisol mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Ascorbinsäure.	102
Tab. 7.10.	Die Reaktionsbedingungen bei der Oxidation von Thioanisol mit unterschiedlichen Reaktionssystemen.	103
Tab. 7.11.	Reaktionsbedingungen der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion mit Wasserstoffperoxid oder 5 mM Ascorbinsäure (AS) im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und 25 °C.	103
Tab. 7.12.	Die Reaktionsbedingungen für die Sulfoxidation in organischen Lösungsmitteln unter der Verwendung unterschiedlicher <i>AaP</i> -Präparate.	106
Tab. 9.1.	Einstellung des pH-Wertes im McIlvain-Puffer bei 18 °C [Rauscher 2000].	125
Tab. 9.2.	Einstellung des pH-Wertes im Phosphatpuffer bei 18 °C [Rauscher 2000].	125
Tab. 9.3.	Einstellung des pH-Wertes im Essigsäure-Acetat-Puffer bei 18 °C [Rauscher 2000].	125
Tab. 9.4.	Einstellung des pH-Wertes im Carbonatpuffer bei 18 °C [Rauscher 2000].	125
Tab. 9.5.	Chemikalienliste.	126
Tab. 9.6.	Geräteliste.	128

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.  
Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das  
Mögliche getan hat.  
JOHANN WOLFGANG VON GOETHE, „Italienreise“ (1787)

Für meine Eltern und Alexander.



# 1 Einleitung

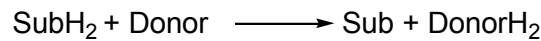
Die Biokatalyse entwickelte sich in den letzten Jahren stetig zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Synthese von Feinchemikalien. Ein besonderes Interesse gilt den Biokatalysatoren, die chirale Verbindungen als Bausteine für bioaktive Substanzen wie Pharmazeutika zugänglich machen. Die Enantioselektivität besitzt in der Synthese von pharmazeutischen und agrochemischen Produkten, aber auch bei Geschmacks- und Geruchsstoffen eine übergeordnete Bedeutung. Organismen unterscheiden zwischen den beiden Antipoden eines Enantiomerenpaares. Enantiomere pharmakologisch aktiver Verbindungen können sehr unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf ihre physiologische Aktivität, auf ihren Wirkmechanismus oder ihrer Toxizität haben. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das Schlafmittel Contergan<sup>®</sup>, bei dem eines der Enantiomere des Wirkstoffes Thalidomid die gewünschte Eigenschaft, das andere jedoch teratogene Nebenwirkungen besitzt [Blaschke 1979]. Aus diesem Grund wird seit 1992 die physiologische Charakterisierung jedes Enantiomeres vor der Zulassung neuer Wirkstoffe sowohl durch die US Food and Drug Administration (FDA) als auch von dem European Committee for Proprietary Medicinal Products eingefordert [Stinson 1992]. In neuester Zeit werden selbst unerwünschte Enantiomere eines racemischen Produktes als Verunreinigung betrachtet, auch wenn keine Nebenwirkung bekannt ist. Diesen so genannten „chiral switch“ haben die Pharmakonzerne für sich erkannt, indem sie vorhandene racemische Wirkstoffe durch eines der Isomere ersetzen, um zum einen eine erhöhte Wirksamkeit zu erzielen und zum anderen einen neuen Patentschutz zu erhalten [Agranat 2002]. Von 1985 bis 2000 stieg der Anteil optisch reiner Wirkstoffe von 7 auf 33 %. Mehr als drei Viertel der neusten Entwicklungen sind chiral [Straathof 2002, Agranat 2002, Breuer 2004]. Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung enantiomerenreiner Produkte deutlich. Mit Hilfe von Biokatalysatoren kann die kinetische Racematspaltung und auch die asymmetrische Synthese verwirklicht werden, um optisch aktive Substanzen zu synthetisieren. Die asymmetrische Synthese, die ökonomisch und ökologisch attraktiver ist, wird vor allem durch Oxidoreduktasen und Lyasen katalysiert. Die kinetische Racematspaltung ist vor allem den Hydrolasen vorbehalten.

65 % der industriell etablierten Enzyme sind Hydrolasen. Nur ein Viertel der industriellen Biokatalysatoren sind Oxidoreduktasen, die zu 90 % als Ganz-Zell-Systeme eingesetzt werden. Neben der Fähigkeit die asymmetrische Synthese zu katalysieren, besitzen die Oxidoreduktasen das große Potential Oxidations- und Reduktionsreaktionen zu katalysieren (Abb. 1.1). Die direkte selektive Oxyfunktionalisierung nichtaktivierter organischer Substrate ist von großem Interesse in der Synthesechemie [Straathof 2002].

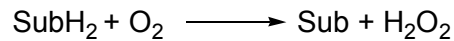
Haloperoxidasen gehören zu den vielseitigsten oxidativen Enzymen. Neben den klassischen Peroxidase-Reaktionen (oxidative Dehydrierung) und der oxidativen Halogenierung organischer Substrate, besitzen Haloperoxidasen das Potential Oxygenase-Reaktionen zu katalysieren. Die selektive Einführung eines Sauerstoffatoms in organische Substrate ist aus synthetischer Sicht höchst attraktiv und vergleichbar mit den Oxidationsreaktionen, die durch die Monooxygenasen vermittelt werden (Abb.1.1).

Der Vorteil der Peroxidasen gegenüber den Monooxygenasen ist, dass die meisten Peroxidasen stabile extrazelluläre Enzyme sind. Sie wirken unabhängig von teuren Redoxkofaktoren und verwenden das preiswerte und umweltfreundliche Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptormolekül.

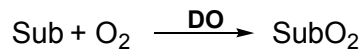
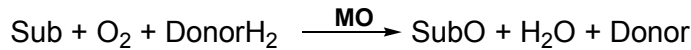
- **Dehydrogenasen/Reduktasen**



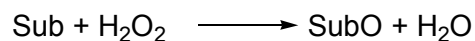
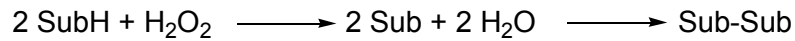
- **Oxidasen**



- **Oxygenasen**



- **Peroxidasen**



**Abb. 1.1. Enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen [Faber 2004].**

Die bekannteste Haloperoxidase ist die Chlorperoxidase (CPO) des Rußschimmels *Caldariomyces fumago*, die eine Reihe interessanter Oxidationsreaktionen in hoher Regio- und Enantioselektivität katalysiert. Der Grund, dass die CPO bisher noch keinen industriellen Einsatz fand, ist die hohe Instabilität des Enzyms gegenüber seinem Oxidationsmittel und die schlechte Verfügbarkeit des Enzyms, was den Einsatz der CPO nicht wirtschaftlich macht. Es ist bisher noch nicht gelungen, durch z.B. verfahrenstechnische Optimierung oder heterologer Expression des Enzyms, diesen Nachteilen entgegenzuwirken [van Rantwijk 2000].

Das Vorliegen einer extrazellulären Haloperoxidase aus dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* mit einem sehr hohen Potential der Oxyfunktionalisierung organischer Substrate ist biotechnologisch von großer Bedeutung. Sie benötigt, wie die Chlorperoxidase, keine teuren Kofaktorsysteme als Akzeptormoleküle, sondern benötigt lediglich das umweltfreundliche und preiswerte Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor. Das Substratspektrum der *Agrocybe aegerita* Peroxidase wird stetig durch neue Entdeckungen in Substratscreeningtests erweitert und übersteigt jetzt schon das Substratspektrum der Chlorperoxidase aus *C. fumago*. Vor allem das Hydroxylierungspotential der *Agrocybe aegerita* Peroxidase (*AaP*) verspricht eine breite Anwendung. So katalysiert die *AaP* die enantioselektive Hydroxylierung von 2-Phenoxypropionsäure zu (*R*)-2-(4-Hydroxyphenoxy)propionsäure. Die BASF produziert dieses Intermediat eines Herbizides im Tonnenmaßstab (1000 t·a<sup>-1</sup>) mit Hilfe einer Oxidase [Dingler 1996, Wandrey 2000]. Des Weiteren katalysiert die *AaP* die enantioselektive Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden. Optisch aktive Sulfoxide sind wichtige Intermediate in der chiralen Synthese bzw. dienen selbst als biologisch aktive Substanz.

Neben der Selektivität ist auch die Produktivität entscheidend für die Qualität und Zyklenzahl eines Katalysators. Viele chirale Intermediate werden in kleineren Mengen hergestellt (< 1 t·a<sup>-1</sup>). Damit ein neuartiger Biokatalysator sich im industriellen Maßstab gegen eine große Konkurrenz an Herstellern und Methoden durchsetzen kann, ist ein breites Substratspektrum wünschenswert [Breuer 2004]. Die neue Peroxidase verspricht ein vielfältig einsetzbarer Biokatalysator mit hohem regio- und enantioselektiven Verhalten zu sein. Eine ausführliche Charakterisierung des Enzyms in Bezug auf die Substratbreite, kinetischen Parameter und optimalen Reaktionsbedingungen sowie eine molekularbiologische Charakterisierung ermöglicht die Wegbereitung eines neuen industriellen Biokatalysators.

## 2 Zielstellung

Mit einer neuartigen extrazellulären Peroxidase aus dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* werden aus ökologischer und taxonomischer Sicht neue katalytische Eigenschaften im Vergleich zu herkömmlichen Peroxidasen erwartet.

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich daraus folgende Ziele:

- Das regio- und enantioselektive, sowie synthetische Potential der neuartigen *Agrocybe aegerita* Peroxidase (AaP) soll getestet werden.
- Die AaP ist in einer für die Feinchemie interessanten Reaktion zu charakterisieren und zu etablieren. Als Modellreaktion dient die Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden, um optisch aktive Sulfoxide zu synthetisieren.
- Auf Grundlage des Kenntnisstandes in der CPO-katalysierten Sulfoxidation von Alkylarylsulfoxiden soll das synthetische Potential der *Agrocybe aegerita* Peroxidase diskutiert und mit dem CPO-Reaktionssystem verglichen werden.
- Die Verwendung des Enzyms für technische Prozesse ist durch eine Prozessoptimierung vorzubereiten und zu diskutieren.

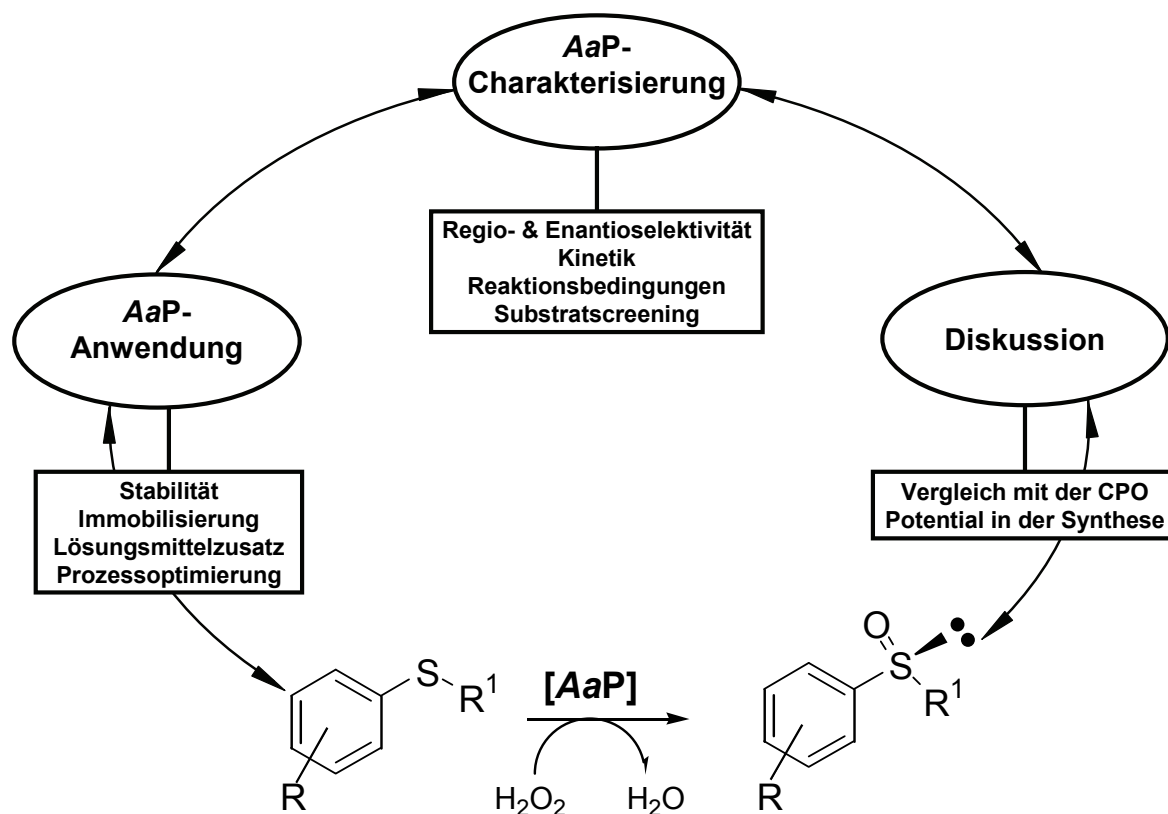


Abb. 2.1. Zielsetzung.

## 3 Stand der Technik

### 3.1 Biokatalysatoren

Seit den frühen 70er Jahren des 20. Jahrhunderts hat sich die Entwicklung der Biokatalysatoren als fundierte Technologie stetig fortgesetzt und in einer Reihe von chemischen Prozessen etabliert [Wong 1994, Drauz 2002, Faber 2004, Liese 2006].

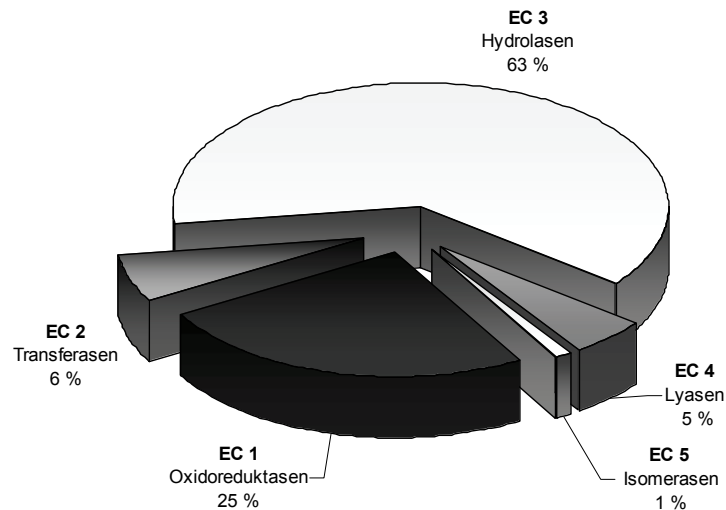
Biokatalytische Prozesse können heutzutage durchaus mit den klassischen chemischen Prozessen konkurrieren und sie teilweise ergänzen oder den gesamten chemischen Prozess ersetzen. Die Gründe für das hohe Interesse Biokatalysatoren in der industriellen Synthese zu etablieren, liegen u.a. in den ökonomischen und ökologischen Vorteilen (umweltfreundliche Reaktionsmedien, geringe Energiekosten, da Einsatz unter Normaldruck und bei Raumtemperatur). Die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität der Biokatalysatoren führt zusätzlich dazu, dass es zur Reduzierung von unerwünschten Nebenprodukten kommt und unter chemischen Aspekten komplizierte Synthesereaktionen oftmals in einem Schritt durch Enzyme katalysiert werden. Die Biokatalyse ist daher eine nachhaltige und grüne Technologie.

Über die EC-Nummern (*Enzyme Commission numbers*) werden die Enzyme in einem internationalen Klassifikationssystem nach den Reaktionen, die sie katalysieren, eingeteilt [IUBMB 1992]. So bekommt jedes Enzym eine Klassifizierungsnummer bestehend aus vier Ziffern (z.B. EC 1.2.3.4). Die erste Ziffer unterteilt die Enzyme in die sechs Enzymhauptklassen (Tab. 3.1). Die zweite Zahl bezeichnet die Unterklasse und differenziert die Enzyme einer Klasse nach der Art des Substrates (EC 1), der Gruppe, die übertragen wird (EC 2), der Bindung, die hydrolysiert, gespalten oder gebildet wird (EC 3, 4 und 6) oder nach dem Typ der Isomerisierung. Nähere Informationen, wie z.B. die Art des Co-Substrates bei Oxidoreduktasen werden durch die dritte Stelle der EC-Nummer beschrieben. Die letzte Ziffer der Enzymklassifizierung ist eine fortlaufende Nummer.

**Tab. 3.1. Die sechs Enzymhauptklassen und katalysierte Reaktionsart.**

Enzymklasse	Reaktionstyp
EC 1 Oxidoreduktasen	Redoxreaktionen
EC 2 Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen
EC 3 Hydrolasen	Hydrolysereaktion (Kondensationsreaktion)
EC 4 Lyasen	Bindungsspaltung, meist unter Bildung einer Doppelbindung
EC 5 Isomerasen	Isomerisierungs- und Umlagerungsreaktionen
EC 6 Ligasen	Bildung chemischer Bindungen unter Energieverbrauch

Es sind über 2500 Enzyme bekannt und zum größten Teil charakterisiert. 300 Enzyme davon sind kommerziell erhältlich und 20 Enzyme finden derzeit Anwendung in der Weißen (Industriellen) Biotechnologie [Zinke 2004]. In mehr als 130 industriellen Prozessen werden Biokatalysatoren in Form isolierter Enzyme, als ganze Zellen und/oder immobilisiert an Trägern oder in Membranen für die Synthese von Feinchemikalien und auch Bulkchemikalien ( $> 10000 \text{ t}\cdot\text{a}^{-1}$ ) eingesetzt [Gerhartz 1990, Sheldon 1993, Tanaka 1993, Straathof 2002, Liese 2002, 2006]. Die meisten Enzyme, die dafür eingesetzt werden, stammen aus der Klasse der Hydrolasen und Oxidoreduktasen (Abb. 3.1). Die Oxidoreduktasen, von denen vor allem die Dehydrogenasen als industrielle Biokatalysatoren dominieren, werden meistens als ganze Zellen eingesetzt, um den Metabolismus der lebenden Zelle für die ansonsten problematische und kostenintensive Kofaktor-Regenerierung zu nutzen.



**Abb. 3.1. Die Verteilung der Biokatalysatoren nach den Enzymklassen in der Industriellen Biotechnologie.**

In der Tabelle 3.2 sind einige Beispiele von Bioprozessen dargestellt, die sich erfolgreich in der industriellen Synthese durchgesetzt haben und dort klassische chemische Synthesestufen oder einen gesamten Prozess ersetzen.

**Tab. 3.2. Beispiele für die industrielle Anwendung von Biokatalysatoren [Liese 2006].**

Enzym	Katalysatorform	Produkt	Jahresproduktion, t·a <sup>-1</sup>	Unternehmen
D-Aminosäure Oxidase <b>EC 1.4.3.3</b>	Trägerimmobilisiert	α-Ketoamidpinyll-7-ACA	200	Sanofi Aventis
D-Aminosäure Transaminase <b>EC 2.6.1.21</b>	ganze Zelle	L-Glutaminsäure	1.500.000	NSC Technologies, Monsanto
Glutaryl Amidase <b>EC 3.1.1.41</b>	Trägerimmobilisiert	7-ACA	200	Sanofi Aventis
Lipase <b>EC 3.1.1.3</b>	Membranretention	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-MPGM	50	Sepracor Inc.
Lactamase <b>EC 3.5.2.11</b>	ganze Zellen	L-Lysin	700.000	Toray Industries
Racemase <b>EC 5.1.1.15</b>				
Nitrilhydratase <b>EC 4.2.1.84</b>	Trägerimmobilisiert	Acrylamid	> 30.000	Nitto Chem. Industry Co.
Xylose Isomerase <b>EC 5.3.1.5</b>	Trägerimmobilisiert	Fructose	> 7·10 <sup>6</sup>	u.a. Novo-Nordisk

## 3.2 Oxidationsreaktionen in der Enzymkatalyse

### 3.2.1 Einleitung

Das steigende Interesse an enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen wurde vor allem durch die hohe Nachfrage an umweltschonender und nachhaltiger Chemie vorangetrieben. Stöchiometrische Mengen Schwermetallsalze, die bisher den Einsatz in Oxidationsreaktionen fanden, können durch katalytische Mengen umweltverträglicher Oxidoreduktasen ersetzt werden, die nur Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel benötigen. Die enzymkatalysierten Reaktionen werden in wässrigen Medien durchgeführt und als Abfallprodukt entsteht meist nur Wasser. Ein weiterer wichtiger Vorteil, oxidativ wirkender Enzyme, ist die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität, was für eine hohe synthetische Wertschöpfung und nachhaltige Prozessführung mit hohen Ausbeuten sorgt. Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen und sind Enzyme der ersten Hauptklasse. Das hohe Redoxpotential, das die Enzyme dieser Klasse besitzen, ermöglicht auch die oxidative Katalyse nicht aktivierter Verbindungen [Burton 2003-a].

### 3.2.2 Oxidoreduktasen

Es ist davon auszugehen, dass 25 % alle bisher bekannten Enzyme Oxidoreduktasen sind. Sie werden nach dem Oxidationsmittel, das sie verwenden, und die Art der Reaktion, die sie katalysieren, in vier Unterklassen eingeteilt: Dehydrogenasen, Oxidasen, Oxygenasen und Peroxidasen (Abb. 3.2).

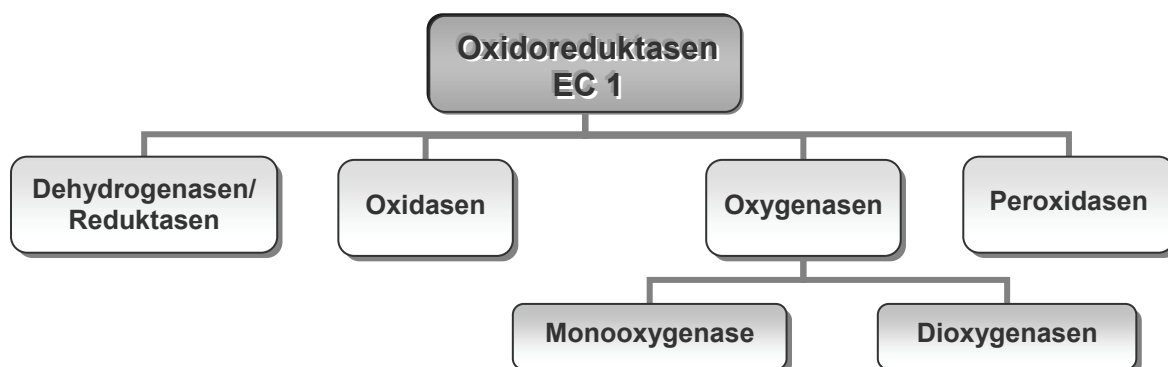


Abb. 3.2. Einteilung der Oxidoreduktasen.

Die **Dehydrogenasen** sind die am intensivsten untersuchten Redoxenzyme für die Anwendung in der Synthese. Sie katalysieren die Oxidation ihrer Substrate, indem Wasserstoff abgespalten wird (Abb. 3.3). Der große Nachteil dieser Enzyme ist, dass sie wie fast alle Oxidoreduktasen kostspielige Co-Substrate benötigen. Als Wasserstoffakzeptoren werden  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$  oder  $\text{FADH}_2$  verwendet.

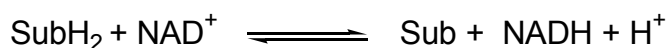
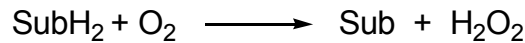


Abb. 3.3. Reaktionsschema der Dehydrogenase-Katalyse.

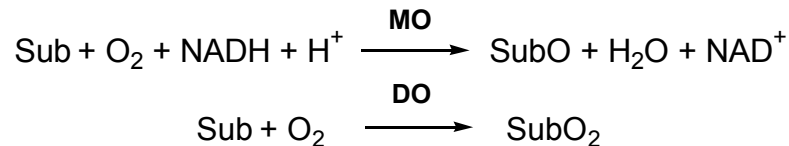
Neben der Oxidation der Substrate, durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms, können sie auch Reduktionsreaktionen katalysieren. So werden mit Hilfe der Dehydrogenasen u.a. optisch aktive Alkohole erhalten. Ein bekannter Prozess in der industriellen Anwendung einer Dehydrogenase in der Ketonreduktion ist der Eli Lilly Prozess [Zmijewski 1997, Liese 2006].

**Oxidasen** nutzen molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor unter Bildung von Wasserstoffperoxid oder Wasser (Abb. 3.4). Sie finden Verwendung als Biosensoren für eine selektive Detektierung von Molekülen, die Substrate der entsprechenden Oxidasen sind. Der namenhafteste Vertreter für die Verwendung als Biosensor ist die Glucoseoxidase für die Bestimmung von Glucose im Blut in der klinischen Chemie, was zum Nachweis einer Erkrankung an *Diabetes mellitus* verwendet wird. Oxidasen haben ein sehr schmales Substratfenster, so dass sie als Biosensor hochspezifisch wirken, was sich jedoch für den Einsatz in der chemischen Synthese als limitierend herausstellt.



**Abb. 3.4. Oxidase-katalysierte Oxidationsreaktion.**

**Oxygenasen** katalysieren die Einführung von Sauerstoff in ein Substrat. Dabei wird zwischen den Monooxygenasen, die die Übertragung eines Sauerstoffatoms vermitteln, und den Dioxygenasen, die die Einführung eines Sauerstoffmoleküls vermitteln, unterschieden (Abb. 3.5). Die Oxygenasen katalysieren Epoxidierungs- und Hydroxylierungsreaktionen in hoher Selektivität [Bugg 2001, Boyd 2002, van Beilen 2003]. Mehr als 50 Dioxygenasen (EC 1.13) und 150 Monooxygenasen (EC 1.14) sind bekannt. Ein Vertreter ist die Cytochrom P450 Monooxygenase, die zu den Häm-Thiolat Proteinen gehört und der bekannteste Vertreter der Hydroxylierungs-Enzyme ist [Lewis 2001]. Der Einsatz der Monooxygenasen ist stark eingeschränkt, da diese Enzyme oft schwer zu isolieren sind, eine niedrige Stabilität besitzen und teure Kofaktorsysteme benötigen. Oft werden sie in Ganzzellsystemen verwendet. Der Einsatz ganzer Zellen führt oft zu verminderten Ausbeuten und Enantioselektivitäten, aufgrund der Nebenreaktionen, die durch unerwünschte Enzymaktivitäten des komplexen Zellsystems katalysiert werden.

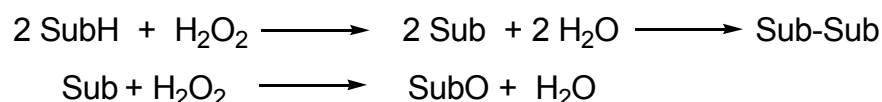


**Abb. 3.5. Die Einführung von Sauerstoff katalysiert durch Monooxygenasen (MO) und Dioxygenasen (DO).**

Es sind aber auch extrazelluläre Monooxygenasen bekannt, die keinen Kofaktor benötigen. Zu diesen Vertretern zählen die Laccasen und Polyphenoloxidasen, bei denen Kupferatome als aktives Zentrum wirken [Burton 2003-b].

Dioxygenasen werden in zwei Hauptgruppen, den Häm- und nicht Häm-haltige Dioxygenasen, unterteilt. Dioxygenasen sind wie die Monooxygenasen meistens NADPH-abhängig. Zu den Reaktionen, die sie katalysieren zählen u.a. *cis*-Dihydroxylierungs- und Hydroperoxidationsreaktionen.

Die **Peroxidasen** benötigen keine teuren Kofaktoren, sondern Peroxide wie z.B. Wasserstoffperoxid, Alkylhydroperoxide oder *tert*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel. Im besten Fall entsteht nur Wasser als Abfallprodukt, bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6. Die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Substraten mit Wasserstoffperoxid.**

Peroxidasen sind stabile extrazelluläre Enzyme und weisen ein breites Substratspektrum in vielfältigen Reaktionen auf, die u.a. auch typische Reaktionen der Monooxygenasen und Dehydrogenasen einschließen. Der bekannteste Vertreter der Peroxidasen ist die Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago*, die 1959 von Hager et al. entdeckt wurde [Shaw 1959, Morris 1966].

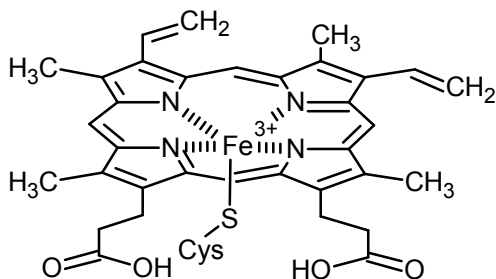
#### 3.2.3 Peroxidasen

Peroxidasen kommen in allen Organismen vor. Die Rolle der Peroxidasen in der Natur ist unterschiedlich. So katalysiert die Katalase die Zersetzung des Zellgiftes Wasserstoffperoxid mit der höchsten je gemessenen Substratspezifität. Die Meerrettichperoxidase (HRP; horseradish peroxidase (*engl.*)) katalysiert die radikalische Oligomerisierung und Polymerisierung elektronenreicher Aromaten. Beim Abbau von Lignin ist die Ligninperoxidase beteiligt. Haloperoxidasen besitzen die Fähigkeit Halogenide zu aktivieren und vermitteln so die Einführung von Halogenen in organische Substrate. Es wird angenommen, dass diese Funktion der Produktion von Abwehrstoffen von Organismen dient [Saunders 1964, Dunford 1976, Everse 1991, Franssen 1994].

Die große Gemeinsamkeit aller Peroxidasen ist, dass sie sehr ähnliche prosthetische Gruppen besitzen. Peroxidasen werden allgemein in drei Kategorien eingeteilt, die auf die Natur des katalytischen Zentrums zurückzuführen sind. So wird in Häm-Peroxidasen, Vanadium-abhängige Peroxidasen und metallfreie Peroxidasen unterschieden.

In Häm-Peroxidasen ist der für die katalytische Wirksamkeit unerlässliche Kofaktor ein Eisenprotoporphyrin IX. Eisenprotoporphyrin IX mit Eisen in der Oxidationsstufe +3 ist ein Hämderivat, das Hämin. Es soll der Einfachheit als Häm bezeichnet werden.

##### 3.2.3.1 Die Häm-Peroxidasen



**Abb. 3.7. Eisenprotoporphyrin IX – prosthetische Gruppe, mit Cystein als axialer Ligand.**

Häm-haltige Peroxidasen kommen in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und auch Tieren vor. Die natürlichen Funktionen der Peroxidasen sind sehr unterschiedlich und abhängig von den Organismen, in denen sie vorkommen. Sie spielen eine Rolle in Polymerisations-, Detoxifikations- und Verwitterungsprozessen [Dunford 1999-a].

Das Eisenion mit der Oxidationsstufe +3 im Häm ist fünffach koordiniert. In der äquatorialen Ebene ist das Eisenion mit den vier Pyrrolstickstoffatomen des Porphyrinringes koordiniert. In der axialen Position befindet sich eine Aminosäureseitenkette als fünfter

Ligand (Abb. 3.7). Über diese axiale Position ist die prosthetische Gruppe mit dem Apoprotein in einer kovalentähnlichen Verknüpfung verbunden. Bei den meisten Peroxidasen ist das aktive Zentrum in der axialen Position über Histidin mit der Proteinhülle verknüpft. Die CPO aus *Caldariomyces fumago* und die in dieser Arbeit verwendeten *Agrocybe aegerita* Peroxidase besitzen Cystein als Liganden in der proximalen Position [Sundaramoorthy 1995, Ullrich 2004]. Die beiden Peroxidasen ähneln somit der Monooxygenase des Typs Cytochrom P450 nicht nur in der Vielzahl der Reaktionen, die dieses Enzym katalysiert, sondern auch am aktiven Zentrum.

##### 3.2.3.2 Der katalytische Mechanismus der Häm-Peroxidasen

In Abbildung 3.8 ist der katalytische Zyklus, der für die Häm-Peroxidasen allgemein gültig ist, dargestellt.



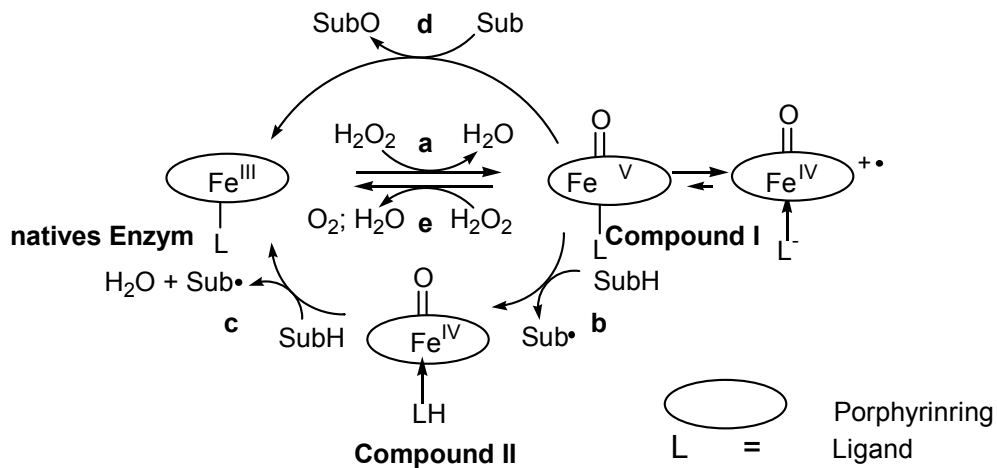


Abb. 3.8. Der katalytische Mechanismus der Häm-Peroxidasen.

Das native Enzym mit Eisen in der Oxidationsstufe +3 wird zunächst durch Wasserstoffperoxid zu Compound I oxidiert (a). Wasserstoffperoxid überträgt dabei ein Sauerstoffatom auf das Häm-Eisen, so dass eine fünffach geladene Eisen-Oxo-Verbindung gebildet wird. Dieser Oxidationszustand ist nicht stabil. Der Porphyrinring überträgt ein Elektron auf das Eisen, um es zu stabilisieren [Dawson 1988, Kitagawa 1994].

Es wird angenommen, dass die Oxidation der nativen Form über einen **Push-und-Pull-Mechanismus** gesteuert wird [Poulos 1987]. Eine Base am aktiven Zentrum entzieht dem Peroxid ein Proton. Das negativ geladene Peroxid bildet einen Hydroperoxidkomplex mit dem  $\text{Fe}(\text{III})$ -Ion des Häms und gleichzeitig wird der fünfte axiale Ligand vom Häm entkoppelt. Der Hydroperoxidkomplex wird durch die protonierte Base und einer positiven Ladung eines zweiten Aminosäurerestes stabilisiert (**Pull-Effekt**). Der axiale Ligand in der proximalen Ebene ist ein guter Elektronendonator und stabilisiert die höhere Oxidationsstufe des Häm-Eisens (**Push-Effekt**). Dieser Push-Pull-Effekt ermöglicht die heterolytische Spaltung des Wasserstoffperoxids und führt zu der  $\text{Fe}(\text{V})$ -Oxo-Form.

Im nächsten Schritt findet die Oxidation des Substrates statt, wobei das katalytische Zentrum wieder in den Ausgangszustand reduziert wird. Die Oxidation des Substrates kann über zwei verschiedene Reaktionswege erfolgen. Entweder durch eine Sauerstoffübertragung der Compound I auf das Substrat (d) oder durch einen radikalischen Zwei-Stufen-Mechanismus, bei dem Compound II gebildet wird (b, c). Der Mechanismus der Compound I-Reduzierung zum Grundzustand ist stark von der Peroxidase abhängig [van Deurzen 1996].

### 3.2.4 Peroxidase-katalysierte Reaktionen

Peroxidasen katalysieren ein breites Spektrum an Reaktionen. Die Anwendung der Peroxidasen als Biokatalysator in selektiven Reaktionen wie die Oxidation von Indol, Epoxidierungs-, Hydroxylierungs- und Sulfoxidationsreaktionen wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln ausführlich dargestellt [van Deurzen 1997-a, Adam 1999, Colonna 1999, van de Velde 2001]. Die *Caldariomyces*-CPO besitzt eine sehr große Bandbreite oxidativer Aktivitäten. Die Vermittlungen von Halogenierungsreaktionen und die Oxidation von Phenolen zählen zu den klassischen Peroxidase-Aktivitäten. Die Oxidation von Alkoholen, Epoxidations- und Sulfoxidationsreaktionen und die Hydroxylierung aktivierter C-H-Bindungen, die die CPO auch katalysieren kann, sind typische Reaktionen, die das Cytochrom P450-System katalysiert. Jedoch kann die CPO nicht, wie das P450-System, wenig aktivierte C-H-Bindungen wie Toluol oder Naphtalen hydroxylieren [Dunford 1999-a].

#### 3.2.4.1 Oxidative Dehydrierung

Bei dieser klassischen Peroxidasereaktion wird die Übertragung eines Elektrons der Compound I auf das Substrat katalysiert (Abb. 3.9). Dabei entsteht ein radikalisches Intermediat des Substrates, das ein Wasserstoffatom auf das katalytische Zentrum übertragen hat. Compound I geht so in Compound II über (**b**, Abb. 3.8). Durch eine weitere Ein-Elektron-Übertragung der Compound II auf ein zweites Substratmolekül erfolgt unter der Abspaltung eines Wasserstoffatoms die Bildung von Wasser, und der Fe(IV)-oxo-Zustand des Häms (Compound II) geht in den Grundzustand des Enzyms über (**c**, Abb. 3.8).



**Abb. 3.9. Oxidative Dehydrierung.**

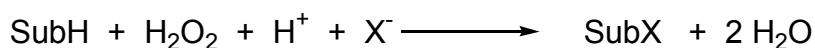
Diese Peroxidase-katalysierte Ein-Elektron-Übertragung auf elektronenreiche Aromaten wird von unspezifischen Dimerisierungs- oder Polymerisierungsreaktion begleitet. Beispiele sind die Oxidation von Methylcatechol (auch Guajacol) katalysiert durch HRP [Gallagher 1923], die HRP-katalysierte oxidative Dimerisierung von Aldoximen [Fukunishi 1991] oder die enzymkatalysierte Synthese von Polyanilin [Zemel 1993].

Ein spezieller Fall dieser klassischen Peroxidasereaktion ist die Dealkylierung von Heteroatomen, die durch Peroxidasen vermittelt wird [Meunier 1985, Meunier 1991].

#### 3.2.4.2 Halogenierungsreaktionen

Die so genannten Haloperoxidasen können die Einführung von Halogenatomen in organische Substrate katalysieren (Abb. 3.10). Haloperoxidasen katalysieren die Oxidation von Chloriden, Bromiden und Iodiden. Die Peroxidase-katalysierte Oxidation von Fluoriden ist bisher noch nicht bekannt.

Die oxidative Halogenierung ist nicht nur auf Häm-haltige Peroxidasen beschränkt, sondern wird auch von Vanadium-abhängigen und metallfreien Peroxidasen vermittelt.



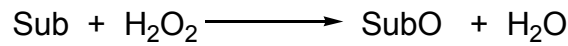
**Abb. 3.10. Die Halogenierung organischer Substrate.**

Es wird angenommen, dass die oxidative Halogenierung über die Bildung von Hypohalogenensäure als aktives Intermediat abläuft [Franssen 1992, Murphy 2003]. Die weitere Einführung des Halogens in organische Moleküle ist unspezifisch und wird vermutlich nicht enzymatisch vermittelt. Es gibt einen Vertreter der Haloperoxidasen, bei dem eine regioselektive Halogenierung beobachtet wurde. Die metallfreie Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrocinia* katalysiert die selektive Umsetzung von Indol zu 7-Chlor-Indol [Wiesner 1986].

Die bekannteste Haloperoxidase ist die Chlorperoxidase aus dem Schimmelpilz *Caldariomyces fumago*. Die CPO katalysiert die unspezifische Chlorierung, Bromierung und Iodierung einer Reihe elektrophiler organischer Substrate über die Bildung von Hypohalogenensäure als aktives Halogenierungsreagenz. Es existieren eine Reihe von Übersichtsartikel, in denen die Peroxidase-katalysierten Halogenierungsreaktionen beschrieben werden [Littlechild 1999, Murphy 2003, van Peé 2003]. So katalysiert die Lactoperoxidase die Oxidation von Bromid- und Iodid-Ionen [Neidman 1981, Geigert 1983-b] und die HRP nur die Oxidation von Iodid-Ionen [Ramakrishnan 1983].

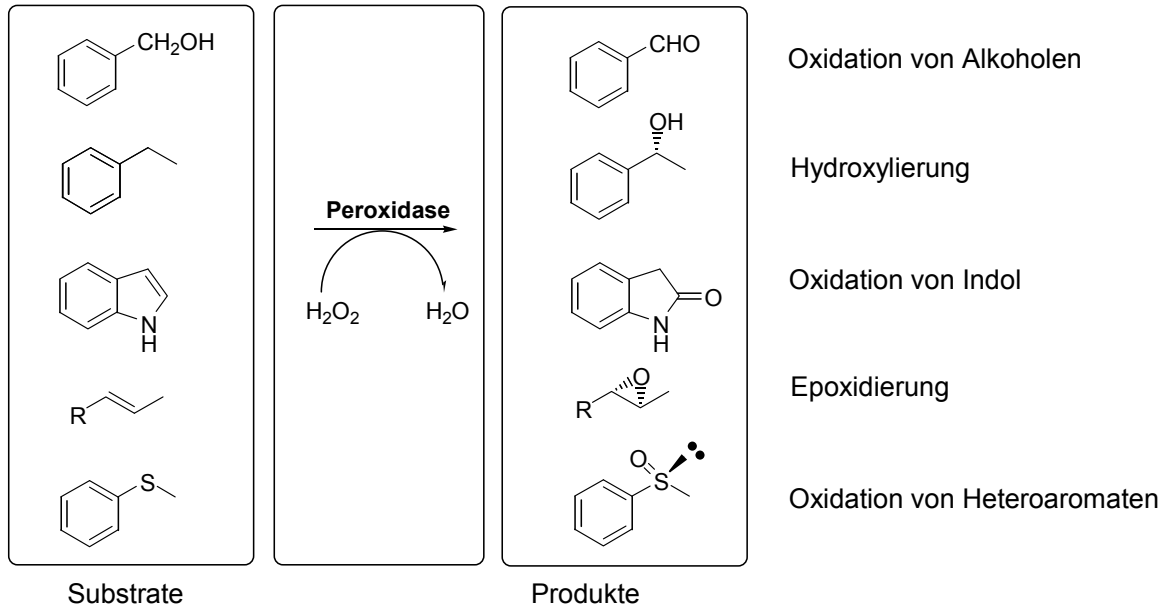
#### 3.2.4.3 Sauerstoffübertragungsreaktion

Für die Anwendung der Peroxidasen als Biokatalysator in der organischen Synthese ist die selektive Einführung eines Sauerstoffmoleküls in ein organisches Substrat der interessanteste Reaktionstyp (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11. Sauerstoffinsertionsreaktion.**

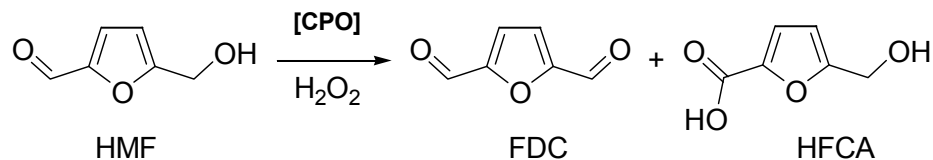
Die Sauerstoffübertragungsreaktionen sind mit denen vergleichbar, die durch Monoxygenasen katalysiert werden. Die Abbildung 3.12 gibt einen Überblick über die Reaktionen.



**Abb. 3.12. Peroxidase-katalysierte Einführung eines Sauerstoffatoms in organische Substrate.**

Bei dieser Art von Peroxidase-katalysierter Oxidation wird das Sauerstoffatom der Compound I meistens direkt auf das Substrat übertragen (**d**, Abb. 3.8). Dabei wird Compound I durch einen Zwei-Elektronen-Prozess in den Grundzustand reduziert. Die angenommenen Mechanismen der Sauerstoffübertragung auf ein Substrat sind vielfältig [van Deurzen 1996].

Wie die Dehydrogenase, Oxidase und Monoxygenase sind Peroxidasen in der Lage **die Oxidation von Alkoholen** zu katalysieren. Jedoch beschränkt sich die Oxidation der meisten Peroxidasen nur auf die katalysierte Umsetzung von Phenolen zu Chinonen über freie radikalische Intermediate (klassische Peroxidasereaktion). Eine Ausnahme bildet die CPO, die die Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden katalysieren kann [Geigert 1983-c]. Van Deurzen konnte zeigen, dass das reaktive Aldehyd 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) nicht nur zum 2,5-Furandicarboxaldehyd (FDC), sondern auch zur korrespondierenden 5-Hydroxymethyl-2-furancarboxylsäure (HFCA) durch die CPO katalysiert werden kann (Abb. 3.13) [van Deurzen 1996].



**Abb. 3.13. Die Oxidation von 5-Hydroxymethylfurfural katalysiert durch die CPO [van Deurzen 1996].**

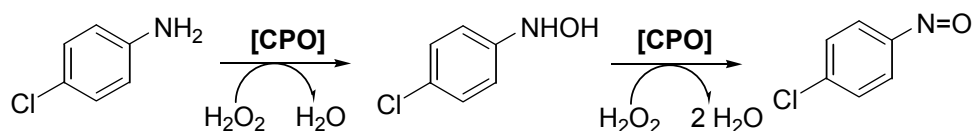
**Selektive Hydroxylierungsreaktionen**, wie sie durch Häm-Monoxygenasen katalysiert werden, werden im Allgemeinen nicht durch Peroxidasen katalysiert. Die einzige bisher bekannte Peroxidase, die die selektive Einführung von Sauerstoff in einer C-H-Bindung katalysiert, ist die CPO. Die Hydroxylierung katalysiert von der CPO wurde bisher nur an Aliphaten und an der Alkylseitenkette aromatischer Systeme, nicht aber direkt am aromatischen Ring, beobachtet [Miller 1995, Zaks 1995].

Die direkte **Oxidation von Indol zu Oxindol** ist schwierig, da die elektronenreiche 3-Position, die zum Indoxyl führt, bevorzugt ist. Mit der CPO gelingt die selektive Oxidation des Indols an der 2-Position [Corbett 1979, van Deurzen 1997-c].

Die Bedeutung optisch aktiver Epoxide ist sehr vielfältiger Natur. Sie finden Anwendung als chirale Intermediate in der asymmetrischen Synthese und/oder stellen selbst ein biologisch aktives Endprodukt dar. Die enantioselektive **Epoxidierung** an kurzkettigen Olefinen und Styrol wird durch die CPO katalysiert [Zaks 1995, van Deurzen 1996]. Andere Peroxidasen, wie HRP und Lactoperoxidase sind gegenüber Olefinen inaktiv [Geigert 1986]. Die Microperoxidase-11 oder Cytochrom c Peroxidase sind in der Lage Epoxidierungsreaktionen zu katalysieren, aber nur mit sehr niedrigen Ausbeuten und Enantioselektivitäten [Mashino 1990, Miller 1992].

Die **Oxidation organischer Sulfide** führen im besten Fall zu chiralen Sulfoxiden. Da die enantioselektive Sulfoxidation Gegenstand dieser Arbeit ist, soll an dieser Stelle auf Kapitel 3.4.3.2 verwiesen werden, in dem die Peroxidase-katalysierte Sulfoxidationsreaktionen ausführlich beschrieben werden.

So wie die Oxidation von Sulfiden wird auch **die Oxidation von Aminen** durch Peroxide katalysiert [Itoh 1993, Kirner 1994, Burd 1995]. Die *N*-Oxidation ist selektiv und wurde im Jahre 1979 erstmalig durch Corbett et al. an der CPO-katalysierten Oxidation von 4-Chloranilin zu 4-Chlornitrosbenzol (Abb. 3.14) publiziert [Corbett 1979].

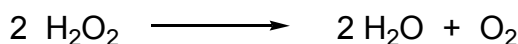


**Abb. 3.14. Die CPO-katalysierte Oxidation von 4-Chloranilin zu 4-Chlornitrosbenzol über die Bildung von 4-Chlorphenylhydroxylamin.**

Die CPO-katalysierte Oxidation von Arylaminen erfolgt über die Sauerstoffübertragung der Fe(V)-oxo-Spezies des Häms zur Bildung von Hydroxylaminen, die dann weiter über die CPO-katalysierte Dehydrierung zu den Nitrosoverbindungen oxidiert werden [Corbett 1983, Doerge 1991-a, -b]. Wurde für die Oxidation der Anilinderivate HRP als Biokatalysator verwendet, konnte ein Gemisch hochmolekularer farbiger Produkte erhalten werden [Saunders 1964, Corbett 1983]. Andererseits ist auch die HRP fähig Hydroxylaminverbindungen selektiv zu Nitrosoverbindungen zu katalysieren. Experimente mit  $\text{O}^{18}$ -markiertem Wasserstoffperoxid haben gezeigt, dass die HRP-katalysierte Oxidation von Everminomycin, ein *N*-haltiges Antibiotikum, selektiv ist [Kalliney 1995].

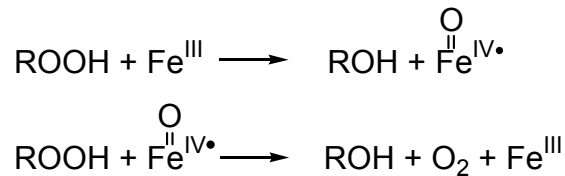
#### 3.2.4.4 Katalasetyp-Reaktion

Die Katalase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid (Abb. 3.15; e, Abb. 3.8). Eine Reihe von Peroxidasen besitzen die Fähigkeit diese Reaktion zu katalysieren. Die CPO besitzt eine ausgeprägte Katalasetyp-Nebenaktivität. Die enzymkatalysierte Zersetzung von Wasserstoffperoxid erfolgt nicht nur bei Abwesenheit eines Substrates, sondern wird auch bei einem Überangebot an Wasserstoffperoxid katalysiert [Sun 1994].



**Abb. 3.15. Die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid.**

Die Katalyse der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Disproportionierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst entsteht Compound I und in der Folgereaktion wird Wasserstoffperoxid durch Compound I zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16.** Die Disproportionierung von Hydroperoxiden (R = H oder Alkyl) in der Katalasetyp-Reaktion von Peroxiden.

### 3.2.5 Desaktivierung der Peroxide

Peroxidasen benötigen als Kosubstrat Peroxide, um in den nötigen Oxidationszustand (Compound I) zu gelangen, aus dem dann die Substratoxidation vermittelt werden kann. Die hohe Affinität des Häm-Zentrums zum Wasserstoffperoxid führt zu einer niedrigen Reaktionsstabilität der Peroxidase. Schon geringe Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30  $\mu\text{M}$  bei der CPO aus *Caldariomyces fumago*) können Desaktivierungsreaktionen einleiten. Die Halbwertszeit beträgt nur 38 min [Seelbach 1997-a]. Der genaue Mechanismus der Katalysatordesaktivierung ist noch nicht geklärt. Es sind jedoch drei unterschiedliche Mechanismen denkbar, die zur reversiblen oder irreversiblen Desaktivierung des katalytischen Zentrums führen können.

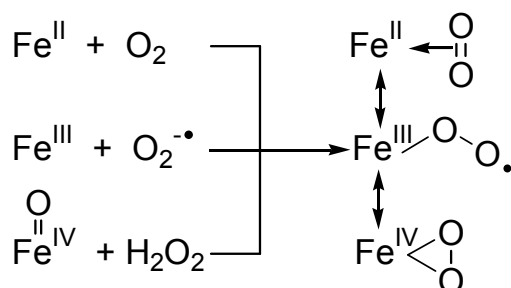
#### 3.2.5.1 Die Oxidation des Porphyrinringes

Die Oxidation des Porphyrinringes durch Peroxide und durch stark reaktive Sauerstofftypen wie Hydroperoxid- und Hydroxyradikale, die während des katalytischen Zyklus entstehen können, führt zur irreversiblen Zerstörung des Häms und letztendlich zur Freisetzung des Häm-Eisens. Bei der Freigabe des Eisens in die Reaktionslösung kommt es zur sofortigen Reaktion mit Wasserstoffperoxid, die auch als so genannte Fenton-Reaktion bekannt ist. Dabei werden erneut reaktive Hydroxylradikale freigesetzt [Valderrama 2002, van Deurzen 1997-a].

#### 3.2.5.2 Die Suizidreaktion

Die Peroxidasen können durch irreversible Inhibierungsreaktionen ihre Aktivität verlieren. Während der enzymkatalysierten Reaktion werden reaktive Intermediate erzeugt, die mit der Peroxidase kovalente Bindungen bilden. Ein Beispiel für die spezifische Suizid-Inaktivierung ist die kovalente Bindung von Resorcinderivaten an die Aminosäurereste der Lacto- oder der verwandten Thyreoperoxidase, die zur Enzymdesaktivierung führen [Divi 1994]. Die Meerrettichperoxidase wird während der Oxidation von Phenol inhibiert. Bei niedrigen Phenolkonzentrationen erfolgt die reversible Inhibierung über die Bildung der Compound III (s. Kapitel 3.2.5.3). Bei hohen Phenolkonzentrationen wird eine irreversible Suizidreaktion verursacht. Man nimmt an, dass Phenoxylradikale gebildet werden, die durch die Reaktion mit Sauerstoff hochreaktive Peroxyradikale bilden und so zur Zerstörung des Enzyms führen [Ma 1988, Baynton 1994].

#### 3.2.5.3 Die Bildung der Compound III



**Abb. 3.17.** Bildung der Compound III nach [van Deurzen 1996].

Ist das Oxidationsmittel im Überschuss vorhanden, kann es zur Addition von Sauerstoff an das Häm-Eisen kommen, wodurch ein inaktives Compound III-Intermediat entsteht [van de Velde 1999]. Compound III, auch Oxyperoxidase genannt, beteiligt sich nicht an dem katalytischen Zyklus und führt zur scheinbaren Enzymdesaktivierung. Es gibt verschiedene Wege, die zur Fe-O-O-Bildung führen:

- Ausgehend von Compound II (Fe(IV)=O) im katalytischen Zyklus (Abb. 3.8) kommt es zur Konkurrenzreaktion zwischen Wasserstoffperoxid und dem reduzierenden Substrat. Bei einer Umsetzung mit dem Oxidationsmittel führt das zur Bildung der hoch reaktiven Peroxy-Eisen(III)-Verbindung, die, wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, drei mesomere Strukturen annehmen kann [Nakajima 1985, Cai 1989].
- Die Reaktion von Hyperoxidanionradikalen ( $O_2^{\cdot-}$ ) mit dem nativen Enzym führt zur Bildung der Oxyperoxidase.
- Die reduzierte Form des nativen Enzyms wird durch molekularen Sauerstoff oxidiert [Chance 1984, Butler 1994].

Die Stabilität dieses reversiblen Zustandes ist dabei von der Peroxidase abhängig. Bei der CPO ist dieser Zustand sehr instabil, sobald kein Wasserstoffperoxid mehr zur Verfügung steht [Lambeir 1985]. Dagegen ist dieser Zustand bei der Ligninperoxidase noch Tage nach der Eliminierung des Wasserstoffperoxides stabil [Cai 1989].

Für die Regenerierung des nativen Enzyms sind drei unterschiedliche Wege möglich:

- Das Peroxylradikal oxidiert den Porphyrinring, was zum Abbau des Häms führt (s.o. Fenton-Reaktion, Kapitel 3.2.5.1).
- Compound III geht in den Grundzustand des Enzyms über, indem die Oxidation der Proteinumgebung oder eines anwesenden Substrates katalysiert wird.
- Im dritten Fall wird das Hyperoxidanionradikal freigesetzt, das dann die Proteinumgebung angreifen kann [Valderrama 2002, Grey 2008].

Ein kontinuierlicher Überschuss des Oxidationsmittels und die Abwesenheit eines reduzierenden Substrates führen zur irreversiblen Zerstörung des Enzyms. Grey et al. haben in ihren MS-MS-Untersuchungen die Unterschiede des nativen CPO-Proteins, des CPO-Proteins nach einer  $H_2O_2$ -Behandlung und des CPO-Proteins nach der  $H_2O_2$ -geführten Indolreaktion herausgestellt, die die oxidative Desaktivierung des katalytischen Zentrums unterstreichen [Grey 2007].

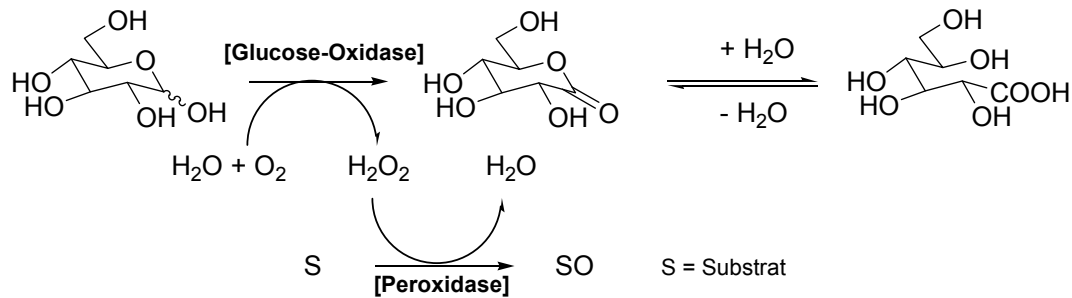
#### 3.2.5.4 Möglichkeiten zur Prävention der Enzym-Desaktivierung

Um die Einschränkung der Peroxidasen gegenüber dem Oxidationsmittel zu überwinden, haben sich verschiedene Verfahren etabliert, um  $H_2O_2$  konstant bei niedrigen Konzentrationen zu halten. Eine niedrige  $H_2O_2$ -Konzentration kann durch kontinuierliche Zugabe geringer Mengen des Oxidationsmittels erreicht werden. Das ist über die Pumpendosierung sehr gut möglich [Seelbach 1997-a, b]. Die Konzentration des Wasserstoffperoxids muss dabei in einem Größenbereich liegen, der die Bildung der Compound I ermöglicht, aber eine Peroxidase-katalysierte Zersetzung von Wasserstoffperoxid verhindert. Je nach Substratspezifität der Peroxidase sollte das Substrat im Überschuss vorhanden sein, so dass die Dosierung von Wasserstoffperoxid reaktionslimitierend wirkt.

Eine bessere Variante ist die  $H_2O_2$ -Zugabe über ein Sensor-Dosiersystem, mit dem eine konstante Wasserstoffperoxidkonzentration automatisch gehalten und kontrolliert wird [Seelbach 1997-a, b, van Deurzen 1997-b]. Der Erfolg dieser Methode spiegelt sich in der Erhöhung der Zyklenzahl (ttn) wieder. Für die CPO-katalysierte Oxidation von Indol zu Oxindol konnte die ttn um das 20-fache gesteigert werden [Seelbach 1997-b].

Eine weitere Möglichkeit bietet die *in situ* Erzeugung von Wasserstoffperoxid durch die Reduktion von Sauerstoff. Ermöglicht werden kann das durch die Verwendung eines Reduktionsmittels wie Ascorbinsäure (s. Kapitel 3.2.6) oder durch die Glucose-Oxidase-

katalysierte Oxidation von Glucose zu Gluconsäure [Neidlman 1981], bei der Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt anfällt (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18. Erzeugung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  über die Glucose-Oxidase-katalysierte Oxidation von Glucose.**

Mit Hilfe dieser Methode können kontinuierlich geringe Mengen Wasserstoffperoxid generiert werden. Über den Glucose-Umsatz wird die Wasserstoffperoxidbildung gesteuert. Van de Velde konnte zeigen, dass durch eine Co-Immobilisierung beider Enzyme in einem Polyurethan-Schaum die Halbwertszeit der Peroxidasen im Prozess verbessert werden konnte [van de Velde 2000-a]. Der Nachteil dieser Methode ist die Verwendung eines zweiten Enzym-Substrat-Systems, dass für die Bildung eines unerwünschten Nebenproduktes sorgt und somit keine Alternative für den Einsatz von Peroxiden in der industriellen Anwendung ist.

Eine alternative Möglichkeit der *in situ* Generation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte Laane 1986 mit der elektrochemischen Reduktion von Sauerstoff. Liese und Lütz adaptierten diesen Prozess auf die enantioselektive Sulfoxidation von Thioanisol, katalysiert durch die CPO [Laane 1986, Liese 2003, Lütz 2004, Kohlmann 2006].

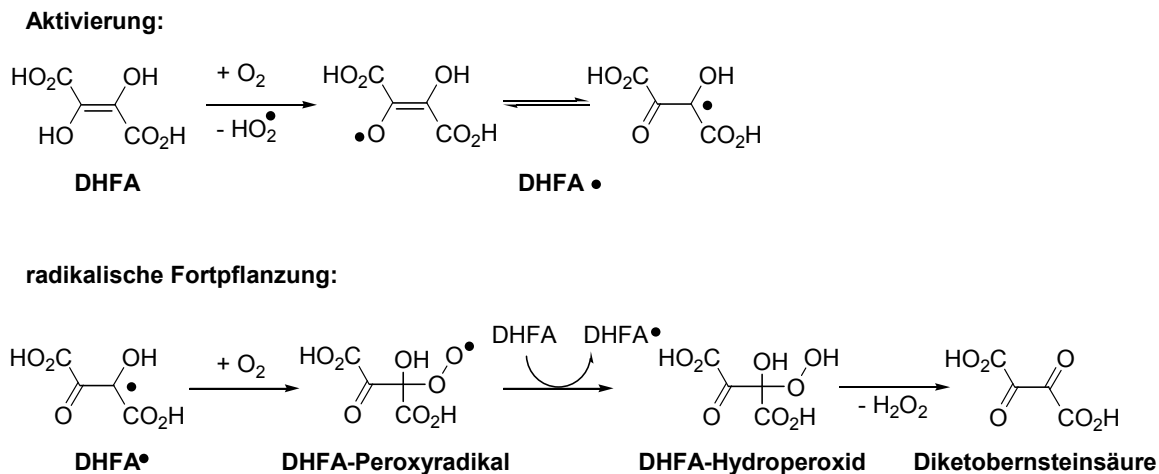
Durch die Verwendung anderer Peroxide wie *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) kann die Katalaseaktivität vermindert werden [Manoj 2001, Grey 2008].

Eine weitere Möglichkeit die Deaktivierung des aktiven Zentrums zu minimieren, ist der Zusatz von Radikalfängern [van de Velde 1999, Grey 2008].

### 3.2.6 Selektive Oxidation mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Reduktionsmitteln

Der Ersatz des Peroxids durch molekularen Sauerstoff in Gegenwart von Reduktionsmitteln verspricht in der Katalyse mit Peroxidasen zunächst die Nachteile, die durch die Oxidation mit Wasserstoffperoxid entstehen, eliminieren zu können. Als Reduktionsmittel werden Verbindungen mit Endiolgruppierungen, wie Dihydroxyfumarsäure (DHFA), Ascorbinsäure oder 1,2-Diphenylhydrazin eingesetzt. Die Peroxidasen scheinen in Gegenwart geeigneter Reduktionsmittel wie die Monooxygenase Sauerstoff als Oxidationsmittel zu verwenden zu können. Van de Velde hat jedoch zeigen können, dass die native CPO nicht wie die Monooxygenase von dem Reduktionsmittel reduziert wird. Wasserstoffperoxid wird, nach Van de Velde, *in situ* über die Autoxidation des Reduktionsmittels gebildet, das dann den katalytischen Zyklus der CPO initiiert. Lösungen von den oben genannten Reduktionsmitteln unterliegen einer rasanten Autoxidation, die durch molekularen Sauerstoff ausgelöst wird (Abb. 3.19) [Durliat 1992, Courteix 1995-a, -b, van de Velde 1999].

Durch die Aktivierung des Luftsauerstoffs werden ein protoniertes Hyperoxidanionradikal und ein Dihydroxyfumarsäureradikal freigesetzt, das unter einer weiteren Oxidation mit einem Sauerstoffmolekül zu einem Peroxyradikal reagiert.



**Abb. 3.19. Autoxidation von DHFA nach [van de Velde 1999].**

Durch Umsetzung mit einem Dihydroxyfumarsäuremolekül wird ein instabiles Hydroperoxid gebildet, das in die Diketobernsteinsäure und Wasserstoffperoxid zerfällt. Van de Velde et al. haben mit einem Titan(IV)-chlorid-Reagenz [Svehla 1996] Wasserstoffperoxid nachweisen können.

Durch bimolekulare Reaktionen zweier Hyperoxidanionradikale, die bei der Autoxidation von DHFA freigesetzt werden, entstehen Hydroxyradikale, die genau wie die Hyperoxidanionradikale die Selektivität der CPO-katalysierten Oxidation herabsetzen. Durch Radikalfänger wie Trolox-C<sup>TM</sup> (wasserlösliches Analogon von  $\alpha$ -Tocopherol) oder dem Zusatz von Superoxid-Dismutase<sup>a</sup> können unspezifische nicht katalysierte Nebenreaktionen vermindert werden [van de Velde 1999].

Anders als in der CPO-katalysierten Oxidation spielt die Autoxidation des Reduktionsmittels in der HRP-katalysierten Oxidation organischer Substrate scheinbar keine Rolle. Wasserstoffperoxid, das dabei *in situ* gebildet wird, kann von der HRP nicht genutzt werden, da das Enzym durch das Reduktionsmittel in die inaktive Compound III reduziert wurde [Dordick 1986, Schmall 1989, van de Velde 1999]. Durch die Oxidation des Reduktionsmittels werden protonierte Hyperoxidanionradikale frei, aus denen Hydroxyradikale hervorgehen. Die Hydroxylierungsreaktionen, die dann in Anwesenheit dieses Systems stattfinden, sind nicht enzymatischer Natur. Durch Zugabe von Superoxid-Dismutase wurden die Hydroxylierungsreaktionen in Anwesenheit der HRP gehemmt. Van de Velde konnte zeigen, dass die native CPO inert gegenüber den verwendeten Reduktionsmitteln ist [van de Velde 1999].

<sup>a</sup> Superoxid-Dismutasen (SOD) sind Enzyme, die Hyperoxide ( $\text{O}_2^-$ ) zu Wasserstoff und Sauerstoff umwandeln [Alscher 2002].



### 3.3 *Agrocybe aegerita* Peroxidase – eine neuartige Haloperoxidase

#### 3.3.1 Einleitung

In dieser Arbeit wird ein neuartiger Typ einer Peroxidase verwendet. Diese Peroxidase stammt aus einem Basidienspiz und wurde erst kürzlich als potentieller Biokatalysator für die regio- und enantioselektive Synthese entdeckt [Ullrich 2004]. Die bereits bekannten pilzlichen Peroxidasen stammen aus verwandten Vertretern wie den Schlauchpilzen (Ascomycota), zu denen viele Schimmel- und Hefepilze, aber auch essbare Pilze wie Morchel oder Trüffel gehören. Das bekannteste Beispiel ist die Chlorperoxidase aus dem Ascomyceten *Caldariomyces fumago*.

Der neue Typ der Peroxidase stammt aus dem Ständerpilz (Basidiomycota) Südlicher Ackerling (*Agrocybe aegerita*), der auch als Speisepilz bekannt ist (Abb. 3.20). Dieser Pilz produziert eine extrazelluläre Peroxidase (*Agrocybe aegerita* Peroxidase). Die Rolle des Enzyms in diesem Organismus ist bis momentan noch nicht geklärt, kann aber vielfältiger Natur sein.



**Abb. 3.20. Der Südliche Ackerling (*Agrocybe aegerita*).**

Die *Agrocybe aegerita* Peroxidase hat eine molekulare Masse von 46 kDa. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem nicht gereinigten Kulturextrakt der Fermentationslösung gearbeitet. Hofrichter et al. haben eine Methode für die Reinigung (u.a. Ultrafiltration, Ionenaustausch-Chromatographie und FPLC) des Enzyms entwickelt, um das aktive Enzymprotein von dem Fermentationsmedium zu trennen. Es wurden zwei Enzymfraktionen erhalten (*AaP* I und *AaP* II), die eine um das 50-fache gesteigerte spezifische Enzymaktivität, verglichen zum Kulturextrakt, aufweisen [Ullrich 2004].

#### 3.3.2 Das Substratspektrum

Hofrichter et al. haben in ihren Untersuchungen mit der aufgereinigten *AaP* II zeigen können, dass das Enzym ein sehr breites Substratspektrum besitzt. So zählen u.a. Phenol, Toluol, Naphtalen, Pyridinderivate, ABTS, Arylalkohole und –aldehyde sowie Halogene (Chlorid und Bromid) zu den Substraten der *Agrocybe aegerita* Peroxidase. In Tabelle 3.3 sind die Substratspezifitäten einiger ausgewählter Substrate dargestellt. Auch die Katalaseaktivität wurde beobachtet (Abb. 3.21 a) [Ullrich 2004, 2005, 2007, 2008, Hofrichter 2006, Kluge 2007, 2009, Kinne 2008, Aranda 2009].

Das Besondere der *AaP* gegenüber der CPO ist, dass die neuartige Peroxidase nicht nur die Oxidation von Arylalkoholen in die korrespondierenden Säuren (Abb. 3.21 c), sondern auch die Oxidation am aromatischen Ring katalysiert (Abb. 3.21 d). Die CPO ist fähig die Oxidation der Methylgruppe des *p*-Xylols zur korrespondierenden Säure zu katalysieren [Morgan 2002], nicht aber die Hydroxylierung des aromatischen Ringes. Die CPO-katalysierte Oxidation des Benzaldehyds zur Benzoesäure ist jedoch weniger stark ausgeprägt wie in der *AaP*-katalysierten Oxidation [Bacocchi 1999, Hofrichter 2006].

Neben der Hydroxylierung des aromatischen Ringes am Toluol haben Hofrichter et al. auch die *AaP*-katalysierte Hydroxylierung von Naphthalin zeigen können. Die Oxidation zu 1-Naphthol wurde nahezu regioselectiv katalysiert. 2-Naphthol entstand in Spuren (Abb.

3.21 e) [Ullrich 2005]. Hofrichter et al. konnten zeigen, dass das primäre Produkt der *AaP*-katalysierten Oxidation von Naphthalin vermutlich das Epoxidintermediat Naphtalin-1,2-oxid ist, dass im Alkalischen relativ stabil ist und im leicht Säuren in das Hauptprodukt 1-Naphthol (90-97 %) und das Nebenprodukt 2-Naphtol (3-10 %) zerfällt [Kluge 2009]. Eine wichtige Anwendung des Hydroxylierungspotentials der *AaP* konnte kürzlich in der regio- und enantioselektiven (*ee*-Wert 60 %) *AaP*-katalysierten Hydroxylierung von 2-Phenoxypropionsäure zu (*R*)-2-(4-Hydroxyphenoxy)propionsäure, was als Vorstufe in der Herbizidsynthese eingesetzt wird, gezeigt werden [Kinne 2008].

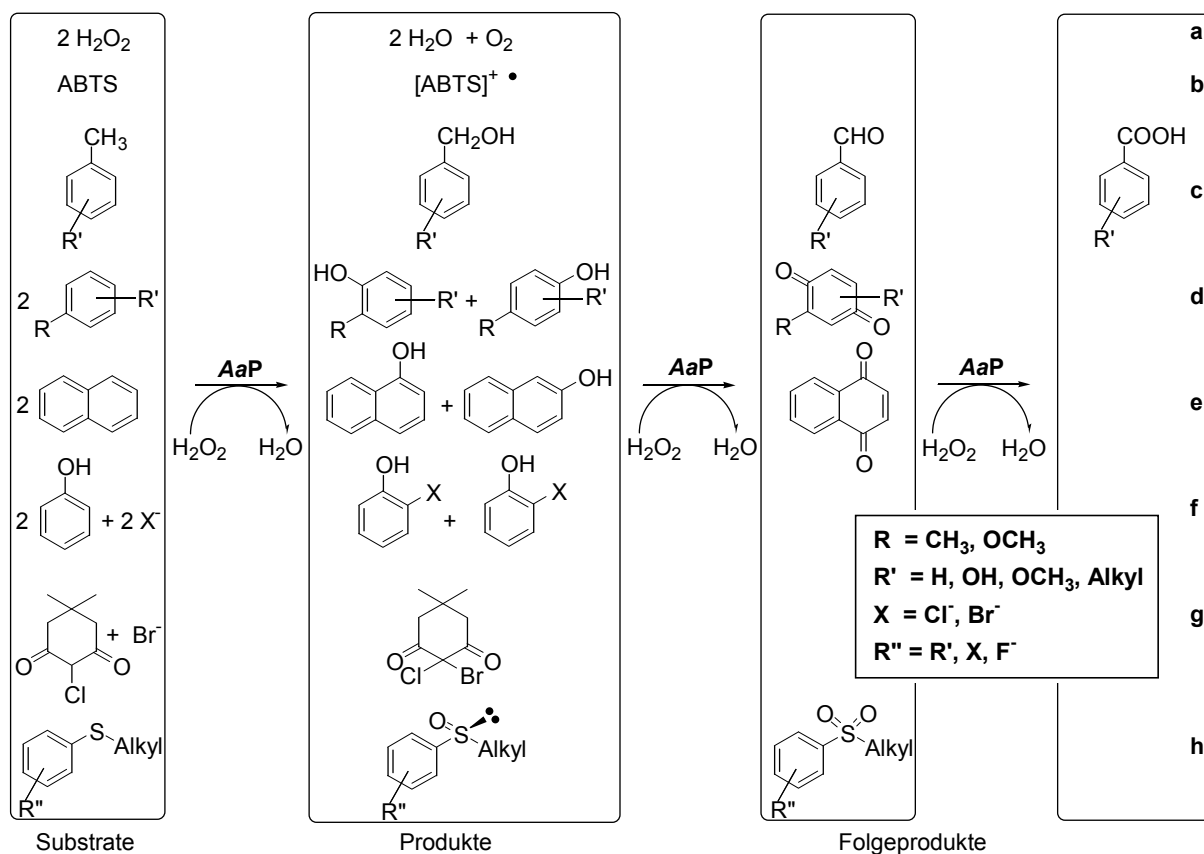


Abb. 3.21. Ausgewählte Substrate der *AaP* [Ullrich 2004].

Die *AaP* besitzt wie die CPO die Fähigkeit, die Halogenierung von Monochlordimedon (Abb. 3.21 g) und die Oxidation anderer typischer CPO-Substrate wie ABTS (Abb. 3.21 b) oder 2,6-Dimethoxyphenol zu katalysieren. Es ist bekannt, dass auch andere Peroxidasen aus Basidiomyceten (Lignin-Peroxidase und Mangan-Peroxidase) die Bromierung von Monochlordimedon katalysieren, aber die Chlorierung, so wie es die CPO vermittelt, wurde bisher noch nicht beobachtet [Farhangrazi 1997, Sheng 1997]. Im Gegensatz zur CPO besitzt die *AaP* ein starkes Potential Bromierungsreaktionen zu katalysieren. So katalysiert die *AaP* die oxidative Bromierung von Phenol zu 2- und 4-Bromphenol im Verhältnis 1:4 (Abb. 3.21 f) und auch die Bromierung von Monochlordimedon (Abb. 3.21 g). Die Katalyse der oxidativen Chlorierung von Phenol mit der *AaP* ist zwar auch möglich, jedoch mit einer 10000-fach geringeren Aktivität als die Bromierung [Hofrichter 2006].

Des Weiteren katalysiert die *AaP* die Oxidation von Heteroatomen, wie das Stickstoffatom in Pyridinderivaten zum N-Oxid [Ullrich 2008] und das Schwefelatom in aromatischen Sulfiden zum Sulfoxid und Sulfon. Kürzlich führten Hofrichter et al. Untersuchungen zu der *AaP*-katalysierten Oxidation von Dibenzothiophen durch, die sowohl zur Sulfoxid- und Sulfonbildung als auch zur Hydroxylierung des aromatischen Ringes führte [Aranda 2009]. Insbesondere die enantioselektive Sulfoxidation (Abb. 3.21 h) gehört zu den Enzymaktivitäten der

*Agrocybe aegerita* Peroxidase. Die enantioselektive Sauerstoffinsertionsreaktion an aromatischen Sulfiden ist Gegenstand dieser Arbeit.

**Tab. 3.3. Kinetische Parameter in der *AaP*-katalysierten Oxidation unterschiedlicher Substrate [Ullrich 2004, 2008, Kluge 2009].**

Substrat	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
ABTS	37	283	$7,67\cdot 10^6$
Naphthalin	320	166	$5,17\cdot 10^5$
2,6-Dimethoxyphenol	298	108	$3,61\cdot 10^5$
Benzylalkohol	1001	269	$2,69\cdot 10^5$
Veratrylalkohol	2367	85	$3,58\cdot 10^4$
Pyridin	69	0,21	$3,04\cdot 10^3$

### 3.3.3 Einordnung der *Agrocybe aegerita* Peroxidase

Die katalytischen und auch spektroskopischen Eigenschaften der *AaP* decken sich mit denen der CPO und der Cytochrom P450 Monooxygenase. Die *AaP* scheint ein Bindeglied zwischen den beiden Häm-Thiolat-Enzymen zu sein.

Der Grad der Übereinstimmung der N-Terminus in der Peptidsequenz anderer Peroxidasen, die ebenfalls aus Basidiomyceten isoliert wurden, ist sehr gering ( $\leq 7\%$ ). Mit der CPO aus *C. fumago* wurden dagegen 35 % Übereinstimmung in der Peptidsequenz gefunden [Ullrich 2004]. Mit dem Cytochrom P450 CYP55A2, eine Monooxygenase aus *Cylindracarpon tonkinense*, wurden 21 % Identität festgestellt [Ullrich 2005].

In der Aminosäuresequenz besitzt die *AaP* Ähnlichkeiten zur CPO und ist in der Lage ähnliche Substrate, wie die Chlorierung von Monochlordimedon zu katalysieren. Grundlegende Unterschiede zur CPO sind allerdings im UV-Vis-Spektrum, im pH-Wert-Verhalten, im Substratspektrum und in der Reaktionsselektivität zu finden.

In den spektralen Eigenschaften besitzt die *AaP* große Ähnlichkeit zu Cytochrom P450 und unterscheidet sich damit von der CPO [Hofrichter 2006]. Im UV-Vis-Spektrum besitzt die native *AaP* das Maximum bei 420 nm (Soret-Bande<sup>b</sup>) und weist weitere Absorptionsbanden bei 359, 540 und 572 nm auf [Ullrich 2004, Ullrich 2005], die mit den Absorptionsmaxima der nativen CPO (496, 515, 542 und 650 nm [Palcic 1980]) nicht vergleichbar sind, aber mit denen der Compound II der CPO (358, 438, 542, 571 nm) [Dunford 1999-c, Hager 1966]. Die Soret-Bande der nativen Cytochrom P450<sub>LM2</sub> liegt wie bei der *AaP* bei 420 nm und auch die weiteren Banden im Spektrum sind mit denen der nativen *AaP* fast identisch (361, 535 und 569 nm) [White 1982]. Die Soret-Bande des Häm-Komplexes mit Kohlenmonoxid befindet sich bei der *AaP* und CPO in einem Bereich um 445 nm und ähnelt damit der Bande des Cytochrom P450 [Ullrich 2004, 2005, Hofrichter 2006]. Diese charakteristische Absorption ist ein eindeutiges Indiz für den proximalen Cystein-Liganden am Häm-Zentrum [Lewis 2001].

Die CPO ist in einem pH-Bereich zwischen 3 und 5 aktiv. Die *AaP* ist zwischen pH 2,5 und 9 aktiv. Das pH-Optimum für die Katalyse der Sauerstoffinsertionsreaktion liegt für die meisten Substrate der *AaP* im neutralen pH-Bereich zwischen pH 6,8 und 7,2 [Ullrich 2004]. Das pH-Optimum für die Bromierung von Phenol liegt wie bei der CPO bei pH 3 [Ullrich 2005].

Hofrichter et al. haben bewiesen, dass die *AaP* keine Oxygenase-Aktivität besitzt, was bedeutet, dass der Sauerstoff aus der Luft nicht mit Hilfe des Redoxsystems

<sup>b</sup> Soret-Bande, ist die Bande mit der höchsten Absorptionsintensität im sichtbaren Bereich der Absorptionsspektren von Porphyrinen.

NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> auf ein Substrat übertragen wird. Auch unter aeroben Bedingungen findet die *AaP*-katalysierte Oxidation des aromatischen Ringes mit Wasserstoffperoxid statt [Ullrich 2005]. Diese Reaktion ähnelt dem so genannten „peroxidase shunt“, eine Nebenaktivität von einigen P450-Enzymen, die unter aeroben Bedingungen Wasserstoffperoxid als Sauerstoffquelle nutzen können. Diese Enzyme werden daher auch als Peroxygenasen bezeichnet [Salazar 2003].

Die CPO ist zwar dafür bekannt typische Monooxygenase-Reaktionen zu katalysieren, aber die *AaP* besitzt ein größeres Vermögen solche Reaktionen zu katalysieren. Das Katalyseverhalten der *AaP* in der Oxidation von Toluol zeigt große Ähnlichkeit zu dem der Cytochrom P450-Enzyme [Ullrich 2005, Nakajima 1997]. So entsteht in der *AaP*-katalysierten Oxidation von Toluol mit Wasserstoffperoxid neben Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoesäure auch 1,2- und 1,4-Hydroxytoluol und 4-Methylbenzochinon. Die CPO katalysiert die Oxidation der Methylgruppe des *p*-Xylols zum Alkohol, Aldehyd und auch zur Carbonsäure. Die Oxidation am aromatischen Ring wird jedoch nicht katalysiert [Morgan 2002].

Die *Agroclybe aegerita* Peroxidase ist eine Häm-Thiolat-Peroxidase, die neben den typischen Peroxidase-Reaktionen, wie die Katalyse von Halogenen, auch die Hydroxylierung von nicht aktivierten aromatischen Systemen katalysiert, was zu den typischen Monooxygenase-Aktivitäten zählt. Auch die Oxidation des Pyridin-Stickstoffatoms ist ein weiterer Hinweis für eine Verwandtschaft bzw. Gemeinsamkeit mit den Monooxygenasen. Neben der *AaP* sind laut [Ullrich 2008] nur zwei andere Enzymtypen fähig diese Stickstoffoxidation zu katalysieren. Dabei handelt es sich um Monooxygenasen, die Methan Monooxygenase und einige P450 Monooxygenasen [Colby 1977, Damani 1982].

Die *AaP* benötigt im Gegensatz zu den Monooxygenasen kein Kofaktorsystem (NAD(P)H) und ist ein extrazelluläres Enzym. Sie gehört in die Klasse der Oxidoreduktasen und nutzt Peroxide als Elektronenakzeptor und katalysiert neben den typischen Peroxidase-Reaktionen auch Sauerstoffinsertionsreaktion, wie die CPO (EC 1.11.1.10). Aufgrund des erweiterten und ungewöhnlichen Substratspektrums, scheint die neuartige Peroxidase eine neue Sub-Klasse zu repräsentieren (EC 1.11.1.x) [Ullrich 2008]. Momentan ist die *AaP* in den katalytischen und spektralen Eigenschaften zwischen der Chlorperoxidase und den Cytochrom P450-Enzymen einzuordnen und verspricht damit ein vielfältiger Biokatalysator zu sein.

### 3.4 Chirale Sulfoxide

#### 3.4.1 Einleitung

Chirale Sulfoxide haben sich zu wichtigen Schlüsselverbindungen in der organischen Synthese entwickelt. Sie finden Anwendungen als Auxiliare in der chiralen Synthese, als synthetische Intermediate biologisch und chemisch aktiver Moleküle und sie dienen selbst als Wirkstoff.

Mit der ersten präparativen Darstellung enantiomerenreiner *p*-Tolyl-substituierter Sulfoxide [Solladié 1981], die als hochwirksame Auxiliare eingesetzt werden, expandierte das Interesse in der Darstellung und Anwendung dieser Verbindungsklasse. Aus der großen Aufmerksamkeit der chiralen Sulfoxidverbindungen gingen zahlreiche Übersichtsartikel hervor, die die vielen Herstellungsverfahren und Anwendungsgebiete enantiomerenreiner Sulfoxide zusammenfassen, u.a. [Barbachyn 1984, Andersen 1988, Posner 1988, Carreno 1995, Fernández 2003, Kaczorowska 2005].

Die hohe Wirksamkeit der Sulfoxide als Überträger chiraler Informationen liegt hauptsächlich darin begründet, dass die Substituenten des dreifach koordinierten Schwefels sich sterisch und stereochemisch stark unterscheiden (Abb. 3.22). Ein freies Elektronenpaar, ein Sauerstoffatom und die beiden unterschiedlichen Alkyl- oder Arylreste sorgen für eine hohe stereochemische Differenzierung.

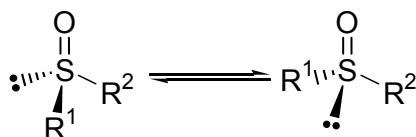


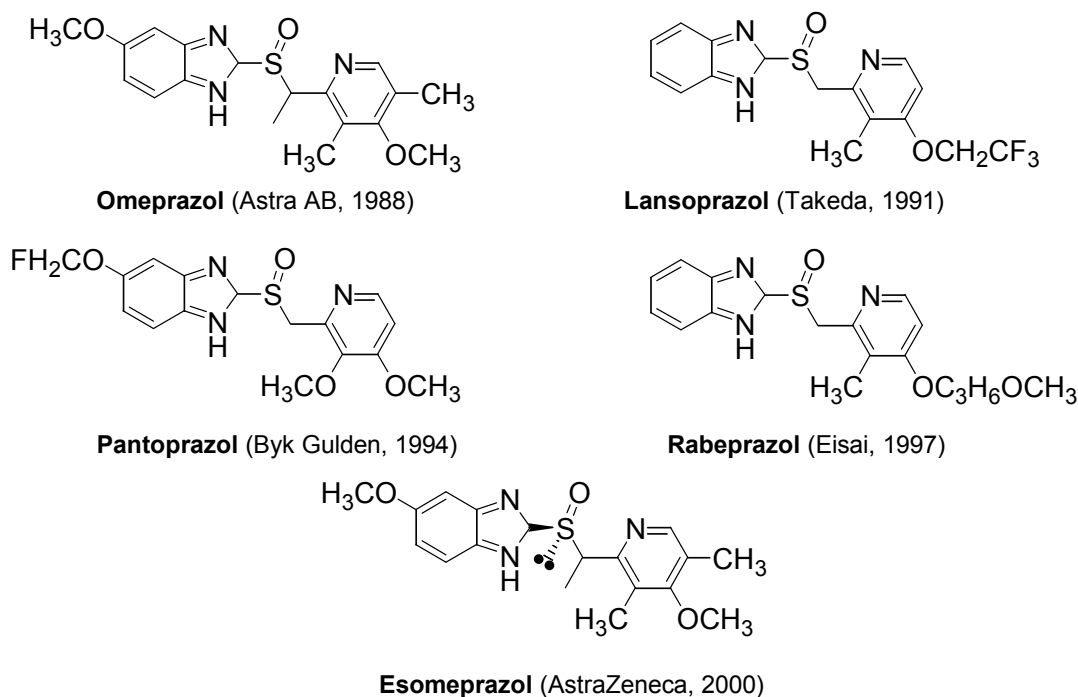
Abb. 3.22. Chirales Zentrum der pyramidalen Sulfinylverbindungen.

Die stark polarisierte S=O-Doppelbindung, mit einer positiven Nettoladung am Schwefelatom, ermöglicht, dass bei diastereoselektiven Reaktionen weiche Lewisäuren (z.B. Pd<sup>2+</sup>) am freien Elektronenpaar und harte Lewisäuren (z.B. Cu<sup>2+</sup>) an dem Sauerstoffatom koordinieren können [Kagan 1992]. Ein weiterer Vorteil enantiomerenreiner Sulfoxide gegenüber anderen chiralen Verbindungen ist die hohe optische Stabilität. Die thermische Stereomutation der Sulfoxide erfolgt erst bei relativ hohen Temperaturen ab 200 °C [Rayner 1968, Mislow 1984].

Einer der prominentesten Vertreter biologisch aktiver Sulfoxide ist der Wirkstoff Omeprazol (Abb. 3.23). Unter dem Namen Antra<sup>®</sup> (D) oder Prilosec<sup>®</sup> (USA) wurde dieses Medikament 1988 durch das schwedische Pharmaunternehmen Astra AB (seit 1999 der schwedisch-britische Pharmakonzern AstraZeneca) auf dem Markt gebracht.

Omeprazol ist das erste Medikament, das die Protonenpumpe H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in den Belegzellen im Magen hemmt und somit die Bildung von Magensäure verringert. Diese neuen Pharmaka, die als Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI) wirken, werden in der Therapie von der Refluxkrankheit, von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren und von Infektionen, die durch *Helicobacter pylori* hervorgerufen werden, eingesetzt [Agranat 2002].

Im Jahr 2000 war Omeprazol das weltweit am meisten verkaufte Arzneimittel und erzielte einen Gewinn von 6,2 Milliarden US \$ [Renfrey 2002]. Der enorme Erfolg des Arzneimittels führte dazu, dass eine Reihe anderer Unternehmen ihre eigenen PPI hervorbrachten, die alle auf der Grundstruktur der Sulfinyl-substituierten Benzimidazole basieren [Wehring 1996]. In Abbildung 3.23 sind einige kommerziell erhältlichen Vertreter dargestellt.

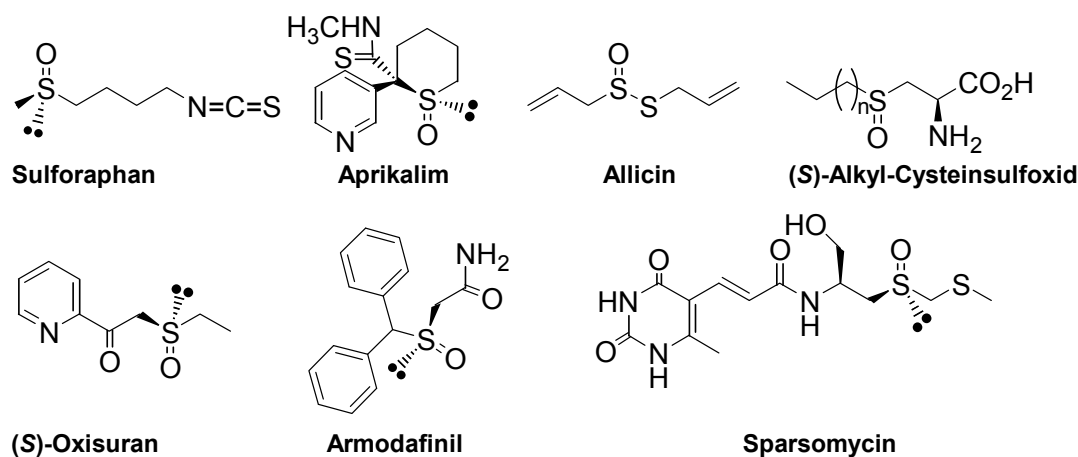


**Abb. 3.23. Sulfinyl-substituierte Benzimidazole in der Anwendung als Protonenpumpenhemmer (PPI).**

Nachdem für Omeprazol im Jahr 1999 das Patent in Europa auslief, brachte AstraZeneca ein Jahr später das (*S*)-Omeprazol (Esomeprazol) unter dem Handelsnamen Nexium<sup>®</sup> auf den Markt. Esomeprazol wird unter einem anderen Metabolisierungsmechanismus in der Niere abgebaut und erreicht dadurch eine höhere Verfügbarkeit, was indirekt zu einer Verstärkung in der Wirkung führt [Kale-Pradham 2002, Agranat 2002].

Das Vorhandensein einer Sulfoxidgruppe in einem Molekül bedingt günstige Eigenschaften für Pharmaka. Die hohe Polarität der Sulfinylgruppe erhöht die Wasserlöslichkeit und somit die Bioverfügbarkeit.

In der Abbildung 3.24 sind weitere biologisch aktive Sulfoxide dargestellt. Darunter befinden sich auch natürlich vorkommende Vertreter wie Sulforaphan, Allicin und die (*S*)-Alkyl-Cysteinsulfoxide [Fernández 2003]. Sulforaphan ein Isothiocyanat, das als Senföl bekannt ist, entsteht bei der enzymatischen Hydrolyse des Senfölglykosids Glucophanin, das in Broccoli und Rettich vorkommt. Der gleiche Mechanismus, der die Pflanzen vor Fraßfeinden schützen soll, findet auch in Lauchgewächsen wie Knoblauch statt.



**Abb. 3.24. Biologisch aktive Sulfoxidverbindungen.**

Alliin, ein geruchsloses (*S*)-Alkyl-Cysteinsulfoxid, kommt in Lauchgewächsen natürlich vor und wird bei Verletzung der Pflanze durch das Enzym Alliin-Lyase in Allylsulfensäure und Dehydroalanin gespalten. Zwei Allylsulfensäuremoleküle bilden unter Wasserabspaltung das geruchsintensive Allicin. Da beide sekundären Pflanzenstoffe keimtötende und zytotoxische Wirkung besitzen, werden sie als Antibiotika oder, wie Sulforaphan, erfolgreich in der Krebstherapie [Brown 1992] eingesetzt. Der Einsatz von Allicin als Tumor bekämpfendes Mittel steht noch in der Testphase.

(*S*)-Alkyl-Cysteinsulfoxide sind wichtige Vorstufen nichtflüchtiger Aromastoffe und werden als Duftstoffe eingesetzt [Kubec 2000, Kyung 1997]. Aprikalim wird als Kaliumagonist in der Behandlung von Bluthochdruck verwendet [Aloup 1990]. Das von dem Pharma-Unternehmen Cephalon entwickelte und 2007 in den USA zugelassene Psychostimulans Armodafinil ist das (*R*)-Enantiomer des Wirkstoffes Modafinil. Aus heutiger Sicht unterscheiden sich beide Wirkstoffe nur in der Pharmakokinetik [Darwish 2008]. Das (*S*)-Oxisuran ist ein Immunsuppressivum [Farrell 1990] und Sparsomycin ist ein Krebstherapeutikum [Ortega 1990].

### 3.4.2 Anwendung chiraler Sulfoxide in der asymmetrischen Synthese

Das Anwendungsfeld chiraler Sulfoxide ist sehr breit. Es existieren zahlreiche Reaktionen, die sich der chiralen Information der Sulfoxidgruppe bedienen. So werden die verschiedensten C-C-Knüpfungen [Solladié 1983, Hua 1996], asymmetrischen Reduktionen [Solladié 1995], Michael-Additionen [Posner 1988], Diels-Alder Reaktionen [Arai 1993, Ruano 1999], Cycloadditionen [Posner 1988] und Umlagerungen mit der chiralen Gruppierung durchgeführt [Kita 1994].

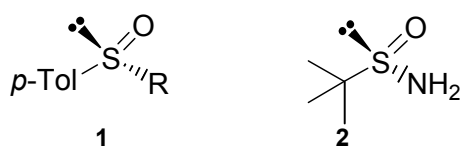


Abb. 3.25. Häufig verwendete chirale Sulfoxidauxiliare.

Trotz vielfältiger Darstellungsmethoden substituierter Sulfoxide, haben sich als Auxiliar nur zwei Vertreter durchgesetzt. Zum einen das (*R*)-(+)-Methyl-*p*-tolyl-sulfoxid **1**, sowie das enantiomerenreine *tert*-Butansulfamid **2** (Abb. 3.25).

An den folgenden Beispielen sollen einige Anwendungen kurz vorgestellt werden.

#### 3.4.2.1 Die Reaktion von $\alpha$ -Carbanionen des Sulfoxids mit Elektrophilen

In dem Carbanion **4** fungiert die Methylengruppe in der direkten Nachbarschaft zur Sulfoxidgruppe als Nukleophil (Abb. 3.26).

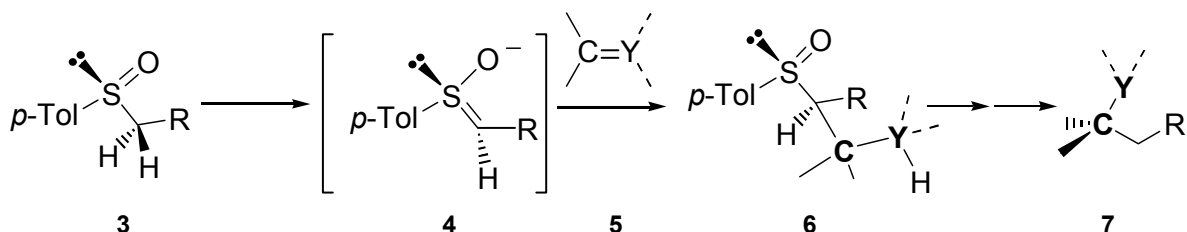


Abb. 3.26. Schematische Darstellung der Reaktion eines Carbanions mit einem Elektrophil.

Als Elektrophil **5** kommen verschiedene Verbindungen in Frage. Je nach dem organischen Rest des Sulfoxidauxiliars **3** und des verwendeten Elektrophils **5** können eine Reihe chiraler Produkte **7** synthetisiert werden. So ist es möglich Carbonylverbindungen als Elektrophil zu

verwenden, um asymmetrische  $\beta$ -Hydroxysäuren [Mioskowski 1980] zu erhalten oder Imine, um  $\beta$ -Aminoester zu erhalten [Shimizu 1994].

Des Weiteren können chirale Säuren, Ester, Aldehyde, Ketone und Amide durch die Verwendung des chiralen Disulfoxid *trans*-1,3-Dithian-1,3-dioxid hergestellt werden [Aggarwal 1991, 1992, 1994].

#### 3.4.2.2 Michael-Addition an Vinylsulfoxiden

Eine *p*-Tolylsulfinylgruppe, die an einer Doppelbindung gebunden ist, erhöht als elektronenziehender Substituent die Reaktivität der Doppelbindung. Somit ist es möglich enantiomerenreine Sulfoxidgruppen als chirales Pendant der Carbonylfunktion in Michael-Additionen zu nutzen [Posner 1983, 1987, Hiroi 1994]. Bei dieser Reaktion stellt das vinyloge Sulfoxid das Elektrophil dar. Mit Hilfe der 1,2-ungesättigten Sulfoxide werden u.a. C-C-Knüpfungsreaktionen ermöglicht, bei denen die chirale Information des Sulfoxids übertragen wird. Ein Beispiel für diese Anwendung ist die Synthese von (*R*)-(+)- und (-)-Sedamin, ein blutdrucksenkendes Piperidinalkaloid [Pyne 1990].

#### 3.4.2.3 Die Synthese chiraler Alkohole durch Reduktion von $\beta$ -Ketosulfoxiden

Die häufigste Anwendung chiraler Sulfoxide ist die Synthese chiraler Alkohole. Das  $\beta$ -Ketosulfoxid **9** wird durch einfache Umsetzung des (*R*)-(+)-Methyl-*p*-tolyl-sulfoxids **1** mit einem Ester **8** erhalten (Abb. 3.27).

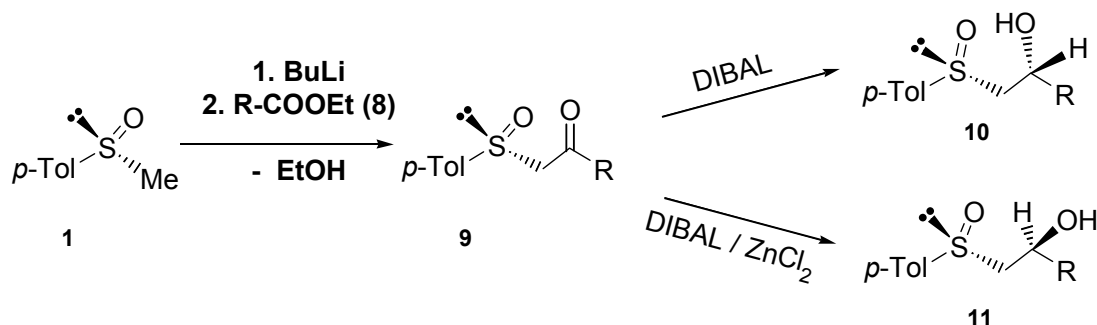


Abb. 3.27. Synthese chiraler Alkohole durch Reduktion von  $\beta$ -Ketosulfoxiden.

Durch Reduktion des  $\beta$ -Ketosulfoxids mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) in An- bzw. Abwesenheit von Zinkchlorid können die entsprechenden enantiomerenreinen Alkohole **10** und **11** erhalten werden [Carreno 1990, Barros 1992].

Je nach Typ des verwendeten Esters **8** und der Art der Abspaltung der Sulfoxidgruppe, lassen sich eine große Palette optisch aktiver Alkohole, cyclische allylische Ester oder Epoxide synthetisieren [Solladié 1985-a, -b, 1994-a, -b, Ruano 1991, Butlin 1996].



### 3.4.3 Darstellung chiraler Sulfoxide

In dieser Arbeit wird nur eine Auswahl an Darstellungsmethoden vorgestellt. Die Verfahren, um enantiomerenreine Sulfoxide zu erhalten, unterscheiden sich darin, auf welchem Weg die chirale Information übertragen wird. Folgende Einteilung der Herstellungsverfahren ist möglich:

- Racemattrennung
- Asymmetrische Oxidation
- Substitutionsreaktionen

Die enantioselective Oxidation prochiraler Sulfide ist die direkteste und ökonomischste Methode zur Synthese enantiomerenreiner Sulfoxide.

#### 3.4.3.1 Chemische Methoden zur Darstellung chiraler Sulfoxide

##### Die asymmetrische Oxidation mit chiralen Oxidationsmitteln

Eine Methode in der Darstellung chiraler Sulfoxide ist die Verwendung stöchiometrischer Mengen **chiraler Oxaziridine** [Davis 1992]. Sie dienen als chiraler Sauerstoffüberträger und geben mit ihrer enantioselectiven Umgebung die Konfiguration des entstehenden Sulfoxides vor.

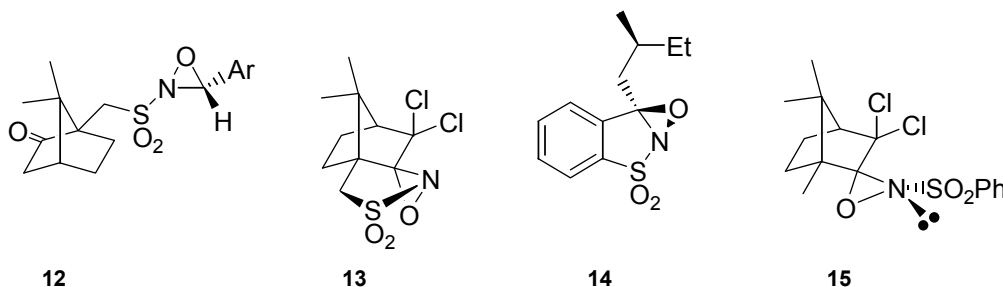


Abb. 3.28. Unterschiedliche chirale Oxaziridine.

In der Abbildung 3.28 sind vier Typen chiraler Davis Oxaziridine **12-15** dargestellt.

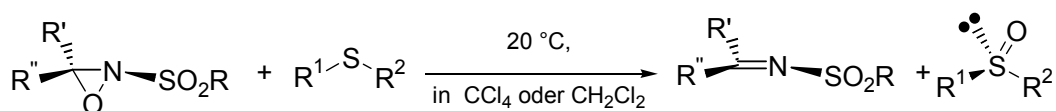


Abb. 3.29. Chirale Oxaziridine als Oxidationsmittel in der enantioselectiven Synthese von Sulfoxiden.

Der verbrückte Sauerstoff wird bei der Umsetzung mit einem Äquivalent Oxaziridin auf das Sulfid übertragen (Abb. 3.29). Die sterisch dirigierenden Sauerstoffüberträger erzeugen den besten Enantiomerenüberschuss (ee-Wert > 90 %), je unterschiedlicher die Reste  $R^1$  und  $R^2$  sind. Das Imin, das als Nebenprodukt anfällt, kann nach der Reaktion isoliert werden und mit  $H_2O_2$  wieder in das entsprechende Oxaziridin überführt werden. So werden Zyklenzahlen bis zu 10 erhalten. Die Oxidation mit chiralen Oxaziridinen ist bisher nur auf die Darstellung optisch aktiver Alkylarylsulfoxide mit ausreichend hoher Enantioselectivität anwendbar. Die chirale Induktion auf Dialkylsulfide ist nur sehr schwach oder liegt gar nicht vor [Fernández 2003].

1997 wurden erstmals **optisch aktive Hydroperoxide** als enantioselective Sauerstoffüberträger in der Oxidation prochiraler Sulfide eingesetzt. Diese Methode erreicht bisher nur einen mäßigen Enantiomerenüberschuss (ee-Wert = 25 %). Die chiralen Hydroperoxide werden aus der Umsetzung von Methylglycosiden [Hamann 1997] mit Wasserstoffperoxid

oder aus der HRP-katalysierten Oxidation zu entsprechenden Hydroperoxiden, z.B. (*S*)-Phenylethylhydroperoxid [Adam 1998], erhalten.

### Die asymmetrische Sulfoxidation mit einem chiralen Katalysator

Das erste Beispiel der asymmetrischen Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden wurde 1984 unabhängig voneinander von Kagan [Pitchen 1984] und Modena [Di Furia 1984] entwickelt, indem sie eine modifizierte Form des **Sharpless-Katalysators** einsetzten.

Der Sharpless-Katalysator wurde für die enantioselektive Darstellung von Epoxiden aus prochiralen Allylalkoholen entwickelt [Katsuki 1980] und setzt sich aus Titan(IV)-isopropylat ( $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ ) und enantiomerenreinen Weinsäurediethylether (DET: Diethyltaträt) zusammen. Die Konfiguration des Tatrates bestimmt die Konfiguration des entstehenden chiralen Produktes. Als Epoxidierungsreagenz werden Hydroperoxide verwendet.

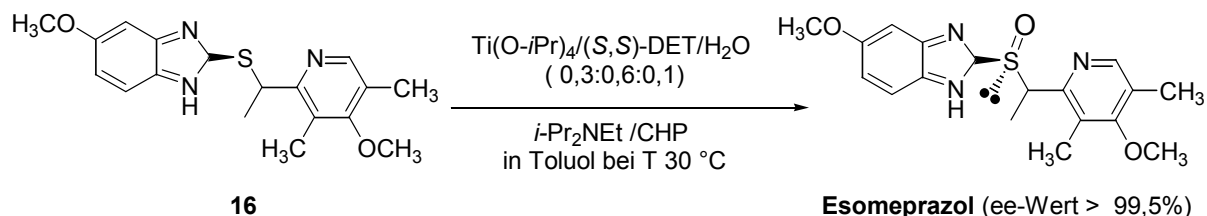
Kagan et al. fanden heraus, dass im Gegensatz zur Sharpless-Epoxidierung das Vorhandensein von Wasser notwendig ist, um prochirale Sulfide mithilfe von TBHP in Anwesenheit von  $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$  und DET enantioselektiv zu Sulfoxiden in Dichlormethan bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  zu oxidieren. Anfangs wurde der Titankomplex im stöchiometrischen Verhältnis zu den Sulfiden gegeben:  $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4/(R,R)\text{-DET}/\text{H}_2\text{O}$  (1:2:1). Es wurde ein höherer Enantiomerenüberschuss in der Oxidation von Alkylarylsulfiden (ee-Wert: 74 - 90 %) erreicht als in der Oxidation von Dialkylsulfiden (ee-Wert: 35 - 64 %) [Pitchen 1984].

Weitere Optimierungen wie der Ersatz des TBHP durch Cumolhydroperoxid (CHP) und der Einsatz von Molekularsieben führte zur Selektivitätssteigerung und vor allem zur Reduzierung der Titankomplex-Menge [Zhao 1987, Zhao 1989].

Modena et al. erreichten mit ihren modifizierten Sharpless-Katalysator ähnliche Selektivitäten in der asymmetrischen Oxidation von prochiralen Sulfiden wie die Gruppe um Kagan. Die Zusammensetzung von TBHP/ $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4/(R,R)\text{-DET}$  wurde im Verhältnis 1:1:4 gewählt [Di Furia 1984, Bortolini 1988].

Sehr gute Selektivitäten (ee-Wert: 75 - 95 %) erreichten Kagan et al. durch eine Kombination des Kagan- und Modena-Systems mit einer neuen Katalysatorzusammensetzung  $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4/(R,R)\text{-DET}/i\text{-PrOH}$  im Verhältnis von 1:4:4 und unter Anwesenheit von Molsieben. Als Oxidationsmittel wurde CHP verwendet [Brunel 1996].

Im industriellen Maßstab wird diese auf Titan und Taträt basierende Methode in der asymmetrischen Oxidation von dem Sulfid **16** (AstraZeneca) für die Produktion von **Esomeprazol** genutzt (Abb. 3.30) [Cotton 2000].

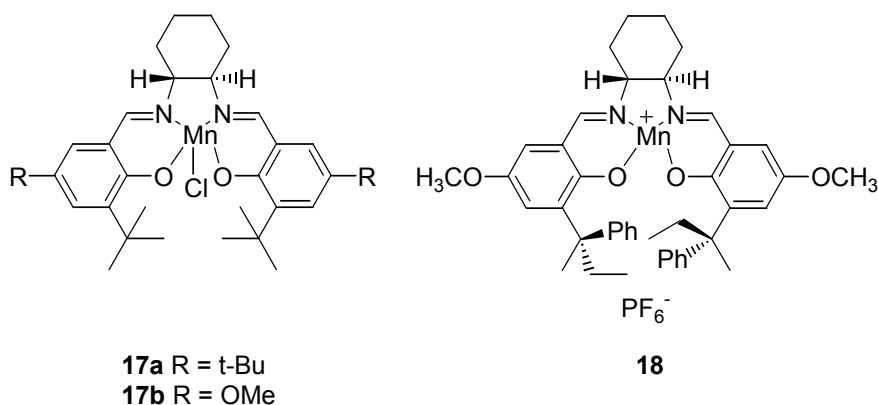


**Abb. 3.30. Die asymmetrische Oxidation des Sulfids 16 mit Cumolhydroperoxid zu Esomeprazol.**

Die Anwesenheit von *N,N*-Diisopropylamin (*i*-Pr<sub>2</sub>NEt) ist dabei für eine hohe Enantioselektivität wichtig. Nach der Kristallisation kann mit einer Ausbeute von 92 % ein enantiomerenreines Produkt erhalten werden [Fernández 2003].

Eine andere Methode der katalytischen asymmetrischen Oxidation wird durch die Anwesenheit der optisch aktiven (**Salen**)-**Mn(III)-Komplexe** erreicht. Sie werden erfolgreich in der

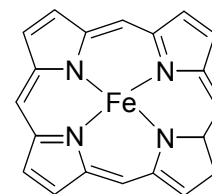
Epoxidierung von Olefinen eingesetzt. Jacobsen und Katsuki haben dieses System auch für die enantioselective Oxidation prochiraler Sulfide verwendet. Jacobsen erhielt mit der Verwendung von 2 mol % des chiralen Salen-Mn(III)-Komplexes **17 a** (Abb. 3.31) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Oxidationsmittel nur unterdurchschnittliche Enantioselectivitäten (ee-Wert: 42 %) in der Oxidation von Alkylarylsulfiden [Palucki 1992]. Der Ersatz der *tert*-Butylgruppen an den Liganden durch elektronenreiche Methoxy-Substituenten **17 b** (Abb. 3.31) erhöhte den Enantiomerenüberschuss auf 47 %. Katsuki entwickelte einen verbesserten (Salen)-Mn(III)-Komplex **18** (Abb. 3.31) und verwendete zudem Phenyliodat als Oxidationsmittel und erreichte Enantioselectivitäten bis 90 % [Noda 1994].



**Abb. 3.31. (Salen)Mn(III)-Katalysatoren von Jacobsen und Katsuki.**

Strukturell weisen die (Salen)-Katalysatoren Ähnlichkeiten zum Porphyrinring (Abb. 3.32) auf, das Eisen als 4-fach koordiniertes Metallatom in einem delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystem besitzt.

**Metallkatalysatoren mit Phorphyrin** als Ligand sind den Hämhaltigen Oxidoreduktasen nachempfunden und variieren durch die verschiedensten Modifikationen am Liganden. An Stelle des Eisens [Natura 1991, Groves 1990] werden auch andere Zentralatome eingesetzt, wie z.B. Mangan [Haltermann 1991]. Diese Arten von Katalysatoren können mit dem Vorbild aus der Natur in der Regio- und Enantioselectivität allerdings nicht mithalten.



**Abb. 3.32. Porphyrin-gerüst.**

#### Sulfoxidsynthese mittels Substitutionsreaktion

Die einfachste und älteste Methode, um enantiomerenreine Sulfoxide zu erhalten ist die 1962 gefundene **Andersen-Methode** [Andersen 1962]. In Anlehnung an die Grignard-Reaktion entwickelte Andersen die Synthese optisch aktiver Sulfoxide durch die nukleophile Substitution optisch aktiver Sulfonsäureester **21** mit Organomagnesiumhalogenid-Verbindungen **23** als nukleophiles Reagenz (Abb. 3.33).

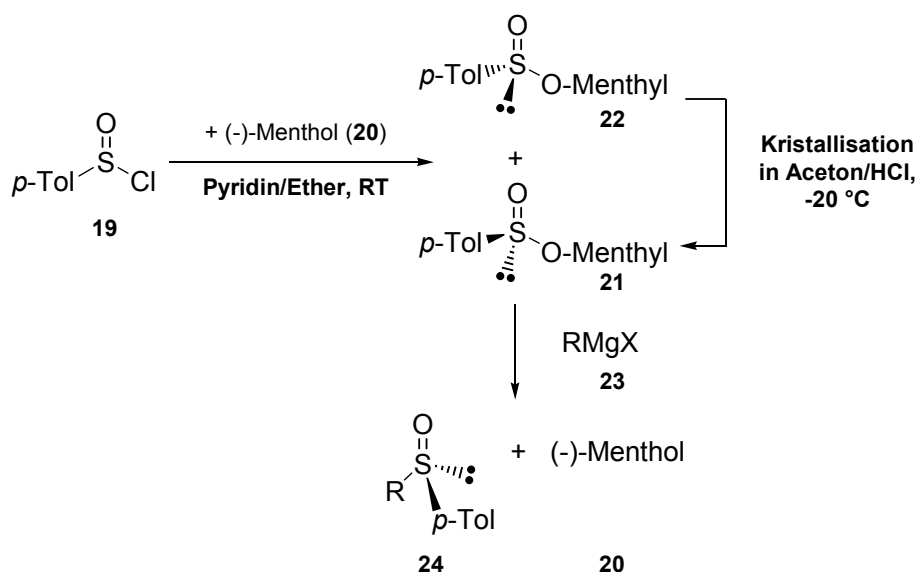


Abb. 3.33. Andersen-Methode zur Synthese chiraler Sulfoxide [Fernández 2003].

Während der Substitutionsreaktion unterliegt der Sulfonsäureester einer totalen Inversion der Absolutkonfiguration am Schwefelatom.

Die Veresterung des Chlor-*p*-tolylsulfoxids **19** mit einem chiralen Alkohol **20** ist nicht stereoselektiv. Durch Kristallisation kann der enantiomerenreine Sulfonester **21** erhalten werden [Solladié 1987].

Die Andersen-Methode kann zur Synthese einer großen Palette enantiomerenreiner Sulfoxide herangezogen werden [Drabowicz 1988], ist aber nicht geeignet für die Synthese optisch aktiver Dialkylsulfoxide. Die Nachfrage optisch aktiver Sulfoxide mit bedarfsgerechter Struktur führte zu vielen Weiterentwicklungen der nukleophilen Substitution diastereomerenreiner Sulfoxidierungsreagenzien basierend auf der Andersen-Methode [Fernández 2003].

### 3.4.3.2 Enzym-katalysierte Sulfoxidation

Anfang der 80er Jahre im 20. Jahrhundert wurden von Walsh et al. [Light 1982] die ersten isolierten Enzyme in der Oxidation prochiraler Sulfide verwendet. Es wurden FAD-abhängige Monooxygenasen aus Schweineleber in der Synthese von (*R*)-Ethyl-*p*-Tolylsulfoxid (ee-Wert 90 %) verwendet und flavinhaltige Cyclohexanon Monooxygenasen (CMO) aus *Acinetobacter*, die die Bildung des (*S*)-Enantiomers mit 64 % im Überschuss katalysierte.

In den Jahren 1992 – 1996 beschäftigte sich die Gruppe um Colonna [Carrera 1992, Colonna 1995-a, 1996, Ottolina 1995] intensiv mit der CMO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion und erreichten hohe Enantioselektivitäten, insbesondere für die Produkte der Alkylarylsulfide.

Mit der Chlorperoxidase (CPO) aus dem Ascomyceten *Caldariomyces fumago* wurde 1987 von Kobayashi die erste Peroxidase in der enantioselektiven Sulfoxidationsreaktion eingesetzt [Kobayashi 1987]. Die Enantioselektivität war mit einem ee-Wert von 13 % in der CPO-katalysierten Oxidation von 4-Methylthioanisol zunächst noch nicht zufrieden stellend, was unter anderem durch die zu hohe Konzentration des Wasserstoffperoxids verursacht wurde. Colonna et al. untersuchten die CPO-katalysierte Sulfoxidation ausführlicher und erzielten Verbesserungen im Umsatz und in dem Enantiomerenüberschuss des resultierenden Produktes [Colonna 1990, 1992-a]. Wasserstoffperoxid stellte sich als bestes Oxidationsmittel in der CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion heraus, aber die Selektivitäten, die in der CMO-katalysierten Oxidation mit molekularem Sauerstoff erreicht wurden, konnten nicht erhalten werden. Die unspezifische Oxidation der Sulfide mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Verunreinigungen wie Spuren

von Metalloxiden und Halogenidionen führten zu racemischen Produkten, was vermindert auf die Enantioselektivität wirkt [Drabowicz 1988, Pasta 1994]. Sheldon et al. durchbrachen mit ihren Arbeiten 1997 diese Barriere und führten die CPO-katalysierte Reaktion in einem *tert*-Butanol/Puffer-Gemisch (50:50 v/v) durch. Die spontane Oxidation wurde unterdrückt und ein Enantiomerenüberschuss > 99 % konnte erreicht werden [van Deurzen 1997-a]. Über die sensor kontrollierte Wasserstoffperoxid dosierung konnte die Zyklenzahl von 45.000 auf 150.000 gesteigert werden [Seelbach 1997-a].

Fu et al. nutzten die Möglichkeit die CPO-katalysierte enantioselektive Sulfoxidation mit der Umsetzung racemischer Peroxide zu verknüpfen [Fu 1992]. So wurden neben den nahezu enantiomerenreinen Sulfoxiden (ee-Werte: 97 – 99 %) auch optisch aktive Alkohole und Alkylarylhydroperoxide erhalten (ee-Werte > 89 %). An diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass die CPO auch die kinetische Isomerentrennung racemischer Peroxide katalysiert.

Häm-Peroxidasen, die die enantioselektive Sulfoxidation aromatischer Sulfide katalysieren sind die Meerrettichperoxidase (HRP, [engl.]: horseradish peroxidase) [Doerge 1986, Colonna 1992-b, Ozaki 1995, Galzigna 1996], die Cytochrom c Peroxidase (CcP) [Miller 1992], Microperoxidase-11 (MP-11) [Colonna 1994], die Lactoperoxidase (LPO) [Doerge 1986, 1991-a, -b, Colonna 1995-b].

**Tab. 3.4. Vergleich verschiedener Häm-Peroxidasen in der Sulfoxidation von Thioanisol [van Deurzen 1996].**

Enzym	Ausbeute, %	ee-Wert, %	ttn	Referenz
CPO	100	99 ( <i>R</i> )	150000	[Seelbach-1997a]
HRP	95	46 ( <i>S</i> )	29	[Colonna 1992-b]
LPO	40	52 ( <i>R</i> )	57	[Colonna 1995-b]
CcP	k.A.	2 ( <i>S</i> )	< 300	[Miller 1992]
MP-11	45	20 ( <i>S</i> )	3	[Colonna 1994]

Die CPO erzielt unter den Häm-Peroxidasen die beste Ausbeute, die höchste Enantioselektivität und die größte Zyklenzahl in der Oxidation von Thioanisol. Die anderen Peroxidasen sind weniger geeignet. Grund dafür sind Unterschiede in der Umgebung des aktiven Zentrums, die die Zugänglichkeit des Substrates zum Häm-Zentrum erschweren, so dass eine direkte Sauerstoffübertragung erschwert ist. Der Nachteil der CPO gegenüber anderen Peroxidasen ist, dass die CPO sich lange Zeit gegen alle Versuche der heterologen Expression gewährt hat. Dadurch wurde eine Enzymoptimierung mit Hilfe der Genmanipulation verzögert. 2001 gelang Sheldon et al. die erfolgreiche Expression in *Aspergillus niger* [Conesa 2001]. Durch zielgerichtete Mutagenese einiger Peroxidasen, insbesondere der HRP, konnte Einfluss auf die Enzymaktivität und Enantioselektivität genommen werden [Miller 1992, Ozaki 1995, Newmyer 1995, Savenkova 1998]. Die Ergebnisse, die in der CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion erzielt werden, konnten jedoch nicht erreicht werden.

Ein Vertreter der vanadathaltigen Peroxidasen, die die Sulfoxidation katalysieren können, ist die Bromperoxidase aus der Alge *Corollina officinalis* [Andersson 1997],

Die meisten Oxygenasen katalysieren die Sulfidoxidation, jedoch ist die Enantioselektivität oder der Umsatz sehr oft niedrig [Wong 1994, Lee 1995]. Secundo et al. zeigte, dass auch eine Bayer-Villiger-Monooxygenase (BVMO) die Synthese chiraler Sulfoxide (ee-Wert: > 99 %) katalysiert [Secundo 1993]. Die neuartigen BVMO Phenylacetone Monooxygenase (PAMO) aus *T. fusca* und 4-Hydroxyacetophenon Monooxygenase (HAPMO) aus *P. fluorescences* katalysieren die Sulfoxidation einer Reihe von aromatischen Sulfiden in hoher Enantioselektivität (ee-Wert > 95 %), hauptsächlich in der (*S*)-Konfiguration [de Gonzalo 2005, 2006]. Die Oxidation der Sulfoxide wird ebenfalls katalysiert. Im Unterschied zur PAMO- wird in der HAPMO-katalysierten Sulfoxidation der Enantiomerenüberschuss nur

aus der asymmetrischen Oxidation der Ausgangsstoffe erhalten. In der PAMO-katalysierten Sulfoxidation trägt die enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung der Sulfoxide zusätzlich zum Enantiomerenüberschuss bei.

Eine aus den Sojabohnen stammende Häm-abhängige Oxidoreduktase katalysiert die Sulfoxidation von 4-Methylthioanisol mit einem Überschuss an (*S*)-Enantiomer (ee-Wert: 90 %) und nutzt dafür Cumolhydroperoxid oder ungesättigte Alkylhydroperoxide als Oxidationsmittel [Blée 1989].

Die Hydrolase Phytase katalysiert in Gegenwart von Vanadat-Ionen und Wasserstoffperoxid Thioanisolderivate zu (*S*)-Sulfoxiden (ee-Werte bis zu 65 %) [van de Velde 2000-b].

#### 3.4.3.3 Mikrobielle Oxidationen in der Synthese optisch aktiver Sulfoxide

Der große Vorteil in der Verwendung ganzer Zellen ist, dass man den Aufwand und die Kosten der Enzymisolierung umgeht und keine teuren Kofaktoren benötigt.

Für die fermentative Umsetzung von Sulfiden zu Sulfoxiden werden Pilze, Hefen und Bakterien eingesetzt [Holland 1988, 2001]. Trotz der guten Enantioselektivitäten, die erhalten werden, ist die Anwendung der mikrobiellen Oxidation im industriellen Maßstab eher weniger geeignet. Es sind wässrige Medien und lange Reaktionszeiten nötig, so dass die Raum-Zeit-Ausbeuten niedrig sind. Eine weitere Folge der langen Reaktionszeiten sind schlechte Ausbeuten, da eine Weiteroxidation nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 3.5 zeigt eine kleine Auswahl mikrobieller Systeme in der asymmetrischen Sulfoxidation.

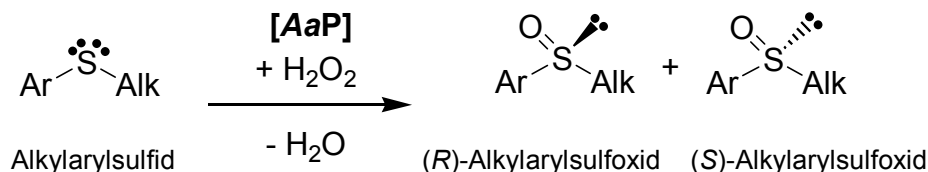
**Tab. 3.5. Asymmetrische Oxidation von Sulfiden durch Ganz-Zell-Biokatalyse.**

Mikroorganismus	Substrat R <sup>1</sup> -S-R <sup>2</sup>	ee-Wert, %	Konfi- guration	Quelle
<i>Corynebacterium equi</i>	Ferrocenyl-S- <i>t</i> -Bu	> 95	( <i>R</i> )	[Yamazaki 1996]
<i>Pseudomonas putida</i>	Dithiane, Dithiolane	> 97	( <i>R</i> )	[Cashman 1992]
<i>Helminthosporium sp.</i>	Me-S- Bu-NCS	86	( <i>S</i> )	[Holland 1995]
<i>Sacch. cerevisiae</i>	Thiafettsäuren	> 96	( <i>R</i> )	[Buist 1992]
<i>Beauvaria caledonica</i>	Methionin	90	( <i>S</i> )	[Holland 1999]

## 4 Ergebnisse

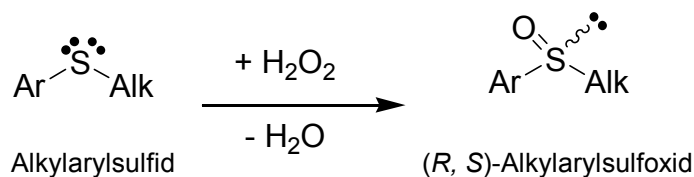
### 4.1 Einleitung

Die *Agrocybe aegerita* Peroxidase (*AaP*) katalysiert die Oxidation aromatischer Sulfide zu chiralen aromatischen Sulfoxiden (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1. Die *AaP*-katalysierte enantioselektive Sulfoxidation aromatischer Sulfide mit Wasserstoffperoxid zu Alkylarylsulfoxiden.**

Bei der *AaP*-katalysierten Umsetzung von Alkylarylsulfiden entsteht das (*R*)-Alkylarylsulfoxid im Überschuss. Der Grad des Enantiomerenüberschusses setzt sich aus dem Verhältnis der enzymkatalysierten und der nicht katalysierten Sulfoxidation zusammen. Eine spontane Oxidation von einem Alkylarylsulfid, die simultan zur katalysierten Oxidation abläuft, führt zu racemischem Produkt und verringert somit den Enantiomerenüberschuss. Alkylarylsulfide werden durch Peroxide spontan oxidiert (Abb. 4.2). Diese Oxidation verläuft unter den Bedingungen der Enzymkatalyse (1 mM Thioanisol,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ , pH 6,8) jedoch mehr als das 50-fache langsamer als die enzymkatalysierte Reaktion (s. Kapitel 4.2.1).



**Abb. 4.2. Die spontane Oxidation aromatischer Sulfide.**

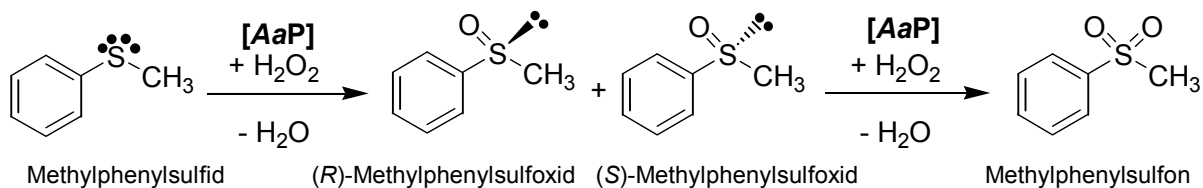
Wird durch die spontane Oxidation der aromatischen Sulfide die Enantioselektivität der Reaktion vermindert, muss durch eine optimierte Prozessführung der nicht katalysierte Anteil gehemmt werden.

Aber auch aus der natürlichen Enantioselektivität des Enzyms resultieren nicht ausschließlich enantiomerenreine Produkte. Im Idealfall führt die asymmetrische Synthese eines Enzyms zu einem Enantiomerenüberschuss größer als 99 %. Ausschlaggebend für eine hohe Enantioselektivität des Enzyms ist, wie stark die chirale Umgebung des aktiven Zentrums zwischen den beiden prochiralen Substraten unterscheiden kann. Je größer der Unterschied der Spezifitätskonstanten von *pro*-(*R*) und *pro*-(*S*), desto größer ist die Enantioselektivität eines Enzyms.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es eine Reaktionsführung zu finden, die zu einer hohen Enantioselektivität bei zugleich möglichst hohen Umsatzgeschwindigkeiten führt.

## 4.2 Die AaP-katalysierte Sulfoxidation

Methylphenylsulfid (Thioanisol) wurde als Modells substrat ausgewählt.



**Abb. 4.3. Die AaP-katalysierte Sulfoxidation von Methylphenylsulfid mit Wasserstoffperoxid.**

Methylphenylsulfid wird durch die Aa-Peroxidase mit Wasserstoffperoxid enantioselectiv zum Methylphenylsulfoxid oxidiert. Das (R)-Enantiomer entsteht dabei im Überschuss. Daneben entstehen geringe Mengen des (S)-Enantiomers, die den ee-Wert erniedrigen, und es entsteht Methylphenylsulfon als Folgeprodukt (s. Kapitel 4.2.2). Das Sulfoxid wird weiter zum Sulfon oxidiert (Abb. 4.3). Im Gegensatz zur CPO aus *C. fumago* katalysiert die neuartige Haloperoxidase diese Weiteroxidation.

In den hier beschriebenen enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen kam die *Agrocybe aegerita* Peroxidase als nicht aufgearbeitetes Rohextrakt aus dem Fermentationsprozess [Ullrich 2004] zum direkten Einsatz. Vergleichende Versuche in der Umsetzung von 5 mM Thioanisol mit einem gereinigtem Enzympräparat und dem Lyophilisat zeigten, dass die in der Fermentationslösung enthaltenen Ionen und Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Spezifität und Selektivität ausübten. Mit dem gereinigten AaP-Präparat konnte keine herausragende Verbesserung in der Enantioselectivität der AaP und in der Umsatzgeschwindigkeit beobachtet werden (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1. Der Vergleich der gereinigten AaP mit dem nicht gereinigten AaP-Lyophilisat in der Umsetzung von 5 mM Thioanisol nach 5,5 h Reaktionszeit (M 7.5 c, e).**

Enzymcharge	[AaP], nM	U, %	ee-Wert, %
AaP-2006	360	48	84
AaP II (2007)	220	56	85
AaP II (2007)	435	56	85

Das gereinigte AaP-Präparat wurde von der Gruppe um Hofrichter et al. nach [Ullrich 2004] angefertigt. Enzymspezifische Daten zu der gereinigten AaP II sind unter Kapitel 7.3.2.1 zu finden.

### 4.2.1 Der Einfluss der spontanen Oxidation auf den Enantiomerenüberschuss

Die Entstehung des (S)-Enantiomers verringert den Enantiomerenüberschuss. Um den Anteil des Produktes aus der nicht katalysierten Oxidation abzuschätzen, wurden die Ausbeuten an (S)-Enantiomer, dass unter den gleichen Bedingungen in der enzymkatalysierten und in der nicht katalysierten Reaktion entstanden ist, miteinander verglichen (Tab. 4.2). Die Ausbeute aus der spontanen Oxidation entspricht im Durchschnitt nur 2 % der Ausbeute des (S)-Enantiomers aus der katalysierten Reaktion. Würde man den Anteil des racemischen Produktes aus der nicht katalysierten Oxidation von dem Produkt aus der katalysierten Reaktion abziehen, erhält man theoretisch die natürliche Enantioselectivität der AaP. Die natürliche Enantioselectivität des Enzyms liegt demzufolge bei 86,6 %.



**Tab. 4.2. Die Ausbeuten des (*S*)-Enantiomers aus der spontanen Oxidation und der enzymkatalysierten Oxidation (360 nM AaP) von Thioanisol unter identischen Reaktionsbedingungen (M 7.5 a, f).**

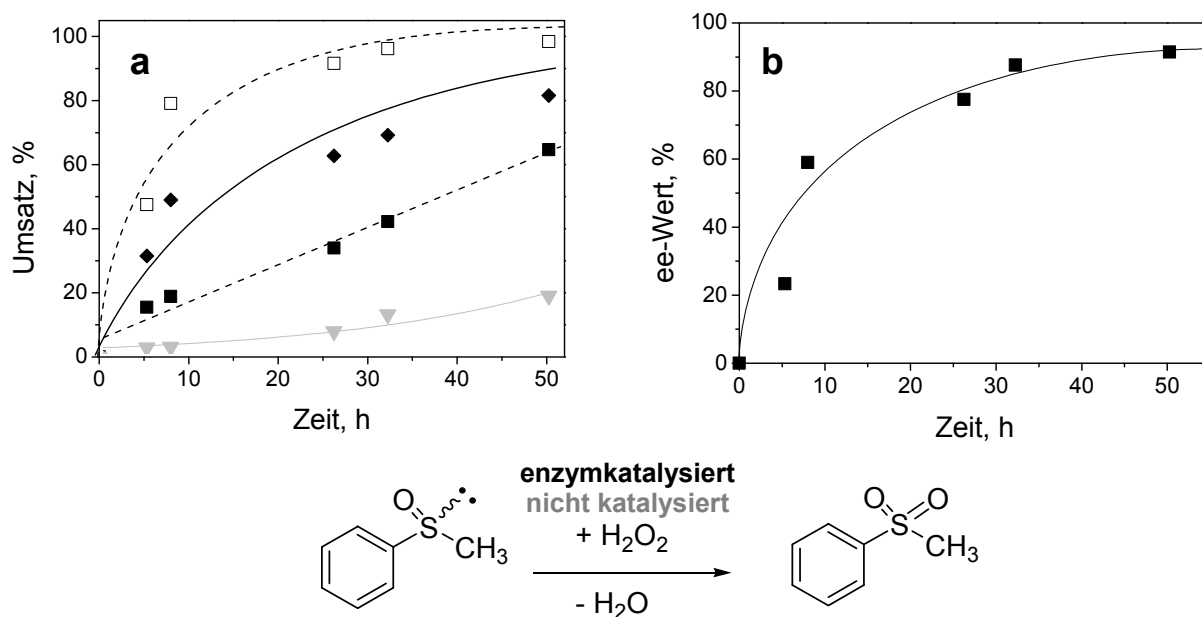
Zeit, h	Ausbeute des ( <i>S</i> )-Produktes, %		ee-Wert, %	
	<i>nicht katalysiert</i>	<i>katalysiert</i>	<i>bestimmt</i>	<i>theoretisch</i>
2,5	0,04	1,45	84,6	87,8
3,5	0,05	3,00	83,4	85,8
4,5	0,08	4,36	83,7	86,3

Es konnte gezeigt werden, dass die spontane Oxidation, die Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss haben kann, im Vergleich zur enzymkatalysierten Sulfoxidation sehr langsam abläuft. Es ist daher davon auszugehen, dass diese spontane Oxidation, die im Hintergrund der Enzymreaktion abläuft, keinen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss hat, da sie vollständig durch die Enzymaktivität unterdrückt wird. Das Oxidationsmittel wird reaktionslimitierend zur enzymkatalysierten Thioanisoloxidation dosiert, damit es nicht zu einer Enzymdesaktivierung kommt. Wasserstoffperoxid wird sofort von dem Enzym eingefangen und steht einer möglichen spontanen Oxidation nicht zur Verfügung. Die nicht katalysierte Sulfoxidation kann unter diesen Bedingungen nicht stattfinden. Der Enantiomerenüberschuss von ~ 84 %, der in der enzymkatalysierten Sulfoxidation von Thioanisol bestimmt wurde, entspricht demzufolge der natürlichen Enantioselektivität des Enzyms (Tab. 4.2). Bei einer Überdosierung von Wasserstoffperoxid wird das Oxidationsmittel von der AaP katalytisch zersetzt, so dass es für eine nicht katalysierte Oxidation nicht verfügbar ist. Diese Katalasereaktion, die zur enzymkatalysierten Disproportionierung des Oxidationsmittels führt, wurde unter 4.4.1.3 ausführlich dargestellt. Erst wenn das Enzym irreversibel deaktiviert wird, hat die spontane Oxidation Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss.

#### 4.2.2 Die AaP-katalysierte Oxidation zum Sulfon

Die Oxidation aromatischer Sulfide, die durch die *Agrocybe aegerita* Peroxidase katalysiert wird, ist nach der Oxidation zum Sulfoxid nicht wie bei der CPO-katalysierte Sulfoxidation abgeschlossen. Mit Ausnahme der Oxidation des Dimethylsulfoxids zum Dimethylsulfon gibt es keine Beispiele dafür, dass die CPO die Oxidation zum Sulfon katalysiert [Geigert 1983-a]. Die aus dem Basidiomyceten stammende *Agrocybe aegerita* Peroxidase katalysiert jedoch die Oxidation zum Sulfoxid und weiter zum Sulfon (Abb. 4.3), wie es auch bei Vanadat-abhängigen Haloperoxidasen bekannt ist [Wikete 2007].

In Abbildung 4.4 sind die enzymkatalysierte (schwarze durchgehende Kurve) und die nicht katalysierte Umsetzung (graue Kurve) des racemischen Methylphenylsulfoxids mit Wasserstoffperoxid zum Methylphenylsulfon dargestellt. Der Umsatz der AaP-katalysierten Oxidation ist deutlich höher als der der nicht katalysierten Oxidation des Methylphenylsulfoxids. In der spontanen Weiteroxidation reagieren die beiden Enantiomere des racemischen Sulfoxides zu gleichen Anteilen zum Sulfon. Der Gesamtumsatz der AaP-katalysierten Reaktion ist in Abbildung 4.4 a in den Verbrauch des (*S*)-Enantiomers und den Verbrauch des (*R*)-Enantiomers aufgeteilt (gestrichelte Kurven). In der enzymkatalysierten Oxidation wird bevorzugt das (*S*)-Enantiomer umgesetzt. Es findet eine enzymatisch kinetische Racemattrennung statt, was zu einer Erhöhung des (*R*)-Enantiomerenüberschuss führt (Abb. 4.4 b).



**Abb. 4.4. a:** Der Umsatz von 5 mM racemischen Methylphenylsulfoxids mit  $1,5 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  Wasserstoffperoxid: enzymkatalysiert  $\blacklozenge$  ((*R*)-Enantiomer  $\blacksquare$ , (*S*)-Enantiomer  $\square$ ) und nicht katalysiert  $\blacktriangledown$ . **b:** Die Erhöhung des Enantiomerenüberschusses des (*R*)-Enantiomers durch die enzymatisch kinetische Racematspaltung in der *AaP*-katalysierten Oxidation von 5 mM Methylphenylsulfoxid; bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und pH 6,8 (M 7.5 g, h).

#### 4.2.3 Die Erhöhung des ee-Wertes durch die enzymkatalysierte Überoxidation

Die Weiteroxidation des erwünschten (*R*)-Sulfoxids zum Sulfon stellt zunächst ein Problem dar. Da die *Agrocybe aegerita* Peroxidase aber bevorzugt das ee-Wert-senkende (*S*)-Enantiomer oxidiert und der Enantiomerenüberschuss dadurch erhöht wird, kann aus dieser Weiteroxidation ein Vorteil gezogen werden. Das Hauptprodukt der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion ist das (*R*)-Methylphenylsulfoxid mit einem Enantiomerenüberschuss von 83,5 % nach 4 h Reaktionszeit (Abb. 4.5). Aufgrund der Sulfonentstehung erhöht sich der ee-Wert mit fortschreitender Reaktionszeit, so dass nach 9 h Reaktionszeit der ee-Wert auf 92,5 % angestiegen ist. Wird die enzymkatalysierte Oxidation nach dem vollständigen Umsatz des Methylphenylsulfids fortgesetzt, führt das zum vollständigen Verbrauch des (*S*)-Produktes und somit zu einem ee-Wert  $> 99,9 \%$  (Abb. 4.5). Zusätzlich zum enantiomerenreinen Produkt liegt ein weiteres Produkt, das Sulfon vor, das durch die einfache präparative Trennung über eine Kieselgelsäule anschließend vom gewünschten Produkt separiert werden kann (s. Kapitel 4.9). Betrachtet man Wasserstoffperoxid nur als Kosubstrat, stehen dem Enzym zwei Substrate zur Verfügung. Es findet eine Konkurrenzreaktion um das aktive Zentrum der *AaP* statt.

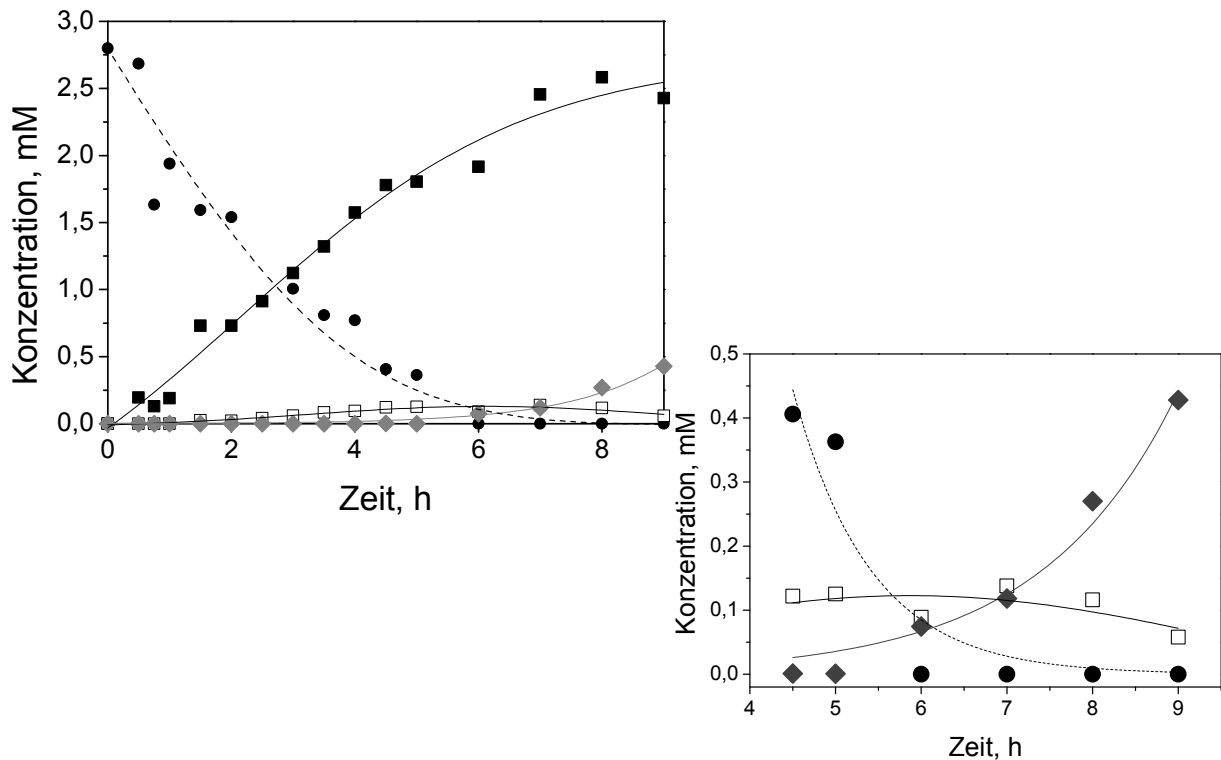


Abb. 4.5. Reaktionsverlauf (Thioanisol ●, (*R*)-Methylphenylsulfoxid ■, (*S*)-Methylphenylsulfoxid □, Methylphenylsulfon ◆) der AaP-katalysierten Sulfoxidationsreaktion (M 7.5 a) in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C; Rechts unten: Vergrößerte Darstellung ab 4,5 h im kleinen Konzentrationsbereich.

Die Affinität des Methylphenylsulfids zum aktiven Zentrum ist größer als die des Methylphenylsulfoxids, was die scheinbaren Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_{m,app}$ -Werte) und vor allem die große Differenz der Spezifitätskonstanten ( $k_{cat}/K_{m,app}$ ) der beiden Substrate bestätigen (Tab. 4.3).

Tab. 4.3. Michaelis-Menten-Konstanten und Spezifitätskonstanten der Substrate aus der Modellreaktion (M 7.4.1.1, 7.4.3).

Substrat	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
Thioanisol	24,86	444,1	$1,79\cdot 10^7$
Methylphenylsulfoxid <sub>racemisch</sub>	1607,36	25,61	$1,59\cdot 10^4$

Thioanisol wird um das 1125-fache<sup>c</sup> schneller umgesetzt als das Zwischenprodukt und kann daher außer Konkurrenz zu dem zweiten Substrat betrachtet werden. Aus diesem Grund steigt die enzymkatalysierte Sulfonbildung erst exponentiell an, nachdem das Sulfid fast vollständig verbraucht ist. Allerdings wurde bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten die racemische Mischung des Sulfoxids verwendet. In der AaP-katalysierten Umsetzung entsteht das (*R*)-Enantiomer im Überschuss. Wie aus der Abbildung 4.4 a hervorgeht, bevorzugt das Enzym das (*S*)-Enantiomer in der katalysierten Umsetzung zum Sulfon. Der Wert der Spezifitätskonstante ( $k_{cat}/K_{m,app}$ ) für das (*S*)-Enantiomer ist mit hoher Wahrscheinlichkeit größer als der Wert für das racemische Gemisch, der allerdings nicht separat ermittelt wurde.

Die hohe katalytische Effizienz, die durch die AaP in der Umsetzung von Thioanisol erreicht wird, kann auch in der Betrachtung anderer katalytischer Systeme außer Konkurrenz gesehen werden. Die Spezifitätskonstante kann nicht größer als eine diffusionsbestimmte bimolekulare Reaktion sein, dessen obere Geschwindigkeitsgrenze bei  $1\cdot 10^8$ - $1\cdot 10^9$   $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  liegt [Buchholz

<sup>c</sup>  $\frac{1,79\cdot 10^7}{1,59\cdot 10^4} \cdot \left[ \frac{\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}}{\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}} \right]$

2005-a]. In Tabelle 4.4 sind Enzyme angegeben, deren Umsatzgeschwindigkeit eines speziellen Substrates, das sie katalysieren, scheinbar nur durch die Diffusion kontrolliert ist.

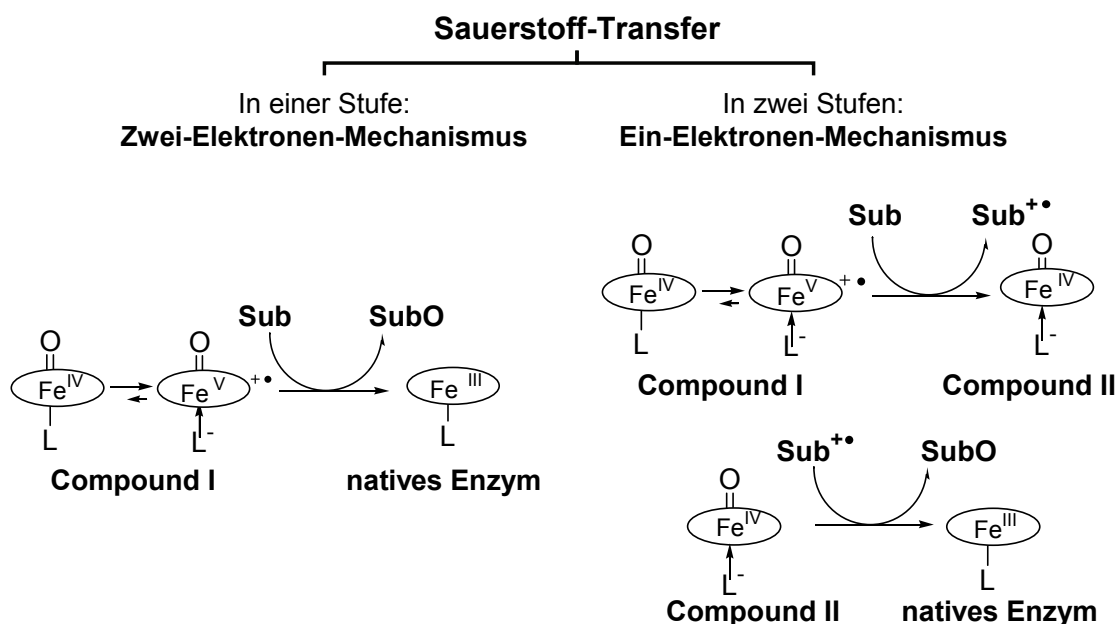
**Tab. 4.4. Wechselzahl und Spezifitätskonstante einiger besonders effektiver Enzyme.**

Enzym	Substrat	$k_{cat}, s^{-1}$	$k_{cat}/K_{m,app.}, M^{-1}\cdot s^{-1}$	Referenz
Carboanhydrase	CO <sub>2</sub>	$1\cdot 10^6$	$7\cdot 10^7$	[Earnhardt 1998]
Katalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$> 1\cdot 10^7$	$> 1\cdot 10^8$	[Abe 1979]
Penicillin amidase	Penicillin G	80	$1\cdot 10^7$	[Buchholz 2005-a]

Die *AaP* kann sich mit einer Spezifitätskonstante von  $1,79\cdot 10^7 M^{-1}\cdot s^{-1}$  (für Thioanisol) in der Katalyse der Sulfoxidationsreaktion in die Reihe besonders effektiver Enzyme einordnen. Die Substratspezifität der CPO in der Katalyse der Sulfoxidation von Thioanisol beträgt hingegen nur  $7,3\cdot 10^5 M^{-1}\cdot s^{-1}$  und damit das 25-fache geringer als die der *AaP* [van Deurzen 1996].

#### 4.2.4 Der Mechanismus der Sauerstoffübertragung

Es wurde mit <sup>18</sup>O-markiertem Wasserstoffperoxid die *AaP*-katalysierte Oxidation von Thioanisol ausgeführt. Mit Hilfe der GC-MS-Analytik (M 7.9) konnte bewiesen werden, dass der Sauerstoff, der auf das Sulfid in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion übertragen wird, direkt aus dem Peroxid stammt. Ausgehend von der Oxidation des nativen Enzyms zur Compound I durch Wasserstoffperoxid werden zwei Mechanismen für die Umwandlung der Compound I zum Grundzustand des Enzyms durch ein reduzierendes Substrat angenommen:



**Abb. 4.6. Angenommene Mechanismen zur Reduktion der Compound I durch ein Substrat (Sub) zur nativen Peroxidase [Kobayashi 1987, van Deurzen 1996].**

Im Zwei-Elektronen-Mechanismus wird der Sauerstoff der Eisenoxo-Verbindung der Compound I in einem Schritt auf das Substrat übertragen. Die Oxidation des Substrates erfolgt gleichzeitig mit der Übertragung von zwei Elektronen auf das aktive Zentrum des Enzyms, das dadurch in den Grundzustand reduziert wird.

In einem weiteren angenommenen Mechanismus wird das Substrat über zwei Ein-Elektron-Übertragungen oxidiert. Dabei entsteht im ersten Schritt ein radikalische Substratkation, während das Eisen(V)-oxoradikalkation in Compound II übergeht. In einem zweiten Schritt

wird der Sauerstoff der Compound II auf das radikalische Substratintermediat übertragen wobei das Enzym dabei in den Grundzustand reduziert wird und für einen nächsten katalytischen Zyklus zur Verfügung steht. Es gibt Beweise, dass z.B. die Lactoperoxidase [Doerge 1991-a, -b] und die Meerrettichperoxidase [Hashimoto 1986] den Sauerstoff über Compound II übertragen.

Neben diesen beiden wesentlichen Annahmen der Sauerstoffübertragung gibt es noch eine Reihe anderer Theorien [van Deurzen 1996, van Rantwijk 2000]. Grundsätzlich ist der Weg der Sauerstoffübertragung sowohl von der Natur des Enzyms als auch von dem Substrat abhängig. Die AaP-katalysierte Umsetzung mit dem  $^{18}\text{O}$ -markierten Wasserstoffperoxid ergab, dass der Sauerstoff in den entstandenen Oxidationsprodukten vollständig aus dem markierten Wasserstoffperoxid stammt. Der Zwei-Elektronen-Mechanismus ist hier sehr wahrscheinlich. Gegen die zwei hintereinander ablaufenden Ein-Elektronen-Reaktionen spricht, dass durch die intermediär gebildeten Sulfidradikale auch andere Sauerstoffquellen herangezogen werden können, z.B. durch die Wechselwirkung des Sulfidradikals mit Wasser [Kobayashi 1987, Hashimoto 1986, Doerge 1991-a, -b]. Die Oxidationsprodukte enthielten aber alle zu 100 % markierten Sauerstoff.

#### 4.2.5 Die Standstabilität der AaP

Die Standstabilität stellt die Stabilität des Enzyms unter nicht aktivierenden Bedingungen dar. Die native AaP wird durch den Zusatz eines Peroxids aktiviert, in dem es zur Bildung der Compound I kommt. Aus diesem Zustand ist das Enzym fähig die Oxidation geeigneter Substrate zu katalysieren. In Abwesenheit von Peroxiden konnte die Wirkung unterschiedlicher Parameter auf die Stabilität des nativen Enzyms beobachtet werden. Die AaP wurde über mehrere Wochen bei Raumtemperatur in Wasser, in Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8, in Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8 mit dem Zusatz von 1 % Propylencarbonat (PPC) bzw. 0,1 mM Ascorbinsäure (AS) und unter den Reaktionsbedingungen, die im Thioanisol-Assay zur Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit eingestellt werden, gelagert (Tab. 4.5). Die Halbwertszeiten der Standstabilität in Abhängigkeit der unterschiedlichen Parameter können nicht direkt auf die Stabilität des aktiven Enzyms übertragen werden. Während der enzymkatalysierten Reaktion kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Enzym-Substrat-Komplexe, die ein ganz anderes Stabilitätsverhalten besitzen als das native Enzym. Die Stabilität der nativen AaP kann allerdings zur ersten Stabilitätseinschätzung gegenüber dem Reaktionsmedium, dem Substrat, PPC und AS herangezogen werden.

**Tab. 4.5. Der Einfluss verschiedener Medien auf die Standstabilität der nativen AaP (M 7.3.2.6).**

<b>Lagerung</b>	<b><math>t_{0,5}</math>, d</b>
AaP in Wasser	31
AaP in Puffer (pH 6,8)	50
AaP in Puffer (pH 6,8) + 1% (v/v) PPC	62
AaP in Puffer (pH 6,8) + 0,1 mM AS	11
AaP in Puffer (pH 6,8) + 1% (v/v) PPC + 0,1 mM Thioanisol	46

Die Halbwertszeiten der AaP, die unter den Lagerbedingungen gemessen worden sind, liegen zwischen 11 – 62 Tage. Der Zusatz von Ascorbinsäure wirkt im Vergleich zu den anderen Bedingungen stark desaktivierend auf das Enzym. Es wurden nur 22 % der Halbwertszeit, die mit der AaP im Puffer-System erhalten wurde, erreicht. Der Grund für die destabilisierende Wirkung der Ascorbinsäure wird in Kapitel 4.5.3 ausführlich erklärt.

Da die Halbwertszeit der Wasserlagerung geringer ist als die Halbwertszeit der Pufferlagerung, kann man davon ausgehen, dass die Puffersalze stabilisierend auf das Enzym wirken oder die Zitronensäure desinfizierend wirkt. Der Zusatz von 1 % Propylencarbonat im Puffer erhöht die Halbwertszeit nochmals um 20 %. Organische Lösungsmittel sind dafür bekannt die Standstabilität der Enzymlösungen zu erhöhen, da dadurch der bakterielle Befall verzögert wird. Die Anwesenheit von 0,1 mM Thioanisol vermindert die Halbwertszeit scheinbar. Es wurde nicht geklärt, ob die leichte Desaktivierungsrate, die mit Thioanisol beobachtet wurde auf eine Destabilisierung des Enzyms zurückzuführen ist oder es zum nicht katalysierten Abbau von Thioanisol über den Untersuchungszeitraum gekommen ist. Die Halbwertszeit der Enzymlagerung in Anwesenheit von Thioanisol ist zwar um 8 % niedriger als die Halbwertszeit der AaP im Puffer, aber in Hinblick auf den langen Untersuchungszeitraum führt Thioanisol nicht desaktivierend.

### 4.3 Die pH-Abhängigkeit der Thioanisoloxidation

Saure und basische Aminosäurereste befinden sich in der Umgebung des aktiven Zentrums und können auch Teil des aktiven Zentrums sein. Der Ionisierungszustand der Aminosäurereste kann die Aktivität, Selektivität und Stabilität des Enzyms beträchtlich beeinflussen.

#### 4.3.1 Der Einfluss der Pufferart und Pufferkonzentration auf die Enzymaktivität

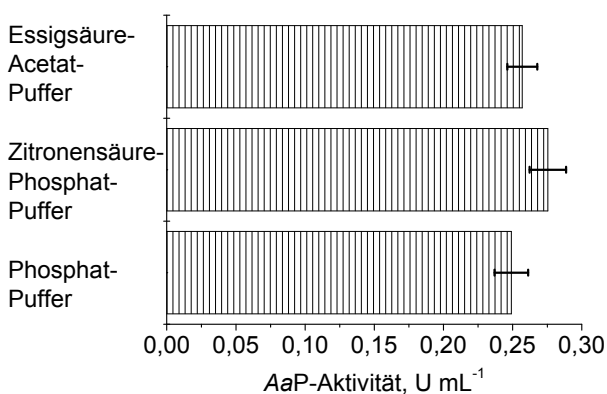


Abb. 4.7. Der Einfluss der Puffersalze verschiedener Puffer (pH 7) auf die Enzymaktivität in der Sulfoxidation von Thioanisol (M 7.3.2.4).

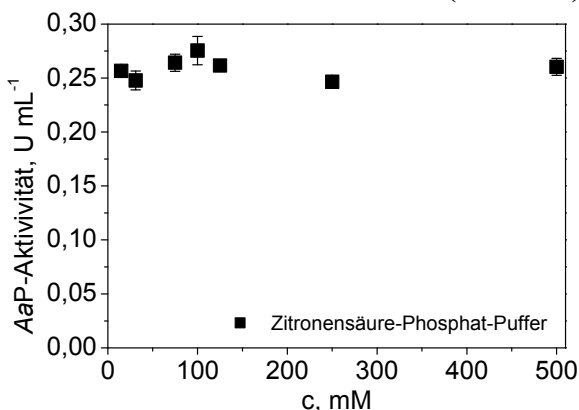


Abb. 4.8. Der Einfluss der Pufferkonzentration des Zitronensäure-Phosphat-Puffers (pH 6,8) auf die Enzymaktivität in der Sulfoxidation von Thioanisol (M 7.3.2.4).

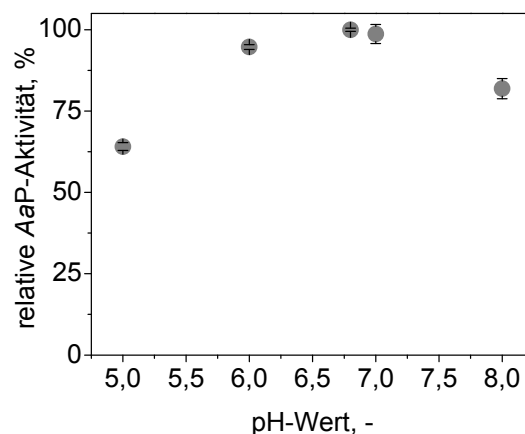
Die Wahl eines geeigneten Puffers im Falle der neuartigen Haloperoxidase ist nicht nur vom pH-Optimum und der Ionenkonzentration abhängig, sondern auch von der Zusammensetzung der Puffersalze. Es können nur Puffer genutzt werden, die frei von Halogenen sind, da das Enzym Halogenierungsreaktionen katalysiert. Unter diesen Aspekten standen die nachfolgenden Puffer zur Auswahl, von denen der Einfluss auf die Enzymaktivität untersucht wurde: Phosphat-Puffer, Essigsäure-Acetat-Puffer und Zitronensäure-Phosphat-Puffer (Abb. 4.7). Es konnte gezeigt werden, dass die Pufferart hat keinen Effekt auf die Enzymaktivität hat.

Des Weiteren wurde die Konzentration des Zitronensäure-Phosphat-Puffers in einem Bereich von 15 mM – 500 mM variiert (Abb. 4.8). Die Pufferkonzentration hat ebenfalls keine Auswirkung auf die Enzymaktivität. In dieser Arbeit wurde mit einer Pufferkonzentration von 100 mM (bezogen auf Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> des Zitronensäure-Phosphat-Puffers) gearbeitet.

## 4.3.2 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Die *AaP* ist zwischen pH 2,5 und pH 9 aktiv [Ullrich 2004]. Je nach Substrat und dessen Eigenschaften verschiebt sich der pH-Wert, bei dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erzielt wird. Hofrichter et al. konnten in einem ausführlichen Substratscreening herausstellen, dass das pH-Optimum für die Oxidationsreaktionen, die die *AaP* katalysiert, bei einem pH-Wert um 7 liegt. Eine Ausnahme stellt die Oxidation von ABTS dar, dessen pH-Maximum bei 4,7 liegt.

In dieser Arbeit stand die Sulfoxidationsreaktion im Vordergrund. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität bei der Umsetzung von Thioanisol mit 63 nM *AaP* ist in der Abbildung 4.9 dargestellt. Die *AaP* ist in dem pH-Bereich zwischen 5 und 8 noch mehr als 60 % aktiv. Die Enzymaktivität besitzt bei einem pH-Wert von 6,8 ein Maximum.



**Abb. 4.9. Die pH-Abhängigkeit der *AaP* bei der Sulfoxidation von Thioanisol (M 7.3.2.3).**

4.3.3 Der Einfluss des pH-Wertes auf den Gesamtumsatz der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation

In einem pH-Bereich von 2,2 – 10,8 wurde die Abhängigkeit des pH-Wertes auf den Gesamtumsatz und die Enantioselektivität untersucht (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6. Umsatz und Enantiomerenüberschuss von 10 mM Thioanisol katalysiert durch 72 nM *AaP* nach 29,08 h Reaktionszeit bei unterschiedlichen pH-Werten (M 7.5.1).**

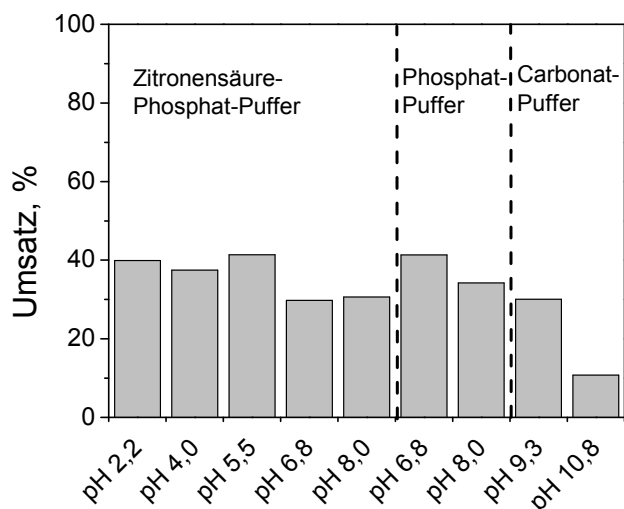
pH-Wert	Umsatz, %	ee-Wert. %
Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 2,2	33,5	5,2
Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,0	28,9	61,3
Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 5,5	98,6	84,5
Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8	89,4	81,8
Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 8,0	85,8	83,6
Phosphat-Puffer pH 6,8	87,4	79,2
Phosphat-Puffer pH 8,0	82,7	81,4
Carbonat-Puffer pH 9,3	71,2	74,9
Carbonat-Puffer pH 10,8	10,1	61,9

Die enzymkatalysierte Sulfoxidationsreaktion von 10 mM Thioanisol erreichte im Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach 29 h bei einem pH-Wert von 5,5 einen fast vollständigen Umsatz. Dabei wurde ein Enantiomerenüberschuss von 84,5 % erhalten. Die Umsätze und ee-Werte im Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8 und pH 8 und im Phosphat-Puffer pH 6,8 und pH 8 unterscheiden sich nur geringfügig. Die Ergebnisse der Oxidation im Zitronensäure-Phosphat-Puffer sind etwas besser als die, die vergleichend im Phosphat-Puffer erhalten wurden. Da bei der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation der ee-Wert aufgrund der selektiven Weiteroxidation vom Umsatz abhängig ist, konnte der Enantiomerenüberschuss bei pH 8 im Vergleich zu dem pH-Wert 6,8, bei dem der Umsatz etwas größer war, verbessert werden.

## 4 Ergebnisse

Im stark sauren und im leicht basischen pH-Bereich ist die Enzymaktivität gehemmt. Der niedrige Enantiomerenüberschuss bei pH 2,2, der trotz relativ hohen Umsatz erhalten wurde, lässt auf eine Enzymdesaktivierung schließen.

In so genannten Blindreaktionen wurde der Einfluss der spontanen Thioanisoloxidation bei den unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Dabei wurden dieselben Bedingungen wie in der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion gewählt (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10. Der Umsatz der nicht katalysierten Sulfoxidation von 10 mM Thioanisol mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 25 °C (M 7.5.1).**

spontanen Thioanisoloxidation werden im Carbonat-Puffer erhalten. Von pH 9,3 auf pH 10,8 sinkt der Umsatz der spontanen Oxidation um 70 %.

Für die enzymkatalysierte Sulfoxidation hat sich die Wahl des pH-Wertes bei 6,8 im Zitronensäure-Phosphat-Puffer als günstig erwiesen. Obwohl bei pH 5,5 der Umsatz der enzymkatalysierten Oxidation um fast 10 % größer ist als bei pH 6,8, muss trotzdem beachtet werden, dass bei pH 5,5 die spontane Oxidation sogar um 17 % größer ist als bei pH 6,8. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert 5,5 ausgeschlossen. Jedoch ist zu beachten, dass die spontanen Sulfoxidation während der enzymkatalysierten Umsetzung von Thioanisol unterdrückt wird, solange das Enzym aktiv ist (s. Kapitel 4.2.1), da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die enzymkatalysierte Sulfoxidation hoch effektiv verbraucht wird.

Die pH-Wert-abhängige Desaktivierung bei der CPO wurde von [Blanke 1996] beschrieben. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen beginnt die Desaktivierung in der CPO-Katalyse schon bei pH 6,5, indem die Koordinationsstruktur des Häm-Eisens verändert wird.

In der nicht katalysierten Oxidation hat der pH-Wert keinen erheblichen Einfluss auf den Umsatz. Im pH-Bereich zwischen 2,2 und 8,0 wird ein durchschnittlicher Umsatz von 37,5 % nach 29 h Reaktionszeit erreicht. Leichte Unterschiede sind bei pH 6,8 und pH 8,0 im Zitronensäure-Phosphat-Puffer vergleichend zu denselben pH-Werten im Phosphat-Puffer zu beobachten, in dem der Umsatz etwas höher ist als im Zitronensäure-Phosphat-Puffer. Dieser Einfluss bewirkt, dass in der enzymkatalysierten Oxidation die ee-Werte, die im Phosphat-Puffer erhalten wurden, unwesentlich geringer sind. Abweichende Ergebnisse zu dem ausgewogenen Umsatz in der



#### 4.4. Die Rolle des Oxidationsmittels

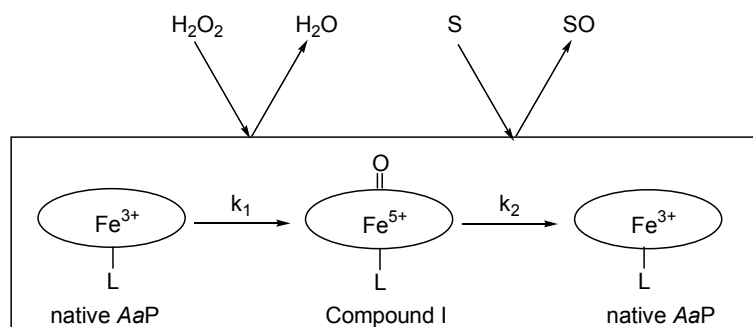
In der enzymkatalysierten Sulfoxidation können eine Reihe von Peroxiden als Elektronenakzeptoren zum Einsatz kommen. In dieser Arbeit wurde neben Wasserstoffperoxid *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) und Peressigsäure als Oxidationsmittel verwendet.

##### 4.4.1 Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel

Die Art und Weise wie Wasserstoffperoxid zur Reaktion gegeben wird ist äußerst wichtig, da Wasserstoffperoxid das Enzym desaktiviert. In erster Linie findet, nachdem Compound I durch die Oxidation mit Wasserstoffperoxid gebildet wurde, eine Konkurrenzreaktion zwischen dem Oxidationsmittel und dem Substrat statt. Bei Substraten, die eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum besitzen, ist das Ausmaß der scheinbaren Desaktivierung des Enzyms geringer. Manoj et al. haben am Vergleich der CPO-vermittelten Sulfoxidationsreaktion und Epoxidierungsreaktion gezeigt, dass das Ethylphenylsulfid ein geeigneteres Substrat als das Indol in der oxidativen Katalyse durch die CPO ist [Manoj 2001]. Die Epoxidierungsreaktion mit Indol als Substrat verläuft unvollständig, da Wasserstoffperoxid sehr schnell durch die Katalaseaktivität der CPO verbraucht wird. Das Enzym wird dadurch scheinbar desaktiviert. Wurde das Oxidationsmittel nachdosiert, konnte die Katalyse der Epoxidierungsreaktion fortgesetzt werden. Dagegen verlief die CPO-katalysierte Sulfoxidierungsreaktion schneller und fast vollständig unter den gegebenen Bedingungen ab. Manoj et al. konnten damit zeigen, dass das Ethylphenylsulfid ein guter Konkurrent zum Wasserstoffperoxid und der damit verbundenen Katalasetyp-Reaktion ist.

##### 4.4.1.1 Die Kinetik von Wasserstoffperoxid in der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation

Die Kinetik der *AaP*-katalysierten Zwei-Substrat Reaktion folgt einem modifizierten Ping-Pong-Mechanismus [Dunford 1976, Segel 1993, Sun 1994, Dunford 1999-b]. Der Ping-Pong-Mechanismus [Alberty 1953, Cleland 1970] ist ein geordneter Enzymmechanismus (Abb. 4.11), bei dem zunächst das erste Substrat über die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes für die Modifizierung des Enzyms verantwortlich ist, so dass, nachdem das erste Produkt frei gelassen wurde das zweite Substrat an das modifizierte aktive Zentrum koppeln kann. Nach der Bildung des zweiten Produktes ist in der Regel der Ausgangszustand des Katalysators wieder hergestellt.



**Abb. 4.11. Ping-Pong-Mechanismus in der Kopplung der Substrate mit dem aktiven Zentrum des Enzyms [Segel 1993].**

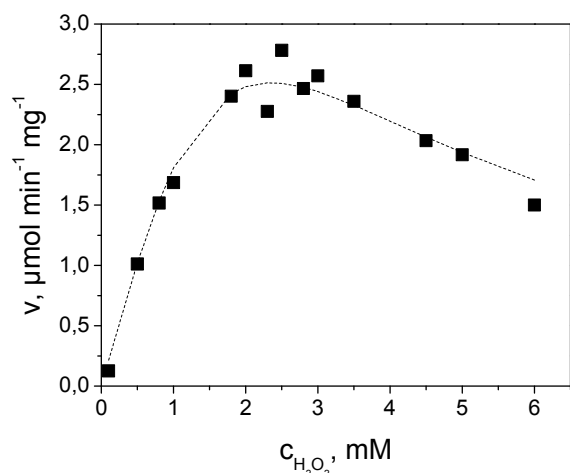
In dieser Arbeit wurde die Kinetik des Ping-Pong-Mechanismus (Glg. 1) für die Auswertung der kinetischen Parameter nicht berücksichtigt.

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}} \quad (1)$$

$K_A$  steht in dieser Gleichung für den Ping-Pong-Mechanismus für die Michaelis-Menten-Konstante des Substrates [A] und  $K_B$  ist die Michaelis-Menten-Konstante des Substrates [B].

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde einer der substratabhängigen Terme der Gleichung 1 vernachlässigt, so dass bei der Variation der Konzentration des einen Substrates der Einfluss des anderen Substrates nicht mit einbezogen wurde. Die Auswertung der Kinetik erfolgte nach der Michaelis-Menten-Theorie (s. Glg. 13 im Anhang, 9.1).

Die so bestimmten Michaelis-Menten-Konstanten werden deshalb als  $K_{m,app.}$  angegeben, da es sich nur um scheinbare (app.: apparent) Michaelis-Menten-Konstanten handelt.



**Abb. 4.12. Der Einfluss der  $H_2O_2$ -Konzentration auf die Enzymaktivität in der Oxidationsreaktion von 0,1 mM Thioanisol im Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,8 bei 25 °C (M 7.4.1.2).**

Der Effekt der Wasserstoffperoxidkonzentration während der *AaP*-vermittelten Sulfoxidationsreaktion von Thioanisol ist in der Abbildung 4.12 zu sehen.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Sulfoxidationsreaktion steigt zunächst mit der Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration. Ab einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 2,5 mM sinkt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration. Wasserstoffperoxid liegt hier im 25-fachen Überschuss zum Thioanisol vor. Es findet hier eine Substratinhibierung der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion statt. Um die Inhibierung der Sulfoxidationsreaktion zu verhindern, sollte der Gehalt von  $H_2O_2$  in der Reaktionslösung kleiner als 1,5 mM sein.

Es konnte die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante mit  $K_{m,app.} = 1270 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und eine Inhibierungskonstante  $k_{i,app.} = 4350 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ermittelt werden (M 7.4.1.2). Ein Effekt, der die Herabsetzung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol bewirkt, ist die *AaP*-katalysierte Disproportionierung des Wasserstoffperoxids. Diese steht in Konkurrenz zur Thioanisoloxidation. Diese Katalasetyp-Reaktion führt in hoher Wahrscheinlichkeit zur Desaktivierung des Enzyms.

Die Michaelis-Menten-Konstante des Wasserstoffperoxids in der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation ist um das 175-fache größer als der  $K_{m,app.}$ -Wert des Thioanisols ( $K_{m,app.}: 24,86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), der unter den gleichen Bedingungen bestimmt worden ist. Das bedeutet für die Sulfoxidationsreaktion, dass das Thioanisol eine höhere Affinität zum aktiven Zentrum besitzt als Wasserstoffperoxid. In der Konkurrenz um die Bindungsstelle am aktiven Zentrum der Compound I wird Thioanisol bevorzugt. Liegt Wasserstoffperoxid im Überschuss vor, kommt es zur enzymkatalysierten Nebenreaktion.

In der CPO-katalysierten Thioanisoloxidation mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid wurde für Thioanisol eine Michaelis-Menten-Konstante von  $10800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ermittelt [Seelbach 1997-a]. Der  $K_{m,app.}$ -Wert für Wasserstoffperoxid konnte aufgrund der geringen Konzentration nicht ermittelt werden und wurde von Seelbach für die Oxidation von 9,18 mM Thioanisol weit unter  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  geschätzt. Bei der CPO-katalysierten Sulfoxidation ist das Verhältnis der  $K_{m,app.}$ -Werte für  $H_2O_2$  und dem Substrat mit 1: >100 entgegengesetzt zu dem Verhältnis in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation, bei der sich die  $K_{m,app.}$ -Werte von  $H_2O_2$  und Thioanisol 50:1 verhalten. In der CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion spielt die Konzentration des

Wasserstoffperoxids eine viel größere Rolle als in der *AaP*-katalysierten. Die Konkurrenz des Thioanisols mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  um das aktive Zentrum ist bei der klassischen Chlorperoxidase viel stärker ausgeprägt. Eine Konzentration von  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führte bei der Oxidation von  $9,18 \text{ mM}$  schon zur scheinbaren Inhibierung des Enzyms. Hier lag Thioanisol im 91,8-fachen Überschuss vor. Eine permanente Dosierung geringer Mengen des Oxidationsmittels ist bei der CPO-Katalyse notwendig, damit die Sulfoxidation aufgrund der peroxidverbrauchenden Nebenreaktion nicht vorzeitig abbricht. Die Ergebnisse der Sensorgesteuerte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung, die sich in der CPO-Katalyse etabliert hat, bestätigen das [van Deurzen 1997-b].

Dennoch kommt es auch bei der *AaP*-vermittelten Oxidation in Anwesenheit eines geeigneten Substrates ab einer bestimmten Konzentration des Oxidationsmittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dessen enzymkatalysierten Disproportionierung (s. Kapitel 4.4.1.3). So wie die CPO aus *C. fumago* besitzt die *AaP* die Fähigkeit diese katalaseartige Reaktion zu vermitteln. Der entscheidendste Unterschied zur CPO-katalysierten Sulfoxidation ist jedoch, dass die Desaktivierung der *AaP* erst bei einem deutlichen Überschuss an Wasserstoffperoxid gegenüber Thioanisol stattfindet. Bei einem Überangebot an Wasserstoffperoxid verliert das eigentliche Substrat Thioanisol in Konkurrenz mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  den Platz am aktiven Zentrum, so dass Compound I des Häm durch ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Molekül zurück in den Grundzustand reduziert wird. Es entstehen Wasser und Sauerstoff (Abb. 4.15). Zum einen wird dadurch das Oxidationsmittel verbraucht, so dass es für die Oxidation des Substrates nicht mehr zur Verfügung steht. Das Enzym ist scheinbar deaktiviert worden. Eine Nachdosierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  würde eine Fortsetzung der enzymkatalysierten Oxidation bewirken. Zum anderen führt die Katalasetyp-Reaktion zur tatsächlichen Zerstörung des katalytischen Zentrums (s. Kapitel 4.4.1.3). Da das Häm sehr anfällig für oxidative Angriffe ist, führt die Bildung von Sauerstoff zu Änderungen der prosthetischen Gruppe, was zum Verlust der Enzymaktivität führt [van Deurzen 1997-a].

Ein weiterer Grund für die Inhibierung der Enzymaktivität bei hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ist die Tatsache, dass Peroxide unspezifische Oxidationsmittel sind und mit einer Reihe von organischen Verbindungen reagieren können. So bietet sich die Proteinumgebung des Enzyms mit den vielen verschiedenen Aminosäureresten als geeigneter Reaktionspartner an [Neumann 1972]. Durch die Oxidation essentieller Aminosäurereste wird nicht nur die Struktur sondern auch die Funktion des Proteins verändert und das Enzym verliert an Aktivität.

Ein weiteres Argument der Enzymdesaktivierung durch hohe Konzentrationen von Peroxiden ist nach Annahme von van de Velde et al. [van de Velde 2001] eine Konkurrenzreaktion zur Bildung der Compound I. Bei dieser Oxidation des nativen Enzyms bildet sich durch eine Ein-Elektronen-Übertragung ein Eisen-(IV)-hydroxyzustand unter der Bildung von Peroxyradikalen aus. Diese Konkurrenzreaktion würde dann zur Desaktivierung des Enzyms führen und zur radikalischen Umsetzung der anwesenden prochirale Substrate zu einem racemischen Produkt führen.

Weiterhin befindet sich das aktive Zentrum verborgen und geschützt in einer Proteintasche. Bei der CPO ist der Zugang zum Häm-Zentrum durch polare Aminosäurereste und eine intensive Glycolysierung hoch polar [Blanke 1996, Sundaramoorthy 1998]. Bei einem Überschuss an  $\text{H}_2\text{O}_2$  verdrängt das polare Oxidationsmittel die weniger polaren Substratmoleküle und kann wirksam an dem Compound I des Häm ankoppeln, so dass bei hohen Oxidationsmittelkonzentrationen die Katalasetyp-Reaktion überwiegt.

Die Verdrängung der unerwünschten Reaktion und Inaktivierung des Enzyms kann durch langsame oder kontrollierte Zugabe von Wasserstoffperoxid minimiert werden. Die sensor kontrollierte Wasserstoffperoxid-Dosierungsstrategie [van Deurzen 1997-b] und die *in situ* generierte Wasserstoffperoxidbildung [van de Velde 2000-a] wurden dafür erfolgreich etabliert.

#### 4.4.1.2 Der Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration auf den Reaktionsverlauf

An der *AaP*-katalysierten Umsetzung von 1 mM Thioanisol wurde gezeigt, wie sich die Wasserstoffperoxidkonzentration auf die enantioselektive Sulfoxidationsreaktion auswirkt. Die Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  variierte zwischen 0,1 mM – 3 mM und wurde jede Stunde nachdosiert (M 7.5 a).

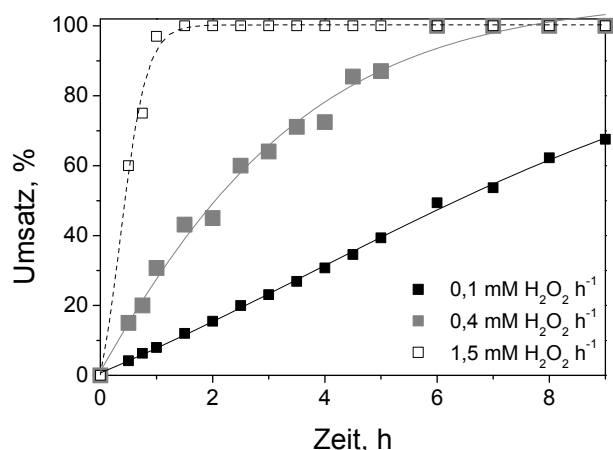


Abb. 4.13. Variation der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei der Oxidation von 1 mM Thioanisol vermittelt von 360 nM *AaP*.

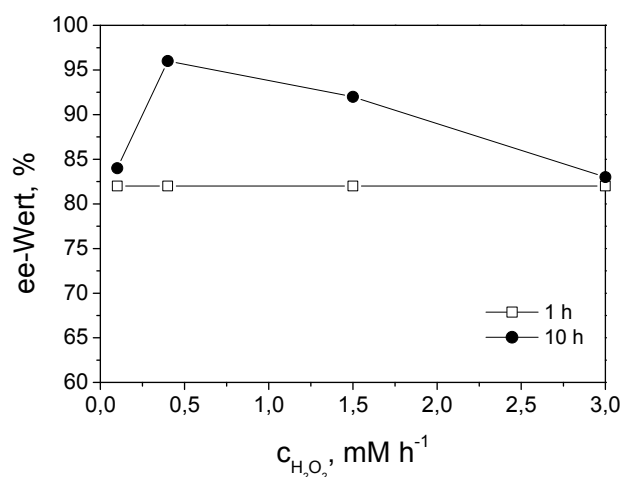


Abb. 4.14. Der Enantiomerenüberschuss in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion von 1 mM Thioanisol mit unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (M 7.5 a).

reicht werden (nach 12 h Reaktionszeit bei  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ ). Die Erhöhung des Enantiomerenüberschusses wurde bei einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung von  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  erreicht. Weniger ausgeprägt war dieser Anstieg bei der  $1,5 \text{ mM}$ -Dosierung, was daran lag, dass die Sulfonbildung ab einer Reaktionszeit von 4 h gestoppt wurde. Die Bildung des Sulfons verlief hier deutlich langsamer als bei der Dosierung mit  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  Wasserstoffperoxid. Bei der Gabe von  $3 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  entstanden nur sehr geringe Mengen Folgeprodukt. Der Enantiomerenüberschuss blieb konstant.

In der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation mit  $0,1 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  kam es kaum zu einer Steigerung des ee-Wertes in dem Reaktionszeitraum, da erst nach 10 h 70 % Thioanisol umgesetzt wurden und die Entstehung des Folgeproduktes noch nicht signifikant war.

Aus der Abbildung 4.13. ist zu entnehmen, dass der Umsatz mit steigender Konzentration an Wasserstoffperoxid stark zunahm. Ab einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung von  $1,5 \text{ mM}$  pro Stunde konnte der Umsatz nicht weiter erhöht werden. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der  $3 \text{ mM}$ -Dosierung in dem Umsatz-Diagramm nicht dargestellt, da sie sich nur unwesentlich von der  $1,5 \text{ mM}$ -Dosierung unterschieden. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wirkt ab  $1,5 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  nicht mehr reaktionslimitierend.

In der Abbildung 4.14 ist der Enantiomerenüberschuss in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration bei zwei unterschiedlichen Reaktionszeiten dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich in der Anfangsreaktionszeit, vor der ersten Nachdosierung des Oxidationsmittels, ein Enantiomerenüberschuss von 82 % einstellte, unabhängig von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. Thioanisol wurde nach 10 h Reaktionszeit in der *AaP*-katalysierten Oxidation mit  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  und  $3 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  vollständig umgesetzt (s. Abb. 4.13). Nach einem nahezu vollständigen Thioanisolumsatz begann, die enzymkatalysierte Umsetzung zum Sulfon, hauptsächlich aus dem (*S*)-Methylphenylsulfoxid. Dadurch konnte ein Enantiomerenüberschuss  $> 99 \%$  er-

Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration die enzymkatalysierte Thioanisolumsetzung deutlich beschleunigt werden kann. 1 mM Thioanisol wurde mit 1,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Stunde fast vollständig umgesetzt. Am Enantiomerenüberschuss ist allerdings zu erkennen, dass es in höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationsbereichen, wie bei der Enzymkinetik, zu einer Katalysatorinhibierung kommt. Unter den gegebenen Bedingungen wirkte  $\text{H}_2\text{O}_2$  ab einer Konzentration von 1,5 mM nicht mehr reaktionslimitierend. Der Thioanisolumsatz konnte dadurch gesteigert werden, aber der Umsatz des Methylphenylsulfoxids zum Sulfon wurde dadurch vermindert. Vergleicht man die  $K_{m,\text{app}}$ -Werte des Methylphenylsulfoxids (1607,36  $\mu\text{M}$ ) und des Wasserstoffperoxids (1140  $\mu\text{M}$  in der Disproportionierung, s. Kapitel 4.4.1.3), ist davon auszugehen, dass das erste ein schlechteres Substrat für die *AaP* ist. Da  $\text{H}_2\text{O}_2$  ab einer Konzentration von 1,5 mM im Überschuss vorliegt, findet die Katalasetyp-Reaktion bevorzugt statt. Um die Sulfonbildung zu fördern, sollte nach dem vollständigen Umsatz von Thioanisol darauf geachtet werden, Wasserstoffperoxid reaktionslimitierend zu dosieren.

Es gab keinen Hinweis darauf, dass radikalische Intermediate entstanden sind, da diese zur eindeutigen Verminderung des Enantiomerenüberschusses geführt hätten.

#### 4.4.1.3 Die *AaP*-katalysierte Disproportionierung von $\text{H}_2\text{O}_2$

Die *AaP* zeigt Katalaseaktivität und vermittelt die Zersetzung von Wasserstoffperoxid. Dabei werden in einem Katalysezyklus der *AaP* 2 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu 2 mol  $\text{H}_2\text{O}$  und 1 mol  $\text{O}_2$  umgesetzt. Zunächst wird mit einem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Molekül Compound I gebildet. Da kein geeignetes Substrat zur Verfügung steht, um das Enzym in den Grundzustand zu reduzieren, reagiert ein zweites Molekül Wasserstoffperoxid mit der Compound I der Peroxidase, was zur Disproportionierung des Oxidationsmittels führt. Folgender Mechanismus der Katalasetyp-Reaktion wird angenommen (Abb. 4.15) [Sun 1994, van Deurzen 1996].

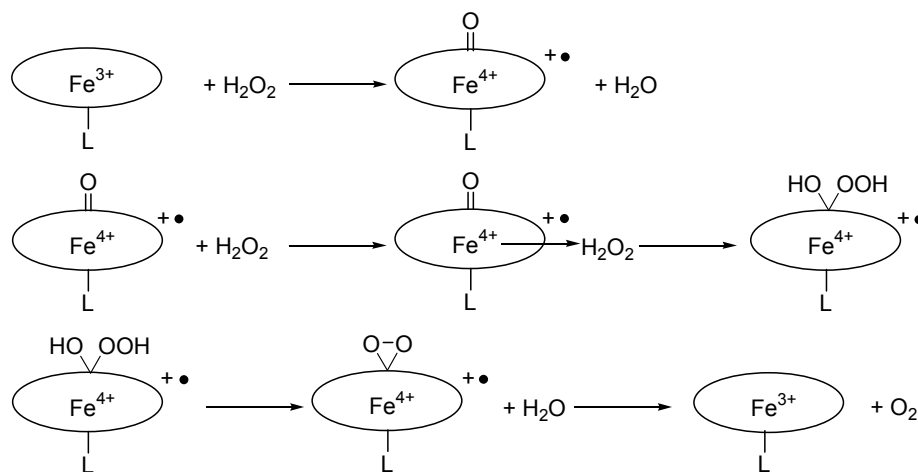


Abb. 4.15. Reaktionsmechanismus der Zersetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach [Sun 1994, van Deurzen 1996].

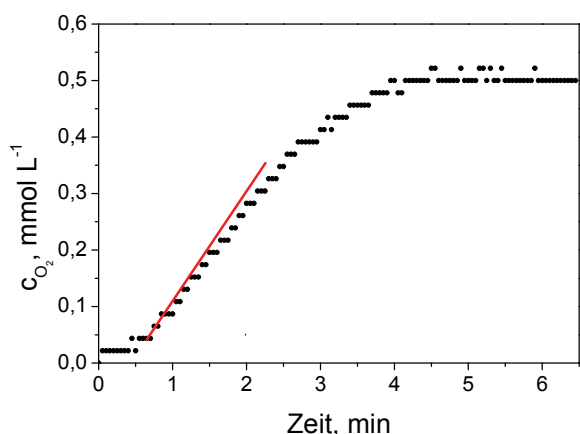


Abb. 4.16. Die Bildung von Sauerstoff bei der Zersetzung von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert durch 72 nM AaP (M 7.4.5.1).

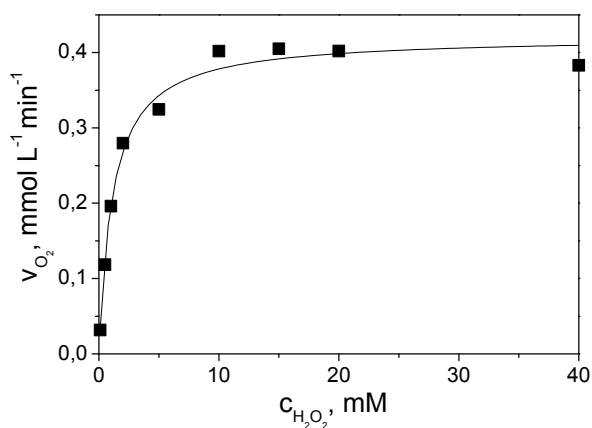


Abb. 4.17. Die Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (M 7.4.5.1).

Mit Hilfe eines optischen Sauerstoffsensors (Fa. PreSens GmbH) wurde der Sauerstoff gemessen, der bei der AaP-katalysierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Disproportionierung entsteht. In Abbildung 4.16 ist die Bildung des Sauerstoffs in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Ein vollständiger Umsatz zu 0,5 mM Sauerstoff konnte nach 4,5 min beobachtet werden, wenn 72 nM AaP und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet wurden.

Für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kinetik in der AaP-katalysierten Disproportionierungsreaktion wurden jeweils die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Sauerstoffbildung (Abb. 4.16, rote Kurve) ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass entsprechend der vorliegenden Michaelis-Menten-Kinetik mit steigendem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt zunächst die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zunimmt, bei höheren Konzentrationen aber eine Sättigung erreicht wird (Abb. 4.17).

Die kinetischen Daten, die dabei für 72 nM AaP ermittelt worden sind lauten:

$$K_m = 1,14 \pm 0,13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v_{\text{max}} = 0,42 \pm 0,01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} = 97,54 \text{ s}^{-1}$$

Aus der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und der Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) ergibt sich die Spezifitätskonstante der AaP-katalysierten Wasserstoffperoxidzerersetzung:  $k_{\text{cat}} / K_m = 8,54 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

In Tabelle 4.7 sind vergleichend dazu der  $K_m$ -Wert und die Spezifitätskonstante der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zersetzung, katalysiert durch die Katalase und die CPO, aufgeführt.

Tab. 4.7. Der  $K_m$ -Wert und die Spezifitätskonstante anderer Peroxidasen in der Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich mit den Werten der AaP.

Enzym	$K_m$ -Wert, mM	$k_{\text{cat}}/K_m, \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Referenz
AaP	1,14	$8,54 \cdot 10^4$	
Katalase	25,00	$4,00 \cdot 10^8$	[Manoj 2001]
CPO	20,00	$1,73 \cdot 10^5$	[Manoj 2001]

Der Vergleich mit den beiden anderen Peroxidasen zeigt, dass die AaP kein effektives Enzym in der Zersetzung von Wasserstoffperoxid ist.

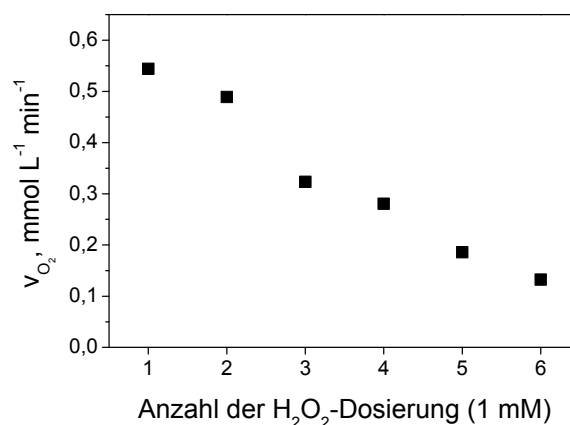
Dies ist für die Anwendung der Peroxidase in der chemischen Synthese ein großer Vorteil. Überschüssiges Wasserstoffperoxid wird nicht so schnell zu Wasser und Sauerstoff zersetzt und erhöht damit die Verfügbarkeit des Oxidationsmittels für die AaP-katalysierte Oxidation organischer Substrate. Es hat sich gezeigt, dass Peroxidasen gegenüber Wasserstoffperoxid instabil sind, was u.a. durch die katalaseartige Zersetzung von Wasserstoffperoxid verursacht wird. Mit der AaP liegt eine Peroxidase vor, die eine natürliche verringerte Katalaseaktivität

besitzt. Dieser Vorteil kann synthetisch, aber vor allem im Verständnis für das Design einer verbesserten Peroxidase genutzt werden.

Des Weiteren wurde die Abnahme der *AaP*-Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass mit zunehmender Wasserstoffperoxidkonzentration die Aktivität der *AaP* bei wiederholter Gabe von Wasserstoffperoxid stark verringert wird. Schon ab einer Konzentration von 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte bei einer zweiten Zudosierung von 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  kein Sauerstoffanstieg aufgezeichnet werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass schon 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausreichend sind, um 72 nM *AaP*, die in der Katalasetyp-Reaktion eingesetzt werden, zu desaktivieren. Die Desaktivierung der Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid ist bereits in zahlreichen Arbeiten diskutiert worden [Sun 1994, van Deurzen 1996, Manoj 2001]. Interessant ist, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Zersetzung von Wasserstoffperoxid bis zu einer Konzentration von 10 mM stetig zunimmt (Abb. 4.17). Eine Desaktivierung des Enzyms ist in der Kinetik des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationsbereiches von 0 – 40 mM nicht zu erkennen. Das kann bedeuten, dass der Sauerstoff der bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Disproportionierung entsteht eine Rolle bei der Enzymdesaktivierung spielt.

Um zu testen, ob das Enzym nach der Wasserstoffperoxidzersetzung noch aktiv ist, wurde ein zweites Mal eine geringere Konzentration des Oxidationsmittels nachdosiert. Aus der resultierenden Sauerstoffentwicklung konnte bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 0,5 mM ein Verlust von 17,2 % der initialen Sauerstoffbildung festgestellt werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde mit einer größeren Menge *AaP* (360 nM) die Abnahme der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nach mehrfacher Dosierung von 1 mM Wasserstoffperoxid gemessen (Abb. 4.18). Nach der zweiten Zugabe von 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  verringerte sich die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit um 10 % und nach der sechsten Zugabe wurde ein Verlust von 75 % beobachtet. Es wurde nicht bewiesen, ob es zu einer irreversiblen Desaktivierung der *AaP* durch die Katalaseaktivität kommt. Es ist schwierig eine Aussage über die Stabilität der *AaP* gegenüber Wasserstoffperoxid zu treffen, da die *AaP* nicht permanent mit Wasserstoffperoxid inkubiert wurde. Betrachtet man die Gesamtmenge an Wasserstoffperoxid, die zugefügt wurde und den Zeitraum der Versuchsreihe, würden 360 nM *AaP* eine Halbwertszeit von 33 min gegenüber 6 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  besitzen. Die CPO besitzt bei pH 5 in Anwesenheit von 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Halbwertszeit von 30 min.

Die Katalaseaktivität der *AaP* steht in Konkurrenz zur *AaP*-katalysierten Sauerstoffübertragungsreaktion. Dabei konkurriert ein Wasserstoffperoxidmolekül mit einem reduzierenden Substrat um die Bindungsstelle der Compound I. Als konkurrierendes Substrat wurde 1 mM Thioanisol in der Katalyse von 72 nM *AaP* eingesetzt und mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen oxidiert (Abb. 4.19). Bei der Oxidation durch 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte keine Bildung von Sauerstoff beobachtet werden. Bei einer Verdopplung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurden geringe Mengen Sauerstoff gemessen. Die Sauerstoffkonzentration entspricht 25 % der Konzentration, die bei Abwesenheit von Thioanisol gebildet wurde.



**Abb. 4.18.** Die Abnahme der *AaP*-katalysierten Sauerstoffbildung mit zunehmendem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt (M 7.4.5.2).

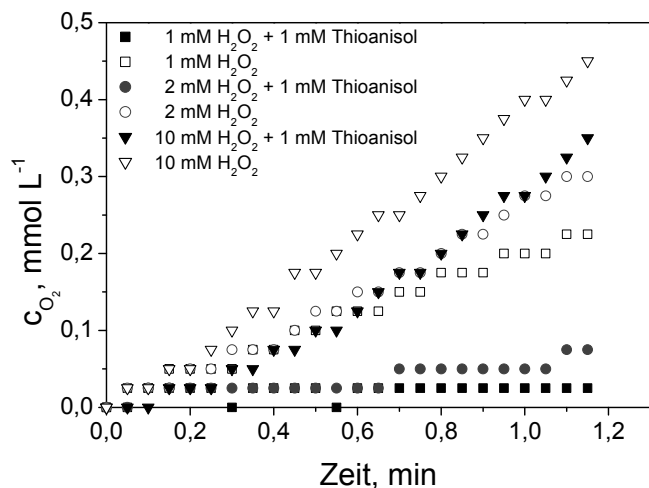


Abb. 4.19. Der Einfluss von Thioanisol bei der initialen Bildung von Sauerstoff bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid durch 72 nM *AaP* (M 7.4.5.3).

Wasserstoffperoxidmolekül benötigt. Vergleicht man die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m = 1,79 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Thioanisoloxidation,  $1,59 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Sulfoxidoxidation,  $8,54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Katalasetyp-Reaktion) der drei Reaktionen, ist zu erkennen, dass die Umsetzung des Thioanisols außer Konkurrenz zu den beiden anderen Reaktionen steht. Für die Folgereaktion ist die Katalasetyp-Reaktion eine Konkurrenzreaktion. Durch eine kontinuierliche und niedrige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung kann die enzymkatalysierte Disproportionierung des Oxidationsmittels unterdrückt werden.

Der Vergleich mit der CPO zeigt, dass hier die *AaP* ein effektiveres Enzym in der Katalyse der Sulfoxidationsreaktion ist. Die CPO besitzt im Vergleich zur *AaP* eine viel ausgeprägtere Katalaseaktivität, die stark mit den CPO-katalysierten Substratumsetzungen konkurriert. Die Wechselzahlen für die Wasserstoffperoxidumsetzung in der Katalasetyp-Reaktion, in der CPO-katalysierte Epoxidierungsreaktion und Sulfoxidationsreaktion lauten  $3,5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ ,  $2,3 \text{ s}^{-1}$  und  $93 \text{ s}^{-1}$  und zeigen deutlich, dass hier die Katalasetyp-Reaktion immer im Vordergrund steht und auch bei der Umsetzung organischer Substrate stattfindet [Manoj 2001]. Bei der CPO ist es daher noch viel wichtiger den Wasserstoffperoxidgehalt durch effektive Dosierungsstrategien weit unter der Substratkonzentration konstant zu halten.

#### 4.4.2 TBHP als Oxidationsmittel

*Tert*-Butylhydroperoxid (TBHP; Abb. 4.20) ist ein organisches Peroxid, das vor allem in organischen Reaktionsmedien als Alternative zum hydrophilen Wasserstoffperoxid Verwendung findet.

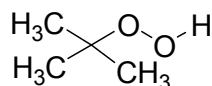


Abb. 4.20. *Tert*-Butylhydroperoxid.

In der CPO-katalysierten Disproportionierung der Peroxide, bei Abwesenheit eines aromatischen Substrates, wird TBHP im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur sehr langsam abgebaut. Die Katalasetyp-Aktivität ist bei diesem Peroxid nicht so wirksam wie bei Alkylperoxiden und Hydrogenperoxid. Allerdings ist auch der katalytische Umsatz in der CPO-katalysierten Sulfoxidation mit TBHP um das 65 fache niedriger als mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  [Manoj 2001].



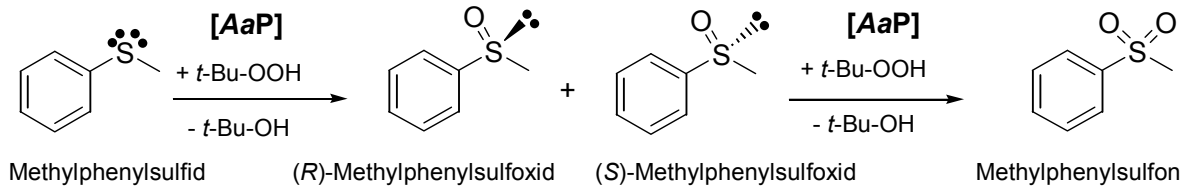


Abb. 4.21. Enantioselektive Oxidation von Thioanisol mit TBHP katalysiert durch *AaP*.

Auch die *Agrocybe aegerita* Peroxidase besitzt die Fähigkeit TBHP als Sauerstoff-Donator zu nutzen (Abb. 4.21). Mit diesem Oxidationsmittel erfolgt ebenfalls eine Überoxidation zum Sulfon.

#### 4.4.2.1 Die Kinetik von TBHP in der *AaP*-vermittelte Sulfoxidierungsreaktion von Thioanisol

Bei der *AaP*-vermittelten Oxidation eines Substrates mit *tert*-Butylhydroperoxid wird ein Sauerstoffatom des Peroxids über die Bildung der Compound I auf das Substrat übertragen und es entsteht *tert*-Butylalkohol (Abb. 4.21).

Der Einfluss der TBHP-Konzentration auf die Aktivität der *AaP* ist in Abbildung 4.22 dargestellt. In dem gewählten Konzentrationsbereich kam es nicht wie bei dem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer Enzyminhibierung. Die Toleranz der *Agrocybe aegerita* Peroxidase gegenüber TBHP ist sehr hoch, was unter anderem an der geringen Affinität zum katalytischen Zentrum liegt. Die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante von TBHP ist um das 20-fache größer als die von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tab. 4.8).

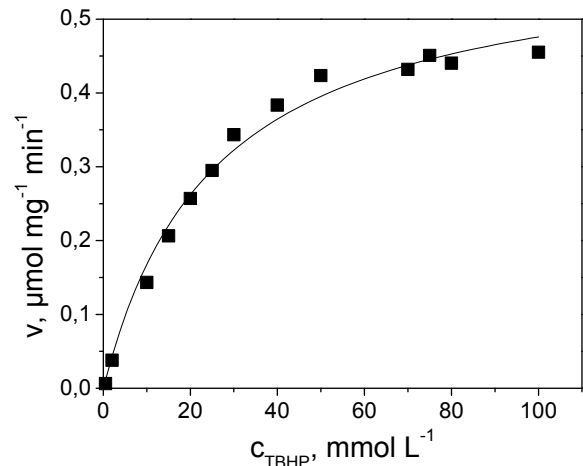


Abb. 4.22. Der Einfluss der TBHP-Konzentration in der *AaP*-vermittelten Oxidation von 0,1 mM Thioanisol mit TBHP (M 7.4.2).

Bei dem TBHP handelt es sich wie beim  $\text{H}_2\text{O}_2$  um ein unspezifisches Oxidationsmittel. Unselektive Nebenreaktionen mit Reaktionsteilnehmern oder der Proteinhülle des Enzyms können auch über die Bildung von aktiven Intermediaten zu unerwünschten Nebenprodukten und/oder zu Inhibierung des Enzyms führen.

Tab. 4.8. Michaelis-Menten-Konstanten und katalytische Effizienz der Oxidationsmittel in der Sulfoxidationsreaktion mit Methylphenylsulfid (M 7.4.1.2, 7.4.2).

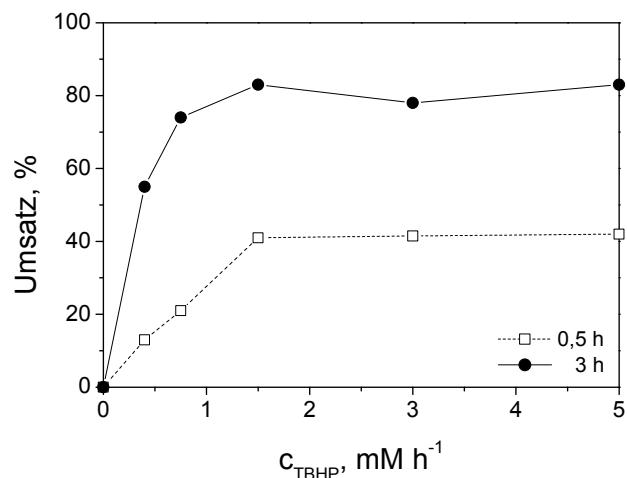
Substrat	$K_{\text{m,app.}}$ -Wert, mmol·L <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}$ , s <sup>-1</sup>	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m,app.}}$ , L·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
$\text{H}_2\text{O}_2$	1,27	$4,44 \cdot 10^2$	$3,49 \cdot 10^5$
TBHP	25,55	$6,49 \cdot 10^1$	$2,54 \cdot 10^3$

Die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  für Wasserstoffperoxid in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation von Thioanisol hat einen Wert von  $4,44 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$  und für TBHP  $6,49 \cdot 10^1 \text{ s}^{-1}$ . Somit ist die katalytische Reaktionsgeschwindigkeit in der Sulfoxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  um das 7-fache höher als mit TBHP.

#### 4.4.2.2 Die *AaP*-vermittelte Sulfoxidationsreaktion von Thioanisol mit TBHP

Die *AaP*-katalysierte Oxidation von Thioanisol wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0,4 – 5 mM) *tert*-Butylhydroperoxid durchgeführt. Dabei wurde das Oxidationsmittel jede

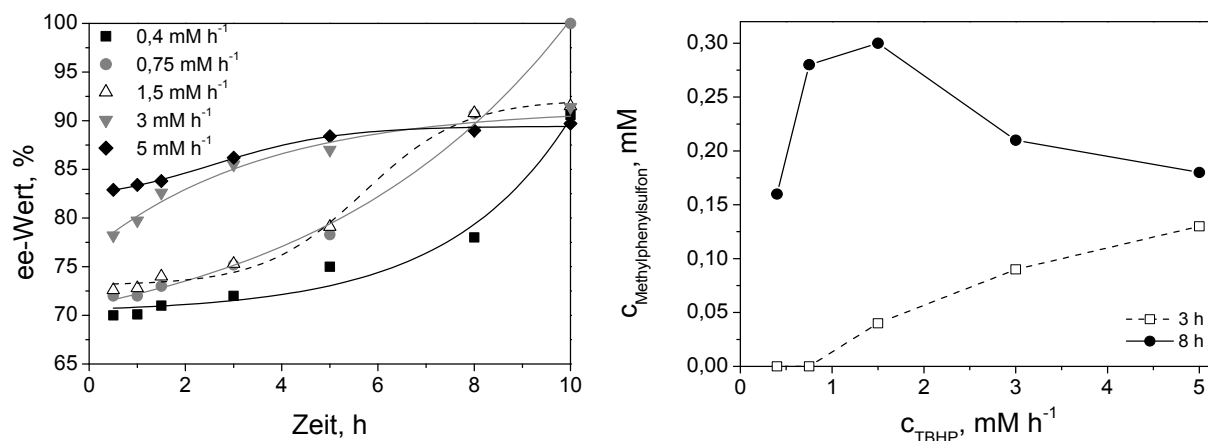
Stunde in das Reaktionssystem nachdosiert, so dass bei der Oxidation mit 3 mM TBHP nach 10 Stunden Reaktionszeit insgesamt 30 mM TBHP dem System zugeführt wurden.



**Abb. 4.23.** Der Umsatz in der *AaP*-katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit TBHP in Abhängigkeit von der TBHP-Konzentration nach 0,5 h (□) und 3 h (●) Reaktionszeit (M 7.5.3.1 a).

In Abb. 4.23 ist der Umsatz in Abhängigkeit von der TBHP-Konzentration nach zwei verschiedenen Reaktionszeiten (0,5 h und 3 h) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Dosierung ab einer TBHP-Konzentration von 1,5 mM das Maximum des Umsatzes erreicht wurde. Unabhängig von der Reaktionszeit konnte der Umsatz ab einer TBHP-Dosierung von 1,5 mM·h<sup>-1</sup> nicht mehr erhöht werden. Im unteren Konzentrationsbereich ist der Umsatz nahezu linear von der TBHP-Konzentration abhängig. In allen Reaktionsansätzen wurde der vollständige Umsatz von Thioanisol in der zeitlichen Reihenfolge mit 0,75 > 0,4 > 1,5 > 3 > 5 mM·h<sup>-1</sup> TBHP erreicht.

Der Verlauf der Konzentrations-Umsatzkurve spiegelt das Ergebnis der TBHP-Kinetik wieder. Mit steigender TBHP-Konzentration erhöhte sich die Umsatzgeschwindigkeit und erreicht einen maximalen Umsatz, den Sättigungsbereich. Das TBHP liegt im Sättigungsbereich im Überschuss vor und wirkt nicht mehr reaktionslimitierend. Jedoch vermindert die Anreicherung des Oxidationsmittels die Enzymaktivität, was sich in der Enantioselektivität bemerkbar macht.



**Abb. 4.24.** Links: Der Enantiomerenüberschuss in der *AaP*-katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol bei unterschiedlichen TBHP-Konzentrationen im gesamten Reaktionszeitraum. Rechts: Die Entstehung von Methylphenylsulfon in Abhängigkeit von der TBHP-Konzentration nach 3 h (●) und 8 h (□) Reaktionszeit (M 7.5.3.1 a).

Der Enantiomerenüberschuss, der sich für das (*R*)-Methylphenylsulfoxid einstellt, ist in der enzymkatalysierten Oxidation stark von der Konzentration des Oxidationsmittels abhängig (Abb. 4.24, links). In der Anfangsphase der Reaktion haben sich für 0,4 mM, 0,75 mM und 1,5 mM TBHP ee-Werte von 70 %, 72 % und 73 % eingestellt. Die ee-Werte für 3 mM und 5 mM TBHP betragen zu diesem Reaktionszeitpunkt schon 78 % und 83 %.

Betrachtet man alle ee-Wert-Entwicklungen über die Zeit, ist anzunehmen, dass sich in der Anfangsphase der Reaktion ein ee-Wert um 70 % eingestellt haben muss, unabhängig von der TBHP-Konzentration. Die Reaktion mit TBHP ist somit deutlich unselektiver als die mit Wasserstoffperoxid. Die anfangs geringe Enantioselektivität zu Reaktionsbeginn nahm mit zunehmendem Reaktionsfortschritt zu. Hierbei ist zu beobachten, dass die Zunahme des ee-Wertes bei einer TBHP-Dosierung von  $0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  und  $0,75 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  exponentiell abließ. Bei der  $1,5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  Dosierung sah es zunächst auch nach einem exponentiellen Anstieg des ee-Wertes aus, bis sich ein maximaler Enantiomerenüberschuss von 91 % eingestellt hat. Durch weitere Nachdosierung des Oxidationsmittels konnte dieser Wert nicht merklich erhöht werden.

Die ee-Werte bei der 3-mM- und 5-mM-Dosierung befanden sich schon in der Anfangsreaktionszeit im Sättigungsbereich. Der Enantiomerenüberschuss konnte über den gesamten Reaktionszeitraum nur marginal erhöht werden. Die ee-Werte für die 3-mM- und 5-mM-Dosierung von TBHP betragen am Ende der Reaktion 91 %. Dieser Wert wurde auch nach einer Reaktionszeit von 24 h ermittelt, was eindeutig auf die Desaktivierung der *AaP* zurückzuführen ist. Ein Enantiomerenüberschuss von  $> 99 \%$  konnte für die TBHP-Dosierung von  $0,75 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  nach 10 h Reaktionszeit erreicht werden. Die Dosierung geringerer Konzentrationen TBHP wirkt reaktionslimitierend, jedoch nicht enzymdesaktivierend, so dass ein ee-Wert  $> 99 \%$  auch mit der Dosierung von  $0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  TBHP möglich ist.

Die geringe Enantioselektivität unter den Anfangsreaktionsbedingungen lässt sich nicht auf die unselektive spontane Oxidation des Thioanisols mit TBHP zurückführen. Eine Oxidation von 1 mM Thioanisol mit  $3 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  und 25 mM TBHP führten bei Abwesenheit der Peroxidase zu keiner Umsetzung des Thioanisols und somit ist kein racemisches Methylphenylsulfid entstanden (M 7.5.3.1 b, c).

Der Grund für den Anstieg des Enantiomerenüberschuss ist wie bei der Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Sulfonentstehung (Abb. 4.24, rechts). Hier gilt, je höher die TBHP-Konzentration ist, desto größer ist der Thioanisolumsatz und desto eher beginnt die Umsetzung des Sulfoxids zum Sulfon, was mit der Erhöhung des Enantiomerenüberschuss einhergeht. Da hohe TBHP-Konzentrationen ( $\geq 1,5 \text{ mM}$ ) zur Enzymdesaktivierung führen, kam es im fortgeschrittenen Reaktionsverlauf zur Umsatzverminderung, sowohl in der Thioanisoloxidation als auch in der Sulfoxidoxidation. Die Dosierung mit  $0,75 \text{ mM}$  TPHP pro Stunde liegt im Optimum der zu wählenden Parameter. Diese Konzentration führte unter den gewählten Bedingungen nicht zur Enzyminhibierung, so dass der schnellste Umsatz und ein ee-Wert  $> 99 \%$  nach 10 h Reaktionszeit erreicht wurde.

#### 4.4.2.3 Der Vergleich der enantioselektiven Sulfoxidation von Thioanisol mit $\text{H}_2\text{O}_2$ und TBHP

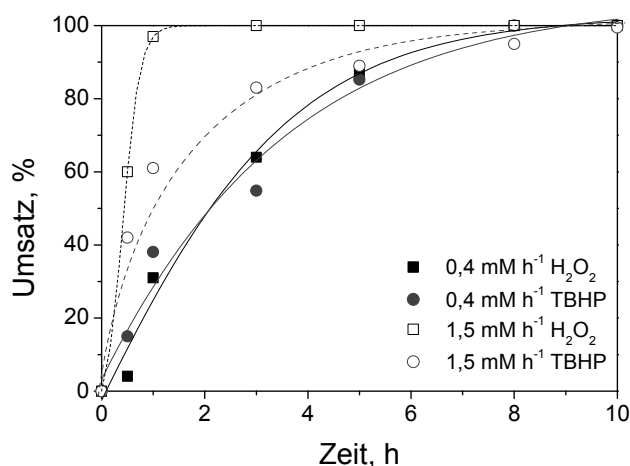


Abb. 4.25. Vergleich der Umsätze von 1 mM Thioanisol in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TBHP (M 7.5 a, M 7.5.3.1 a).

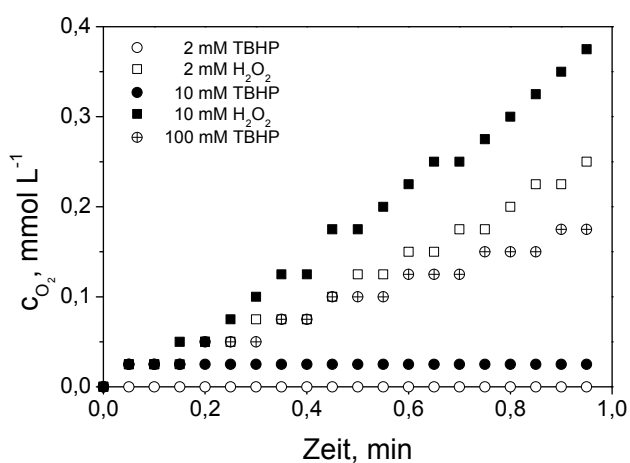
Der Umsatz in der *AaP*-katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TBHP ist in dem Diagramm der Abbildung 4.25 dargestellt. Mit einer Konzentration von  $0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  wirken beide Oxidationsmittel aufgrund ihrer niedrigen Konzentration limitierend auf den Umsatz. In diesem Konzentrationsbereich unterscheiden sich die beiden Oxidationsmittel im Thioanisolumsatz nicht. Allerdings gibt es starke Unterschiede in der Enantioselektivität, wie in Tabelle 4.9 gezeigt ist

Eine Konzentrationserhöhung auf  $1,5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  Oxidationsmittel zeigt, dass der Umsatz mit Wasserstoffperoxid deutlich schneller ist, als der mit TBHP. Hier kommt der Effekt der höheren katalytischen Effizienz des  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Geltung, die mit  $3,5\cdot 10^5 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$  140 Mal größer ist, als die des TBHP ( $2,5\cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ). Auch die Enantioselektivität des  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist zu Beginn der Reaktion größer als die des TBHPs. Jedoch führten diese Konzentrationen von Wasserstoffperoxid in der Oxidation des Methylphenylsulfoxid zur scheinbaren Enzyminhibition, so dass die enzymkatalysierte Oxidation des Methylphenylsulfoxids gestoppt wird und es zu keiner Steigerung des ee-Wertes kommen kann. Wie oben gezeigt, führt auch die Oxidation mit  $1,5 \text{ mM}$  TBHP zur scheinbaren Desaktivierung der *AaP*, so dass ein ee-Wert  $> 99 \%$  auch hier nicht erreicht werden kann. Um einen schnellen Umsatz und gleichzeitig hohe ee-Werte zu gewährleisten, ist es sinnvoll den Thioanisolumsatz zu überwachen. Bis zu einem vollständigen Thioanisolumsatz kann eine hohe Dosierung des Oxidationsmittels gewählt werden. Sobald es zum vollständigen Umsatz des Thioanisols kommt, muss die Konzentration des Oxidationsmittels verringert werden (s. Kapitel 4.4.1.2).

**Tab. 4.9.** Die ee-Werte der Sulfoxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TBHP im Vergleich (M 7.5 a, M 7.5.3.1 a).

t, h	ee-Werte, %			
	$0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	$0,4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ TBHP	$1,5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	$1,5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ TBHP
1	83	70	83	73
5	84	75	85	79
8	89	78	85	91
10	96	90	85	92

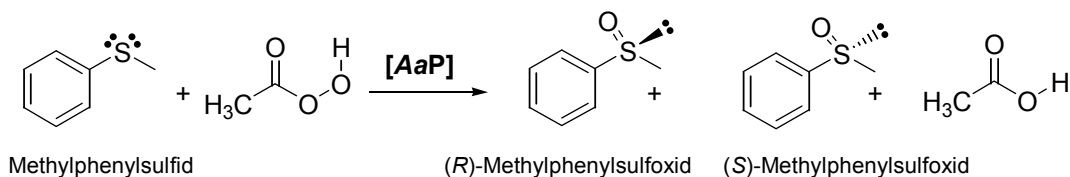
#### 4.4.2.4 Die *AaP*-katalysierte Disproportionierung von TBHP



**Abb. 4.26.** Die Sauerstoffbildung bei der Disproportionierung von TBHP und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalysiert durch  $72 \text{ nM}$  *AaP* (M 7.4.5.4).

Die *AaP*-katalysierte Zersetzung von TBHP zu *tert*-Butanol und Sauerstoff ist erst bei hohen TBHP-Konzentrationen zu beobachten (Abb. 4.26). Die Katalasetyp-Aktivität ist gegenüber TBHP kaum ausgeprägt, was auch schon bei der CPO-katalysierten TBHP-Zersetzung beobachtet wurde [Manoj 2001]. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit einer  $100 \text{ mM}$  TBHP-Zersetzung, die durch  $72 \text{ nM}$  *AaP* katalysiert wurde, entspricht der *AaP*-katalysierten Disproportionierung von  $1 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. erreicht nur  $44,9 \%$  der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Zersetzung von  $10 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 4.4.3 Peressigsäure als Oxidationsmittel



**Abb. 4.27.** Die *AaP*-katalysierte Sulfoxidation von Thioanisol mit Peressigsäure.

Die Ergebnisse der enzymkatalysierten Sulfoxidation mit der Peressigsäure (Tab. 4.10) zeigen deutlich, dass dieses Oxidationsmittel auf das Enzym stark desaktivierend wirkt. Der Umsatz ist kleiner als der mit Wasserstoffperoxid. Der sinkende Enantiomerenüberschuss vom (*R*)-Methylphenylsulfoxid deutet auf eine zunehmende Bildung racemischen Produktes hin. Die katalysierte Oxidation des Methylphenylsulfoxid zum Methylphenylsulfon wurde nicht festgestellt.

**Tab. 4.10.** Die *AaP*-katalysierte Oxidation von 5 mM Thioanisol mit 1,5 mM·(2 h)<sup>-1</sup> Peressigsäure im Vergleich zur Oxidation mit 1,5 mM·(2 h)<sup>-1</sup> Wasserstoffperoxid (M 7.5.3.2).

Zeit, h	Peressigsäure		Wasserstoffperoxid	
	U, %	ee-Wert, %	U, %	ee-Wert, %
5	37	54	45	84
10	56	49	100	87

Durch den katalytischen Umsatz der Peressigsäure entsteht Essigsäure als Produkt. Schon bei der Bildung der Compound I geht Essigsäure aus dem Sauerstofftransfer hervor. Eine zusätzliche *AaP*-katalysierte Disproportionierung des Oxidationsmittels würde ein zweites Molekül Essigsäure hervorbringen. Die Untersuchungen zum pH-Wert-Einfluss auf die Enzymaktivität haben gezeigt, dass die Enzymaktivität ab einem pH-Wert < 4 stark reduziert wird. Bei der CPO kommt es im sauren Bereich zu einer Änderung der Koordination in der Hämstruktur. Das Häm-Eisen fällt von dem high-spin in den low-spin Zustand und verliert somit die Funktion der katalytischen Wirkung. Der Einfluss der pH-Wertminderung durch die Entstehung der Essigsäure konnte im Puffer nicht gemessen werden. Es kam zu keinem Abfall des pH-Wertes. Die Essigsäureentstehung findet jedoch direkt am aktiven Zentrum statt, so dass es dort zu einer lokalen pH-Wertsenkung kommen kann, die dann wahrscheinlich die Desaktivierung der Häm-Verbindung hervorruft. Es ist zu vermuten, dass sich die gebildete polare Essigsäure in polaren Bereichen des Enzymproteins anreichert, insbesondere das aktive Zentrum des Enzyms besitzt eine sehr polare Proteinumgebung. Andererseits kann es durch Wechselwirkungen der Essigsäure mit essentiellen Aminosäureresten des Proteins kommen, was zu Strukturveränderungen und Funktionsverlust führt.

### 4.5 Selektive Oxidation mit molekularem Sauerstoff unter Anwesenheit eines Reduktionsmittels

#### 4.5.1 Einleitung

Alle Häm-Peroxidasen sind für ihre geringe Reaktionsstabilität gegenüber Peroxiden als Oxidationsmittel bekannt. Dosierungsstrategien sind nötig, um zum einen die Konzentration des Oxidationsmittels so gering zu halten, dass das aktive Zentrum der Peroxidasen nicht desaktiviert wird, und zum anderen, um genau die Menge des notwendigen Oxidationsmittels bereitzustellen, das für die Oxidationsreaktion, die durch die Peroxidase katalysiert wird, benötigt wird.

Eine sehr attraktive Alternative, um die Desaktivierung des Enzyms zu umgehen, ist der Ersatz der Peroxide als Oxidationsmittel durch Sauerstoff in Kombination mit einem Reduktionsmittel. Auf diese Weise funktioniert die Peroxidase wie eine Monooxygenase, nur ohne ein kostspieliges Kofaktorsystem. Der Sauerstoff kann aus der Umgebung genutzt werden und die Kosten des Wasserstoffperoxids werden durch die Kosten des Reduktionsmittels ersetzt. Schon im Jahre 1957 wurde gezeigt, dass die Meerrettichperoxidase (HRP) in Gegenwart von Sauerstoff und Dihydroxyfumarsäure (DHFA) als Reduktionsmittel die Hydroxylierungsreaktion aromatischer Substrate katalysiert [Manson 1957, Buhler 1961].

Van de Velde et al. zeigten, dass mit der CPO die Oxidation von Thioanisol zum (*R*)-Methylphenylsulfoxid mit Sauerstoff in Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie Dihydroxyfumarsäure (DHFA), Ascorbinsäure (AS) oder 1,2-Diphenylhydrazin selektiv katalysiert werden kann (ee-Wert > 99%) [van de Velde 1999].

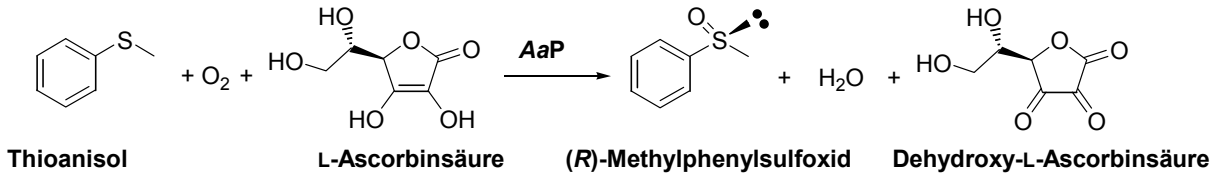
Aufgrund der in der aeroben CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion erreichten hohen Regio- und Enantioselektivität kann der Reaktionsmechanismus nicht über die Wirkung von Hydroxyradikale erklärt werden, wie es für die HRP-katalysierte Hydroxylierungsreaktion postuliert wurde [Dordick 1986]. Van de Velde stellt die Hypothese auf, dass Wasserstoffperoxid durch die Autoxidation von DHFA entsteht (s. Kapitel 3.2.6).

Pasta et al. [Pasta 1999] untersuchten die CPO-katalysierte enantioselektive Oxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid, dem DHFA/O<sub>2</sub>- und dem AS/O<sub>2</sub>-System in Hinblick auf die Selektivität, Produktivität und Stabilität der CPO gegenüber den unterschiedlichen Oxidationsmitteln. Sie konnten zeigen, dass mit der Ascorbinsäure in Gegenwart von Sauerstoff die beste Enantioselektivität erhalten werden konnte. Pasta et al. postulierte die Oxidation mit Sauerstoff in der CPO-katalysierten Sulfoxidation über einen Monooxygenase-Mechanismus, bei dem zunächst das Häm-Eisen der CPO durch die Ascorbinsäure zu Fe(II) reduziert wird, dass dann von Sauerstoff oxidiert wird und in die Compound II übergeht [Pasta 1998].

In Bezug auf die *AaP*-katalysierte Reaktion ist es zum einen interessant zu testen, ob die Möglichkeit besteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Sauerstoff als Oxidationsmittel zu ersetzen. Zum anderen besteht die Chance auf ein näheres Verständnis über die Funktionsweise der neuartigen Peroxidase.

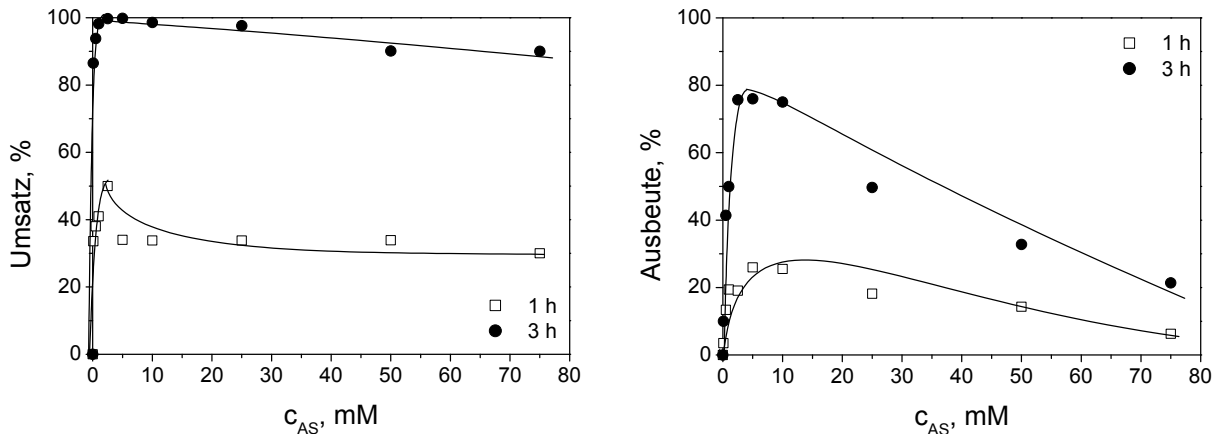
#### 4.5.2 Die Oxidation von Thioanisol mit Sauerstoff in Anwesenheit von Ascorbinsäure

Schon in den ersten Testreaktionen zeigte sich, dass auch in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Ascorbinsäure (AS) im hohen Überschuss (*R*)-Methylphenylsulfoxid gebildet wird (Abb. 4.28).



**Abb. 4.28.** Die enantioselective Oxidation von Thioanisol mit dem Luftsauerstoff-Ascorbinsäure-System katalysiert durch *AaP*.

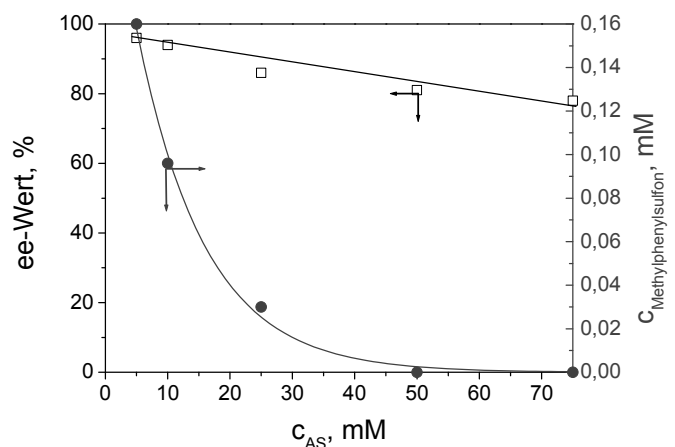
Neben der enantioselectiven Bildung des Sulfoxides wird auch die Bildung des Sulfons durch die *Agrocybe aegerita* Peroxidase in Gegenwart von Ascorbinsäure katalysiert.



**Abb. 4.29.** Umsatz und Ausbeute der *AaP*-katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit Ascorbinsäure (0,01 – 75 mM) nach 1 h (□) und 3 h (●) Reaktionszeit (M 7.5.3.3 a).

Zunächst soll der Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration diskutiert werden. Die Abbildung 4.29 zeigt, dass sich der Verlauf der Ausbeute stark vom Reaktionsumsatz unterscheidet. Im Konzentrationsbereich bis 5 mM Ascorbinsäure findet eine rapide Reaktionssteigerung statt. Der Umsatz und auch die Ausbeute erreicht bei 5 mM AS das Maximum. Die starke Abweichung zwischen dem Umsatz und der Ausbeute zeigt, dass die Oxidation mit dem Sauerstoff-AS-System nicht so selektiv ist wie die Oxidation mit Wasserstoffperoxid. Der Umsatz des Ausgangsstoffes fällt mit der Erhöhung des Reduktionsmittelgehaltes leicht ab, die Ausbeute an Sulfoxid und Sulfon nimmt jedoch ab einer AS-Konzentration von 5 mM im hohen Ausmaß ab. Der ee-Wert, der bei der Oxidation mit dem Sauerstoff-Ascorbinsäure-System erhalten wird, unterscheidet sich nicht von dem ee-Wert der Oxidation mit Wasserstoffperoxid (Abb. 4.30).

Die Enantioselectivität ist wie bei der Oxidation mit  $H_2O_2$  vom Umsatz des Sulfoxids zum Sulfon abhängig. Der ee-Wert nahm, wie bei der Oxidation mit Wasserstoffperoxid, mit steigendem Gehalt an Ascorbinsäure ab.



**Abb. 4.30.** Der Einfluss der Ascorbinsäurekonzentration auf die Bildung von Methylphenylsulfon (●) und die Enantioselectivität (□) nach 8 h Reaktionszeit (M 7.5.3.3 a).

## 4 Ergebnisse

In Abbildung 4.30 ist der Zusammenhang zwischen der Sulfoxidbildung und der Enantioselektivität in Abhängigkeit von der Ascorbinsäurekonzentration dargestellt. Die Produktbildung wurde mit zunehmendem Gehalt an AS gehemmt, was sich negativ auf den ee-Wert auswirkte.

Versuche unter anaeroben Bedingungen haben gezeigt, dass es bei Anwesenheit von 5 mM Ascorbinsäure nicht zur *AaP*-katalysierten Umsetzung von Thioanisol kam (M 7.5.3.5).

In Abwesenheit der *AaP* kam es zur Thioanisolumsetzung, jedoch wurden nur sehr geringe Mengen racemisches Sulfoxid gebildet (M 7.5.3.3 b). Die Tatsache, dass die nichtkatalysierte Thioanisoloxidation in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid stattfindet, ist ein Indiz für die *in situ*-Generierung von Wasserstoffperoxid als Folge der Autoxidation der Ascorbinsäure.

Nach van de Velde ist davon auszugehen, dass die gelöste Ascorbinsäure unter Sauerstoffeinfluss der Autoxidation unterliegt [van de Velde 1999]. Dabei kommt es zur Bildung von protonierten Hyperoxidanionradikalen, die in Hydroxyradikale übergehen können. Zusätzlich werden bei der Autoxidation der Ascorbinsäure Monodehydroxyascorbinsäureradikale gebildet (s. Anhang, Abb. 9.5). Die Ascorbinsäureradikale werden radikalisch unter Einwirkung von Sauerstoff zu Dehydroxyascorbinsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid wird von der *Agrocybe aegerita* Peroxidase genau wie von der CPO für die enantioselektive Sulfoxidation von Thioanisol verwendet. Das erklärt auch, dass die Enantioselektivität nicht verbessert wurde, da *in situ* gebildetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor dient.

Unter der Verwendung geringer AS-Konzentrationen (bis 5 mM, bei der Oxidation von 1 mM Thioanisol von 360 nM *AaP*) konnte keine Inhibierung der *AaP* beobachtet werden, was ein Einbruch in der Enantioselektivität gezeigt hätte. Van de Velde zeigte durch eine photometrische Messung, dass die CPO nicht wie die HRP durch die Ascorbinsäure reduziert wird [van de Velde 1999]. Das schließt den Mechanismus nach Pasta et al. aus, dass die Sauerstoffübertragung über den Monooxygenase-Mechanismus durch die CPO katalysiert wird [Pasta 1999].

Mit zunehmendem Gehalt an Ascorbinsäure nimmt neben der Ausbeute auch die Selektivität der Reaktion stark ab. Da der Umsatz des Thioanisols nur leicht zurückgeht, ist davon auszugehen, dass es zu nicht katalysierten Nebenreaktionen kommt, in denen Thioanisol zu Nebenprodukten umgesetzt wurde und es vermehrt zur Bildung von racemischen Methylphenylsulfoxid kommt. Es ist anzunehmen, dass dabei auch die Hydroxyradikale, die sekundär bei der Autoxidation frei werden, eine Rolle spielen und die Reaktionspartner unselektiv hydroxylieren. Durch Zusätze von Radikalfängern, wie Mannitol oder Trolox-C<sup>TM</sup>, könnte die unselektive Oxidation verhindert werden und das Enzym vor Radikalen geschützt werden, wie es van de Velde erfolgreich an der CPO-katalysierten Indoloxidation gezeigt hat [van de Velde 1999].

**Tab. 4.11. Vergleich der *AaP*-katalysierten Thioanisolumsetzung mit unterschiedlichen Oxidationssystemen (M 7.5.3.4).**

0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 5 mM AS	75	100	100	Umsatz, %
5 mM AS	34	99	100	
0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40	75	89	
	1	3	5	Zeit, h
0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 5 mM AS	83	87	94	ee-Wert, %
5 mM AS	83	83	88	
0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	83	83	84	

Zusätzlich wurde der Einfluss von Ascorbinsäure in der *AaP*-vermittelnden Sulfoxidation mit 0,4 mM·h<sup>-1</sup> Wasserstoffperoxid untersucht. Im Vergleich zur reinen Wasserstoffperoxid-



dosierung und der reinen Oxidation mit Luftsauerstoff in Anwesenheit von Ascorbinsäure kann die Umsatzgeschwindigkeit in der Reihenfolge  $\text{H}_2\text{O}_2 < \text{AS}/\text{O}_2 < \text{H}_2\text{O}_2/\text{AS}/\text{O}_2$  gesteigert werden (Tab. 4.11).

Die Ausbildung des Enantiomerenüberschusses ist in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion stark vom Umsatz abhängig. So konnte schon nach 5 h Reaktionszeit mit dem kombinierten Oxidationssystem ein ee-Wert von 94 % erhalten werden. Auch hier zeigte sich, dass bei der Verwendung der Ascorbinsäure das Enzym nicht desaktiviert wurde. Die zusätzliche Zugabe von Wasserstoffperoxid zu dem  $\text{AS}/\text{O}_2$ -System führte zu einer Erhöhung der *AaP*-Aktivität in der Umsetzung von Thioanisol.

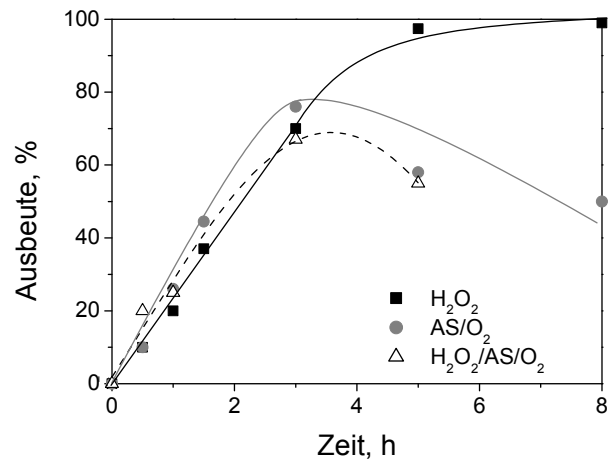
Die *in situ* Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Autoxidation der Ascorbinsäure gewährleistet ein permanentes Reservoir an notwendigen Oxidationsmittel für die enantioselektive Sulfoxidation, die durch die *AaP* katalysiert wird. Die manuelle Nachdosierung von Wasserstoffperoxid nach festgelegten Zeitpunkten wirkt zwar reaktionslimitierend, verhindert aber eine Überdosierung des Oxidationsmittels. Die Chemoselektivität, die sich in den Ausbeuten widerspiegelt (Abb. 4.31), zeigt, dass die manuelle Wasserstoffperoxid dosierung der Oxidation mit dem *in situ* erzeugten Wasserstoffperoxid aus der AS-Autoxidation vorzuziehen ist.

In der unter Anwesenheit von Ascorbinsäure durchgeführten Oxidation wurde weniger gewünschtes Produkt gebildet. Die verminderte Ausbeute, die in der Oxidation mit dem  $\text{AS}/\text{O}_2$  erhalten wurde, lässt auf die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten schließen. Die Radikale, die durch die Autoxidation der Ascorbinsäure gebildet werden, sorgen für eine unselektive Umsetzung aller an der Reaktion beteiligten Moleküle.

#### 4.5.3 Die Stabilität der *Agrocybe aegerita* Peroxidase gegenüber der Ascorbinsäure

Um die Stabilität der *Agrocybe aegerita* Peroxidase gegenüber der Ascorbinsäure zu ermitteln, wurde die Lagerstabilität des Enzyms in Anwesenheit von AS untersucht. Dabei wurden 92 nM *AaP* zusammen mit 0,1 mM AS in Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) bei Raumtemperatur gelagert (M 7.3.2.6). Die Halbwertszeit der *AaP* in Gegenwart von 0,1 mM AS beträgt 11,6 Tage. Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit der *AaP* in der Pufferlösung 50 Tage.

Die Verminderung der Halbwertszeit um 77 % durch die Inkubation der *AaP* mit 0,1 mM Ascorbinsäure kann auf die bei der Autoxidation der Ascorbinsäure entstehenden Produkte zurückgeführt werden. Wasserstoffperoxid entsteht dabei als Nebenprodukt. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym die Zersetzung von Wasserstoffperoxid katalysiert, was zur Desaktivierung des Enzyms führt.



**Abb. 4.31.** Die Ausbeute an Produkten bei der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol mit unterschiedlichen Oxidationssystemen unter gleichen Bedingungen (M 7.5.3.4).

Zusätzlich kommt das Enzymprotein in Kontakt mit den Radikalen, die bei der Autoxidation der Ascorbinsäure entstehen, was zur Modifizierung der Proteinoberfläche führen kann und somit die Funktion und Aktivität des Enzyms verändert.

Der Einfluss höher Ascorbinsäurekonzentrationen auf die *AaP* konnte nicht untersucht werden, da die Absorption der Ascorbinsäure im photometrischen Assay zu groß war und somit die Aktivitätsmessungen unmöglich machte. Auf HPLC-Messungen wurde zugunsten anderer Untersuchungen in Hinblick auf die präparative Nutzung der *AaP* verzichtet.

### 4.6 Der Zusatz von Co-Solventien

#### 4.6.1 Einleitung

Die biologische Funktion der Enzyme ist auf wässrige Systeme spezialisiert. Enzyme katalysieren Reaktionen in diesen Systemen, während die Substratkonzentration vergleichsweise klein ist ( $< 10$  mM). Für den Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese ist die Verwendung höherer Substratkonzentrationen erforderlich, um gute Raum-Zeit-Ausbeuten zu erhalten und somit die Prozesskosten zu reduzieren.

Oft handelt es sich bei den Verbindungen, die in dem enzymkatalysierten Prozess eingesetzt werden, um hydrophobe Moleküle, die gar nicht oder sehr schlecht in Wasser löslich sind. Thioanisol, das Modellsubstrat dieser Arbeit, ist sehr schlecht in Wasser löslich. Durch kräftiges Durchmischen lag Thioanisol als Emulsion in dem herkömmlichen Reaktionsprozess vor und war der *AaP* als Substrat zugänglich. Durch Zugabe geeigneter wasserlöslicher organischer Lösungsmittel ist es möglich die Löslichkeit und Diffusionseigenschaften hydrophober Substrate zu verbessern. Dadurch kann zum einen die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum des Enzyms erleichtert werden und zum anderen wird durch den Zusatz von Co-Solventien die Reaktivität und Selektivität des Enzyms verändert.

Bei der CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktionen hat sich *t*-Butanol als Co-Solvent etabliert. Die Reaktionen werden in einem Gemisch aus Pufferlösung und *t*-Butanol (50:50 (v/v)) durchgeführt [van Deurzen 1996].

#### 4.6.2 Der Einfluss wassermischbarer Lösungsmittel auf die Enzymaktivität

Es wurden eine Reihe wassermischbarer organischer Lösungsmittel im Standardassay der *AaP* getestet, die in Abbildung 4.32 nach steigendem log P-Wert<sup>d</sup> (n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) aufgeführt sind. Bezogen auf die Enzymaktivität, die ohne den Zusatz eines Co-Solvents erhalten wurde, setzten alle verwendeten Lösungsmittel die Enzymaktivität herab. Ein Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und dem Einfluss auf die Enzymaktivität ist nicht zu erkennen. Es wird deutlich, dass schon ein Gehalt von 5 % (v/v) Lösungsmittel die Aktivität der *AaP* erheblich verringert. Die natürliche Enzymaktivität blieb bei der Anwesenheit von 5 % (v/v) Triethylenglycol (TEG), Acetonitril und Aceton als Co-Solvent nahezu erhalten. In Hinblick auf die Umweltverträglichkeit bei der Verwendung von Co-Solventien scheiden Acetonitril und Aceton als Löslichkeitsvermittler aus. Acetonitril wird gesundheitlich und ökotoxikologisch als bedenklich eingestuft. Beide Lösungsmittel, insbesondere Aceton, besitzen zudem einen sehr hohen Dampfdruck, was in der Funktion als Co-Solvent nachteilig ist.

---

<sup>d</sup> Der log P-Wert ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen zwei nicht mischbaren Phasen im Verhältnis von P. Als Lösungsmittel werden oft Wasser und Octanol verwendet. Der log P-Wert wird als Maß für das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie einer Substanz verwendet [Hansch 1995].

Für die weiteren Untersuchungen von Co-Solventien in der enzymkatalysierten Sulfoxidation kamen daher neben Triethylenglycol auch Propylencarbonat (PPC), *t*-Butanol und dem TEG verwandten Ethylenglycol (EG; in Abb. 4.32 nicht dargestellt) zum Einsatz (Abb. 4.33).

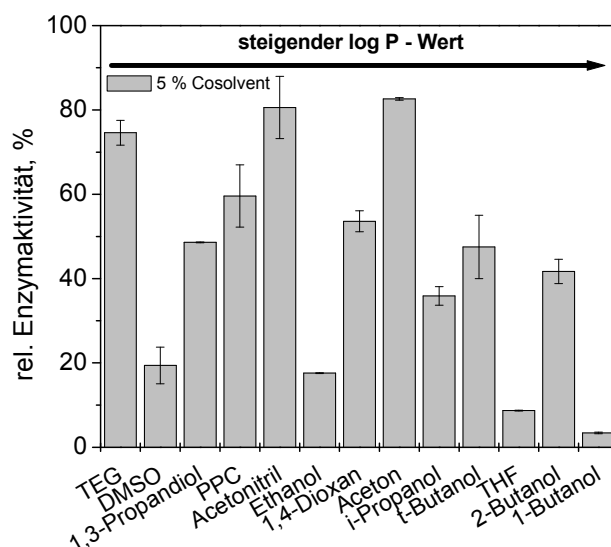


Abb. 4.32. Der Einfluss von 5 % (v/v) Lösungsmittel (von links: Abnahme der Polarität) auf die Enzymaktivität im Veratrylalkohol-Assay (M 7.3.1.1).

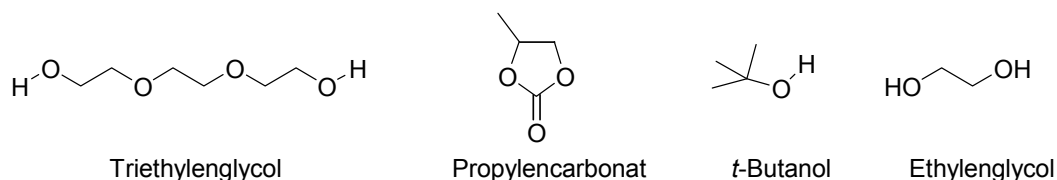


Abb. 4.33. Die verwendeten Co-Solventien.

Neben den wassermischbaren organischen Lösungsmitteln wurde auch der Effekt halogenfreier wassermischbarer Ionischer Flüssigkeiten ([BMIM][BF<sub>4</sub>], [ECOENG 41M], [ECOENG 500], [ECOENG 212], [EMIM][TOS] und 4-Methylethylpyridiniumdiethylphosphat) auf die Enzymaktivität untersucht (M 7.3.1.1). Alle eingesetzten Ionischen Flüssigkeiten wirkten desaktivierend auf die *AaP*. Im Standardassay der *AaP* konnte bei Anwesenheit von 5 % (v/v) IL keine Enzymaktivität gemessen werden.

Über photometrische Messungen wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von 0,1 mM Thioanisol mit 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalysiert durch 0,62 nM *AaP*, in Abhängigkeit der Co-Solvent-Zusätze bestimmt (Abb. 4.34). In Abbildung 4.34 sind die Aktivitäten, die durch den Zusatz von 5 % (v/v) Co-Solvent verursacht worden sind, relativ zur Enzymaktivität, ohne den Zusatz von Co-Solventien, dargestellt. Wie in dem Veratrylalkohol-Assay (Abb. 4.32) wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation durch den Zusatz wassermischbarer Lösungsmittel in der Reihenfolge Propylencarbonat > Ethylenglycol > Triethylenglycol > *t*-Butanol herabgesetzt. Der Zusatz von 5 % (v/v) Co-Solvent hat jedoch in der Sulfoxidation von Thioanisol einen anderen Einfluss auf die *AaP*-Aktivität als in der Oxidation von Veratrylalkohol.

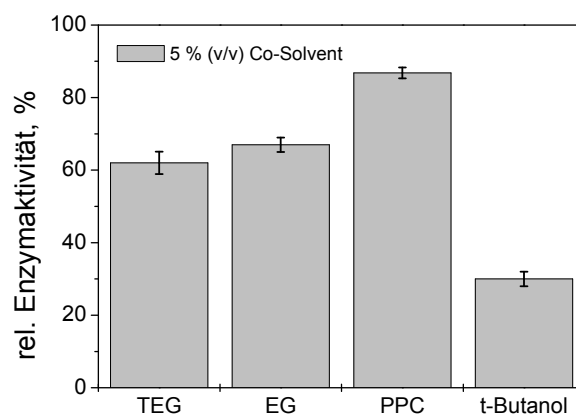
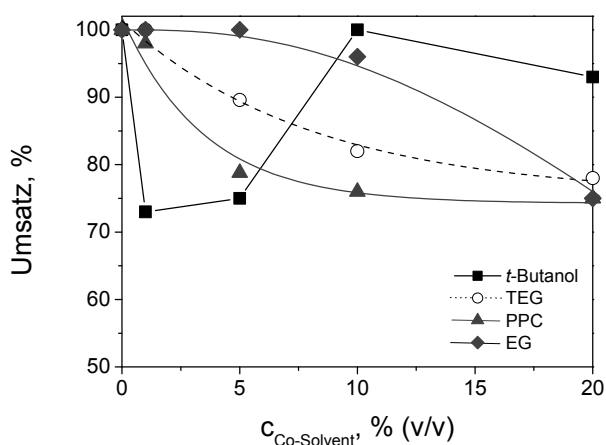


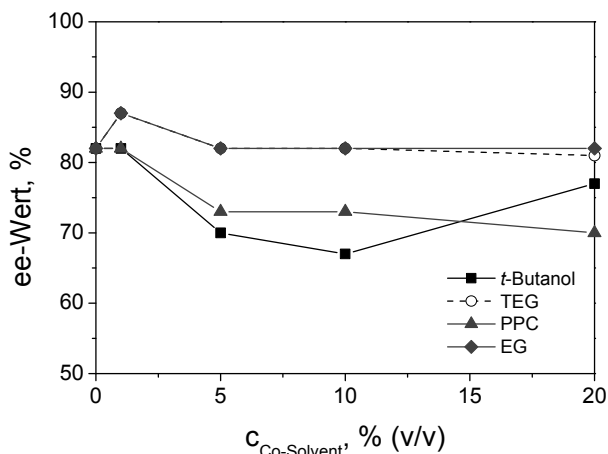
Abb. 4.34. Der Einfluss von 5 % (v/v) Lösungsmittel im Thioanisolassay (M 7.3.2.5).

Triethylenglycol und *t*-Butanol bewirkten im Thioanisol-Assay eine stärkere Aktivitätsverminderung (TEG um 38 % und *t*-Butanol um 70 %, anstatt 25 % und 52 % im Standardassay). Mit dem Zusatz von 5 % (v/v) Propylencarbonat konnte in der Sulfoxidation jedoch eine höhere Enzymaktivität erhalten werden als in der Vertryalalkoholoxidation (Herabsetzung der Aktivität im Thioanisol-Assay um 13 %, anstatt 40 % im Vertryalalkohol-Assay).

#### 4.6.3 Der Einsatz von Co-Solventien in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation



**Abb. 4.35.** Der Umsatz in Abhängigkeit des Co-Solvent-Gehaltes nach 13,5 h (M 7.5.2 a, b).



**Abb. 4.36.** Der Enantiomerenüberschuss in Abhängigkeit des Co-Solvent-Gehaltes nach 13,5 h (M 7.5.2 a, b).

dargestellt. Ohne den Zusatz eines Löslichkeitsvermittlers wurde nach 13,5 h ein ee-Wert von 82 % erhalten. Es ist zu erkennen, dass der Zusatz von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln die Selektivität der *AaP* nicht positiv beeinflusst. Die leichte Zunahme des ee-Wertes bei 1 % TEG und EG resultiert, wie oben schon erwähnt, aus der fortgeschrittenen Sulfonbildung. Der Enantiomerenüberschuss bei den beiden Glykolen bleibt mit ansteigendem Gehalt nahezu konstant. Dagegen wird die Selektivität in der Thioanisoloxidation mit zunehmendem PPC-Gehalt vermindert. Da dieser Effekt mit der Abnahme des Umsatzes einhergeht, kann man davon ausgehen, dass die *AaP* durch PPC deaktiviert wird. Das racemische Methylphenylsulfoxid aus der nicht katalysierten Oxidation von Thioanisol führte zur Verringerung des ee-Wertes. Mit zunehmendem Lösungsmittelgehalt wird auch die

Der Einfluss der vier ausgewählten wassermischbaren Lösungsmittel wurde in der *AaP*-katalysierten Umsetzung von 10 mM Thioanisol mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel untersucht. Es wurde festgestellt, dass mit steigendem Lösungsmittelgehalt die Reaktivität abnahm (Abb. 4.35). Nach 13,5 h wurde Thioanisol ohne Lösungsmittelzusatz vollständig umgesetzt. Durch den Zusatz von 1 % (v/v) TEG und EG konnte eine leichte Umsatzsteigerung erzielt werden. So wurde schon nach 12 h bei einem Zusatz von 1 % TEG und EG der vollständige Umsatz von Thioanisol erreicht. Diese leichte Umsatzsteigerung machte sich in der Ausbildung des Enantiomerenüberschusses bemerkbar (Abb. 4.36). Nach 13,5 h konnte in Anwesenheit von 1 % TEG und EG ein ee-Wert von 87 % erhalten werden, der aus der fortgeschrittenen Umsetzung zum Sulfon resultierte. Mit steigender Co-Solvent-Konzentration nimmt die *AaP*-katalysierte Umsetzung von Thioanisol in der Reihenfolge Ethylenglycol > Triethylenglycol > Propylencarbonat ab. *t*-Butanol hat einen völlig anderen Einfluss auf die *AaP*-katalysierte Umsetzung von Thioanisol und wird deshalb gesondert diskutiert.

In Abbildung 4.36 sind die ee-Werte in Abhängigkeit vom Co-Solventgehalt

nichtkatalysierte Oxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid gehemmt. In Blindversuchen konnte belegt werden, dass ab einem Gehalt von 50 % (v/v) Co-Solvent die nichtkatalysierte Oxidation unterdrückt werden kann (M 7.5.2 d).

In dem Umsatz-Zeit-Diagramm der unterschiedlichen TEG-Zusätze (Abb. 4.37) ist zu sehen, wie mit steigendem Co-Solvent-Gehalt das Enzym desaktiviert wird. Eine Desaktivierung des Enzyms, ausgelöst durch eine lokale Überdosierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kann hier ausgeschlossen werden, da 1 mM Thioanisol mit einer reaktionslimitierenden Wasserstoffperoxid-Dosierung ( $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ ) durch 360 nM *AaP* katalysiert wurde. Im Abschnitt 4.4.1.3 konnte gezeigt werden, dass es bei der *AaP*-katalysierten Oxidation von 1 mM Thioanisol mit 1 mM Wasserstoffperoxid zu keiner Zersetzung des Oxidationsmittels kam, was für die Enzyminhibierung verantwortlich sein könnte.

Bei der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol wurde bis zu einem TEG-Gehalt von 80 % ein Enantiomerenüberschuss von 82 % erreicht. Dieser blieb konstant, was eine nicht katalysierte Sulfoxidation im Hintergrund ausschließt. Bis zu einem Gehalt von 50 % (v/v) TEG war der ee-Wert aufgrund der Weiteroxidation zum Sulfon erhöht. Bei einem Zusatz von 80 % (v/v) wurde die Sulfonbildung nicht mehr beobachtet.

*t*-Butanol beeinflusste die *AaP*-katalysierte Oxidation nicht kongruent zu den anderen Lösungsmitteln, die als Co-Solventen zum Einsatz kamen. Schon ein Gehalt von 1 % *t*-Butanol setzte den Umsatz um fast 30 % herab (Abb. 4.35). Die Zunahme der *t*-Butanol-Konzentration führte zur Umsatzsteigerung bis zu einem Gehalt von 10 % (v/v) *t*-Butanol. Bei dieser *t*-Butanolkonzentration wurde der vollständige Umsatz von Thioanisol erreicht. Eine weitere Erhöhung des *t*-Butanol-Gehaltes auf 20 % (v/v) führte wieder zur Umsatzverminderung. Es wurde trotzdem noch ein Umsatz von 93 % erreicht. Im Vergleich dazu konnte mit den anderen Lösungsmitteln bei dieser Lösungsmittel-Konzentration nur ein Umsatz von 75 – 78 % erhalten werden.

Die Enantioselektivität der *AaP* wurde in Anwesenheit von *t*-Butanol stark herabgesetzt (Abb. 4.36). Der höchste ee-Wert mit 82 % konnte nur bei 1 % (v/v) *t*-Butanol beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass *t*-Butanol zunächst die Enzymaktivität stark herabsetzt. Da mit zunehmendem Gehalt an *t*-Butanol der Umsatz des Thioanisols zunahm

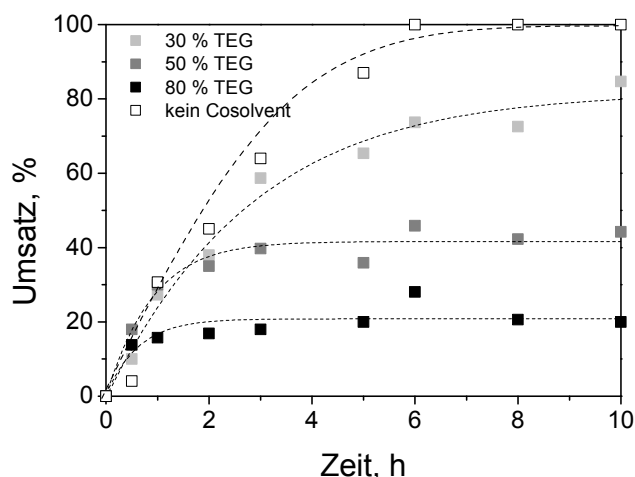


Abb. 4.37. Der Effekt des TEG-Gehaltes auf die Sulfoxidation von 1 mM Thioanisol mit 0,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysiert durch 360 nM *AaP* (M 7.5.2 c).

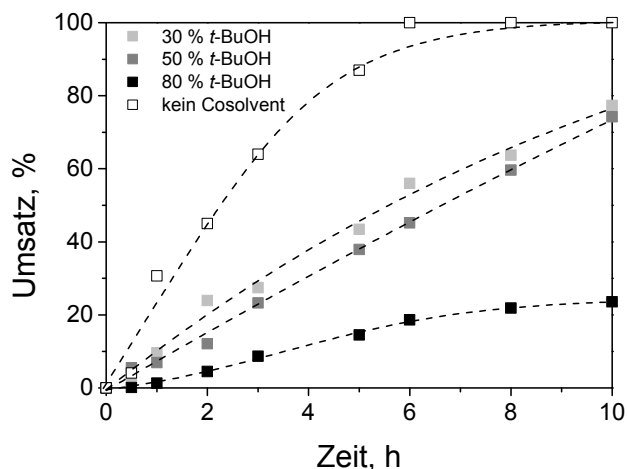


Abb. 4.38. Der Effekt des *t*-Butanol-Gehaltes auf die Sulfoxidation von 1 mM Thioanisol mit 0,4 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysiert durch 360 nM *AaP* (M 7.5.2 c).

und sich der ee-Wert gleichzeitig verringerte, ist anzunehmen, dass hier die nicht katalysierte Umsetzung von Thioanisol zu racemischen Sulfoxid durch *t*-Butanol gefördert wird. Jedoch nimmt die nicht katalysierte Thioanisoloxidation mit steigendem Gehalt an *t*-Butanol ab und kann bei einem Gehalt von 50 und 80 % (v/v) nicht mehr beobachtet werden. Bei einem Gehalt von 20 % (v/v) *t*-Butanol erhöhte sich der ee-Wert wieder auf 77 %.

Die Desaktivierung des Enzyms, wie sie durch Triethylenglycol verursacht wurde, ist bei Zusatz von *t*-Butanol nicht in dem Ausmaß zu beobachten. Im Umsatz-Zeit-Diagramm (Abb. 4.38 ist zu sehen, dass die Enzymaktivität stark herabgesetzt wird, aber eine Inhibierung des Enzyms konnte nur im späteren Verlauf der Reaktion bei einem *t*-Butanol-Gehalt von 80 % festgestellt werden. Die ee-Werte erhöhten sich weiterhin mit abnehmendem Umsatz, so dass nach 10 h Reaktionszeit ee-Werte von 77 %, 83 % und 84 % für die Reaktionen in 30, 50 und 80 % (v/v) *t*-Butanol erhalten wurden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass keines der Lösungsmittel die Enantioselektivität der *AaP* verbesserte. Triethylenglycol, Ethylenglycol und Propylencarbonat haben gar keinen Einfluss auf die Ausbildung des Enantiomerenüberschuss. *t*-Butanol setzt die Enantioselektivität der *AaP* in der Thioanisoloxidation herab. Mit steigendem *t*-Butanol-Gehalt nimmt dieser Einfluss allerdings ab, was aber nicht zu einer Erhöhung des ee-Wertes im Vergleich zur *AaP*-katalysierten Reaktion ohne Co-Solventzusatz führt. Mit steigendem Lösungsmittelgehalt wird die Enzymaktivität stark herabgesetzt, was bei Triethylenglycol, Ethylenglycol und Propylencarbonat zur Desaktivierung des Enzyms führte. Beim Zusatz von *t*-Butanol konnte auch bei einem Gehalt von 80 % (v/v) noch Enzymaktivität gemessen werden, da hier ebenfalls die Sulfoxidbildung, die zur Erhöhung des ee-Wertes führt, durch die *AaP* katalysiert wurde.

Die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen werden durch eine Reihe nicht-kovalenter Bindungskräfte (Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe und Ionische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte) stabilisiert, die durch Änderung der äußeren Bedingungen stark beeinflusst werden. Der Einsatz organischer Lösungsmittel beeinflusst diese nicht-kovalenten Bindungskräfte, was zu Veränderungen in der Funktion des Enzyms führt und den  $K_m$ -Wert und  $k_{cat}$  beeinflusst. Auch die Bindungskräfte zwischen dem Enzym und dem Substrat können dadurch vermindert werden, was sich in der Erhöhung des  $K_m$ -Wertes und der Verringerung der Wechselzahlen äußert und van Deurzen für die CPO-katalysierte Sulfoxidationsreaktion in *t*-Butanol/Puffer-Gemisch auch zeigen konnte [van Deurzen 1996].

Die Substratspezifität und katalytische Effizienz ist von der Fähigkeit des Enzyms abhängig, die Freie Energie, die bei der Bindungsknüpfung mit dem Substrat entsteht, zu nutzen. Veränderungen des Reaktionssystems, wie der Zusatz organischer Lösungsmittel, beeinflussen die Bindungsenergien zwischen Enzym und Substrat und auch zwischen dem Substrat und dem Solvent. Der Anstieg des  $K_m$ -Wertes mit zunehmendem Co-Solventanteil im Reaktionsmedium kann mit einer Stabilisierung des Substrates in diesem System oder durch eine Destabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes erklärt werden [Ryu 1992]. Dringt das Co-Solvent in das geschützte aktive Zentrum, führt das zur Veränderung der Polarität, was Auswirkungen auf die Selektivität, den  $K_m$ -Wert und die Wechselzahl  $k_{cat}$  hat [Ryu 1992].

### 4.7 Die Immobilisierung der AaP an feste Träger

#### 4.7.1 Einleitung

Biokatalysatoren können unter Erhaltung ihrer katalytischen Wirksamkeit in definierte Räume zurückgehalten, an feste Träger oder untereinander quervernetzt gebunden werden [Katchalski-Katzir 1993]. Das Ziel, den Biokatalysator erfolgreich an einem Träger zu fixieren, ist von grundlagenwissenschaftlichem als auch von wirtschaftlichem Interesse. Die Enzymimmobilisierung macht eine heterogene Katalyse möglich, und man erhält somit die Möglichkeit, die Vorteile der Biokatalyse mit der heterogenen Katalyse zu vereinen. Die heterogene Katalyse hat erhebliche Vorteile gegenüber homogen katalysierten Reaktionen:

- Rezyklierung des Katalysators
- hohe Katalysatordichte (Erhöhung der RZA)
- Stabilität,  $K_m$ -Wert,  $k_{cat}$ , pH-Wert- und/oder Temperatur-Abhängigkeit des Enzyms kann verbessert werden
- Einsatz in organischen Lösungsmitteln
- Vereinfachung der Produktaufarbeitung

Das Enzym kann in der immobilisierten Form einfach aus dem Reaktionsprozess abgetrennt werden. Das hat zum einen den Vorteil, dass die Trennung des Katalysators aus dem Produktgemisch erleichtert wird und zum anderen besteht die Möglichkeit den immobilisierten Biokatalysator wieder zu verwenden oder in kontinuierlichen Prozessen einzusetzen, was die Produktionskosten vermindert. Die hohe Katalysatordichte, die durch eine Trägerbindung erreicht werden kann, schafft hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und erhöht somit die Produktivität eines chemischen Prozesses. Dadurch wird eine produktschonende Prozessführung ermöglicht, da die Verweilzeit des Produktes unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen sehr kurz gehalten werden kann. Aber auch das Enzym kann durch die Immobilisierung vor einer Substrat- oder Produktinhibierung geschützt werden. Durch die Immobilisierung des Enzyms wird eine Stabilitätssteigerung erreicht und ermöglicht den Einsatz des Enzyms unter nicht optimalen Bedingungen wie hohe Temperaturen, unnatürliche pH-Werte oder die Verwendung des Enzyms in organischen Lösungsmitteln, was insbesondere bei Löslichkeit hydrophober Substrate in Reaktionslösung erhöht.

Immobilisierte Biokatalysatoren stehen trotz der beachtlichen Vorteile in Konkurrenz zu den nativen löslichen Biokatalysatoren. Zum einen führt der Immobilisierungsprozess zu zusätzlichen Produktionskosten, die jedoch durch die Wiederverwendung des Biokatalysators ausgeglichen werden können, und zum anderen können durch die Fixierung eines Enzyms an einem Träger Stoffübergangslimitierungen hervorgerufen werden, die die Aktivität und Selektivität des Enzyms oft beeinträchtigen [Hartmeier 1986, Buchholz 2005-c, Horn 2008].

Die folgenden Ergebnisse zu den Immobilisierungsmethoden zeigen nur die Möglichkeit, die AaP an einen Träger zu fixieren und dienen als Grundlage für weiterführende Anwendungen. Es wurden keine weiterführenden Untersuchungen zur Optimierung der Enzymrückhaltung an feste Träger vorgenommen.

#### 4.7.2 Kovalente Immobilisierung der AaP auf Glasperlen

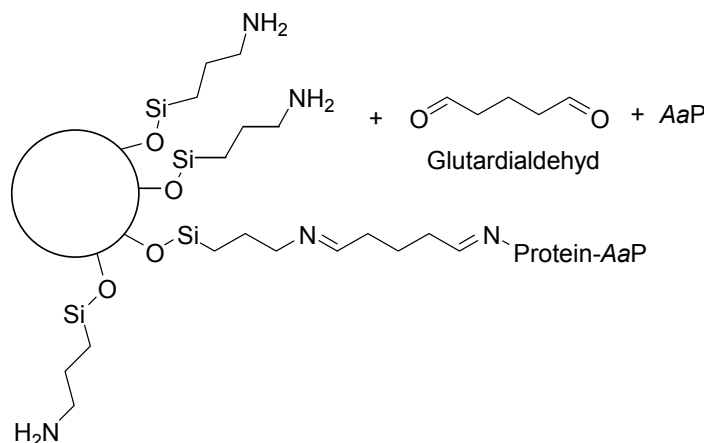
Bei der kovalenten Bindung des Enzyms an einem Träger kommt es zur Ausbildung einer chemischen Bindung. Vorteil dieser Atombindung ist, dass das Enzym fest an dem Träger fixiert ist. Nachteile dieser Methode sind die rauen Immobilisierungsbedingungen, die das Enzym schon in der Herstellungsprozedur beeinflussen und damit zu Aktivitätsverlusten führen können. Die Fixierung eines Enzyms an einen festen Träger ist oftmals zu starr und

## 4 Ergebnisse

schränkt den Biokatalysator in seiner Bewegungsfreiheit ein, so dass Substrate einen erschweren oder gar keinen Zugang zum aktiven Zentrum haben.

Poröses Glas ist das am häufigsten verwendete anorganische Trägermaterial. Es zeichnet sich durch eine große Zahl von OH-Gruppen an seiner Oberfläche aus. Durch Behandlung mit Silanen, insbesondere Aminoalkylethoxysilan oder Aminoalkylchlorsilan, kann die Glasoberfläche aktiviert und für weitere Umsetzungen reaktionsfähiger gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden die aminosilylierten Glasperlen TRISOPERL<sup>®</sup> für die kovalente Bindung der AaP verwendet. Die Anbindung an die Aminogruppen des Trägers findet über die Verknüpfung mit den primären Aminogruppen der endständigen Aminosäuren des Enzymproteins statt. Die Verknüpfung erfolgt über einen so genannten Linker, ein bifunktionales Molekül. In diesem Fall wurde Glutardialdehyd verwendet (Abb. 4.39, M 7.6.1).



**Abb. 4.39. Die Immobilisierung der AaP an die aminomodifizierten Glasperlen TRISOPERL<sup>®</sup> über die Verknüpfung durch Glutardialdehyd (M 7.6.1).**

Über den photometrischen Assay wurde die Enzymaktivität des Immobilisates gemessen. Es wurde keine Aktivität festgestellt. Die Waschlösungen aus der Immobilisierungsprozedur wurden ebenfalls auf Enzymaktivität untersucht. Auch hier konnte keine Enzymaktivität gemessen werden. Es ist zu vermuten, dass die AaP erfolgreich mit dem Träger verbunden wurde, da in der Waschlösung kein aktives Enzym zurückblieb. Die kovalente Kopplung der AaP an Glasperlen führte zum Verlust der Enzymaktivität. Gründe dafür können unter anderem sein:

- Eine Umfaltung der Enzymstruktur, die zum Verlust der Aktivität führt.
- Das aktive Zentrum ist durch eine zu starre Fixierung an den Träger nicht zugänglich.
- Es wurde nicht aufgearbeitetes AaP-Lyophilisat verwendet. Die Verunreinigungen, die zum größten Teil Sojaprotein aus dem Fermentationsprozess ausmachen, stören bei der erfolgreichen Immobilisierung und verhindern den Zugang zum aktiven Zentrum.

Eine weitere Möglichkeit, die zum Verlust der Enzymaktivität führte, ist eine Desaktivierung der AaP während der Immobilisierungsprozedur.

### 4.7.3 Adsorption der AaP an Anionenaustauscher-Harze

Die ionische Bindung an geeignete Träger ist einfach vorzunehmen und funktioniert nach den Prinzipien der physikalischen Adsorption. Die Trägermaterialien sind meist preiswert und können regeneriert werden, da die Adsorptionsmethode reversibel ist. So kann der Träger enzimschonend neu beladen werden. Der Nachteil dieser Trägerbindung ist, dass ganz bestimmte Bedingungen (Wahl des Puffers, Temperatur, pH-Wert u.a.) eingehalten werden



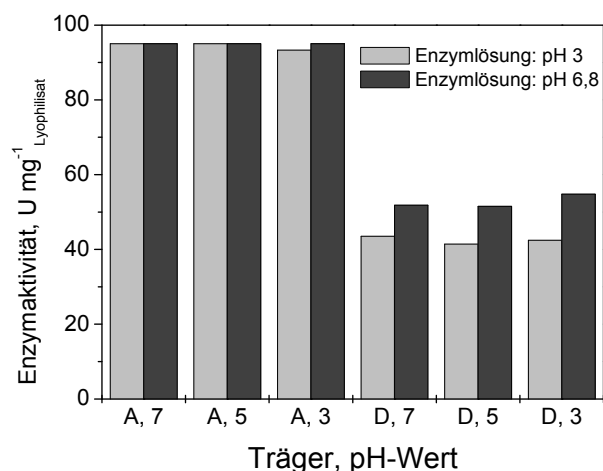
müssen, damit die Immobilisierung aufrechterhalten wird. Schon geringe Veränderungen im pH-Wert können zur Desorption des Enzyms führen [Hartmeier 1986].

Für die adsorptive Immobilisierung der AaP wurden Amberlite FP A51 und Duolite A 568, zwei schwach basische Anionenaustauscher verwendet. Amberlite FP A51 ist ein quervernetztes synthetisches Styrol-Divinylbenzol Copolymer, das tertiäre Amine als funktionelle Gruppen besitzt. Duolite A568 ist ein hydrophobes quervernetztes Phenol-Formaldehyd Polykondensat, das ebenfalls tertiäre Amine als funktionelle Gruppen trägt.

Um abzuschätzen, welcher Träger am besten für die Adsorption der AaP geeignet ist, wurde die Immobilisierung an beiden Trägern unter verschiedenen pH-Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Träger mit Pufferlösungen im sauren bis neutralen pH-Bereich (pH-Werte: 3, 5 und 7) aktiviert. Die AaP, die immobilisiert wurde, lag als Lyophilisat vor, in dem zwei AaP-Fractionen vorkommen mit je drei Isoformen des Enzyms, die verschiedene isoelektrische Punkte (pI) besitzen. Die pIs für die AaP I wurden bei 4,9, 5,2 und 5,4 gefunden und die pIs für die AaP II lauten 4,9, 5,3 und 5,7 [Ullrich 2004]. Für eine Wechselwirkung mit dem schwach basischen Anionenaustauscher-Harzen ist es notwendig, dass das Enzymprotein negativ geladen vorliegt. Ausgehend von den isoelektrischen Punkten, sollte die AaP in einem Puffer mit einem pH-Wert größer als die pIs gelöst sein. Daher wurde das Enzym in einem Zitronensäure-Phosphat-Puffer mit dem pH-Wert 6,8 gelöst. Als Vergleich zu dem theoretisch optimalen pH-Wert der AaP-Lösung für die adsorptive Bindung an den Harzen, wurde das Enzym auch in einem Puffer mit einem pH-Wert von 3 gelöst und an die Träger adsorbiert.

Um das Enzym auf dem Trägermaterial zu immobilisieren, wurden die unterschiedlich aktivierten Träger mit den beiden Enzymlösungen inkubiert.

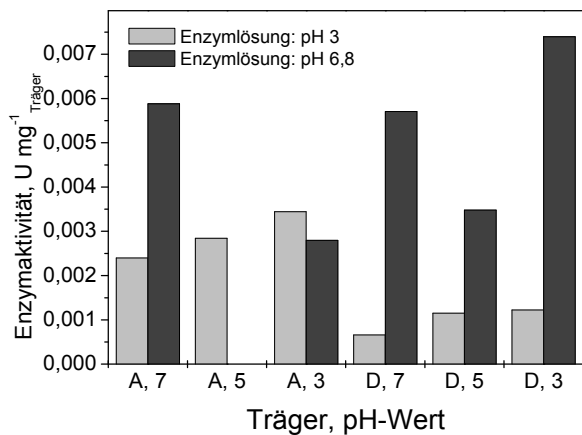
Der Immobilisierungsüberstand, die Wasch- und die Aufbewahrungslösung der Enzym-Immobilisierung wurden mit Hilfe des Standardassays der AaP auf Enzymaktivität getestet. In der Grafik der Abbildung 4.40 ist die Summe der Enzymaktivitäten aus der Überstands-, Wasch- und Aufbewahrungslösung in Bezug zur eingesetzten Enzymaktivität dargestellt. Die Aktivität des nicht immobilisierten Enzyms ist für beide Träger (Amberlite (A) und Duolite (D)), die bei den pH-Werten 3, 5 und 7 aktiviert worden sind und mit der Enzymlösung bei pH 3 und pH 6,8 immobilisiert worden sind, aufgetragen. Es ist zu sehen, dass die Enzymaktivität der AaP-Lösung, die in der Amberlite-Immobilisierung eingesetzt



**Abb. 4.40. Die Summe der Enzymaktivität der Überstands-, Wasch- und Aufbewahrungslösung im Verhältnis zur eingesetzten Enzymaktivität (M 7.6.2).**

wurde, zum größten Teil wieder gefunden werden konnte. Aus der AaP-Immobilisierung auf dem Duolite-Träger wurden hingegen nur 40 – 55 % gelöstes Enzym wieder gefunden.

Die AaP-Immobilisate wurden ebenfalls mit dem photometrischen Standardassay der AaP auf Enzymaktivität getestet (Abb. 4.41). Aus den gemessenen Enzymaktivitäten geht hervor, dass die Amberlite-Träger die besten Enzymaktivitäten mit der AaP zeigen, die bei pH-Wert 3 immobilisiert wurde und der Duolite-Träger mit der AaP, die bei pH 6,8 immobilisiert wurde. Insgesamt konnte die AaP, die im pH-Wert 6,8 gelöst wurde, besser immobilisiert werden. Das Immobilisat mit der höchsten Enzymaktivität ist der Duolite-Träger, aktiviert bei pH 3, immobilisiert mit dem Enzym bei pH 6,8, was den theoretischen Erwartungen entspricht.



**Abb. 4.41. Die Enzymaktivität der *AaP* immobilisiert auf Anionenaustauscher (M 7.6.2).**

Amberlite-Träger weniger geeignet ist, wurden auf diesem Träger relativ hohe Enzymaktivitäten gefunden. Die Enzymaktivitäten der Immobilisate, die im Standardassay gemessen worden sind, sind aber nicht miteinander vergleichbar. Die unterschiedlichen Bedingungen, die der pH-Wert und das Trägermaterial ausüben, beeinflussen das Enzym auf völlig unterschiedliche Weise. Wechselwirkungen der Trägeroberfläche mit der Proteinumgebung des Enzyms oder mit dem Substrat des Standardassays haben u.a. Einfluss auf die katalytische Effizienz.

Weiterhin können auch die Enzymaktivitäten, der immobilisierten *AaP* nicht mit denen der gelösten *AaP* verglichen werden. Es ist nicht bekannt, wie viel Enzym tatsächlich auf der Trägeroberfläche immobilisiert wurde. Über einen Vergleich der eingesetzten Proteinmenge, die Rückschluss auf die eingesetzte Enzymmenge gibt, und der Proteinmenge des nicht immobilisierten Enzyms, die aus den Überstands-, Wasch- und Aufbewahrungslösungen bestimmt wird, kann die tatsächliche immobilisierte Enzymmenge abgeschätzt werden. Eine quantitative Proteinbestimmung, z.B. mit dem Bradford-Test [Bradford 1976], wurde nicht durchgeführt.

Für eine weitergehende Optimierung der Immobilisierung der *AaP* an Anionenaustauscher-Harzen ist der Duolite-Träger zu verwenden. Die Immobilisierung sollte in einem pH-Bereich oberhalb des isoelektrischen Punktes der *AaP* durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass die Aufbewahrungslösung der Duolite-Immobilisate D-3, D-5 und D-7, die bei pH 6,8 mit der *AaP* beladen wurden, keine Enzymaktivitäten besaßen (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei allen anderen Trägern desorbierte das Enzym während der Lagerung vom Träger.

### 4.7.4 Einschluss der *AaP* in natürliche Träger

Bei der Matrixeinhüllung werden die Biokatalysatoren in natürliche oder synthetische Polymere, die meist eine gelartige Struktur aufweisen, eingebettet. Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit der so eingehüllten Biokatalysatoren ist, dass Substrate und Produkte der Reaktion die Hüllsubstanz passieren können. Andererseits dürfen die Maschen der Matrix nicht zu weit sein, weil die Biokatalysatoren selbst darin zurückgehalten werden sollen.

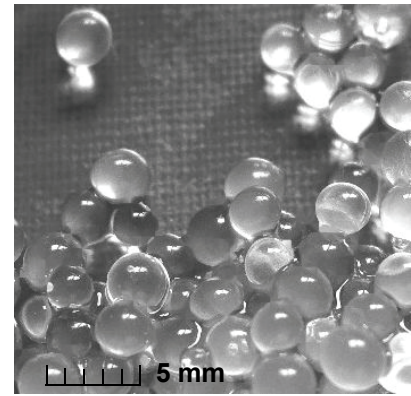
Der Einschluss von Biokatalysatoren in natürliche Hüllsubstanzen bietet den Vorteil der enzymschonenden Einbettung. Als natürliche Polymere werden u.a. Alginat, Carrageenan, Pectin, Agar und Gelatine verwendet. Der Nachteil dieser Polymere ist, dass sie für die Einbettung von Enzymen oft nicht geeignet sind, da sie zu grobmaschig sind und das Enzym nicht ausreichend zurückhalten [Hartmeier 1986].

Der hydrophile Duolite-Träger scheint insgesamt besser geeignet zu sein als der hydrophobe Amberlite-Träger. In einem saurem pH-Wert kann ein schwach basischer Träger gut protoniert werden, um dann als Anionenaustauscher zu funktionieren. Der pH-Wert 6,8 liegt über dem isoelektrischen Punkt des Enzyms, was somit vorwiegend negative Ladungen trägt und daher bei diesem pH-Wert am besten mit dem protonierten Träger in Wechselwirkung treten kann.

Auch wenn die Aktivitäten des gelösten Enzymanteils, der nicht immobilisiert wurde (Abb. 4.40), bestätigen, dass der

Als natürliches Polymer für den Einschluss der AaP wurde Natrium-Alginat verwendet, das aus Meeresalgen gewonnen wird. Alginat ist ein Polysaccharid, das aus Ketten 1,4-glycosidisch verknüpfter  $\alpha$ -L-Guluronsäure und  $\beta$ -D-Mannuronsäure besteht, die ihrerseits homopolymer miteinander verbunden sind [Buchholz 2005-d].

Natrium-Alginat ist in Wasser löslich und wird in Calciumlösungen über die so genannte ionotrope Gelbildung ausgehärtet. Dabei tritt Calcium in Wechselwirkung mit den Carboxylgruppen und Hydroxygruppen der Zuckermoleküle und bildet somit eine gelartige, mechanisch relativ stabile Matrix aus, die in Wasser unlöslich ist. Auf der Grundlage von Smidsrød wurde der Einschluss der AaP durchgeführt [Smidsrød 1990]. You und Buthe beschreiben die Möglichkeit reproduzierbare und definierte Größen der Alginat-Perlen herzustellen [You 2001, Buthe 2004].



**Abb. 4.42. Der Einschluss von AaP in Calcium-Alginatperlen (M 7.6.3).**

Die AaP konnte erfolgreich in das Calcium-Alginatgel eingeschlossen werden (Abb. 4.42). Die Alginat-Perlen wurden über den Standardassay der AaP auf ihre Aktivität untersucht. Es wurde eine Enzymaktivität von  $0,0048 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Träger}$  bestimmt (M 7.6.3). Die Aufbewahrungslösung der Perlen besaß keine Enzymaktivität.

Der Einschluss der AaP in Alginat wurde nicht weiter vertieft. Es konnte gezeigt werden, dass die AaP erfolgreich in einer Gelmatrix zurückgehalten werden kann. Es ist vorstellbar, diese einfache und preiswerte Enzymrückhaltung in einer abgeschlossenen Gelmatrix in den enzymkatalysierten Prozess einzusetzen, um das Produkt nicht mit der Enzymlösung zu verunreinigen und somit eine schnelle und einfache Produktaufarbeitung zu gewährleisten. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Calcium-Alginat-Matrix durch Anwesenheit alternativer Ionen gestört werden kann. Große Mengen Natriumionen können das Calcium wieder verdrängen, was zur Auflösung des Gels führt. Phosphationen bewirken ebenfalls das Auflösen der Gelmatrix, da Phosphationen mit dem Calcium reagieren. Auf die Verwendung von phosphathaltigen Puffern sollte daher verzichtet werden [Hartmeier 1986].

### 4.7.5 Einschluss der AaP in Polydimethylsiloxan

#### 4.7.5.1 Einleitung

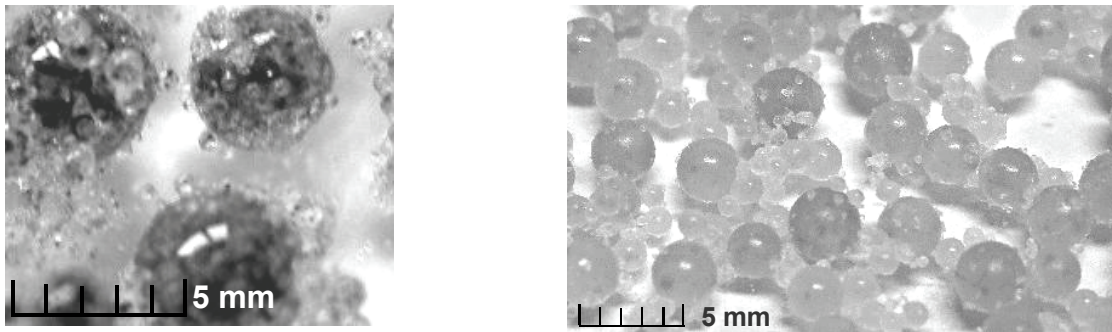
Eine weitere Möglichkeit die AaP in eine Matrix einzuschließen ist die Verwendung synthetischer Polymere. Für den Einschluss der AaP wurde ein Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet. PDMS ist ein anorganisches Siliziumpolymer, in dem die Siliziumatome ketten- und netzartig über Sauerstoffatome miteinander verbunden sind und die restlichen Valenzen des Siliziums durch Kohlenwasserstoffe abgesättigt sind. PDMS gehört daher in die Gruppe der Silikone, die hydrophobe und mechanisch stabile Eigenschaften besitzen und temperatur- und oxidationsbeständig sind.

Wang et al. immobilisierte Enzyme ( $\alpha$ -Amylase und Glucoseoxidase) erfolgreich in porösen Silikon-Membranen [Wang 1996]. Auch die Einhüllung von Lipasen in Silikon wurde beschrieben [Gill 1999, Ragheb 2003].

Zur Einbettung der *Agrocybe aegerita* Peroxidase in PDMS wurde der Zweikomponenten-Silikonkautschuk Sylgard<sup>®</sup> 184 (Fa. Dow Corning) verwendet. Dabei wurde das Enzym zum einen in gelöster Form und zum anderen als Lyophilisat mit den beiden Silikonkomponenten homogen vermischt. Der Vorteil des Sylgard<sup>®</sup> 184 ist, dass die Aushärtung bei moderaten

Temperaturen stattfinden kann und so eine enzymeschonende Immobilisierung gewährleistet wird (M 7.6.4.1).

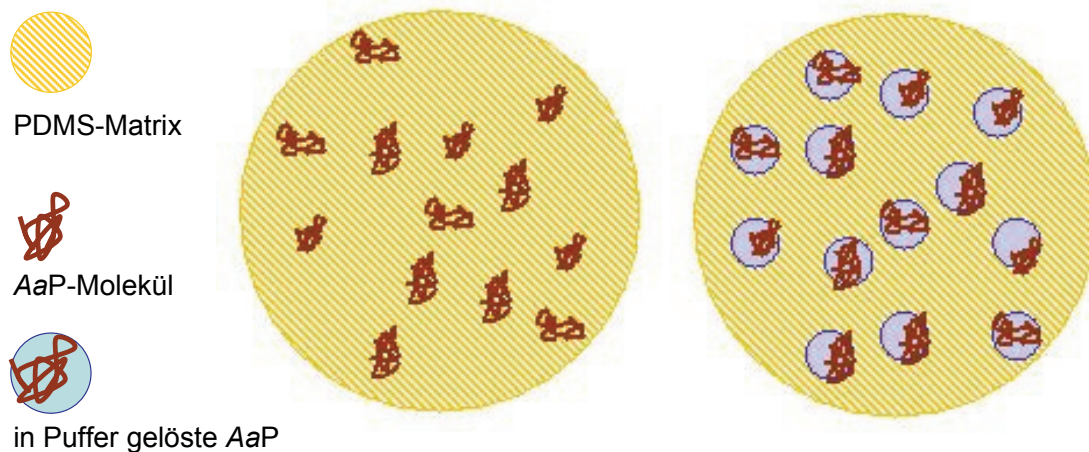
Es resultierten 0,5 - 4 mm große gummielastische, mechanisch äußerst stabile Kugeln, die im Gegensatz zur klaren, enzymfreien Matrix eine Trübung aufwiesen (Abb. 4.43). Die ausgehärteten PDMS-Perlen sind hydrophob und sehr gut in organischen Lösungsmitteln einsetzbar, so dass das Enzym in organische Lösungsmittel überführt werden kann.



**Abb. 4.43. AaP-aktive PDMS-Perlen. Links: Wasserfreie Immobilisierung von AaP-Lyophilisat. Rechts: Statische Emulsion aus gelöster AaP und PDMS (M 7.6.4.1).**

### 4.7.5.2 Die Oxidation von Thioanisol katalysiert durch AaP-PDMS-Perlen in Puffer

Es wurden zwei verschiedene Arten gewählt, die AaP in PDMS zu immobilisieren. In der ersten Variante wurden 300 mg AaP-Lyophilisat in den Silikonträger eingeschlossen. In der zweiten Variante wurden zunächst 200 mg AaP in 1 mL Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8, gelöst, was zusammen mit der Silikonmatrix eine statische Emulsion bildet (Abb. 4.44). Um stabile PDMS-Sphären zu erhalten, konnte nur ein begrenztes Volumen des gelösten Enzyms zum Silikongemisch gegeben werden. In 6,6 g PDMS konnte nur maximal 1 mL gelöste AaP gemischt werden. Die Masse an AaP-Lyophilisat, die sich in einem Milliliter Puffer lösen, begrenzte sich auf 200 mg.



**Abb. 4.44. Schema der beiden Formen des AaP-Einschlusses. Links: Die wasserfreie Immobilisierung der lyophilisierten AaP. Rechts: Die Immobilisierung der gelösten AaP in Form einer statischen Emulsion (M 7.6.4.1).**

Für die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. TBHP wurden beide Formen der AaP-Immobilisate zur Katalyse eingesetzt. Die Umsetzung von Thioanisol fand im Zitronensäure-Phosphat-Puffer bei pH 6,8 statt. Das hydrophobe Thioanisol reichert sich in der hydrophoben Trägermatrix an, so dass eine Umsatzbestimmung nicht möglich war. Da sich die Produkte sehr gut in Wasser lösen, konnte über die Entstehung des Hauptproduktes (*R*)-Methylphenylsulfoxid die Produktivität der eingesetzten Immobilisate und der Einfluss der beiden unterschiedlichen Oxidationsmittel miteinander verglichen werden.

**Tab. 4.12. Die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit 0,75 mM·h<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder TBHP in Puffer katalysiert mit 0,1 g·mL<sup>-1</sup> immobilisierter AaP (M 7.6.4.2 a, b).**

eingeschlossenes Lyophilisat				statische Emulsion			
OM	Zeit, h	ee-Wert, %	[( <i>R</i> )-Me-SO-phe], mM	OM	Zeit, h	ee-Wert, %	[( <i>R</i> )-Me-SO-phe], mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	72	0,2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	81	0,4
	10	68	0,7		10	76	1,4
	27	66	2,5		27	75	3,0
TBHP	3	73	0,3	TBHP	3	71	0,4
	10	72	2,3		10	71	2,2
	27	78	5,3		27	74	8,0

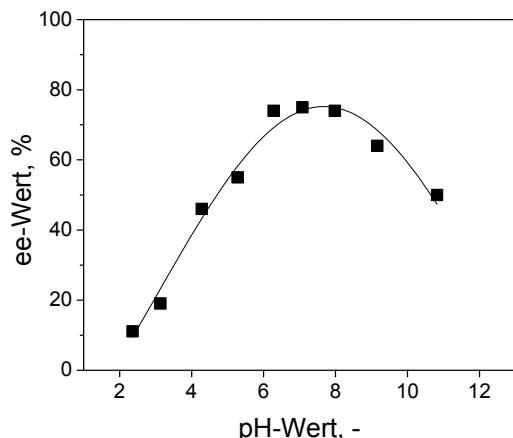
Die größte Produktentstehung konnte bei der Katalyse durch die statische Emulsion und TBHP als Oxidationsmittel beobachtet werden, gefolgt von dem eingeschlossenen Lyophilisat und TBHP als Oxidationsmittel (Tab 4.12). Auch mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel ist die Reaktivität der statischen Emulsion besser, als die des eingeschlossenen AaP-Lyophilisates. Die Enantioselektivitäten, die erreicht wurden, sind stark vom Umsatz abhängig. Der höchste Enantiomerenüberschuss zu Beginn der Reaktion wurde mit der statischen Emulsion und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhalten. Der ee-Wert dieses Systems wie auch der der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation, die durch das eingeschlossene AaP-Lyophilisat katalysiert wurde, verringerte sich mit zunehmender Reaktionszeit. Die Produktivitäten der beiden Systeme, die mit Wasserstoffperoxid oxidiert wurden, sind sehr gering. Wasserstoffperoxid ist eine hydrophile Substanz und reichert sich vor allem in der Bulk-Phase (Puffer) an. In der Bulk-Phase kommt es jedoch zur nicht katalysierten Oxidation von Thioanisol zu racemischen Methylphenylsulfoxid. Dieser nicht katalysierte Anteil verringert den ee-Wert der Reaktionen.

Die Oxidationen mit TBHP führten mit zunehmender Reaktionszeit zum Anstieg des ee-Wertes. TBHP ist ein hydrophobes Oxidationsmittel und wird daher auch für die Synthese in organischen Lösungsmitteln eingesetzt. Der Stoffübergang des TBHPs aus der Bulk-Phase in das Immobilisat ist sehr wahrscheinlich weniger limitiert als der des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dem Enzym steht dadurch mehr Oxidationsmittel zur Verfügung, was sich in der erhöhten Reaktivität widerspiegelt. Der Anstieg des ee-Wertes resultiert aus der AaP-katalysierten Weiteroxidation zum Sulfon, die sich in dem geringen Umsatz mit Wasserstoffperoxid nicht bemerkbar machen konnte.

Die ee-Werte mit der AaP als eingeschlossenes Lyophilisat sind nicht zufrieden stellend. Die Frage, die gestellt werden muss ist, wie aktiv kann ein wasserfreies immobilisiertes Enzympräparat sein. Da die Reaktion im wässrigen Medium durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass genügend Wasser in das Immobilisat diffundiert, damit die AaP aktiv sein kann, aber nicht ausreichend genug, um die gesamte Aktivität auszuschöpfen.

Auch die ee-Werte, die in der Oxidation mit TBHP erhalten werden, unabhängig davon welches Immobilisat verwendet wurde, sind niedrig. Es ist nicht auszuschließen, dass es in der PDMS-Matrix, in der Thioanisol und auch TBHP angereichert vorliegen, zur nicht katalysierten Umsetzung von Thioanisol kommt. Dadurch wird der ee-Wert permanent auf einem niedrigen Level gehalten.

#### 4.7.5.3 Der Einfluss des pH-Wertes der dispersen Phase der statischen Emulsion von *AaP* in PDMS



**Abb. 4.45.** Der Einfluss des pH-Wertes der statischen Emulsion auf den ee-Wert in der Oxidation von 10 mM Thioanisol mit  $1,5 \text{ mM} \cdot (2 \text{ h})^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ , katalysiert durch immobilisierte *AaP* in PDMS (M 7.6.4.1).

Für die Herstellung der statischen Emulsion der *AaP* in dem Silikonkautschuk wird das Enzym in Puffer gelöst. In Abbildung 4.45 ist der Einfluss des pH-Wertes der Pufferlösung, in dem die *AaP* eingeschlossen in den PDMS-Sphären vorliegt, auf den ee-Wert in der katalysierten Umsetzung von Thioanisol dargestellt. Das pH-Optimum der dispersen *AaP*-Lösung der statischen Emulsion liegt bei 6,8, was dem pH-Optimum der *AaP*-katalysierten Thioanisoloxidation entspricht (s. Kapitel 4.3).

#### 4.7.5.4 Die *AaP*-katalysierte Sulfoxidation in organischen Lösungsmitteln

Die Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln wurde ausführlich untersucht und kann sich vor- und nachteilig auf die Enzymkatalyse auswirken [Koskinen 1996]. So kann der Einsatz organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedium die Substratlöslichkeit verbessern und sich günstig auf die Enzym-, Substrat- und Produktstabilität auswirken. Des Weiteren wird die Produktisolierung erleichtert, was von wirtschaftlichem Interesse ist. Ein nachteiliger Effekt ist, dass die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln stark herabgesetzt wird [Klibanov 1997, Samra 1999].

Das synthetische Potential der Peroxidasen die asymmetrische Sulfoxidation zu katalysieren, wird neben der geringen Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid auch durch die schlechte Substratlöslichkeit im wässrigen Reaktionssystem beeinträchtigt. Dai et al. haben die Thioanisoloxidation in das organische Reaktionsmedium übertragen und konnten zeigen, dass dadurch die spontane Oxidation des Thioanisols fast vollständig unterdrückt und im Gegensatz dazu die HRP-katalysierte Sulfoxidation des Thioanisols beschleunigt werden konnte [Dai 2000]. Durch den fast vollständigen Ersatz des wässrigen Mediums durch organische Lösungsmittel (3 % (v/v) Wasser) konnten Dai et al. die Enantioselektivität und Reaktionsgeschwindigkeit der Thioanisoloxidation mit Wasserstoffperoxid, katalysiert durch HRP, Sojamehl-Peroxidase und durch drei nichtenzymatische Häm-Proteine Myoglobin, Hämoglobin und Cytochrom c, verbessert werden. Nach Samra et al. konnte durch den Ersatz des wässrigen Mediums durch Isooctan in der CPO-katalysierten Oxidation von Benzylalkoholen mit TBHP als Oxidationsmittel die Stabilität der CPO gegenüber dem Oxidationsmittel verbessert, quantitative Ausbeuten des Benzylaldehyds durch geringere Mengen CPO erhalten und auf die Dosierung des Oxidationsmittels verzichtet werden [Samra 1999].

In Kapitel 4.6 konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Gehalt wassermischbarer organischer Lösungsmittel die Reaktivität der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol herabgesetzt wurde. Deshalb soll im Folgenden Kapitel der Ersatz des wässrigen

Puffersystems durch hydrophobe organische Lösungsmittel untersucht werden. Als Oxidationsmittel wurde neben Wasserstoffperoxid *tert*-Butylhydroperoxid eingesetzt.

In suspensierter Form ist die AaP in hydrophoben organischen Lösungsmitteln nicht einsetzbar, da das Enzym kaum aktiv ist. Das AaP-Lyophilisat wurde ohne Vorbehandlung in hydrophobe organische Lösungsmittel suspendiert. Als organische Lösungsmittel wurden n-Heptan, Isooctan, Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und Diisopropylether (DIPE) verwendet. Der Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Umsetzung von 0,5 mM Thioanisol mit Wasserstoffperoxid und TBHP, katalysiert durch 360 nM suspendierte AaP, ist in der Tabelle 4.13 dargestellt.

**Tab. 4.13. Die Oxidation von 0,5 mM Thioanisol mit  $0,75 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  bzw. TBHP, katalysiert durch 360 nM AaP, in organischen Lösungsmitteln (M 7.6.4.2 c).**

LM	OM	Zeit, h	U, %	ee-Wert, %
n-Heptan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6	< 1	80
		25	< 1	67
	TBHP	6	< 1	58
		25	< 1	54
Isooctan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6	< 1	80
		25	4	77
	TBHP	6	2	56
		25	4	46
MTBE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6	0	0
		25	0	0
	TBHP	6	0	0
		25	0	0
DIPE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6	0	0
		25	0	0
	TBHP	6	0	0
		25	< 1	52

In den beiden stark unpolaren Lösungsmitteln n-Heptan (log P 4,66) und Isooctan (log P 4,09) zeigte die AaP eine geringfügige Enzymaktivität. In Isooctan war die Aktivität, insbesondere mit TBHP als Oxidationsmittel, leicht höher als in n-Heptan. In der Anfangsreaktionszeit wurde mit der Oxidation von Wasserstoffperoxid in beiden Lösungsmitteln ein ee-Wert von 80 % erreicht, ein eindeutiges Indiz für eine existente Aktivität der AaP. Die ee-Werte nahmen mit zunehmender Reaktionszeit ab. Mit der Thioanisoloxidation von TBHP wurde nur ein maximaler Enantiomerenüberschuss von 58 % in n-Heptan und 56 % in Isooctan erreicht.

In den weniger stark unpolaren Lösungsmitteln Methyl-*tert*-butylether (log P 0,94) und Diisopropylether (log P 1,52) konnte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und in MTBE auch mit TBHP als Oxidationsmittel kein Umsatz des Substrates beobachtet werden. In Diisopropylether wurde mit TBHP nach 25 h Reaktionszeit ein geringer Umsatz beobachtet und ein Enantiomerenüberschuss von 52 %. Diese beiden Lösungsmittel führten zur vollständigen Enzymdesaktivierung.

In n-Heptan und Isooctan wurde unter den Bedingungen der enzymkatalysierten Oxidation von Thioanisol mit TBHP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die nicht katalysierte Umsetzung durchgeführt. In keinem der beiden Lösungsmittel konnte die Produktentstehung der spontanen Oxidation beobachtet werden (M 7.6.4.2 d).

Da die nicht katalysierte Nebenreaktion keinen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss haben kann, führen andere Effekte zur Verminderung des Enantiomerenüberschusses, die an dieser Stelle nicht geklärt werden konnten. Aufgrund der sehr geringen Aktivität der AaP

kommt es zur Anreicherung der Oxidationsmittel im System. Es ist nicht auszuschließen, dass die *AaP*- die Disproportionierung der Oxidationsmittel unter diesen Bedingungen katalysiert. Die Folge der katalaseartigen Zersetzung der Peroxide wurde weiter oben ausführlich diskutiert. Es ist zu vermuten, dass dabei radikalische Intermediate freigesetzt werden können, die zur unselektiven Oxidation von Thioanisol führen. Konformationsänderungen der Enzym-Proteinstruktur oder Einschränkungen in der Funktion des aktiven Zentrums, die durch die Suspension im organischen Lösungsmittel denkbar sind, können möglicherweise dazu führen, dass die Enantioselektivität der *AaP* verringert wird [Klibanov 1997].

#### 4.7.5.5 Die Oxidation von Thioanisol katalysiert durch *AaP*-PDMS-Perlen in organischen Lösungsmitteln

Die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. TBHP wurde in n-Heptan unter der Verwendung von in PDMS-immobilisierter *AaP* katalysiert. Dabei wurden zwei unterschiedliche PDMS-Immobilisate verwendet. In dem ersten Präparat wurden 6,6 g Silikon mit 300 mg lyophilisierter *AaP* beladen und in dem zweiten Präparat wurden 200 mg *AaP* gelöst in 1 mL Zitronensäure-Phosphat-Puffer in 6,6 g Silikon immobilisiert. Um einen besseren Vergleich mit den Ergebnissen der Tabelle 4.12 zu gewährleisten, wurde auf die Darstellung des Thioanisolumsatzes verzichtet. Dafür ist in Tabelle 4.14 die Konzentration des Hauptproduktes als Maß der Produktivität zu finden.

Aus den Ergebnissen der Tabelle 4.14 ist zu erkennen, dass sich die beiden Silikon-Präparate in der Enantioselektivität und auch in der Produktivität stark voneinander unterscheiden. Die wasserfreie *AaP*-Immobilisierung zeigte nur sehr geringe Aktivität und erreichte niedrige ee-Werte. Trotzdem stiegen die ee-Werte im Laufe der Reaktion unter der Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als auch TBHP als Oxidationsmittel an. Aufgrund der nicht zufrieden stellenden Ergebnisse, die durch die Katalyse mit dem eingeschlossenen Lyophilisat erhalten wurden, kam das PDMS-Präparat in der weiteren Verwendung als *AaP*-Immobilisat nicht mehr zum Einsatz. Zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes muss die Umgebung am aktiven Zentrum stark polar sein, damit es zur ionischen Wechselwirkung der Substratmoleküle und der Aminosäurereste des Enzym-Proteins am aktiven Zentrum kommen kann. Die Aktivität von wasserfreien Enzymreaktionen ist daher stark eingeschränkt. Da nicht mit wasserfreien Lösungsmitteln gearbeitet wurde und die Oxidationsmittel in Wasser gelöst worden sind, standen dem Enzympräparat geringe Mengen Wasser zur Verfügung, womit die geringe Enzymaktivität erklärt werden kann. Der steigende Enantiomerenüberschuss kann eventuell dadurch erklärt werden, dass dem Reaktionssystem durch die Dosierung des Oxidationsmittels jede Stunde 0,5 % Wasser, in Form des in Wasser verdünnten Oxidationsmittels, zugefügt worden sind.

**Tab. 4.14. Die Oxidation von 10 mM Thioanisol mit  $0,75 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  oder TBHP in n-Heptan katalysiert mit  $0,1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  immobilisierter *AaP* (M 7.6.4.2 a, b).**

eingeschlossenes Lyophilisat				statische Emulsion			
OM	Zeit, h	ee-Wert, %	[( <i>R</i> )-Me-SO-phe], mM	OM	Zeit, h	ee-Wert, %	[( <i>R</i> )-Me-SO-phe], mM
$\text{H}_2\text{O}_2$	3	-	-	$\text{H}_2\text{O}_2$	3	81	0,04
	10	64	0,02		10	88	0,06
	27	84	0,07		27	89	0,16
TBHP	3	13	0,013	TBHP	3	87	0,09
	10	25	0,025		10	82	0,2
	27	41	0,08		27	79	0,3

Die Produktentstehung, katalysiert durch die statische Emulsion, verlief zwar auch sehr langsam, aber um das 3 - 8-fache schneller als durch das eingeschlossene *AaP*-Lyophilisat. Die Produktivität der statischen Emulsion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel in n-Heptan erreichte nur 5 % der Produktivität der statischen Emulsion, die in Puffer zur Katalyse eingesetzt wurde



(Tab. 4.12). In n-Heptan entstand unter der Verwendung von TBHP mit der statischen Emulsion als Katalysator nur 3,75 % der Produktmenge, die in Puffer entstanden ist.

Der ee-Wert, der durch die Oxidation von Thioanisol mit TBHP, katalysiert durch die statische Emulsion in n-Heptan, nach 3 h Reaktionszeit erhalten wurde, ist mit 87 % sehr hoch. Allerdings nahm der Enantiomerenüberschuss in der Oxidation mit TBHP mit zunehmender Reaktionszeit ab. In der Oxidation von Thioanisol mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalysiert durch die statische Emulsion in n-Heptan, nahm der ee-Wert mit steigendem Umsatz zu und erreichte nach 27 h Reaktionszeit einen Wert von 89 %. Im Gegensatz dazu verhielt sich die ee-Wert-Entwicklung der Sulfoxidation von Thioanisol im Puffer, katalysiert durch die statische Emulsion. Im Puffer erfolgte ein Anstieg des ee-Wertes durch die Oxidation von TBHP und ein Abfall des ee-Wertes durch die Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tab. 4.12).

In der Katalyse mit beiden Silikon-Präparaten konnte die Entstehung des Folgeproduktes beobachtet werden, was ein Hinweis darauf ist, dass das organische Lösungsmittel zu Veränderungen der K<sub>m,app</sub>-Werte der Substrate führt. In der Thioanisoloxidation, katalysiert durch gelöste AaP in Puffer, kam es erst, nachdem Thioanisol fast vollständig umgesetzt wurde, zur katalysierten Oxidation des Methylphenylsulfoxids zum Methylphenylsulfon. Der Grund dafür ist die große Differenz der K<sub>m,app</sub>-Werte und der Spezifitätskonstante (k<sub>cat</sub>/K<sub>m,app</sub>) dieser beiden Substrate in der AaP-katalysierten Sulfoxidation im Puffer mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel (Tab. 4.3).

Ein Grund für die verringerte Produktivität in n-Heptan, katalysiert durch die immobilisierte AaP in PDMS, können u.a. Solvatationseffekte sein, die durch das organische Lösungsmittel verursacht werden. Die Solvatationseffekte können zur Stabilisierung des Substrates führen und/oder die Energie, die aufgewendet werden muss, um den Enzym-Substrat-Komplex zu bilden, erhöhen [Ryu 1992, Schmitke 1996, Klivanov 1997]. Weiterer Effekte, die die Reaktivität der Thioanisoloxidation in n-Heptan erniedrigten, sind externe und interne Stoffüberganglimitierungen. Der externe Stoffübergang beschreibt die Diffusion der Substrate in der Bulk-Phase zur Oberfläche des Trägers. Der interne Stoffübergang umfasst die Diffusion des Substrates innerhalb des Trägermaterials zum Enzym. [Buchholz 1979, Buchholz 2005-e, Horn 2008] geben einen Überblick über die Reduzierung der Stoffüberganglimitierung durch gezielte Prozess- und Immobilisierungsoptimierung.

Neben dem Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8, und n-Heptan wurden zwei weitere unpolare organische Lösungsmittel als Reaktionsmedium in der AaP-katalysierten Oxidation von Thioanisol verwendet. Die AaP wurde dabei in Form der statischen Emulsion in PDMS verwendet (Tab. 4.15). Die beiden weiteren Lösungsmittel n-Decan (log P 5,01) und Isooctan (log P 4,09) sind wie n-Heptan (log P 4,66) sehr unpolar.

**Tab. 4.15. Die Oxidation von 2,5 mM Thioanisol mit 0,75 mM·h<sup>-1</sup> OM katalysiert durch 0,05 g·mL<sup>-1</sup> AaP eingeschlossen in PDMS als statische Emulsion (M 7.6.4.2 e).**

		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		TBHP	
Medium	Zeit, h	ee-Wert, %	[(R)-Me-SO-phe], mM	ee-Wert, %	[(R)-Me-SO-phe], mM
Puffer	3	81	0,076	73	0,142
	27	74	1,944	74	3,134
n-Heptan	3	80	0,001	88	0,032
	27	80	0,029	86	0,175
n-Decan	3	-	-	86	0,061
	27	91	0,053	74	0,172
Isooctan	3	85	0,009	80	0,105
	27	91	0,116	79	0,208

Mit den Ergebnissen aus der Tabelle 4.15 können folgende Zusammenhänge zusammengefasst werden:

- Die Reaktivität der statischen Emulsion der *AaP* in PDMS ist im Puffer deutlich höher als in polaren organischen Lösungsmitteln. So entstand nach 27 h Reaktionszeit im Puffer mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel die 67-fach, 37-fach und 16-fach höhere Menge (*R*)-Methylphenylsulfoxid als in n-Heptan, n-Decan und Isooctan als Reaktionsmedium. Mit TBHP als Oxidationsmittel entstand im Puffer nach 27 h Reaktionszeit die 15 - 18-fach höhere Menge an (*R*)-Methylphenylsulfoxid als in den polaren Lösungsmitteln.
- Die Verwendung von TBHP als Oxidationsmittel führte in allen Reaktionsmedien zu einer höheren Bildung von (*R*)-Methylphenylsulfoxid.
- Die Enantioselektivität, die mit der immobilisierten *AaP* in der Thioanisoloxidation erhalten wurde, ist in den organischen Lösungsmitteln höher als im Puffer.
- In den organischen Lösungsmitteln führte die Oxidation von Thioanisol mit TBHP, katalysiert durch die statische *AaP*-Emulsion in PDMS, zur Abnahme des Enantiomerenüberschusses und mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel zur Zunahme des Enantiomerenüberschusses mit zunehmendem Umsatz.
- Im Gegensatz dazu nahmen im Puffer die ee-Werte der Sulfoxidation mit TBHP, katalysiert durch die statische *AaP*-Emulsion in PDMS, mit steigender Reaktionszeit zu und die Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte zur Verringerung der ee-Werte.

Die nach 95 h erhaltenen Ergebnisse, die in Tabelle 4.15 dargestellt sind, sind repräsentativ für die Umsetzung von Thioanisol mit zwei unterschiedlichen Oxidationsmitteln, in den verschiedenen Reaktionsmedien, katalysiert durch die immobilisierte *AaP* in PDMS. Nach 95 h konnte nur im Puffer mit TBHP als Oxidationsmittel ein nahezu vollständiger Umsatz von 97 %<sup>e</sup> erreicht werden. Dabei wurde ein ee-Wert von 80 % erhalten. Die Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Puffer erreichte nach 95 h einen Umsatz von 70 % und einen ee-Wert von 66 %. In den organischen Lösungsmitteln blieb der Umsatz auch nach 95 h Reaktionszeit kleiner als 10 %. Die höchsten Enantioselektivitäten (ee-Wert 91%) in der Sulfoxidation von Thioanisol wurden in Isooctan und n-Decan mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel, katalysiert durch die statische *AaP*-Emulsion in PDMS, erhalten.

Die Effekte, die die Sulfoxidation von Thioanisol in organischen Lösungsmitteln, katalysiert durch die immobilisierte *AaP* in PDMS, beeinflussen, sind vielfältiger Natur und wurden an den entsprechenden Stellen dieses Kapitels diskutiert. Zusammenfassend beeinflussen folgende Faktoren [Ryu 1992, Klibanov 1997, Buchholz 2005-e] die enzymkatalysierte Sulfoxidation von Thioanisol:

- Externe und interne Diffusionsbarrieren führen zur Reaktionslimitierung.
- Durch den Einschluss der *AaP* in die Silikonmatrix kann der Zugang des aktiven Zentrums blockiert sein.
- Solvationseffekte der unterschiedlichen Lösungsmittel führen zu Veränderungen der Energien, die aufgebracht werden müssen, um die Substrate, zu denen auch die Oxidationsmittel gehören, an das aktive Zentrum zu binden.
- Konformationsmodifikationen des Enzymproteins, verursacht durch die organischen Lösungsmittel oder die Immobilisierung in PDMS, können zu Aktivitätsverlusten und Veränderungen in der Enantioselektivität der *AaP* führen.

---

<sup>e</sup> Der Umsatz wurde aus der Bildung von (*R*)-Methylphenylsulfoxid ermittelt.

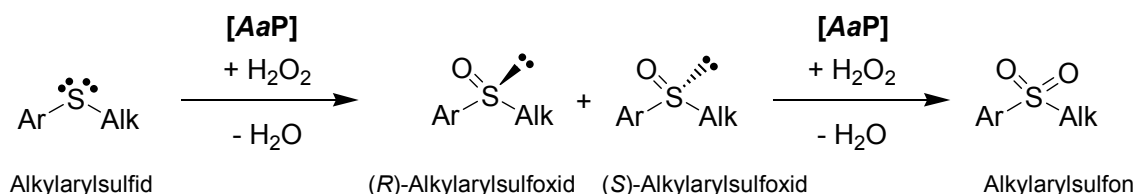
- Der Ersatz des wässrigen Mediums durch organische Lösungsmittel verändert durch den pH-Verlust und die stark unpolaren Eigenschaften die Aktivität des Enzyms.
- Organische Lösungsmittel führen zur Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit nicht katalysierter Nebenreaktionen und somit zur Stabilisierung des Enzyms gegen desaktivierende chemische Reaktionen [Koskinen 1996, Samra 1999, Dai 2000].

Ein weiteres Hindernis, dass zu einer geringen Reaktivität der Immobilisate führte, war der Einsatz des nicht gereinigten Enzympräparates. Das Massenverhältnis Enzym zu Silikonträger konnte nicht erhöht werden, da zum einen der Einschluss der Flüssigkeitsmenge mit 1 mL auf 6,6 g Silikon limitiert war und zum anderen die Masse des *AaP*-Lyophilisates, die sich in 1 mL Puffer lösen ließ, auf 200 mg begrenzt war. In  $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  *AaP*-Lyophilisat befinden sich  $20506 \text{ nM}$  aktives Enzymprotein. Es wurden  $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Immobilisat als Katalysator in der enantioselektiven Sulfoxidation eingesetzt. Bei einem verlustfreien Einschluss der *AaP* in die Silikonmatrix würden daher  $310 \text{ nM}$  immobilisierte *AaP* die Sulfoxidation vermitteln. Im Vergleich dazu erfolgte die Umsetzung  $1 \text{ mM}$  Thioanisol und einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosierung von  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  nach 9 h Reaktionszeit vollständig (mit  $360 \text{ nM}$  gelöste *AaP* als Katalysator in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8). Der Enantiomerenüberschuss erreichte zu diesem Reaktionszeitpunkt ein ee-Wert von 92,5 %.

Mit der Immobilisierung von 1 mL gereinigter *AaP* II könnte die Enzymdichte in dem Träger verdoppelt<sup>f</sup> werden, so dass limitierende Effekte, verursacht durch die Immobilisierung der *AaP* und den organischen Lösungsmitteln als Reaktionsmedium, entgegengewirkt werden könnte. Außerdem befinden sich in dem gereinigten Enzympräparat keine Fremdproteine, die zusätzliche Limitierungen in der Verwendung der immobilisierten *AaP* hervorrufen können und die Aktivität beeinträchtigen.

#### 4.8 Das Substratscreening

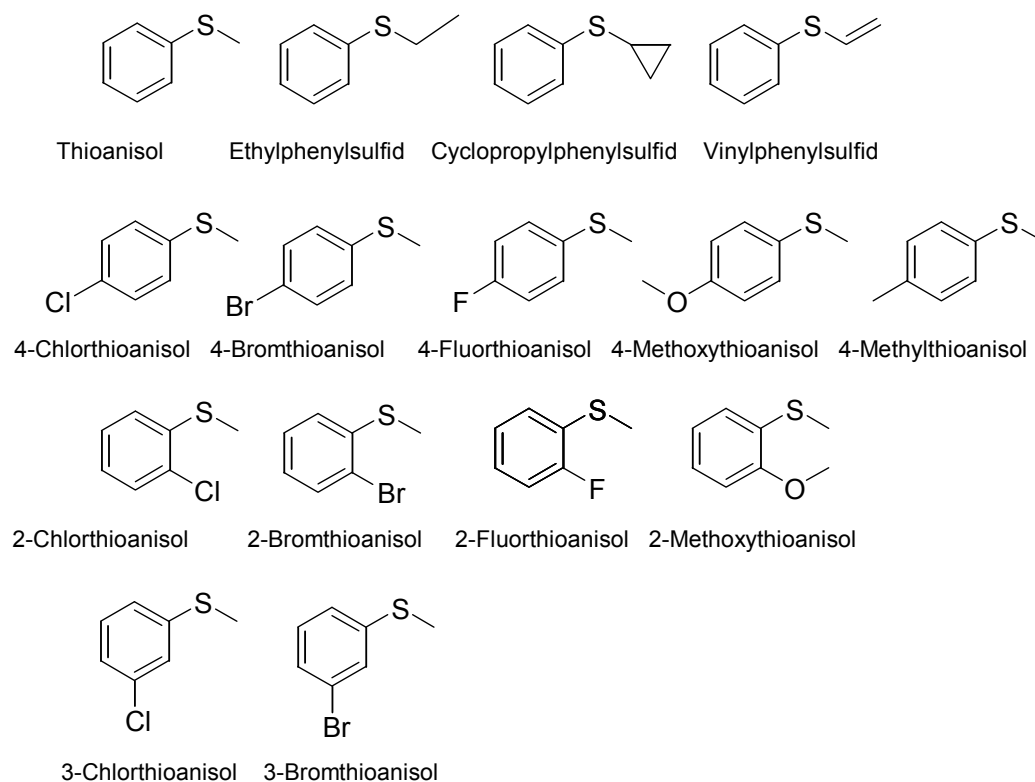
Neben Thioanisol wurden weitere Alkylarylsulfide in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation getestet (Abb. 4.46). Bei allen bisher getesteten Substraten katalysierte die *AaP* bevorzugt die Bildung des (*R*)-Sulfoxids im Überschuss. Weiterhin wurde auch die Folgereaktion zum Alkylarylsulfon katalysiert, die zusätzlich zur Erhöhung des Enantiomerenüberschusses beiträgt.



**Abb. 4.46. Die enantioselektive *AaP*-katalysierte Oxidation von Alkylarylsulfid zum chiralen Alkylarylsulfoxid und Alkylarylsulfon als Folgeprodukt.**

Neben verschiedenen einfach substituierten Thioanisolderivaten, wurde auch die Alkylkette der aromatischen Sulfide variiert. In Abbildung 4.47 sind die in der *AaP*-katalysierten enantioselektiven Sulfoxidation erfolgreich eingesetzten Substrate dargestellt.

<sup>f</sup> In 1 mL gereinigter *AaP* II befinden sich 2 mg Enzymprotein, was einer Enzymkonzentration von  $43480 \text{ nM}$  entspricht.



**Abb. 4.47. Erfolgreich getestete Thioanisolanaloge in der enantioselektiven *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion.**

In der Tabelle 4.16 sind der Umsatz und der Enantiomerenüberschuss der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion der Thioanisolanaloge dargestellt, die nach 0,5 h Reaktionszeit erhalten worden sind.

**Tab. 4.16. Umsatz und Enantiomerenüberschuss in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden mit  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  Wasserstoffperoxid nach 0,5 h Reaktionszeit (M 7.5.4 a).**

Substrat	ee-Wert, % ( <i>R</i> )	Umsatz, %
Thioanisol	87	18
Ethylphenylsulfid	95	35
Cyclopropylphenylsulfid	94	18
Vinylphenylsulfid	83	45
4-Chlorthioanisol	92	18
4-Bromthioanisol	94	33
4-Fluorthioanisol	77	24
4-Methoxythioanisol	80	17
4-Methylthioanisol	89	36
2-Chlorthioanisol	89	18
2-Bromthioanisol	65	n.d.
2-Fluorthioanisol	n.d.	24
2-Methoxythioanisol	24	25
3-Chlorthioanisol	n.d.	20
3-Bromthioanisol	n.d.	16

In der Tabelle 4.16 sind der Umsatz und der ee-Wert der verschiedenen Substrate in der Anfangsreaktionszeit dargestellt. Zu Beginn der Reaktion ist die Oxidation zum Folgeprodukt noch nicht soweit fortgeschritten, so dass die ee-Werte, miteinander vergleichbar sind. So konnte festgestellt werden, dass mit Ethylphenylsulfid, Cyclopropylphenylsulfid, 4-Chlorthioanisol und 4-Bromthioanisol der Enantiomerenüberschuss schon zu Beginn der Reaktion > 90 % war. Allerdings wurde mit keinem Substrat schon zu Beginn der Reaktion ein ee-Wert > 99 % erhalten. Mit steigendem Umsatz stiegen aufgrund der Sulfonentstehung die ee-Werte der (*R*)-Sulfoxide an. So erreichte die katalysierte Oxidation u.a. von Ethylphenylsulfid und 4-Bromthioanisol sehr schnell ein Enantiomerenüberschuss > 99 %. Ee-Werte < 80 % wurden nach 0,5 h in der *AaP*-katalysierten Oxidation von 4-Fluorthioanisol, 2-Bromthioanisol und 2-Methoxythioanisol erhalten. Von 2-Fluor-, 3-Chlor- und 3-Bromthioanisol konnten die ee-Werte unter Verwendung der chiralen HPLC-Säule Eurocel 01 (Fa. Knauer) nicht bestimmt werden, da das Enantiomerenpaar, nicht ausreichend getrennt werden konnten.

Alle Substrate wurden nach 9 h Reaktionszeit vollständig umgesetzt. In der *AaP*-katalysierten Oxidation von Vinylphenylsulfid, Ethylphenylsulfid, 4-Methyl-, 2-Fluor-, 4-Fluor- und 4-Bromthioanisol konnte schon nach 0,5 h ein hoher Umsatz erreicht werden. Bei diesen Substraten wurde der vollständige Umsatz schon nach 3 h Reaktionszeit erreicht. Auffällig langsam hingegen wurde 3-Bromthioanisol umgesetzt. Der Umsatz von 2-Bromthioanisol konnte aufgrund einer störenden Peaküberlagerung nicht ausgewertet werden.

Betrachtet man die Kopplung des Substrates an Compound I in der Sauerstoffübertragungsreaktion als elektrophile Reaktion seitens der Compound I, dann müsste die Reaktionsgeschwindigkeit der Substrate mit elektronenspendenden Substituenten steigen. Compound I mit Eisen in der Oxidationsstufe +5 überträgt den Sauerstoff auf das zu oxidierende Substrat und erhält im Gegenzug zwei Elektronen, um in den Grundzustand mit Eisen in der Oxidationsstufe +3 reduziert zu werden. Die Substrate, in denen das Sulfid-Schwefelatom von den Alkyl- und/oder Aryl-Rest durch eine elektronenschiebende Wirkung stabilisiert wird, würden sich demzufolge leichter oxidieren lassen. Da die Sauerstoffzuführung nicht am aromatischen Ring stattfindet, sondern am Schwefelatom in der Seitenkette, spielen die induktiven Effekte der Substituenten am Aromaten eher eine geringfügige Rolle. Von höherer Bedeutung ist ein positiv induktiver Effekt der Alkylseitenkette, der mit steigender Kettenlänge zunimmt. Auch positive Mesomerieeffekte der Substituenten am Aromaten, spielen eine wichtige Rolle, um Elektronen in das aromatische System zu schieben. Je elektronenreicher der aromatische Ring, desto besser wird das Schwefelatom der Alkylarylsulfide stabilisiert.

Alle Substituenten der substituierten Thioanisolanaloge, die in der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion eingesetzt worden sind, besitzen einen positiven mesomeren Effekt, so dass es sich um elektronenreiche Aromaten handelt. Die Umsatzgeschwindigkeit der meisten Substrate ist mit dem Thioanisolumsatz vergleichbar. Eine verminderte Umsatzgeschwindigkeit konnte bei 3-Brom-, 3-Chlor-, 4-Chlor und 4-Methoxythioanisol festgestellt werden. Trotzdem konnte der vollständige Umsatz dieser Substrate erreicht werden. Umsatzeinbußen durch sehr geringe *AaP*-Aktivitäten konnte, so wie es in der CPO-katalysierten Sulfoxidation einiger Substrate beobachtet wurde, nicht festgestellt werden [van Deurzen 1996, Seelbach 1997-a].

In der Enzymkatalyse spielt neben induktiven und mesomeren Effekten auch die Größe der Substituenten eine Rolle. In der CPO-katalysierten Sulfoxidationsreaktion konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Alkylkette zu Umsatzverlusten führte [van Deurzen 1996, Seelbach 1997-a]. Es wurde vermutet, dass eine Verlängerung der Alkylseitenkette zu sterischen Hinderungen in die Enzymtasche des aktiven Zentrums führt. In der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation konnte dieser Einfluss nicht beobachtet werden. Cyclopropyl-

thioanisol wurde annähernd schnell wie Thioanisol umgesetzt und bei Ethylphenylsulfid und Vinylphenylsulfid kam es zur Umsatzsteigerung in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation.

Von einigen ausgewählten Substraten wurde die Kinetik in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation mit Wasserstoffperoxid bestimmt und mit den Werten, die von Thioanisol ermittelt worden sind, verglichen (Tab. 4.17).

**Tab. 4.17. Die  $K_{m,app}$ -Werte und Spezifitätskonstanten ausgewählter Alkylarylsulfide in der Oxidation mit Wasserstoffperoxid (M 7.4.4).**

Substrat	$K_{m,app}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{cat}, \text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_{m,app}, \text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
Thioanisol	24,9	444	$1,79\cdot 10^7$
Ethylphenylsulfid	17,6	169	$9,60\cdot 10^6$
2-Methoxythioanisol	20,9	178	$8,52\cdot 10^6$
4-Chlorthioanisol	14,3	193	$1,35\cdot 10^7$
4-Bromthioanisol	6,61	235	$3,55\cdot 10^7$
4-Fluorthioanisol	19,6	192	$9,78\cdot 10^6$

Die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante und auch die Spezifitätskonstante der Substrate liegen in der gleichen Größenordnung wie die des Thioanisols. 4-Bromthioanisol besitzt mit  $6,6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  einen sehr niedrigen  $K_{m,app}$ -Wert, was sich auch in der hohen Spezifitätskonstante von  $3,55\cdot 10^7 \text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  bemerkbar macht. 4-Bromthioanisol wird demnach doppelt so effektiv wie Thioanisol katalysiert durch die *AaP* zum Sulfoxid umgesetzt.

**Tab. 4.18. Umsatz und Enantiomerenüberschuss in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation von 1 mM Alkylarylsulfiden mit 5 mM Ascorbinsäure und Sauerstoff nach 0,5 h Reaktionszeit (M 7.5.4 b).**

Substrat	ee-Wert, % ( <i>R</i> )	Umsatz, %
Thioanisol	89	24
Ethylphenylsulfid	95	38
Cyclopropylphenylsulfid	91	22
Vinylphenylsulfid	48	40
4-Chlorthioanisol	78	20
4-Bromthioanisol	63	12
4-Fluorthioanisol	66	27
4-Methoxythioanisol	76	27
4-Methylthioanisol	89	30
2-Chlorthioanisol	78	10
2-Bromthioanisol	70	n.d.
2-Fluorthioanisol	n.d.	32
2-Methoxythioanisol	31	18
3-Chlorthioanisol	n.d.	15
3-Bromthioanisol	n.d.	12

Neben der Oxidation durch die direkte Wasserstoffperoxiddosierung wurde die *AaP*-katalysierte Sulfoxidation der Substrate auch mit dem Sauerstoff/Ascorbinsäure-System durchgeführt (Tab. 4.18). Auf diese Weise konnte auf eine Dosierung des Oxidationsmittels verzichtet werden.

Die *in situ* Generation von Wasserstoffperoxid bewirkte bei fast allen Substraten eine Umsatzsteigerung. Die Hintergründe dazu wurden schon ausführlich in Kapitel 4.5 diskutiert. Aufgrund der erhöhten Umsatzrate wurden teilweise, verglichen mit der Oxidation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , höhere ee-Werte erhalten.

Bei Vinylphenylsulfid, 4-Chlor-, 4-Brom-, 4-Fluor- und 4-Methoxythioanisol kam es allerdings zu einer Verminderung des ee-Wertes. Da es beim Einsatz von Ascorbinsäure unter aeroben Bedingungen vermutlich zur Autoxidation des Reduktionsmittels kommt, werden unselektive, nichtkatalysierte Nebenreaktionen durch die Entstehung von Hyperoxidanionradikalen begünstigt. Für diese unselektiven Reaktionen scheinen die in der 4. Position substituierten Alkylarylsulfide mit einem negativ induktiven Effekt bevorzugt zu sein.

In dieser Arbeit wurde sich nur auf Alkylarylsulfide beschränkt. Es ist zu testen, ob sich das Substratspektrum auch auf Dialkylsulfide erweitern lässt.

#### 4.9 Die Produktisolierung

Das Ziel war es (*R*)-Methylphenylsulfoxid im Gramm-Bereich zu produzieren und anschließend zu isolieren. Verschiedene Faktoren begrenzten dabei das minimale Volumen des Reaktionsansatzes und die Masse des Ausgangsstoffes Thioanisol, dass durch die *AaP* mit Hilfe von Wasserstoffperoxid zum (*R*)-Methylphenylsulfoxid oxidiert werden sollte:

- Die lokale Konzentration des Oxidationsmittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Reaktionsansatz sollte nicht höher als 2 mM sein, damit es nicht zur *AaP*-Desaktivierung kommt.
- Die Konzentration des Oxidationsmittels bestimmt die Umsatzmenge des Ausgangsstoffes, so dass bei einer Wasserstoffperoxiddosierung von  $2 \text{ mM} \cdot (20 \text{ min})^{-1}$  6 mM Substrat pro Stunde enzymatisch oxidiert werden können. Nach einer Reaktionszeit von 5 h würden dem System mit dieser Dosierweise 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugefügt werden. Zusätzlich wird Wasserstoffperoxid aber auch für die enzymkatalysierte Weiteroxidation zum Folgeprodukt verbraucht.
- Um 1 g Thioanisol (30 mM) mit 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation zum (*R*)-Methylphenylsulfoxid zu oxidieren, benötigt man ein Reaktionsvolumen von 270 mL. Von den 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird ein geringer Teil durch die enzymkatalysierte Weiteroxidation zum Sulfon verbraucht, so dass für die Oxidation des Thioanisols nur 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Verfügung stehen. Deshalb muss das Reaktionsvolumen auf 400 mL erhöht werden, damit 1 g Thioanisol (20 mM) nach 5 h Reaktionszeit mit einer Wasserstoffperoxiddosierung von  $2 \text{ mM} \cdot (20 \text{ min})^{-1}$ , katalysiert durch die *AaP*, vollständig oxidiert werden können.
- Für 20 mM Thioanisol in einer 400 mL Pufferlösung werden 7200 nM *AaP* benötigt, um die Sulfoxidation in 5 h Reaktionszeit zu katalysieren. 7200 nM *AaP* sind in  $104,34 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  *AaP*-Lyophilisat enthalten. Für einen Reaktionsansatz von 400 mL benötigt man daher 42 g *AaP*-Lyophilisat (*AaP*-2007 (M 7.3.2)).

Der letzte Punkt führte dazu, dass das Vorhaben ursprünglich 1 g Thioanisol in der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation umzusetzen, daran scheiterte, dass zum einen nicht genügend *AaP*-Lyophilisat zur Verfügung stand und zum anderen die eingesetzte Menge *AaP*-Lyophilisat unverhältnismäßig groß wäre. Das Problem, dass bei der Verwendung der nicht gereinigten Enzymcharge auftritt, ist der Überschuss an Fremdprotein und Verunreinigungen. In 42 g *AaP*-2007 sind 8,4 g Protein enthalten. Davon sind jedoch nur 126,8 mg biokatalytisch aktiv. Das Lyophilisat hat eine sehr geringe Dichte. 42 g Lyophilisat besitzt ein Volumen von ca. 100 mL, was 25 % (v/v) des Reaktionsvolumens entspricht. Es ist kaum möglich 42 g in

## 4 Ergebnisse

---

400 mL Puffer zu lösen. Hinzu erschwert der hohe Anteil der Verunreinigungen des *AaP*-Rohextraktes die Produktisolierung (siehe unten).

Aufgrund der oben diskutierten Faktoren wurden in einem 250 mL-Reaktionsansatz 590  $\mu$ L Thioanisol (20 mM), katalysiert durch 5466 nM *AaP* (20 g *AaP*-Lyophilisat, von dem 60,4 mg *AaP*-Aktivität besitzen) in 5 h Reaktionszeit vollständig umgesetzt. Es wurden alle 20 min 2 mM Wasserstoffperoxid in den Reaktionsansatz dosiert. In den bisherigen *AaP*-katalysierten Thioanisolumsätzen, mit einem Reaktionsvolumen von 30 mL, wurden 3,54  $\mu$ L Thioanisol eingesetzt. Bezogen auf das eingesetzte Thioanisolvolumen wurde der Reaktionsumsatz damit um das 167-fache vergrößert.

Die Reaktion wurde nach 7 h abgebrochen, so dass sich, neben dem Methylphenylsulfon als Folgeprodukt, 96 % (*R*)-Methylphenylsulfoxid im Überschuss in der Reaktionslösung befanden. Mit Hilfe der HPLC-Analytik wurde die Reaktion überwacht. Nach 7 h Reaktionszeit wurde eine Ausbeute von 90 % (*R*)-Methylphenylsulfoxid ermittelt. Die restlichen 10 % umfassen die geringen Mengen des (*S*)-Enantiomers und Methylphenylsulfons.

Die Reaktionslösung wurde mehrfach mit Chloroform extrahiert (M 7.7). Der hohe Grad der Verunreinigung des verwendeten Enzympräparates erschwerte die Extraktion, da diese die Bildung einer stabilen Emulsion der Chloroform und Wasserphase förderten. Die Chloroformextrakte wurden gesammelt und auf ein Volumen von 1 mL eingengt.

Die Trennung der Reaktionsteilnehmer, die über ein Kieselgelbett mit Ethylacetat als Laufmittel erfolgte, war unproblematisch.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *AaP*-katalysierten (*R*)-Methylphenyl-Produktion und -Isolierung zusammengefasst und mit Hilfe der Zyklenzahl (ttn) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) bewertet.

<b>Masse Methylphenylsulfoxid:</b>	<b>300 mg</b>
<b>Stoffmenge Methylphenylsulfoxid:</b>	<b>8 mM</b>
<b>ee-Wert:</b>	<b>96 % (<i>R</i>)</b>
<b>Umsatz (Thioanisol):</b>	<b>100 %</b>
<b>Ausbeute, isoliert:</b>	<b>40 %</b>
<b>Masse <i>AaP</i>-Protein (Lyophilisat):</b>	<b>60,4 mg (20 g)</b>
<b>Stoffmenge <i>AaP</i>-Protein:</b>	<b><math>5,46 \cdot 10^{-3}</math> mM</b>
<b>Reaktionsvolumen:</b>	<b>0,25 L</b>
<b>Reaktionszeit:</b>	<b>7 h (0,29 d)</b>
<b>ttn (isoliert), <math>n_P/n_{Kat}</math>:</b>	<b>1465</b>
<b>RZA (isoliert):</b>	<b><math>4,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}</math></b>

Durch die Produktaufarbeitung sind 50 % (*R*)-Methylphenylsulfoxid verloren gegangen. Der Verlust des stark hydrophilen Produktes resultiert aus der Extraktion mit Chloroform, die zusätzlich durch die Verunreinigung des Enzympräparates limitiert wurde.

Bei einer idealen Produktisolierung wäre eine Masse von 631 mg (*R*)-Methylphenylsulfoxid (18 mM) zu erwarten. Das würde eine ttn von 3297 und eine RZA von  $8,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ergeben.



Durch gezielte Prozessoptimierung konnte Seelbach in der CPO-katalysierten Oxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel die Zyklenzahl von 44250 [Fu 1992] auf 148460 und die RZA von  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  [Fu 1992] auf  $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  erhöhen [Seelbach 1997-a, 1997-b]. Die Verbesserung der CPO-katalysierten Sulfoxidation wurde vor allem durch die sensor kontrollierte Wasserstoffperoxid dosierung ermöglicht. Die Produktivität der CPO konnte dadurch drastisch erhöht werden. Mit Hilfe des Sensors wurde eine Überdosierung des Oxidationsmittels, die zur Desaktivierung der Peroxidase führt, verhindert, und das Oxidationsmittel konnte dem Bedarf des Enzyms entsprechend zugeführt werden, was die Reaktionszeit deutlich verringert.

Eine präzise Prozessoptimierung in der AaP-katalysierten Sulfoxidationsreaktion ist auf jeden Fall umsetzbar. Die Priorität in dieser Arbeit wurde zunächst auf die Produktisolierung gelegt, die erfolgreich durchgeführt wurde.

Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass ein Scale-up der Substratmenge von  $3,54 \mu\text{L}$  auf  $590 \mu\text{L}$  Thioanisol in der AaP-katalysierten Sulfoxidation möglich ist.

Entgegen einem wirtschaftlichen Prozess wurde das Oxidationsmittel stark reaktionslimitierend, in den Reaktionsansatz dosiert. Aus den enzymkinetischen Daten der AaP in der Sulfoxidation des Thioanisols mit Wasserstoffperoxid geht hervor, dass die AaP ein effektiveres Enzym in der Sulfoxidationsreaktion ist, als die CPO. Es konnte gezeigt werden, dass in der Oxidation von Thioanisol, Wasserstoffperoxid äquimolar dosiert werden kann, ohne dass es zur Enzyminhibierung kam (4.4.1). Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein ausreichender Mengen Thioanisol bzw. ein vergleichbares Substrat. Für die Optimierung des Prozesses ist die sensor kontrollierte Wasserstoffperoxid dosierung nicht notwendig. Um enantiomerenreine Ausbeuten des Sulfoxides zu erhalten, muss jedoch die weitere Wasserstoffperoxid dosierung im Unterschuss erfolgen. Die AaP-katalysierte Oxidation zum Folgeprodukt steht in großer Konkurrenz zur Katalasetyp-Reaktion, die zur Desaktivierung der AaP führt.

Mit der Verwendung eines gereinigten Enzympräparates könnte die Produktisolierung erleichtert werden. Gereinigte AaP II besitzt  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $43478 \text{ nM}$ ) aktives AaP-Protein. Für die katalytische Umsetzung von  $20 \text{ mM}$  Thioanisol in  $250 \text{ mL}$  unter den oben gewählten Bedingungen würden  $30 \text{ mL}$  gereinigte AaP benötigt werden, um in  $250 \text{ mL}$  eine Enzymkonzentration von  $5466 \text{ nM}$  zu erreichen. Die Verfügbarkeit größerer Mengen gereinigter AaP ist bisher noch beschränkend.

## 4.10 Andere Oxidationsreaktionen katalysiert durch die AaP<sup>§</sup>

### 4.10.1 Die Halogenierung von Phenol

Hofrichter et al. stellten das Potential der AaP Halogenierungsreaktionen zu katalysieren dar [Ullrich 2005].

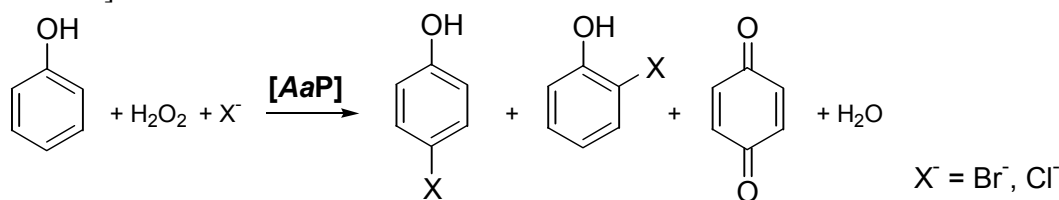
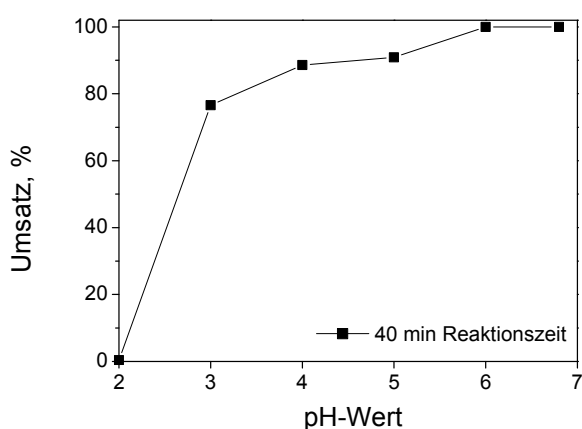


Abb. 4.48. Die AaP-vermittelte Halogenierung von Phenol.

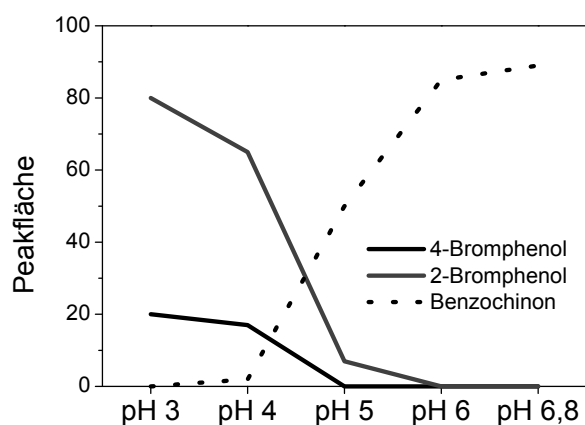
<sup>§</sup> Die Ergebnisse des Kapitels 4.10 wurden aus der Diplomarbeit „Selektive Oxidationsreaktionen und Halogenierungen, katalysiert durch eine neuartige Haloperoxidase aus *Agrocybe aegerita*“, angefertigt von Anne Roock im Jahr 2008 an der Universität Rostock, entnommen.

Am Beispiel der Halogenierung von Phenol konnten Hofrichter et al. zeigen, dass die *AaP* in hohem Maße die Bromierung katalysiert, wobei die beiden Produkte 2-Brom- und 4-Bromphenol in einem Verhältnis 1:4 entstehen (Abb. 4.48). Das Nebenprodukt Benzochinon, das aus der enzymkatalysierten Hydroxylierungsreaktion entsteht, wurde in geringen Ausbeuten detektiert. Die *AaP*-katalysierte Chlorierung von Phenol konnten Hofrichter et al. nur in Spuren beobachten. Das Hauptprodukt, was bei der enzymkatalysierten Umsetzung von Phenol mit KCl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstand, war Benzochinon. Daneben entstanden eine Reihe nicht identifizierter Produkte und ca. 1 % 2-Chlorphenol. Das in 4-Position chlorierte Produkt wurde nicht detektiert [Ullrich 2005].

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse zur Bromierung, bestätigt werden. Die Untersuchungen zur Einstellung des pH-Wertes zeigten, wie entscheidend der richtige pH-Wert für die Ausbeute an bromierten Produkt ist.



**Abb. 4.49.** Die Abhängigkeit der *AaP*-katalysierten Umsetzung von 0,5 mM Phenol mit 1 mM·(20 min)<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 mM KBr von unterschiedlichen pH-Werten im Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach 40 min Reaktionszeit (M 7.10.2.1).



**Abb. 4.50.** Entstehung der Produkte in der *AaP*-katalysierten Bromierung von Phenol in Abhängigkeit von dem pH-Wert.

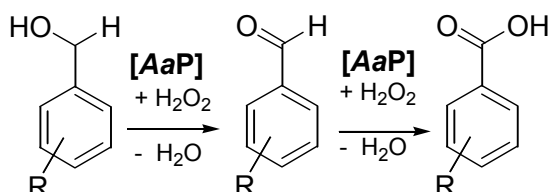
In der Abbildung 4.49 ist die Abhängigkeit des Umsatzes vom pH-Wert dargestellt. Man erkennt, dass der Umsatz von Phenol mit steigendem pH-Wert, im pH-Bereich von 2-7, zunimmt. Bei einem pH-Wert von 2 ist das Enzym nicht aktiv. Im Unterschied zur *AaP*-katalysierten Sauerstoffinsertionsreaktion, wie z.B. die Oxidation von 3,4-Dimethoxybenzylalkohol [Ullrich 2004] oder von Thioanisol (s. Kapitel 4.3) wird in der *AaP* katalysierten Bromierung von Phenol ein sehr breites pH-Optimum erhalten. Auch wenn der Umsatz von pH 3 – 6,8 leicht zunimmt, konnte auch schon bei pH 3 ein relativ hoher Umsatz von Phenol erreicht werden. Der Grund für diese ausgedehnte Aktivität über einen großen pH-Bereich liegt in der Art der Reaktionen begründet, die die *AaP* in Anwesenheit von KBr und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Zwischen pH 3 und 5 wird bevorzugt die Bromierung von Phenol katalysiert (Abb. 4.50). Der optimale pH-Wert der Bromierung wurde bei pH 3 gefunden. Ab pH-Wert 4 nahm die Entstehung von Benzochinon stark zu. Das Optimum der *AaP*-katalysierten Phenoloxidation ist hier nicht genau bestimmt worden, aber es ist anzunehmen, dass es wie bei den meisten *AaP*-Substraten im neutralen pH-Bereich zwischen 6,8 und 7,2 liegt. Die Phenoloxidation, die in Konkurrenz zur Bromierung stattfindet, kann allerdings bei pH-Wert 3 stark vermindert werden.

Die Variation der KBr-Konzentration im Bereich von 1 – 20 mM KBr bei pH 3 ergab keine erheblichen Unterschiede im

Phenolumsatz oder in der Produktentstehung. Leichte Umsatzeinbußen wurden bei einer KBr-Konzentration von 1 mM und 20 mM festgestellt, so dass die Wahl von 10 mM KBr unter den gegebenen Bedingungen optimal ist (M 7.10.2.2).

#### 4.10.2 Die Oxidation von Benzylalkoholen

Die AaP katalysiert die Oxidation von Benzylalkoholen zu den korrespondierenden Säuren. Dabei entsteht der entsprechende Aldehyd als Zwischenprodukt (Abb. 4.51), der im Gegensatz zur CPO Substrat der AaP ist.



**Abb. 4.51. AaP-katalysierte Oxidation von Benzylalkohol zur Benzolcarbonsäure über die Oxidation des Benzylaldehyds.**

Es wurde die Oxidation verschiedener einfach substituierter Benzylalkohole durch AaP vermittelt. Die Reaktivität der einzelnen Benzylalkoholderivate ist von der Art und Position der Substituenten abhängig. Betrachtet man den Umsatz der Derivate im Vergleich zu dem unsubstituierten Benzylalkohol, wird der Umsatz durch alle Substituenten in der 4-Position gesteigert und in der 2-Position und 3-Position vermindert (Tab. 4.19).

In dem oberen Teil der Tabelle 4.19 sind die in Position 4 substituierten Benzylalkohole gegenübergestellt. Die Methylgruppe scheint keinen Einfluss auf die enzymkatalysierte Oxidation am Aromaten zu haben. Die Methylgruppe übt einen +I-Effekt aus und erhöht somit die Elektronendichte am Aromaten. Demgegenüber wirken alle anderen Substituenten, die sich an den hier verwendeten Benzylalkoholderivaten befinden in entgegengesetzter Richtung.

**Tab. 4.19. Der Umsatz von 0,5 mM Benzylalkohol in der Oxidation mit 0,4 mM (20 min)<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert durch 25 nM AaP nach 50 min Reaktionszeit (M 7.10.3).**

Substrat	Umsatz, %
Benzylalkohol	58
4-Methylbenzylalkohol	58
4-Methoxybenzylalkohol	70
4-Hydroxybenzylalkohol	65
4-Fluorbenzylalkohol	65
4-Chlorbenzylalkohol	75
4-Brombenzylalkohol	80
4-Nitrobenzylalkohol	65
2-Hydroxybenzylalkohol	29
3-Hydroxybenzylalkohol	11
4-Hydroxybenzylalkohol	65
2-Methoxybenzylalkohol	15
3-Methoxybenzylalkohol	80
4-Methoxybenzylalkohol	70

Sie ziehen infolge höherer Elektronegativität die Elektronen der kovalenten Bindung zum C-Atom des Benzolringes auf ihre Seite und üben somit einen -I-Effekt auf den Aromaten aus. Elektronenarme Benzylalkoholderivate wurden in der Reihenfolge  $-\text{NO}_2 > -\text{OH} > -\text{F} > -\text{OCH}_3 > -\text{Cl} > -\text{Br}$  schneller in der *AaP*-katalysierten Oxidation umgesetzt als die nicht aktivierten bzw. elektronenreichen Derivate in der 4-Position.

Der induktive Effekt wird durch den mesomeren Effekt, der zusätzlich die Elektronendichte am Aromaten beeinflusst, überlagert. Der mesomere Effekt ist weitreichender als der induktive Effekt. Es zeigt sich, dass die Reihenfolge der Umsatzgeschwindigkeit mit zunehmendem +M-Effekt einhergeht. Mit Ausnahme der Nitro-Gruppe erhöhen alle Substituenten die Elektronendichte des Aromaten, indem ihr freies Elektronenpaar, das in direkter Nachbarschaft zum aromatischen Ring steht, mit an der Mesomerie des Kerns beteiligt ist. Je kleiner die Elektronegativität des am Kern haftendes Atoms ist, umso größer wirkt der +M-Effekt. Dieser Zusammenhang ist bei der *AaP*-katalysierten Oxidation von einfach substituierten Benzylalkoholderivaten in der Umsatzrate zu erkennen. Die Methylgruppe besitzt kein freies Elektronenpaar und kann somit nicht auf die Mesomerie am Aromaten wirken. Der Umsatz unterscheidet sich nicht vom unsubstituierten Benzylalkohol. Die Nitrogruppe besitzt einen -M-Effekt und bewirkt neben dem stark elektronegativen Fluorid die geringste Umsatzsteigerung. Bromid besitzt aufgrund der geringsten Elektronegativität, von den hier verwendeten Substituenten, den größten +M-Effekt. Mit 4-Brombenzylalkohol wurde bei allen getesteten Substraten der höchste Umsatz erreicht.

Im unteren Teil der Tabelle 4.19 sind die unterschiedlichen Hydroxy- und Methoxybenzylalkohole gegenübergestellt. Mit Ausnahme des 3-Methoxybenzylalkohols kann verallgemeinert werden, dass die Substituenten, die beide mit einem +M-Effekt wirken, in der 2- und 3-Position den Umsatz herabsetzen.

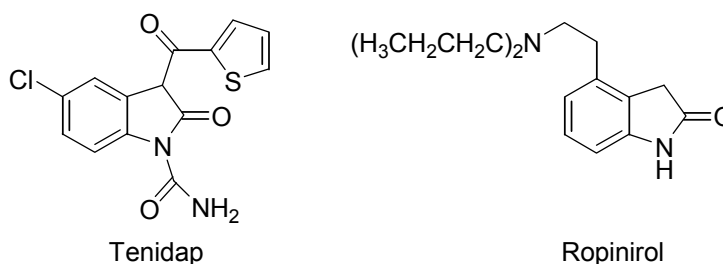
Die Diskussion über die dirigierende Wirkung des Substituenten darf an dieser Stelle nicht überbewertet werden. Zum einen ist die Zielreaktion, die Oxidation der Seitenkette, und nicht die Zweitsubstitution am aromatischen Ring ausschlaggebend. Zum anderen handelt es sich um eine enzymkatalysierte Reaktion, bei der sterische und elektrische Einflüsse der Proteinumgebung des aktiven Zentrums entscheidend sind. Sicherlich muss in Betracht gezogen werden, dass unselektive Reaktionen, die u.a. zur Oxidation des aromatischen Ringes führen, von der Elektronendichte am aromatischen Ring abhängig sind.

Bei der *AaP*-vermittelten Oxidation von Benzylalkoholderivaten konnte mit Hilfe der HPLC-Analytik abgeleitet werden, dass mindestens zwei Produkte entstehen. Die Identifizierung der Produkte erfolgte über den Vergleich mit Referenzsubstanzen. So konnte bei allen Benzylalkoholderivaten festgestellt werden, dass die korrespondierende Benzoessäure aus dem Benzaldehyd, das als Zwischenprodukt anfiel, entstand. Hofrichter et al. beschrieben, insbesondere für Toluol, dass die Oxidation sowohl an der Seitenkette als auch am Ring durch die *AaP* katalysiert wird [Ullrich 2004, Ullrich 2005]. In dieser Arbeit wurden keine vertieften Untersuchungen zur Oxidation am aromatischen Ring vorgenommen. Am Beispiel der *AaP*-katalysierten Oxidation des 4-Chlorbenzylalkohols konnte festgestellt werden, dass die Oxidation an der Seitenkette selektiv ist und ausschließlich 4-Chlorbenzoessäure als Endprodukt entstand. Bei der Oxidation von 4-Methylbenzylalkohol entstanden mehr als zwei Produktpeaks, die jedoch nicht identifiziert worden sind. Es ist anzunehmen, dass hier auch die Methylseitenkette oxidiert wurde. Die Oxidation am aromatischen Ring ist bei den einfach substituierten Benzylalkoholderivaten nicht so wahrscheinlich wie beim Toluol, da eine Drittsubstitution energetisch nicht begünstigt ist.

## 4.10.3 Die Oxidation von Indol

## 4.10.3.1 Einleitung

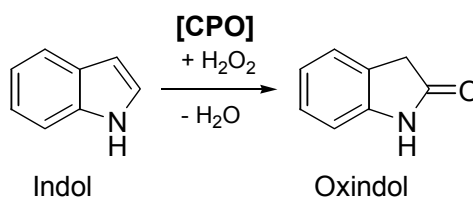
Das Oxidationsprodukt Oxindol und dessen Derivate sind von biologischer und pharmazeutischer Bedeutung [Sundberg 1970, Houlihan 1972, Wiseman 1973]. Die bekanntesten Vertreter sind Tenidap (5-Chlor-2-hydroxy-3-(2-thienylcarbonyl)-1*H*-indol-1-carboxamid), was zur Behandlung von Arthritis eingesetzt wird [Lewis 1989] und Ropinirol (4-[2-(Dipropylamino)]ethyl-oxindol), was sich als sehr wirksames und selektives Mittel gegen die Parkinsonsche Krankheit erwiesen hat [Kleemann 2000] (Abb. 4.52).



**Abb. 4.52. Tenidap, ein nichtsteroidales Antirheumatikum zur Behandlung von Arthritis, und Ropinirol, ein Dopaminagonist als Mittel gegen die Parkinson-Krankheit und das Restless-Legs-Syndrom.**

Es existieren eine Vielzahl chemischer Methoden zur Darstellung von Oxindol und Derivate, die größtenteils auf Cyclisierungsreaktionen beruhen und viele Präparationsstufen umfassen. Dazu gehört z.B. die Gassmann-Methode, ausgehend von einer Anilinverbindung [Gassman 1974], Cyclisierungen von *N*-Acylphenylhydrazinen [Endler 1963], Photochemische Cyclisierungen von *N*-Acetylanilinverbindungen [Hamada 1981, Boivin 1994, Goehring 1985], um nur einige Synthesemethoden zu nennen.

Die direkte Oxidation von Indol führt in der Regel zum Indoxyl und nicht zum Oxindol. Die 3-Position des Indols ist elektronenreicher und wird bevorzugt oxidativ angegriffen. Die Chlorperoxidase aus *C. fumago* katalysiert die selektive Oxidation der 2-Position in direkter Nachbarschaft zum Stickstoff des Indols zum Oxindol (Abb. 4.53) [Corbett 1979].



**Abb. 4.53. CPO-katalysierte Oxidation von Indol zu Oxindol.**

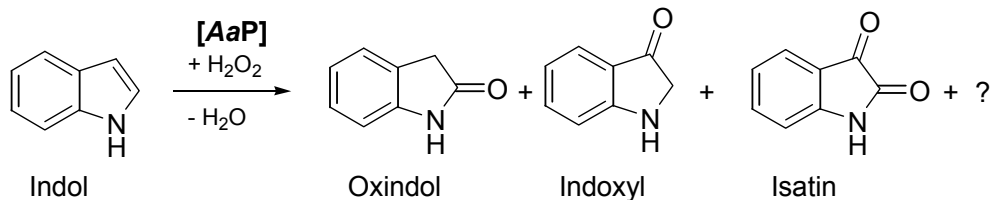
Van Deurzen et al. und Seelbach et al. optimierten die CPO-katalysierte Oxidation von Indol zu Oxindol, indem *t*-Butylalkohol/Puffer als Reaktionsmedium und eine sensorgesteuerte Wasserstoffperoxid dosierung gewählt wurden [van Deurzen 1997-c, van Deurzen 1997-b, Seelbach 1997-a]. Dadurch konnte die Ausbeute des Oxindols deutlich erhöht werden, da so die Substratlöslichkeit erhöht wurde und unselektive Nebenreaktionen durch eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überdosierung vermieden wurden. Zudem zeigte van Deurzen, dass die CPO fähig ist, eine breite Palette an substituierten Indolderivate zu katalysieren [van Deurzen 1997-a].

4.10.3.2 *Agrocybe aegerita* Peroxidase-katalysierte Oxidation von Indol

Es wurde im Zitronensäure-Phosphat-Puffer ohne Co-Solvent die Oxidation von 0,5 mM Indol mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid, dass alle 20 min nachdosiert wurde, mit 25 nM AaP

katalysiert (**M** 7.10.4). Schon nach 50 Minuten Reaktionszeit wurde ein vollständiger Umsatz erreicht.

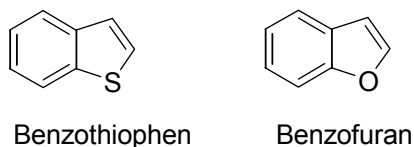
Mit Hilfe der GC-MS-Analytik konnte festgestellt werden, dass Oxindol als Produkt entstanden ist (**M** 7.10.1.3). Neben dem Oxindol als Hauptprodukt wurden allerdings auch Indoxyl, Isatin und nicht identifizierte Produkte gefunden (Abb. 4.54).



**Abb. 4.54. Die AaP-katalysierte Oxidation von Indol mit Wasserstoffperoxid.**

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um Aussagen über die Ausbeute des Oxindols und somit die Selektivität der AaP-katalysierten Indoloxidation zu treffen, und um festzustellen unter welchen Bedingungen die weiteren Oxidationsprodukte entstanden sind.

Neben dem Indol wurden auch Benzothiophen und Benzofuran (Abb. 4.55), katalysiert durch die AaP, mit Wasserstoffperoxid unter den oben genannten Bedingungen oxidiert.



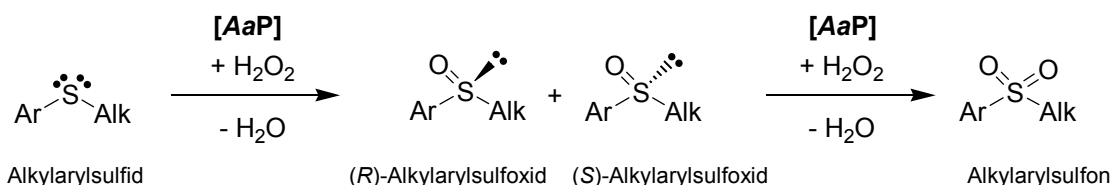
**Abb. 4.55. Die Benzoheterocyclen Benzothiophen und Benzofuran.**

Im Unterschied zur CPO [van Deurzen 1996] katalysiert die AaP die Oxidation dieser benzoanelierten Ringssysteme. Für Benzofuran konnte nach 50 Minuten Reaktionszeit ein Umsatz von 97 % und 40 % für Benzothiophen festgestellt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das synthetische Potential in der regio- und enantioselektiven Reaktion für das Enzym *Agrocybe aegerita* Peroxidase (*AaP*) aus dem gleichnamigen Basidienspiz aufzeigt. Insbesondere konnte das Potential der *AaP* als innovativer neuer Biokatalysator in der enantioselektiven Sulfoxidation dargestellt werden. Die einzelnen Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

- 1) Die neuartige Haloperoxidase *Agrocybe aegerita* Peroxidase konnte **erfolgreich in der Synthese optisch aktiver Sulfoxide etabliert** werden. In der Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden entsteht das (*R*)-Alkylarylsulfoxid im Überschuss. Das Enzym katalysiert ebenfalls die Oxidation des Alkylarylsulfoxids zum Alkylarylsulfon (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1. Die enantioselektive *AaP*-katalysierte Oxidation von Alkylarylsulfid zum chiralen Alkylarylsulfoxid und Alkylarylsulfon als Folgeprodukt.**

- 2) Für die Charakterisierung des Enzyms in der enantioselektiven Sulfoxidation diente Thioanisol (Methylphenylsulfid) als Modell-Substrat.
- 3) In der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol wurde ein Enantiomerenüberschuss von 84 % erhalten. Damit besitzt die *AaP* nicht die Eigenschaft der CPO, in einem hohen Maß zwischen zwei prochiralen Substraten zu unterscheiden. Durch die *AaP*-katalysierte Oxidation des Methylphenylsulfoxids, insbesondere des unerwünschten (*S*)-Enantiomers, zum Methylphenylsulfon, kann ein Enantiomerenüberschuss > 99 % erreicht werden. Durch diesen zusätzlichen Beitrag der kinetischen Racematspaltung besitzt auch die *Agrocybe aegerita* Peroxidase die **Fähigkeit die Synthese enantiomerenreiner Sulfoxide zu katalysieren**.
- 4) Die **optimalen Reaktionsbedingungen** für die Enzymaktivität der *AaP* in der Oxidation von Thioanisol lauten:

<b>pH-Wert:</b>	<b>6,8</b>
<b>Temperatur:</b>	<b>25 °C</b>
<b>Reaktionsmedium:</b>	<b>Zitronensäure-Phosphat-Puffer</b>
<b>Oxidationsmittel:</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>Konzentration des Oxidationsmittels:</b>	<b>≤ 2 mM im Reaktionsmedium</b>

In Hinblick auf die industrielle Anwendung besitzt die *AaP* günstigere Eigenschaften als die CPO. Die Oxidation der Alkylarylsulfide, katalysiert durch die *AaP*, kann in einem weiten pH-Bereich (pH 2,2 – 10,8) stattfinden. Das **pH-Optimum** liegt dabei im neutralen Bereich (pH 6,8) und nicht wie bei der CPO im leicht sauren Bereich (pH 5,2). Auch das pH-Optimum der Halogenierungsreaktion liegt weniger im Sauren (pH 4, anstelle von pH 2,8 bei der CPO).

Der bedeutendste **Unterschied zur CPO** ist die **hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akzeptanz**. In der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kinetik kam es erst bei einem 25-fachen Überschuss an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegenüber Thioanisol zur Verminderung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Solange der *AaP* ein Substrat mit einem K<sub>m</sub>-Wert < 500 μM zur Verfügung steht, kann das Oxidationsmittel äquimolar zudosiert werden (dazu auch Tab. 5.1).

- 5) Aus Tabelle 5.1 ist zu entnehmen, dass die **enzymkinetischen Daten** der *AaP* bei weitem günstiger sind als die der CPO. Die Affinität der *AaP* zum Oxidationsmittel ist viel geringer als zu den Alkylarylsulfiden, die enantioselektiv zum (*R*)-Methylsulfoxid katalytisch oxidiert werden sollen. Die Neigung des Enzyms das Oxidationsmittel katalytisch zu zersetzen, steht im Unterschied zur CPO-Katalyse in keiner Konkurrenz zur Umsetzung der Alkylarylsulfide. Die Spezifitätskonstanten der *AaP* in der enzymkatalysierten Umsetzung von Alkylarylsulfiden sind um zwei Zehnerpotenzen höher als die der CPO. Im Gegensatz dazu sind die Spezifitätskonstanten der *AaP* in der enzymkatalysierten Umsetzung von Wasserstoffperoxid um eine Zehnerpotenz niedriger als die der CPO. Die *AaP* ist daher das selektivere Enzym in der Sulfoxidationsreaktion. Wasserstoffperoxid hat keinen Einfluss auf die *AaP*, solange ein Substrat mit günstigen kinetischen Konstanten zur Verfügung steht.

**Tab. 5.1. Michaelis-Menten-Konstanten und Spezifitätskonstanten ausgewählter Substrate der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation und Disproportionierung von Wasserstoffperoxid im Vergleich zur CPO.**

Substrat	Parameter	<i>AaP</i> <sup>h</sup>	CPO	Referenz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <sup>i</sup>	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1270	$\ll 100$	[Seelbach 1997-a]
	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	444	650	[van Deurzen 1996]
	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$3,50\cdot 10^5$	$\gg 6,50\cdot 10^6$	-
<b>Thioanisol</b>	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24,9	900	[van Deurzen 1996]
	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	444	650	[van Deurzen 1996]
	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$1,79\cdot 10^7$	$7,30\cdot 10^5$	[van Deurzen 1996]
<b>4-Brom-thioanisol</b>	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6,61	$\gg 300$	[van Deurzen 1996]
	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	235	57,9	[van Deurzen 1996]
	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$3,55\cdot 10^7$	$1,93\cdot 10^5$	[van Deurzen 1996]
<b>Methylphenylsulfoxid</b> <sub>racemisch</sub>	$K_{m,app}$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1607	-	-
	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	25,6	-	-
	$k_{cat}/K_{m,app}$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$1,59\cdot 10^4$	-	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <sup>j</sup>	$K_m$ -Wert, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1140	20000	[Manoj 2001]
	$k_{cat}$ , $\text{s}^{-1}$	97,4	3460	[Manoj 2001]
	$k_{cat}/K_m$ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$8,54\cdot 10^4$	$1,73\cdot 10^5$	[Manoj 2001]

- 6) Die **Weiteroxidation des Methylphenylsulfoxid** ist aus enzymkinetischer Sicht nicht begünstigt (Tab. 5.1). Sie steht in starker Konkurrenz zur *AaP*-katalysierten Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die zur Desaktivierung des Enzyms führt. Um jedoch die *AaP*-katalysierte Oxidation des Methylphenylsulfids zur Erhöhung des Enantiomerenüberschusses zu nutzen (s. Punkt 3), muss die Dosierung des Wasserstoffperoxids im Unterschuss erfolgen und somit reaktionslimitierend sein.
- 7) Neben **Wasserstoffperoxid** wurden auch **TBHP** und **Peressigsäure als Oxidationsmittel** getestet. TBHP ist zwar im Gegensatz zur Peressigsäure als Oxidationsmittel geeignet, jedoch konnte keine Verbesserung im Umsatz und der Enantioselektivität erzielt werden. Der  $K_{m,app}$ -Wert der für TBHP in der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol ermittelt wurde, ist mit 25550  $\mu\text{M}$  um das 20-fache größer als die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Thioanisoloxidation.
- 8) Durch den Zusatz von **Co-Solventien** konnte keine Verbesserung im Umsatz und in der Enantioselektivität der *AaP*-katalysierten Sulfoxidationsreaktion erzielt werden.

<sup>h</sup> Ergebnisse dieser Arbeit.

<sup>i</sup> Bestimmt in der *AaP*-katalysierten Oxidation von Thioanisol.

<sup>j</sup> Bestimmt in der *AaP*-katalysierten Disproportionierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



- 9) Die **Immobilisierung** der *AaP* in PDMS und Calcium-Alginat, sowie die adsorptive Bindung an dem Anionenaustauscher-Harz Duolite A 568 konnte erfolgreich demonstriert werden.

Der Einsatz der immobilisierten *AaP*, in Form einer statischen Emulsion in PDMS, in hydrophoben organischen Lösungsmitteln (n-Heptan, Isooctan, n-Decan) ist möglich. Es wurden dabei **hohe ee-Werte** erzielt (**91 % in Isooctan und n-Decan** nach 27 h). Allerdings ist die Umsatzrate stark limitiert.

- 10) An einer Reihe einfach substituierter Alkylarylsulfide bzw. Thioanisolanaloge mit einer verlängerten Alkylkette konnte in einem **Substratscreening** gezeigt werden, dass die *AaP* die Umsetzung anderer Derivate dieser Substratklasse genauso effizient bzw. noch effizienter katalysieren kann.
- 11) (*R*)-Methylsulfoxid wurde erfolgreich aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Zunächst konnte die **Produktisolierung** nur im Milligramm-Bereich (300 mg) gezeigt werden, da die Enzymverfügbarkeit noch limitierend wirkte.
- 12) Neben der enantioselektiven Sulfoxidationsreaktion konnte das synthetische Potential der *AaP* auch in der **Halogenierung von Phenol**, der **Oxidation von Benzylalkohol-derivaten** und in der **Oxidation von Indol, Benzothiophen und Benzofuran** gezeigt werden. Wie die CPO katalysiert die *AaP* die Umsetzung dieser Substrate, auch die von Benzothiophen und Benzofuran, die von der CPO nicht katalysiert wird.

Das katalytische Verhalten der *AaP* unterscheidet sich dabei stark von dem der CPO. So katalysiert die *AaP* bevorzugt und in hohem Maße die oxidative Bromierung des Phenols zum 2- und 4-Bromphenol. Weiterhin besitzt die *AaP* im Unterschied zur CPO das Potential die Oxidation der Benzaldehydderivate weiter zu den Benzylsäuren zu katalysieren. In der *AaP*-katalysierten Oxidation des Indols entstehen neben dem Oxindol weitere Oxidationsprodukte, von denen Indoxyl und Isatin identifiziert werden konnten.

## 6 Ausblick

Da die einzelnen Ergebnisse am Ende eines jeden Kapitels zusammenfassend diskutiert wurden, soll an dieser Stelle eine abschließende und umfassende Bewertung der neuartigen Peroxidase in der Anwendung als enantioselektiver Biokatalysator in der Sulfoxidation erfolgen.

Mit der *Agrocybe aegerita* Peroxidase konnte ein neuartiges Enzym in der asymmetrischen Synthese optisch aktiver Sulfoxide eingesetzt werden. Die hohe Substratspezifität der *AaP* gegenüber Alkylarylsulfiden und die vergleichend niedrige Affinität zum Oxidationsmittel, was eine stöchiometrische Wasserstoffperoxid dosierung ermöglicht, macht diese Peroxidase für die industrielle Anwendung sehr wertvoll und ermöglicht die Überwindung der bisherigen Nachteile, die in der CPO-katalysierten Sulfoxidation vorherrschen (geringe Stabilität gegenüber dem Oxidationsmittel, was eine reaktionslimitierende Dosierung des Oxidationsmittels voraussetzt). Da die erreichte Enantioselektivität (ee-Wert > 99 %) der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation die der chemischen Alternativen übertrifft, ist es wünschenswert eine Scale-up-fähige *AaP* zu erzeugen.

Der limitierende Faktor in der Prozessoptimierung und im Scale-up, mit der *AaP* als Biokatalysator, ist derzeit die Enzymverfügbarkeit. Die Verwendung des nicht gereinigten Rohenzym erreichte in der Enzymimmobilisierung (Kapitel 4.7) und in der Produktisolierung (Kapitel 4.9) die Grenzen. Im Folgenden sind die Möglichkeiten der **Optimierung unter Verwendung des Rohextraktes** dargestellt:

In der Oxidation von 1 mM Thioanisol mit 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalysiert durch 360 nM *AaP* in 30 mL Puffer, konnte ein vollständiger Umsatz zu 0,96 mM (*R*)-Methylphenylsulfoxid in **1,5 h** erreicht werden (s. Kapitel 4.4.1.2). Daraus ergibt sich für die Zyklenzahl und Raum-Zeit-Ausbeute: **ttn = n<sub>p</sub>/n<sub>Kat</sub> = 2667 und RZA = 2,15 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>**.

Eine Nachdosierung des Thioanisols in einer **fed batch Prozessführung**, könnte, bei gleich bleibender Stabilität der *AaP*, die Zyklenzahl drastisch erhöhen. Eine fed batch Prozessführung wirkt sich jedoch ungünstig auf die Raum-Zeit-Ausbeute aus.

Für den Umsatz von 15 mM Thioanisol in einer **batch** Reaktionsführung könnte man theoretisch unter denselben Bedingungen eine **ttn von 40000** erhalten. Bei gleich bleibender Umsatzgeschwindigkeit würde dafür eine Reaktionszeit von ca. **22,5 h** benötigt. Die **RZA** verschlechtert sich bei Verlängerung der Reaktionszeit auf **1,6 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>** und würde sich bei einer Dosierung des Oxidationsmittels durch die Vergrößerung des Reaktionsvolumens weiterhin verkleinern.

Um in **großen Mengen reines *AaP*-Protein zu produzieren** ist es notwendig, das enzymproduzierende Genom der *Agrocybe aegerita* in einem leicht zu manipulierenden und zu reinigenden System, wie z.B. *E. coli*, zu exprimieren.

In der Abbildung 6.1 ist aufbauend auf die Ergebnisse dieser Arbeit eine weiterführende Prozessentwicklung der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation vorgeschlagen.

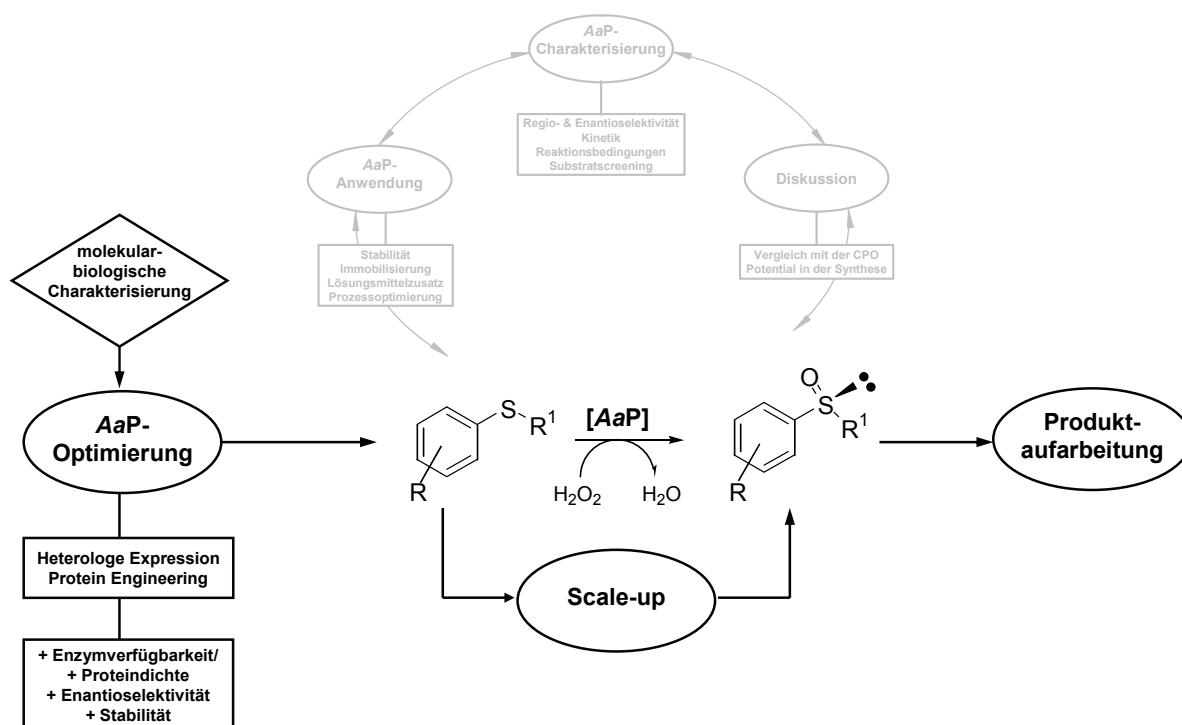


Abb. 6.1. Die Weiterentwicklung des *AaP*-Einsatzes in der enantioselektiven Sulfoxidation.

In dieser Arbeit wurden alle notwendigen, prozessrelevanten Bedingungen (u.a. Reaktionsbedingungen, Co-Solventzugabe, Enzymimmobilisierung, Kinetik) an der *AaP*-katalysierten Sulfoxidation getestet und stehen als Daten für ein **Scale-up** im großtechnischen Maßstab zur Verfügung (Abb. 6.1). Bei einer **Optimierung der *AaP*-Produktion**, die für eine ausreichende Katalysatorverfügbarkeit in hoher Reinheit sorgen muss, ist auch das molekulare Eingreifen zur Verbesserung der **Enantioselektivität** und **Chemoselektivität** vorstellbar. Die aus dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind wichtige Bausteine in der Aufklärung des Enzymmechanismus, um gezielt und mit Hilfe der molekularbiologischen Charakterisierung auf das Protein einzuwirken zu können.

Für die **Reaktionsführung in einem Scale-up** muss beachtet werden, dass ab einer bestimmten Thioanisolkonzentration, die unterschritten wird, die Oxidation des Sulfoxides zum Sulfon katalysiert wird. Sobald es zur enantioselektiven *AaP*-katalysierten Oxidation zum Sulfon kommt, sollte das Oxidationsmittel bedarfsgerecht zudosiert werden, um die *AaP*-katalysierte Disproportionierung des Oxidationsmittels zu unterdrücken. Eine Möglichkeit die Konzentration des Sulfoxides im Reaktionssystem niedrig zu halten, wäre eine **in situ Produktisolierung**. Der große Vorteil in der Sulfoxidation ist, dass sich das Sulfid und das Sulfoxid stark in ihrer Polarität unterscheiden. Im Gegensatz zu dem Sulfid ist das Sulfoxid stark polar. Zwei Lösungsansätze hierfür sind denkbar:

- Die Reaktion läuft in einem Zwei-Phasen-System ab: Hierbei muss jedoch gewährleistet sein, dass die enzymkatalysierte Umsetzung in der organischen Phase, in der sich das Sulfid anreichert, stattfindet. Wird die *AaP* in hydrophoben PDMS-Sphären eingeschlossen, kann die Biokatalyse in der unpolaren Phase realisiert werden. Das Produkt reichert sich in der wässrigen Phase an und wird so separiert. Ist die Enantioselektivität der *AaP* durch gezielte Mutagenese, z.B., noch nicht optimiert worden, ist die Umsetzung zum Sulfon erwünscht, um über die enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung den Enantiomerenüberschuss des (*R*)-Enantiomers zu

erhöhen. Nach der Separation der wässrigen von der organischen Phase kann die Racematspaltung dann gesondert katalysiert werden.

- Die Reaktion findet im Puffer statt: Durch eine Abtrennung des Produktes *in situ*, kann die Konzentration des Sulfoxids niedrig gehalten werden. Über selektive Carrier-Moleküle oder speziell modifizierte Adsorber kann das Sulfoxid aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden (Reaktivextraktion) [Schugerl 1986, Pai 2002, Hilker 2004]. Ist eine enantioselektive Weiteroxidation notwendig, da die Enantioselektivität der *AaP* noch nicht optimiert werden konnte, kann die *AaP*-katalysierte kinetische Racematspaltung separat durchgeführt werden.

Um eine effiziente und effektive **Produktaufarbeitung** zu gewährleisten, muss eine speziell für die *AaP*-katalysierte Sulfoxidation abgestimmte Produktseparation erarbeitet werden, die u.a. auch von der Reaktionsführung abhängig ist. In dieser Arbeit konnte die Isolierung des (*R*)-Sulfoxids vom Sulfon mit Hilfe von Kieselgel als stationäre Phase gezeigt werden. Eine einfache Möglichkeit, das Produkt von dem Enzym zu trennen, ist die Enzymrückhaltung durch Membranen oder die Trägerfixierung.

## 7 Methoden

Alle Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser hergestellt.

### 7.1 HPLC-Analytik: Alkylarylsulfide – chirale Alkylarylsulfoxide

Säule:	Eurocel 01 (5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm), Knauer GmbH
Detektor:	UV-Detektor K-2501, Knauer GmbH
Säulentemperatur:	25 °C
Eluenten:	<i>n</i> -Heptan : Ethanol (9 : 1)
Eluentenstrom:	1 mL·min <sup>-1</sup>

Die Wellenlänge für die für die UV-Detektion wurde für jedes Substrat am Photometer bestimmt (Tab. 7.1).

**Tab. 7.1. Gewählte Wellenlänge zur Identifizierung mit dem UV-Detektor.**

Wellenlänge $\lambda$ , nm	Substanzen + Produkte
193	Benzylmethylsulfid
200	Ethylphenylsulfid, 4-Methylthioanisol, 4-Methoxythioanisol, Vinylphenylsulfid, 4-Chlorthioanisol, 4-Fluorthioanisol, 1-Benzothiophen, 2-(Methylthio)benzimidazol, 2-(Methylthio)benzylamin, 3-Methyl-4-(methylthio)-phenol, 4-(Methylthio)anilin
205	Cyclopropylphenylsulfid, 2-Fluorthioanisol
215	2-Methoxythioanisol, 2-Chlorthioanisol, 3-Chlorthioanisol
220	Thioanisol, 2-Bromthioanisol, 3-Bromthioanisol, 4-Bromthioanisol

### 7.2 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten

Unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes und der ermittelten Regressionsgeraden (s. Anhang, Abb. 9.1) erhält man den molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  für Methylphenylsulfoxid bei  $T = 25\text{ °C}$  und  $\lambda = 230\text{ nm}$ :  $\epsilon_{230} = 3190\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Tab. 7.2. Molare Extinktionskoeffizienten bei 25 °C .**

Substrat	$\epsilon$ , L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	d, cm	$\lambda$ , nm	T, °C
Thioanisol	7910	1	250	25
Methylphenylsulfoxid	3190	1	230	25
4-Bromthioanisol	7840	1	257	25
4-Chlorthioanisol	12696	1	260	25
Ethylphenylsulfid	6786	1	254	25
4-Fluorthioanisol	8834	1	250	25
2-Methoxythioanisol	6761	1	254	25
Veratrylalkohol	9300	1	310	25

Die Alkylarylsulfide sind sehr schlecht in Wasser löslich. Daher wurden die Stammlösungen der hydrophoben Substrate zunächst in dem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel Propylencarbonat hergestellt, um so eine präzise Dosierung zu gewährleisten. Aus der propylencarbonatbasierenden Stammlösung wurden Verdünnungsreihen in entionisiertem Wasser erstellt, in denen der Propylencarbonatanteil immer 10 % (v/v) betrug, so dass in der Messküvette stets ein Propylencarbonat-Gehalt von 1 % (v/v) eingestellt werden konnte.

### 7.3 Photometrische Assays

#### 7.3.1 Standardassay – Die Oxidation von Veratrylalkohol

Im Standardassay der *Agrocybe aegerita* Peroxidase wurde die Enzymaktivität über die Umsetzung von Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzylalkohol) mit Wasserstoffperoxid photometrisch bestimmt. Es wurde die Reaktionsgeschwindigkeit des entstehenden Aldehyds durch den Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 310 nm beobachtet.

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	310 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	3,4-Dimethoxybenzylalkohol:	5 mmol·L <sup>-1</sup>
	Enzymlösung:	0,12 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer Quarzküvette wurden 690 µL Puffer, 100 µL 50 mM 3,4-Dimethoxybenzylalkohol und 200 µL 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µL 200 mM Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Der Anstieg der Absorption bei 310 nm wurde über 2 min am Photometer verfolgt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde nur der lineare Bereich  $\Delta A$  der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit herangezogen. Bei der in Gleichung 2 benutzten Formel handelt es sich um eine volumenbezogene Enzymaktivität.

$$\left[ \text{U/mL}_{\text{Enzymlösung}} \right] = \frac{\Delta A \cdot 60 [\text{min}^{-1}] \cdot V_{\text{Reaktionsvolumen}} [\mu\text{L}]}{\varepsilon [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}] \cdot V_{\text{Enzymlösung}} [\mu\text{L}]} \cdot 1000 \quad (2)$$

##### 7.3.1.1 Der Einfluss wasserlöslicher organischer Lösungsmittel und halogenfreier ionischer Flüssigkeiten auf die Enzymaktivität

Puffer-Lösungsmittelgemische bzw. Puffer-IL-Gemische mit 5 % (v/v) hydrophiler organischer Lösungsmittel wurden hergestellt und für die Aktivitätsmessung (M 7.3.1) verwendet.

**Verwendete organische Lösungsmittel:** Triethylenglycol, Dimethylsulfoxid, 1,3-Propan-diol, Propylencarbonat, Acetonitril, Ethanol, 1,4-Dioxan, Aceton, 2-Propanol, *tert*-Butanol, Tetrahydrofuran, 2-Butanol, 1-Butanol

**Verwendete IL's:** [BMIM][BF<sub>4</sub>], [ECOENG 41M], [ECOENG 500], [ECOENG 212], [EMIM][TOS] und 4-Methylethylpyridiniumdiethylphosphat

#### 7.3.2 Thioanisol-Assay

In dieser Arbeit wurde vorwiegend der Thioanisol-Assay als Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Da Thioanisol als Modellsubstrat ausgewählt wurde, konnten mit Hilfe dieses Assays alle Einflüsse auf die Enzymaktivität bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 250 nm wurde die Abnahme der Absorption von Thioanisol beobachtet.

### 7.3.2.1 Die Bestimmung der Enzymaktivität

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	250 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	Thioanisol:	0,1 mmol·L <sup>-1</sup> (1 % (v/v) PPC)
	Enzymlösung:	0,006 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer Quarzküvette wurden 880 µL Puffer, 100 µL 1 mM Thioanisollösung (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 10 µL 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µL 200 mM Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Der Anstieg der Absorption bei 250 nm wurde über 1 min am Photometer verfolgt. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Für diese Arbeit wurden verschiedene gefriergetrocknete Proben der *AaP* verwendet. Die Daten des Herstellers sowie die gemessenen Enzymaktivitäten sind in folgender Tabelle aufgelistet:

**Tab. 7.3. Enzymaktivitäten der verschiedenen gefriergetrockneten Enzymchargen.**

Herstellungsjahr der Enzymcharge		<i>AaP</i> - 2006	<i>AaP</i> - 2007	<i>AaP</i> - 2008
Angaben des Herstellers	<i>AaP</i> -Aktivität <sup>k</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Lyophilisat</sub>	0,47	0,32	0,71
	Proteingehalt, mg·g <sup>-1</sup>	250	200	282
	spez. <i>AaP</i> -Aktivität <sup>l</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Protein</sub>	1,88	1,60	2,54
Gemessen	<i>AaP</i> -Aktivität <sup>l</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Lyophilisat</sub>	1,40	0,63	2,20
	spez. <i>AaP</i> -Aktivität <sup>k</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Protein</sub>	5,60	3,15	7,86
	1 U <i>AaP</i> , mg <sub>Lyophilisat</sub> mL <sup>-1</sup>	0,69	1,58	0,47

Zusätzlich wurde mit einer Probe des gereinigten Enzyms gearbeitet, die aus der Arbeitsgruppe Prof. Hofrichter, IHI Zittau, erhalten wurde. Die gereinigte *AaP* II (2007, bestehend aus zwei Isoenzym-Formen) hatte eine Proteinkonzentration von 2 mg·mL<sup>-1</sup> (Enzymkonzentration). Die Volumenaktivität im Standardassay beträgt 95 µmol·min<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup> (Angabe des Herstellers) und die Volumenaktivität im Thioanisol-Assay betrug 227,56 µmol·min<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup>.

### 7.3.2.2 Die Bestimmung des pH-Maximums für die Sulfoxidation von Thioanisol

Der pH-Wert des Zitronensäure-Phosphat-Puffer wurde variiert (s. Anhang, 9.5). Die Enzymaktivität (s. M 7.3.2.1) wurde bei pH 5, pH 6, pH 6,8, pH 7 und pH 8 bestimmt.

### 7.3.2.3 Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Pufferwahl und Pufferkonzentration

Phosphat-Puffer, Essigsäure-Acetat-Puffer und Zitronensäure-Phosphat-Puffer (s. Anhang, 9.5) wurden auf ihren Einfluss im Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) untersucht. Des Weiteren wurde die Konzentration des Zitronensäure-Phosphat-Puffer in einem Bereich von 15 mM – 500 mM variiert und für die Bestimmung der *AaP*-Aktivität (M 7.3.2.1) herangezogen.

<sup>k</sup> Bestimmung der Enzymaktivität über den photometrischen Veratrylalkohol-Assay (M 7.3.1)

<sup>l</sup> Bestimmung der Enzymaktivität über den photometrischen Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1).

### 7.3.2.5 Der Einfluss von 5 % (v/v) Co-Solvent auf die Enzymaktivität

Die Enzymaktivität (M 7.3.2.1) wurde in Anwesenheit von 5 % (v/v) Co-Solvent bestimmt. Als Co-Solventien wurden Triethylenglycol, Ethylenglycol, Propylencarbonat und *t*-Butanol verwendet.

### 7.3.2.6 Die Standstabilität der *AaP* bei Raumtemperatur

- **im Zitronensäure-Phosphat-Puffer bei pH 6,8:** 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> lyophilisierte *AaP* wurden in Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert. In diesem Zeitraum wurde in regelmäßigen (2 – 3 Mal in der Woche) Abständen die Enzymaktivität mit dem Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) bestimmt.

- **in entionisiertem Wasser:** 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> lyophilisierte *AaP* wurden in entionisiertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert. In diesem Zeitraum wurde in regelmäßigen (2 – 3 Mal in der Woche) Abständen die Enzymaktivität mit dem Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) bestimmt.

- **unter Reaktionsbedingungen:** 0,006 mg·mL<sup>-1</sup> lyophilisierte *AaP* wurden zusammen mit 0,1 mM Thioanisol und 1 % Propylencarbonat im Puffer gelöst und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert. In diesem Zeitraum wurde in regelmäßigen (2 – 3 Mal in der Woche) Abständen die Enzymaktivität mit dem Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) bestimmt. Die gewählten Bedingungen sind denen in der Messküvette des Thioanisol-Assays identisch. Deshalb wurden hierzu 990 µL der mit Thioanisol und Propylencarbonat versetzten Enzymlösung mit 10 µL 200 mM Wasserstoffperoxidlösung versetzt und photometrisch vermessen.

- **bei Zusatz von 1 % (v/v) Propylencarbonat:** 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> lyophilisierte *AaP* wurden in Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert. Zusätzlich wurde 1 % (v/v) Propylencarbonat der Enzymlösung beigelegt. In diesem Zeitraum wurde in regelmäßigen (2 – 3 Mal in der Woche) Abständen die Enzymaktivität mit dem Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) bestimmt.

- **bei Zusatz von 0,1 mM Ascorbinsäure:** 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> lyophilisierte *AaP* wurden in Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst und bei Raumtemperatur vier Wochen gelagert. Zusätzlich wurde 0,1 mM Ascorbinsäure in die Enzymlösung gegeben. In diesem Zeitraum wurde in regelmäßigen (2 – 3 Mal in der Woche) Abständen die Enzymaktivität mit dem Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1) bestimmt.

## 7.4 Die Bestimmung der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten

Die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde größtenteils mit der photometrischen Messung durchgeführt. Die Peroxidase katalysiert einen Zwei-Substrat-Mechanismus. Die Michaelis-Menten-Theorie ist allgemein gültig für einen Ein-Substrat-Mechanismus. Da diese Theorie zur Ermittlung der kinetischen Parameter herangezogen wurde, werden die ermittelten Konstanten als scheinbare (*engl.*: apparent) Michaelis-Menten-Konstanten bezeichnet [Buchholz 2005-a].

7.4.1 Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid

### 7.4.1.1 Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{Thioanisol}}$ und des $K_{m,\text{app.}}$ -Wertes von Thioanisol

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von Thioanisol wurden alle Bedingungen bis auf die Thioanisolkonzentration konstant gehalten.



Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	250 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL (1 cm); 0,3 mL (0,1 cm)
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm und 0,1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	Thioanisol:	0,01 – 0,5 mmol·L <sup>-1</sup> (1 % (v/v) PPC)
	Enzymlösung:	0,006 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer 1 cm-Quarzküvette wurden 880 µL Puffer, 100 µL 0,1 – 1,0 mM Thioanisol (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 10 µL 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µL 200 mM Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Der Anstieg der Absorption bei 250 nm wurde über 1 min am Photometer verfolgt. Ab einer Thioanisolkonzentration von 0,15 mM in der Messlösung musste, aufgrund der starken Intensitätsschwankungen (Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes), die Schichtdicke der Küvette verkleinert werden. Für die Messung der höheren Thioanisolkonzentrationen wurden in einer 0,1 cm-Quarzküvette 30 µL 1,5 – 5 mM Thioanisol (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 3 µL 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung in 264 µL Puffer bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µL Wasserstoffperoxid gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Die kinetischen Parameter wurden über eine nicht lineare Kurvenanpassung ermittelt (s. Anhang, Abb. 9.2). Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Thioanisolkonzentration folgt scheinbar der Michaelis-Menten-Kinetik (Glg. 3).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Die kinetischen Parameter lauten:

$$K_{m, \text{app.}} = 24,86 \pm 2,65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}, v_{\max} = 2,78 \pm 0,67 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Lyophilisat}$$

#### 7.4.1.2 Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{H}_2\text{O}_2}$ , der Inhibierungskonstante $k_{i, \text{app.}}$ und des $K_{m, \text{app.}}$ -Wertes von Wasserstoffperoxid

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	250 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	0,1 – 6 mmol·L <sup>-1</sup>
	Thioanisol:	0,1 mmol·L <sup>-1</sup> (1 % (v/v) PPC)
	Enzymlösung:	0,006 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer Quarzküvette wurden 100 µL 1 mM Thioanisol (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 10 µL 0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung im Puffer bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Konzentration des Oxidationsmittels wurde von 0,1 – 6 mM in der Messküvette variiert. Der Anstieg der Absorption bei 250 nm wurde über 1 min am Photometer verfolgt. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Die kinetischen Parameter wurden über eine nicht lineare Kurvenanpassung ermittelt. Die Abhängigkeit des Wasserstoffperoxids bei der Sulfoxidation von Thioanisol ist in Abbildung

7.3 dargestellt. Es liegt hier eine Form der Substratüberschussinhibierung vor. Die Inhibierungsgleichung beschreibt aber nicht den bekannten Verlauf einer Inhibierung (s. Anhang, Abb. 9.3). Eine Modifizierung der allgemeinen Inhibierungsgleichung gibt den aufgenommenen Verlauf besser wieder (Glg. 4).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]}{K_m + \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]^2}{k_i}} \quad (4)$$

Es ergeben sich daraus folgende Werte:

$$K_{m,\text{app.}} = 1,27 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}, v_{\max} = 2,72 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{Lyophilisat}}, k_{i,\text{app.}} = 4,35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

#### 7.4.2 Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisol mit TBHP

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	250 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	TBHP:	0,5 – 100 mmol·L <sup>-1</sup>
	Thioanisol:	0,1 mmol·L <sup>-1</sup> (1 % (v/v) PPC)
	Enzymlösung:	0,12 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer Quarzküvette wurden 100  $\mu\text{L}$  1 mM Thioanisol (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 200  $\mu\text{L}$  0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung im Puffer bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von TBHP wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Konzentration des Oxidationsmittels wurde von 0,5 - 100 mM in der Messküvette variiert. Der Anstieg der Absorption bei 250 nm wurde über 1 min am Photometer verfolgt. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Gleichung 3 (M 7.4.1.1) über eine nicht lineare Kurvenanpassung ermittelt.

#### 7.4.3 Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Methylphenylsulfoxid mit Wasserstoffperoxid

Es wurde die Konzentration des racemischen Methylphenylsulfoxid variiert und dabei alle anderen Parameter konstant gehalten.

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Wellenlänge:	230 nm
	Reaktionsvolumen:	1 mL (1 cm); 0,3 mL (0,1 cm)
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm und 0,1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	2 mmol·L <sup>-1</sup>
	Methylphenylsulfoxid, racemisch:	0,1 – 4,5 mmol·L <sup>-1</sup>
	Enzymlösung:	0,12 mg·mL <sup>-1</sup>

In einer 1 cm-Quarzküvette wurden 880  $\mu\text{L}$  Puffer, 100  $\mu\text{L}$  0,1 - 0,2 mM Methylphenylsulfoxid und 200  $\mu\text{L}$  0,6 mg·mL<sup>-1</sup> Enzymlösung bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  200 mM Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Der Anstieg der Absorption bei 230 nm wurde über 1 min am Photometer verfolgt. Ab einer Methylphenylsulfoxidkon-

zentration von 0,3 mM in der Messlösung musste, aufgrund von Intensitätsschwankungen (Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes), die Schichtdicke der Küvette verkleinert werden. Für die Messung der höheren Substratkonzentrationen wurden in einer 0,1 cm-Quarzküvette 0,3 – 4,5 mM Methylphenylsulfoxid und 60  $\mu\text{L}$  0,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Enzymlösung im Puffer bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3  $\mu\text{L}$  Wasserstoffperoxid gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Gleichung 3 (M 7.4.1.1) über eine nicht lineare Kurvenanpassung ermittelt.

#### 7.4.4 Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die enzymkatalysierte Oxidation von Thioanisolanaloga mit Wasserstoffperoxid

Von folgenden Substraten wurde die Kinetik am Photometer bei entsprechender Wellenlänge aufgenommen:

4-Bromthioanisol (257 nm), 4-Chlorthioanisol (260 nm), Ethylphenylsulfid (254 nm), 4-Fluorthioanisol (250 nm), 2-Methoxythioanisol (254 nm)

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Reaktionsvolumen:	1 mL (1 cm); 0,3 mL (0,1 cm)
	Schichtdicke der Quarzküvette:	1 cm und 0,1 cm
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,8
	Alkylarylsulfid:	0,005 – 1,0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1 % (v/v) PPC)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
	Enzymlösung:	0,006 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

In einer 1 cm-Quarzküvette wurden 880  $\mu\text{L}$  Puffer, 100  $\mu\text{L}$  0,05 – 3 mM Alkylarylsulfid (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 10  $\mu\text{L}$  0,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Enzymlösung bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  200 mM Wasserstoffperoxid wurde die Enzymreaktion gestartet. Der Anstieg der Absorption wurde über einen Zeitverlauf von 1 min am Photometer verfolgt. Ab einer Substratkonzentration von 0,4 mM in der Messlösung (Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes) wurde die Schichtdicke der Küvette verkleinert. Für die Messung der höheren Konzentrationen wurden in einer 0,1 cm-Quarzküvette 30  $\mu\text{L}$  4 – 10 mM Alkylarylsulfid (PPC-Gehalt: 10 % (v/v)) und 3  $\mu\text{L}$  0,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Enzymlösung in 264  $\mu\text{L}$  Puffer bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3  $\mu\text{L}$  Wasserstoffperoxid gestartet. Die Enzymaktivität wurde nach Gleichung 2 (M 7.3.1) berechnet.

Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Gleichung 3 (M 7.4.1.1) über eine nicht lineare Kurvenanpassung ermittelt.

#### 7.4.5 Die Messung der Sauerstoffentstehung bei der AaP-katalysierten Disproportionierung der Oxidationsmittel

Bei der AaP-katalysierten Zersetzung von Wasserstoffperoxid entsteht neben Wasser, Sauerstoff. Mit Hilfe eines optischen Sauerstoffsensors der Fa. PreSens wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Sauerstoffbildung aufgezeichnet. Die Reaktionen wurden in speziell für den Sensor präparierten 40-mL-Vials durchgeführt. Das Aufnahmegerät des Sensors wurde mit einer Zwei-Punkt-Kalibrierung geeicht. Als Kalibrierlösungen diente Wasser (100 % O<sub>2</sub>) und eine gesättigte Natriumsulfidlösung (0 % O<sub>2</sub>). Die Messung des Sauerstoffs erfolgte in  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 7.4.5.1 Die Bestimmung der Kinetik für Wasserstoffperoxid in der Katalasetyp-Reaktion

Bedingungen:	Temperatur:	22,5 °C
	pH:	6,8
Lösungen:	Reaktionsvolumen:	10 mL
	Zitronensäure-Phosphat-Puffer:	100 mmol·L <sup>-1</sup> , pH 6,8
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	0,1 - 40 mmol·L <sup>-1</sup>
	Enzymlösung:	0,465 mg·mL <sup>-1</sup>

Bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen 0,5 mM, 2 mM und 10 mM wurde das Oxidationsmittel jeweils ein zweites Mal in die Enzymlösung dosiert, um zu prüfen, ob das Enzym noch aktiv ist.

### 7.4.5.2 Die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in der Bildung von O<sub>2</sub> bei wiederholter Wasserstoffperoxid dosierung

Die Bedingungen wurden wie unter 7.4.5.1 gewählt, nur das statt einer 72 nM *AaP*-Lösung eine 360 nM (2,325 mg·mL<sup>-1</sup> *AaP*-Lyophilisat) *AaP*-Lösung zur Katalyse der Wasserstoffperoxidzerersetzung genutzt wurde. In diesem Versuch wurde der Anstieg der Sauerstoffentstehung, die durch wiederholte Zugabe einer 1 mM Wasserstoffperoxidlösung entstanden ist, gemessen. Anzahl der Wasserstoffperoxidzugaben: 6.

### 7.4.5.3 Der Einfluss von Thioanisol in der *AaP*-katalysierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Disproportionierung

Bei Anwesenheit von 1 mM Thioanisol wurden die Bedingungen wie unter 7.4.5.1 gewählt ( $c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ : 1 mM, 2 mM und 10 mM).

### 7.4.5.4 Die *AaP*-katalysierte Disproportionierung von TBHP

Die Bedingungen wurden wie unter 7.4.5.1 gewählt ( $c_{\text{TBHP}}$ : 2 mM, 10 mM und 100 mM).

## 7.5 Die *AaP*-katalysierte Sulfoxidation von Thioanisol mit Wasserstoffperoxid

Die Reaktionen fanden in 40 mL-Vials statt und das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C thermostatisiert und kräftig durchmischt. Das *AaP*-Lyophilisat wurde in Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst und bei 25 °C inkubiert. Die Einwaage des Lyophilisates ist von der Aktivität der Enzymcharge abhängig (Tab. 7.3). Nachdem sich das Lyophilisat vollständig im Puffer gelöst hat, wurde Thioanisol hinzugefügt. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde die Reaktion gestartet. Das Oxidationsmittel wurde gleichmäßig manuell nachdosiert. In Tabelle 7.4 sind die Konzentrationen der Substrate, der Enzymlösung und der Wiederholung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Nachdosierung für die einzelnen Reaktionsansätze zusammengefasst.

**Tab. 7.4. Reaktionsbedingungen während der enzymkatalysierten Thioanisol-oxidation mit Wasserstoffperoxid im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Dosierung	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
a	1	0,1; 0,4; 1,5; 3	1 h <sup>-1</sup>	35	360
b	3	0,4	1 h <sup>-1</sup>	35	360
c	5	0,75	1 h <sup>-1</sup>	35	360
d	5	1,5	2 h <sup>-1</sup>	5	72
e	5	0,75	1 h <sup>-1</sup>	10	220 <sup>m</sup> , 435 <sup>m</sup>
f	1	0,4	1 h <sup>-1</sup>	35	-

In der Tabelle 7.5 sind die Reaktionsbedingungen der oxidativen Umsetzung des racemischen Methylphenylsulfoxid zum Methylphenylsulfon aufgeführt.

**Tab. 7.5. Reaktionsbedingungen während der katalysierten und nicht katalysierten Oxidation von racemischen Methylphenylsulfoxid mit Wasserstoffperoxid im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.**

Nr.	[Me-phe-Sulfoxid], mM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Dosierung	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
g	5	1,5	2 h <sup>-1</sup>	10	360
h	5	1,5	2 h <sup>-1</sup>	10	-

Für die Analyse des Reaktionsgemisches mit Hilfe einer chiralen HPLC-Säule (M 7.1) wurden 900 µL Probe aus dem zuvor kräftig durchmischten (Vortex-Schüttler) Reaktionsansatz genommen und mit 100 µL einer gesättigten Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung versehen, um überschüssiges Wasserstoffperoxid zu zersetzen. Die Probe wurde dann für die HPLC-Analyse mit 900 µL *n*-Heptan extrahiert (10 s Vortex-Schüttler), und die *n*-Heptan-Phase anschließend chromatographisch untersucht.

### 7.5.1 Variation des pH-Wertes

Es wurden Pufferlösungen mit pH-Werten zwischen 2,2 und 10,8 hergestellt. Dazu wurde der Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH-Werte: 2,2; 4,0; 5,5; 6,8 und 8,0), der Phosphat-Puffer (pH-Werte: 6,8 und 8,0) und der Carbonat-Puffer (pH-Werte: 9,3 und 10,8) verwendet (s. Anhang, 9.5). Die Oxidation von 10 mM Thioanisol wurde mit 1,5 mM·(2 h)<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Pufferlösungen mit den unterschiedlichen pH-Werten bei 25 °C durch 72 nM AaP katalysiert. Vergleichend wurden unter denselben Bedingungen 10 mM Thioanisol unkatalysiert durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Die Proben wurden wie unter 7.5 beschrieben vorbereitet und analysiert.

### 7.5.2 Der Zusatz von Co-Solventien

Die Reaktionen und die Probenahme fanden wie unter 7.5 beschrieben statt. In 10-mL-Ansätzen wurde in der Pufferlösung ein Gehalt von 1, 5, 10 und 20 % (v/v) Co-Solvent eingestellt (Tab. 7.6). Es wurden Triethylenglycol (TEG), Ethylenglycol (EG), *t*-Butanol (*t*-BuOH) und Propylencarbonat (PPC) als Co-Solventien verwendet. In den 20 mL-Ansätzen wurden 30, 50 und 80 % (v/v) *t*-Butanol und Triethylenglycol als Lösungsmittel verwendet und in der enzymkatalysierten und nicht katalysierten Thioanisoloxidation eingesetzt.

<sup>m</sup> Gereinigtes AaP II-Präparat mit einer Proteinkonzentration von 2 mg·mL<sup>-1</sup> und einer Volumenaktivität von 228 U·mL<sup>-1</sup>.

**Tab. 7.6. Reaktionsbedingungen während der enzymkatalysierten Thioanisoloxidation mit Wasserstoffperoxid unter dem Einfluss wassermischbarer organischer Lösungsmittel im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und bei 25 °C.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Dosierung	Co-Solvent	[Co-Solvent], % (v/v)	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
a	10	1,5	2 h <sup>-1</sup>	-	-	10	72
b	10	1,5	2 h <sup>-1</sup>	TEG, EG, PPC, <i>t</i> -BuOH	1, 5, 10, 20	10	72
c	1	0,4	1 h <sup>-1</sup>	TEG, <i>t</i> -BuOH	30, 50, 80	20	360
d	1	0,4	1 h <sup>-1</sup>	TEG, <i>t</i> -BuOH	50, 80	20	-

### 7.5.3 Verwendung anderer Oxidationsmittel

Die Reaktionen und die Analyse der Proben unter der Verwendung alternativer Oxidationsmittel wurden bei den Bedingungen wie unter 7.5 beschrieben durchgeführt. Als Oxidationsmittel wurden *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) und Peressigsäure verwendet. Außerdem wurde Ascorbinsäure in Kombination mit dem Luftsauerstoff eingesetzt, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* produziert wurde.

#### 7.5.3.1 *tert*-Butylhydroperoxid

**Tab. 7.7. Reaktionsbedingungen bei der Verwendung von TBHP als Oxidationsmittel im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[TBHP], mM	TBHP- Dosierung	[AaP], nM	V <sub>R</sub> , mL
a	1	0,4; 0,75; 1,5; 3; 5	1·h <sup>-1</sup>	360	30
b	1	3	1·h <sup>-1</sup>	-	30
c	1	25	-	-	30

#### 7.5.3.2 Peressigsäure

**Tab. 7.8. Reaktionsbedingungen bei der Verwendung von Peressigsäure als Oxidationsmittel im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 bei 25 °C.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[Peressigsäure], mM	Peressigsäure- Dosierung	[AaP], nM	V <sub>R</sub> , mL
a	5	1,5	2·h <sup>-1</sup>	360	30

#### 7.5.3.3 Ascorbinsäure/Sauerstoff

Die Oxidation der Substrate mit Sauerstoff in Anwesenheit von Ascorbinsäure (AS) wurde in offenen 40-mL-Vials ausgeführt. Die Reaktionslösung wurde hierbei auf einer Rührplatte mittels Magnetrührer bei konstanten 890 U·min<sup>-1</sup> gerührt, so dass der Luftsauerstoff optimal in das Reaktionsmedium übergehen konnte. Im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8, wurde zunächst das Enzym und Thioanisol gelöst und bei Raumtemperatur inkubiert. Mit der Zugabe der gesamten Menge an Ascorbinsäure wurde die Reaktion gestartet.

**Tab. 7.9. Die Reaktionsbedingungen in der Oxidation von Thioanisol mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Ascorbinsäure.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[AS], mM	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
a	1	0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 75	20	360
b	1	5	20	-

Für die Analyse des Reaktionsgemisches mit Hilfe einer chiralen HPLC-Säule (M 7.1) wurden 900 µL Probe aus dem zuvor kräftig durchmischten (Vortex-Schüttler) Reaktionsansatz genommen und mit 100 µL einer gesättigten Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung versehen, um eventuell

vorhandenes Wasserstoffperoxid zu zersetzen. Die Probe wurde dann für die HPLC-Analyse mit 900  $\mu\text{L}$  *n*-Heptan extrahiert (10 s Vortex-Schüttler).

#### 7.5.3.4 Der Vergleich verschiedener Oxidationssysteme

Die Durchführung der Reaktion und der Probenanalyse erfolgte gemäß Versuch 7.5.3.3.

**Tab. 7.10. Die Reaktionsbedingungen bei der Oxidation von Thioanisol mit unterschiedlichen Reaktionssystemen.**

Nr.	[Thioanisol], mM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Dosierung	[AS], mM	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
a	1	0,4	1 h <sup>-1</sup>	-	20	360
b	1	-	-	5	20	360
c	1	0,4	1 h <sup>-1</sup>	5	20	360

#### 7.5.3.5 Die AaP-katalysierte Umsetzung von Thioanisol unter anaeroben Bedingungen

Mit Hilfe eines optischen Sauerstoffsensors der Fa. PreSens konnte in einem speziell für den Sensor präparierten geschlossenen 40-mL-Vial die anaerobe Umsetzung von 1 mM Thioanisol mit 5 mM Ascorbinsäure, katalysiert durch 360 nM AaP, beobachtet werden. Zunächst wurde der gelöste Sauerstoff aus dem Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8, in dem AaP und Thioanisol gelöst vorlagen, unter einer Argonatmosphäre aus dem System getrieben. Der optische Sauerstoffsensor diente zur Überwachung der anaeroben Bedingungen. Durch den Zusatz der Ascorbinsäure wurde die Reaktion gestartet. Das Reaktionsgefäß war luftdicht verschlossen, so dass kein Sauerstoff aus der Umgebung in das Reaktionssystem übergehen konnte. Über eine Membran wurden Reaktionsproben genommen, die dann über die HPLC-Analytik (M 7.1) ausgewertet wurden.

#### 7.5.4 Substratscreening

Folgende Alkylarylsulfide wurden auf ihre Verwendung als AaP-Substrate getestet:

Benzothiophen, Benzylmethylsulfid, 2-Bromthioanisol, 3-Bromthioanisol, 4-Bromthioanisol, 2-Chlorthioanisol, 3-Chlorthioanisol, 4-Chlorthioanisol, Cyclopropylphenylsulfid, Ethylphenylsulfid, 2-Fluorthioanisol, 4-Fluorthioanisol, 2-Methoxythioanisol, 4-Methoxythioanisol, 2-(Methylmercapto)benzimidazol, 4-(Methylmercapto)benzaldehyd, 4-(Methylmercapto)phenol, 3-Methyl-4-(methylthio)-phenol, 2-(Methylthio)benzylamin, Methylphenylsulfoxid, 4-(Methylthio)anilin, 6-Methylthiochroman-4-on, 2-Methylthiophen, 4-Methylthioanisol, 4-Toluenthiol, Vinylphenylsulfid,

Das AaP-Lyophilisat wurde im Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8 gelöst und bei 25 °C inkubiert. Die Menge des Lyophilisates ist von der Aktivität der Enzymcharge abhängig (Tab. 7.3). 1 mM Substrat wurde mit Wasserstoffperoxid oder 5 mM Ascorbinsäure enzymkatalysiert oxidiert. Durch die Zugabe des Oxidationsmittels wurde die Reaktion gestartet. Wasserstoffperoxid wurde gleichmäßig manuell nachdosiert. In Tabelle 7.11 sind die Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

**Tab. 7.11. Reaktionsbedingungen der enzymkatalysierten Sulfoxidationsreaktion mit Wasserstoffperoxid oder 5 mM Ascorbinsäure (AS) im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 und 25 °C.**

Nr.	[Substrat], mM	OM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Dosierung	V <sub>R</sub> , mL	[AaP], nM
a	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4	1 h <sup>-1</sup>	30	360
b	1	AS	-	-	20	360

## 7.6 Immobilisierungsmethoden

### 7.6.1 Immobilisierung an aminomodifizierten Glasperlen nach Spohn

**Immobilisierung:** 500 mg aminosilyliertes Trisoperl<sup>®</sup> mit einer Partikelgröße von 50-100 µm wurden in einer Lösung aus 1,25 mL wässrigen Glutardialdehyd (50 % (v/v)) und 11,25 ml 0,02 M Essigsäure-Acetatpuffer (pH 5) suspendiert und 30 min bei 780 mbar (Rotationsverdampfer) und weitere 30 min unter Atmosphärendruck aktiviert. Dabei musste eine stetige schonende Durchmischung gewährleistet werden. Der Träger wurde über eine Fritte abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

In 1,5 mL Puffer wurden 20 mg *AaP*-Lyophilisat (1378 nM) gelöst und zu 200 mg Perlen gegeben. Mit einer Pufferlösung wurde auf 10 mL aufgefüllt. Diese Suspension, die unter einem Druck von 780 mbar 30 min gut durchmischt wurde, wurde anschließend 15 Stunden bei 4°C unter Atmosphärendruck aufbewahrt. Abschließend wurde das Immobilisat abfiltriert, mit Pufferlösung gewaschen und in ungefähr 2 mL Puffer aufbewahrt. Als Pufferlösungen wurde der Essigsäure-Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 5 und in einer zweiten Immobilisierungsprozedur wurde der Zitronensäure-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7 verwendet [Spohn 1998].

**Aktivitätsbestimmung:** Die Überstands-, die Wasch- und die Aufbewahrungslösungen wurden im Standardassay der *AaP* (M 7.3.1) auf Enzymaktivität getestet. Die Träger wurden mit 13,34 mg·L<sup>-1</sup> *AaP*-Lyophilisat beladen. Im Standardassay entspricht diese Enzymkonzentration einer volumetrischen Aktivität von 2,6 U·mL<sup>-1</sup> und einer spezifischen Aktivität von 0,13 U·mg<sup>-1</sup><sub>Lyophilisat</sub>. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge an Waschlösung und Aufbewahrungslösung wurden die Enzymaktivitäten der nicht immobilisierten *AaP* addiert und ins Verhältnis zur Gesamtmenge der *AaP* gesetzt (Glg. 5).

$$AaP_{\text{gelöst}} = \frac{A_{\text{Über}} + A_{\text{Wasch}} + A_{\text{Lager}}}{A_{\text{gesamt}}} \quad (5)$$

Die Immobilisate wurden ebenfalls mit dem Standardassay auf Enzymaktivität geprüft. Dazu wurden 200 mg *AaP*-Immobilisat in 7 mL Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8 mit 50 mM Veratrylalkohol suspendiert. Durch die Zugabe von 100 µL einer 140 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde die *AaP*-katalysierte Oxidation von Veratrylalkohol gestartet. Für die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden in den ersten 3 min alle 30 s 100 µL Probe aus dem Reaktionsgefäß entnommen, und diese jeweils am Photometer bei 310 nm vermessen (M 7.3.1).

### 7.6.2 Immobilisierung an Anionenaustauscher-Harzen

**Trägerbehandlung:** Die Anionenaustauscher Duolite A 568 und Amberlite FPA 51 wurden mit entionisiertem Wasser gewaschen und danach für 3 – 4 Stunden im Zitronensäure-Phosphat-Puffer bei pH 3, 5 und 7 inkubiert. Vor der Beladung des Trägers mit der *AaP* wurde dieser mit dem 20-fachen Volumen entionisiertem Wasser gewaschen. Die Träger dürfen nach der Aktivierung nicht trocknen.

**Enzymbehandlung:** 20 mg·L<sup>-1</sup> *AaP*-Lyophilisat wurde in dem Zitronensäure-Phosphat-Puffer mit dem pH-Wert 3 und pH-Wert 6,8 gelöst.

**Immobilisierung:** 1 g der unterschiedlich aktivierten Träger wurden mit 5 mL Enzymlösung über Nacht inkubiert. Die Emulsion wurde dabei auf einem Schüttler langsam durchmischt. Die Überstandslösung wurde dekantiert und die Immobilisate wurden mit insgesamt 20 mL entionisiertem Wasser gewaschen. Damit die Immobilisate nicht austrocknen, wurden sie in 2 mL entionisiertem Wasser bei 4 °C aufbewahrt.



**Aktivitätsbestimmung:** Die Aktivität wurde wie unter **M** 7.6.1 beschrieben ermittelt. Die Träger wurden mit  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  *AaP*-Lyophilisat beladen. Im Standardassay entspricht diese Enzymkonzentration eine volumetrischen Aktivität von  $4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  und eine spezifischen Aktivität von  $0,2 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{Lyophilisat}}$ . Für die Aktivitätsbestimmung der Immobilisate wurden  $500 \text{ mg}$  in  $7 \text{ mL}$  Puffer suspendiert.

### 7.6.3 Einschluss in Natrium-Alginat

Die Versuchsvorschrift zur Herstellung von Alginatperlen [Smidsrød 1990] wurde für den Einschluss der *Agroclybe aegerita* Peroxidase modifiziert. Anstelle des Calciumchlorids wurde für diese Arbeit das halogenfreie Calciumgluconat verwendet, das die nötigen Calciumionen lieferte.

$0,4 \text{ g}$  Natrium-Alginat wurde in  $20 \text{ mL}$  entionisiertem Wasser gelöst. Das Wasser wurde leicht erwärmt, damit sich das Alginat besser löst. In einem breiten und hohen Becherglas wurden  $4 \text{ g}$  Calciumgluconat in  $200 \text{ mL}$  entionisiertem Wasser gelöst und die Lösung wurde turbulent gerührt.  $5,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  *AaP* ( $600 \text{ nM}$ ) wurde in Zitronensäure-Phosphat-Puffer ( $\text{pH } 6,8$ ) gelöst.  $2 \text{ mL}$  Enzymlösung und  $2 \text{ mL}$  Alginatlösung wurden miteinander homogenisiert und in eine Einwegspritze gefüllt. Über die Einwegspritze wurde das Gemisch in die Calciumgluconat-Lösung getropft. Nach  $1 \text{ h}$  Aushärungszeit können die Perlen abfiltriert werden. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank. Es ist darauf zu achten, dass die Alginatperlen nicht austrocknen.

Es wurden  $370 \text{ mg}$  Alginatperlen im Standardassay der *AaP* auf Enzymaktivität untersucht. Der Aktivitätstest der Alginatperlen und der Aufbewahrungslösung wurden wie unter 7.6.1 beschrieben durchgeführt.

### 7.6.4 Die Herstellung und Anwendung PDMS-immobilisierter *AaP*

#### 7.6.4.1 Die Herstellung der *AaP*-aktiven PDMS-Perlen

Die Immobilisierung der *AaP* in Polydimethylsiloxan (PDMS) erfolgte unter der Verwendung des Zweikomponenten-Silikonkautschuks Sylgard<sup>®</sup> 184. Sylgard<sup>®</sup> 184 besteht aus zwei Komponenten, Komponente A (Präpolymer:  $\alpha,\omega$ -divinylterminiertes Polydimethylsiloxan) und Komponente B (Copolymer aus Methylhydrosiloxan und Dimethylsiloxan). Durch das Mischen beider Komponenten setzt eine kalte Vulkanisierung ein, die durch den Platinkatalysator Syloff 4000 (Bis(1,3-divinyl-1,1,3,3-tetradisiloxan)platin(0)), der die Komponente B enthält, katalysiert wird und durch eine leichte Temperaturerhöhung beschleunigt werden kann.

In einem  $15\text{-mL}$ -Polypropylengefäß wurden  $300 \text{ mg}$  des *Agroclybe aegerita* Peroxidase-Lyophilisates vorgelegt und  $6 \text{ g}$  der Komponente A, sowie  $0,6 \text{ g}$  der Komponente B zugefügt. Das Gemisch wurde mit Hilfe eines Spatels homogenisiert und mit einer  $100 \text{ mL}$ -Einwegspritze in eine  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  temperierte Polyvinylalkohol-Lösung ( $4 \%$  PVA (w/v)) eingetropft und für  $2 - 3 \text{ h}$  turbulent gerührt. Die angefertigte Suspension aus *AaP*-Lyophilisat und PDMS hatte eine ausreichende Viskosität, bevor sie in die PVA-Lösung zum Aushärten getropft wurde. Die erhaltenen Silikonkugeln wurden durch Filtration von der PVA-Lösung abgetrennt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und dicht abgeschlossen im Kühlschrank gelagert.

**Herstellung einer statischen Emulsion in Silicon:** Die Erzeugung einer statischen Emulsion aus gelöster *AaP* in den Silikonkugeln erfolgte gemäß der Immobilisierung in Silicon. Hierbei wurde anstelle des Lyophilisates gelöstes Enzym eingesetzt. Um stabile PDMS-Kugeln zu erhalten, konnte nur ein begrenztes Volumen an gelöstem Enzym zu den Silikonkomponenten gegeben werden. In  $6,6 \text{ g}$  Silicon konnte maximal  $1 \text{ mL}$  gelöstes Enzym

eingeschlossen werden. 200 mg *AaP*-Lyophilisat lösen sich maximal in 1 mL Puffer. Es wurde der Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8 verwendet.

Für die **Untersuchung des pH-Wert-Einflusses** der Pufferlösung, in der die *AaP* für die Herstellung der statischen Emulsion gelöst wird, wurden Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 2,2 – 10,8 hergestellt. Für die pH-Werte von 2 - 8 wurde der Zitronensäure-Phosphat-Puffer verwendet. Für die Herstellung der pH-Werte von 9,2 und 10,8 wurde der Carbonatpuffer verwendet (s. Anhang, 9.5). Jeweils 67 mg *AaP* wurden in 34 mL der verschiedenen Pufferlösungen gelöst. Die Enzymlösungen wurden wie oben beschrieben in insgesamt 2,2 g PDMS immobilisiert (2 g Komponente A + 0,2 g Komponente B). Die *AaP*-aktiven PDMS-Perlen wurden dann in der Umsetzung von 10 mM Thioanisol mit 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,8 eingesetzt. Wasserstoffperoxid wurde alle 2 h manuell nachdosiert.

Für die Analyse des Reaktionsgemisches mit Hilfe einer chiralen HPLC-Säule (M 7.1) wurden 900 µL Probe aus dem zuvor kräftig durchmischten (Vortex-Schüttler) Reaktionsansatz genommen und mit 100 µL einer gesättigten Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung versehen, um eventuell vorhandenes Wasserstoffperoxid zu zersetzen. Die Probe wurde dann für die HPLC-Analyse mit 900 µL *n*-Heptan extrahiert (10 s Vortex-Schüttler).

#### 7.6.4.2 Die Sulfoxidation von Thioanisol, katalysiert durch *AaP* immobilisiert in PDMS

Die Oxidation von Thioanisol erfolgte immer mit 0,75 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder TBHP. Das Oxidationsmittel wurde jede Stunde manuell nachdosiert. Als Puffer wurde immer Zitronensäure-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 verwendet. Das Silikon-Präparat der statischen Emulsion ist mit 200 mg *AaP* auf 6,6 g Silikon beladen. In dem Silikon-Präparat mit dem eingeschlossenen *AaP*-Lyophilisat wurden 300 mg *AaP* auf 6,6 g Silikon verwendet. Bei der Verwendung von gelöstem Enzym in organischen Lösungsmitteln wurde 360 nM *AaP* eingesetzt. In der Tabelle 7.12 sind die Reaktionsbedingungen für den Einsatz der *AaP* in organischen Lösungsmitteln dargestellt.

**Tab. 7.12. Die Reaktionsbedingungen für die Sulfoxidation in organischen Lösungsmitteln unter der Verwendung unterschiedlicher *AaP*-Präparate.**

Nr.	Immobilisat	[Immobilisat], g·mL <sup>-1</sup>	[Thioanisol], mM	LM	OM
a	s. E.	0,1	10	Puffer, <i>n</i> -Heptan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBHP
b	e. Lyo.	0,1	10	Puffer, <i>n</i> -Heptan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBHP
c	<i>AaP</i> <sub>sus</sub>	0,1	0,5	<i>n</i> -Heptan, Isooctan, MTBE, DIPE	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBHP
d	-	0,1	0,5	<i>n</i> -Heptan, Isooctan,	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBHP
e	s. E.	0,05	2,5	Puffer, <i>n</i> -Heptan <i>n</i> -Decan, Isooctan	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBHP

s.E. – statische Emulsion; e. Lyo. – eingeschlossenes Lyophilisat; *AaP*<sub>sus</sub> – suspendierte *AaP*

## 7.7 Die Produktisolierung

In einem 500 mL Becherglas wurden 20 mM Thioanisol in 250 mL Zitronensäure-Phosphat-Puffer gelöst. Die Reaktion wurde bei 25 °C durch 20 g lyophilisierte *AaP* (Herstellungsjahr 2007) katalysiert. Durch das Hinzufügen von 0,25 mL 2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Alle 20 Minuten wurden 0,25 mL 2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachdosiert, so dass im Reaktionssystem eine Konzentration von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingestellt wurde. Die Reaktion wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik (M 7.1) überwacht, um den Umsatz des Thioanisols zu kontrollieren und den Enantiomerenüberschuss des (*R*)-Methylphenylsulfoxids zu bestimmen. Das Reaktions-

volumen wurde geteilt und jeweils sechsmal mit 100 mL Chloroform in einem Scheidetrichter extrahiert. Die Chloroformphasen wurden gesammelt, vereinigt und mit Hilfe des Rotationsverdampfers auf ein Volumen von 1 mL eingengt. Über eine Kieselgelsäule (18 x 3,5 cm) erfolgte die Trennung des Produktgemisches. Dazu wurde das Kieselgel mit Ethylacetat aufgeschwemmt und in eine Chromatographiesäule (25 x 3,5 cm) mit Fritte und Hahn am unteren Ende gefüllt und blasenfrei gepackt. Der eingengte Chloroformextrakt wurde auf das Kieselgelbett gebracht. Über einen Tropftrichter wird das Fließmittel Ethylacetat kontinuierlich auf das Adsorbensmaterial getropft. Am unteren Ende der Säule wurden die getrennten Produkte in kleinen Fraktionen aufgefangen. Mit Hilfe einer Kieselgel-Trägerplatte und einer UV-Lampe konnte sofort bestimmt werden, ob sich in den einzelnen Fraktionen UV-aktive Substanzen befinden. Insgesamt wurden 300 mL Ethylacetat zur Produkttrennung benötigt. Methylphenylsulfon eluierte schon nach wenigen Millilitern Ethylacetat und konnte sauber vom Methylphenylsulfoxid abgetrennt werden. Die gewünschten Ethylacetatphasen wurden vereint und am Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter eingengt. Das restliche Lösungsmittel wurde vorsichtig unter Argonzufuhr abgedampft. Über Gefriertrocknung wurde der Produktcharge Wasser entzogen. Der dabei erwartete Übergang des Produktes in den festen Zustand blieb aus. Der Enantiomerenüberschuss, der Umsatz, die Ausbeute und die Reinheit des Produktes wurden mit Hilfe der chiralen stationären Phase der HPLC-Analytik (M 7.1) bestimmt.

### 7.8 Quantitative Bestimmung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die handelsübliche 30 % (v/v) Wasserstoffperoxidlösung enthält Stabilisatoren, die die Zersetzungsreaktion, die u.a. durch Hydroxid-, Iodid- und Schwermetallionen katalysiert wird, unterbinden sollen. Trotzdem kann die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid nicht ausgeschlossen werden, so dass die Lösung über die Zeit an Wasserstoffperoxid verarmt. Daher wurde die tatsächliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration über die permanganometrische Titration bestimmt (s. Anhang, 9.4).

### 7.9 Überprüfung des Reaktionsmechanismus mit Hilfe von H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub>

In einem 5 mL-Ansatz fand die Oxidation von 1 mM Thioanisol mit 0,75 mM <sup>18</sup>O-markiertem Wasserstoffperoxid statt. Nach jeder Stunde wurden 0,75 mM H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub> nachdosiert. Die Oxidation wurde mit 5 U·mL<sup>-1</sup> (AaP-2006, 0,69 mg·mL<sup>-1</sup>) AaP katalysiert. Die Reaktion erfolgte bei 25 °C im Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8.

In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde unter denselben Bedingungen die Oxidation von 1 mM Methylphenylsulfoxid katalysiert. Beide Reaktionen wurden ebenfalls mit nicht markiertem Wasserstoffperoxid durchgeführt.

#### Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über die GC-MS-Methode:

##### GC

Gerät:	GCQ, Finnigan MAT
Injektion:	splittless-mode; 280 °C; geöffnet nach 1 min; 1 µL Probe
Temperaturprogramm:	60(1)-20-300(10)
Trärgas:	40 cm·s <sup>-1</sup> Helium
Säule:	DB 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Fa. J&W Scientific

##### MS

Startzeit:	3 min
Temperatur:	Ionenquelle: 170 °C; transfer line: 280 °C
maximale Ionisierung:	25 ms
micro scans:	5; scan time: 1,07 s
full scan:	50 – 800 amu

### 7.10 Andere Oxidationsreaktionen katalysiert durch die AaP

Für die Versuche 7.10.2 – 7.10.4 wurden das AaP-Lyophilisat und das entsprechende Substrat im Zitronensäure-Phosphat-Puffer gelöst und bei 25 °C inkubiert. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde die Reaktion gestartet. Wasserstoffperoxid wurde gleichmäßig manuell nachdosiert. Die Reaktionen wurden bei 25 °C thermostatisiert und entweder in 2 mL-Eppendorf-Vials durchgeführt und in einem Thermomixer der Fa. Eppendorf bei 900 U·min<sup>-1</sup> geschüttelt oder in 40 mL Vials durchgeführt und in einem Thermoschüttler der Fa. Memmert bei 300 U·min<sup>-1</sup> geschüttelt.

Für die Analyse des Reaktionsgemische, mit Hilfe einer C-18 HPLC-Säule (M 7.10.1.1), wurden 100 µL Probe aus dem zuvor kräftig durchmischten (Vortex-Schüttler) Reaktionsansatz genommen und mit 10 µL einer gesättigten Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung versehen, um überschüssiges Wasserstoffperoxid zu zersetzen. Die Probe wurde dann für die HPLC-Analyse mit entionisiertem Wasser auf 900 µL Probevolumen aufgefüllt und anschließend chromatographisch untersucht.

#### 7.10.1 Analytik

##### 7.10.1.1 HPLC

Säule:	Discovery <sup>®</sup> , C-18-Reverse Phase (5 µm, 150 x 2,1 mm), Supelco
Detektor:	UV-Detektor K-2501, Knauer GmbH
Wellenlänge:	220 nm (254 nm Indol, Benzofuran und Benzothiophen)
Säulentemperatur:	25 °C
Eluenten:	Methanol, 0,1 % Ameisensäure
Eluentenstrom:	0,3 mL·min <sup>-1</sup>
Gradient MeOH:HCOOH:	1:9 (0 min), 1:0 (20 - 30 min), 1:9 (40 - 45 min)

Die Reaktionsproben der Indol-, Benzofuran- und Benzothiophenreaktion und der Reaktion der halogenierten Benzylalkohole wurden unter isokratischen Bedingungen, mit einem Eluentenverhältnis von 1:1 (v/v) über die HPLC-Säule getrennt. Die Reaktionsproben der Phenolhalogenierungsreaktion und der Oxidation der nicht halogenierten Benzylalkohole wurden über Gradientenelution separiert.

##### 7.10.1.2 LC-MS-Analytik

MS-Methode:	ESI low flow
Tray Temperatur:	20 °C

##### HPLC

Säule:	Discovery <sup>®</sup> , C-18-Reverse Phase (5 µm, 150 x 2,1 mm), Supelco
Säulentemperatur:	25 °C
Eluenten:	Methanol, 0,1 % Ameisensäure (Gradientenelution)
Eluentenstrom:	0,2 mL·min <sup>-1</sup>
Wellenlängenbereich:	190 – 800 nm
Gradient MeOH:HCOOH:	2:8 (0 min), 8:2 (10 - 20 min), 2:8 (30 min)

##### 7.10.1.3 GC-MS-Analytik

MS-Methode:	EI 70 eV
-------------	----------

##### GC

Gerät:	GCQ, Finnigan MAT
Injektion:	splitless-mode; 280 °C; geöffnet nach 1 min; 1 µL Probe
Temperaturprogramm:	60(1)-20-300(10)
Trägergas:	40 cm·s <sup>-1</sup> Helium

Säule: DB5 MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , Fa. J&W Scientific  
 Temperaturgradient 80 °C (1 min), 160 °C (20 min), 290 °C (30 - 34 min)

### 7.10.2 Halogenierung von Phenol

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	Reaktionsvolumen:	1 mL
Lösungen:	Reaktionsmedium:	100 mM Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 3
	Phenol:	0,5 mmol·L <sup>-1</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	1 mmol·L <sup>-1</sup> ; manuelle Nachdosierung alle 20 min
	Kaliumbromid:	10 mmol·L <sup>-1</sup>
	AaP:	0,12 mg·L <sup>-1</sup> (13 nmol·L <sup>-1</sup> )

#### 7.10.2.1 Variation des pH-Wertes

Die Reaktionsbedingungen wurden wie unter **M** 7.10.2 gewählt, unter der Variation des pH-Wertes zwischen pH 2,2 – 6,8. Die Einstellung des pH-Wertes des Zitronensäure-Phosphat-Puffer ist im Anhang (9.5) beschrieben.

#### 7.10.2.2 Variation der Kaliumbromidkonzentration

Die Reaktionsbedingungen wurden wie unter **M** 7.10.2 gewählt, unter der Variation der Kaliumbromidkonzentration zwischen 1 – 20 mmol·L<sup>-1</sup>.

### 7.10.3 Oxidation von Benzylalkoholen

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	Reaktionsvolumen:	20 mL
Lösungen:	Reaktionsmedium:	100 mM Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8
	Benzylalkoholderivat:	0,5 mmol·L <sup>-1</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	0,4 mmol·L <sup>-1</sup> ; manuelle Nachdosierung alle 20 min
	AaP:	0,24 mg·L <sup>-1</sup> (25 nmol·L <sup>-1</sup> )

### 7.10.4 Oxidation von Indol, Benzofuran und Benzothiophen

Bedingungen:	Temperatur:	25 °C
	Reaktionsvolumen:	10 mL
Lösungen:	Reaktionsmedium:	100 mM Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,8
	Substrat:	0,5 mmol·L <sup>-1</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	0,4 mmol·L <sup>-1</sup> ; manuelle Nachdosierung alle 20 min
	AaP:	0,24 mg·L <sup>-1</sup> (25 nmol·L <sup>-1</sup> )

## 8 Literatur

- Abe 1979 K. Abe, N. Makino, F. K. Anan, *J. Biochem.* **1979**, *85*, 473.
- Adam 1998 W. Adam, M. N. Korb, K. J. Roschman, C. R. Saha-Möller, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3423.
- Adam 1999 W. Adam, *Adv. Bio. Eng.* **1999**, *63*, 73.
- Aggarwal 1991 V. K. Aggarwal, R. J. Franklin, M. J. Rice, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7743.
- Aggarwal 1992 V. K. Aggarwal, G. Evans, E. Moya, J. Dowden, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6390.
- Aggarwal 1994 V. K. Aggarwal, A. Thomas, R. J. Franklin, *J. Chem Commun.* **1994**, 1653.
- Agranat 2002 I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 753.
- Alberty 1953 R. A. Alberty, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1928.
- Aloup 1990 J. C. Aloup, D. Farge, C. James, S. Mondot, I. Cavero, *Drugs of the Future* **1990**, *15*, 1097.
- Alscher 2002 R. G. Alscher, N. Erturk, L. S. Heath, *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1331.
- Andersen 1962 K. K. Andersen, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 63.
- Andersen 1988 K. K. Andersen in *The Chemistry of Sulfones and Sulfoxides*, S. Patai, Z. Rappaport, C. J. M. Stirling (Editorial), John Wiley & Sons New York **1988**, 55-95.
- Andersson 1997 M. Andersson, A. Willetts, S. Allenmark, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8544.
- Arai 1993 Y. Arai, T. Koizumi, *Sulfur Rep.* **1993**, *15*, 41.
- Aranda 2009 E. Aranda, M. Kinne, M. Kluge, R. Ullrich, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1057.
- Baciocchi 1999 E. Baciocchi, O. Lanzalunga, L. Manduchi, *Chem. Commun.* **1999**, *17*, 1715.
- Barbachyn 1984 M. R. Barbachyn, C. R. Johnson in *Asymmetric Synthesis Vol. 4*, J. D. Morrison, J. W. Scott (Editorial), Academic Press, Inc. San Diego **1984**, 227-261.
- Barros 1992 D. Barros, M. C. Carreno, J. L. G. Ruano, M. C. Maestro, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2733.
- Blanke 1996 S. R. Blanke, S. A. Martinis, S. G. Sligar, L. P. Hager, J. J. Rux, J. H. Dawsen, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14537.
- Blaschke 1979 G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Flickentscher, F. Köhler, *Arzneim.-Forsch.* **1979**, *29*, 1640.
- Baynton 1994 K. J. Baynton, J. K. Bewtra, N. Biswas, K. E. Taylor, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 272.
- Blée 1989 E. Blée, F. Schuber, *Biochem.* **1989**, *28*, 4962.
- Boivin 1994 J. Boivin, M. Yousfi, S. Z. Zard, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9553.
- Bortolini 1988 O. Bortolini, F. Di Furia, G. Licini, G. Modena, *Rev. Heteroat. Chem.* **1988**, *1*, 66.
- Boyd 2002 D. R. Boyd, N. D. Sharma, C. R. C. Allen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *12*, 564.
- Bradford 1976 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- Breuer 2004 M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.

- Brown 1992 T. J. Brown, R. F. Chapman, D. C. Cook, T. W. Hart, I. M. McLay, R. Jordan, J. S. Mason, M. N. Palfreyman, R. J. A. Walsh, M. T. Withnall, J.-C. Aloup, I. Cavero, D. Fargen, C. James, S. Mondot, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3613.
- Brunel 1996 J. M. Brunel, H. B. Kagan, *Synlett* **1996**, 404.
- Buchholz 1979 K. Buchholz, *Characterization of Immobilized Biocatalyst, DECHEMA Monographs*, Verlag der Chemie Weinheim **1979**, Vol. 84.
- Buchholz 2005-a K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Weinheim **2005**, 27-108.
- Buchholz 2005-b K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Weinheim **2005**, 109-170.
- Buchholz 2005-c K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Weinheim **2005**, 243-282.
- Buchholz 2005-d K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Weinheim **2005**, 283-332.
- Buchholz 2005-e K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH Weinheim **2005**.
- Bugg 2001 T. D. Bugg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 550.
- Buhler 1961 D. R. Buhler, H. S. Manson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *92*, 424.
- Buist 1992 P. H. Buist, D. M. Marecak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5073.
- Burd 1995 W. Burd, O. Yourkevich, A. J. Voskoboev, K.-H. Van Pée, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129*, 255.
- Burton 2003-a S. G. Burton, *TIBTEC* **2003**, *21*, 543.
- Burton 2003-b S. G. Burton, *Curr. Org. Chemistry* **2003**, *7*, 1.
- Buthe 2004 A. Buthe, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *J. Microencapsulation* **2004**, *21*, 865.
- Butler 1994 A. Butler, M. J. Clague, G. E. Meister, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 625.
- Butlin 1996 R. J. Butlin, I. D. Linney, M. F. Mahon, H. Tye, M. Wills, *J. Chem. Soc. – Perkin Transactions 1* **1996**, *1*, 95.
- Cai 1989 D. Cai, M. Tien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 464.
- Cashman 1992 J. R. Cashman, L. D. Olsen, D. R. Boyd, R. A. S. McMordi, R. Dulop, H. Dalton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8772.
- Carrea 1992 G. Carrea, B. Redigolo, S. Riva, S. Colonna, N. Gaggero, E. Battistel, D. Bianchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1063.
- Carreno 1990 M. C. Carreno, J. L. G. Ruano, M. Garrido, M. P. Ruiz, G. Solladie, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *55*, 2120.
- Carreno 1995 M. C. Carreno, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1717.
- Chance 1984 B. Chance, L. Powers, Y. Ching, T. Poulos, G. R. Schonbaum, I. Yamazaki, K. G. Paul, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *235*, 596.
- Cleland 1970 W. W. Cleland in *The Enzymes*, 3<sup>rd</sup> Ed., P. D. Boyer (Editor), Academic Press New York **1970**, Vol. II, 1-65.
- Colby 1977 J. Colby, D. I. Stirling, H. Dalton, *Biochem. J.* **1977**, *165*, 395.
- Colonna 1990 S. Colonna, N. Gaggero, A. Manfredi, L. Casella, M. Gullotti, P. Pasta, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10465.
- Colonna 1992-a S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95.

- Colonna 1992-b S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea, P. Pasta, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 4, 357.
- Colonna 1994 S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9103.
- Colonna 1995-a S. Colonna, N. Gaggero, A. Manfredi, L. Casella, M. Gullotti, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 11, 1123.
- Colonna 1995-b S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi, G. Carrera, P. Pasta, *Gazz. Chim. Ital.* **1995**, 125, 479.
- Colonna 1996 S. Colonna, N. Gaggero, P. Pasta, G. Ottolina, *Chem. Commun.* **1996**, 20, 2303.
- Colonna 1999 S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi, P. Pasta, *Tibtech* **1999**, 17, 163.
- Conesa 2001 A. Conesa, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, C. A. M. J. J. van den Hondel, P. J. Punt, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 17635.
- Corbett 1979 M. D. Corbett, B. R. Chipko, *Biochem. J.* **1979**, 183, 269.
- Corbett 1983 M. D. Corbett, B. R. Corbett, *Experientia* **1983**, 39, 487.
- Cotton 2000 H. Cotton, T. Elebring, M. Larsson, L. Li, H. Sørensen, S. von Unge, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 3819.
- Courteix 1995-a A. Courteix, A. Bergel, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 1087.
- Courteix 1995-b A. Courteix, A. Bergel, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 1094.
- Dai 2000 L. Dai, A. M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 70, 353.
- Damani 1982 L. A. Damani, P. A. Crooks, M. S. Shaker, J. Caldwell, J. D'Souza, R. L. Smith, *Xenobiotica* **1982**, 12, 527.
- Darwish 2008 M. Darwish, M. Kirby, P. Robertson, E.T. Hellriegel, *Clinical Pharmacokinetics* **2008**, 47, 61.
- Davis 1992 F. A. Davis, B. C. Chen, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 919.
- Dawson 1988 J. H. Dawson, *Science* **1988**, 240, 433.
- de Gonzalo 2005 G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmino, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3077.
- de Gonzalo 2006 G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmino, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 130.
- Di Furia 1984 F. Di Furia, G. Modena, R. Seraglia, *Synthesis* **1984**, 325.
- Dingler 1996 C. Dingler, W. Ladner, G. A. Krei, B. Cooper, B. Hauer, *Pestic. Sci.* **1996**, 46, 33.
- Divi 1994 R. L. Divi, D. R. Doerge, *Biochem.* **1994**, 33, 9668.
- Doerge 1986 D. R. Doerge, *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 244, 678.
- Doerge 1991-a D. R. Doerge, N. M. Cooray, M. E. Brewster, *Biochemistry* **1991**, 30, 8960.
- Doerge 1991-b D. R. Doerge, M. D. Corbett, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 556.
- Dordick 1986 J. S. Dordick, A. M. Klivanov, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1986**, 25, 2946.
- Drauz 2002 K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Wiley-VCH Weinheim **2002**.
- Drabowicz 1988 J. Drabowicz, P. Kielbasinski, M. Mikolajczyk in *The Chemistry of Sulfones and Sulfoxides*, S. Patai, Z. Rappaport, C. Stirling (Editorial), Wiley and Sons New York **1988**.
- Dunford 1976 H. B. Dunford, J. S. Stillman, *Coord. Chem. Rev.* **1976**, 19, 187.
- Dunford 1999-a H. B. Dunford, *Heme peroxidases*, Wiley VCH New York **1999**.



- Dunford 1999-b H. B. Dunford, *Heme peroxidases*, Wiley VCH New York **1999**, 9-12.
- Dunford 1999-c H. B. Dunford, *Heme peroxidases*, Wiley VCH New York **1999**, 323-339.
- Durliat 1992 H. Durliat, A. Courteix, M. Combat, J.-L. Séres, *J. Mol. Catal.* **1992**, *75*, 357.
- Endler 1963 A. S. Endler, E. I. Becher, *Org. Synth.* **1963**, *Col. Vol. IV*, 657.
- Everse 1991 J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham, *Peroxidases in Chemistry and Biology*, CRC Press Boston **1991**.
- Faber 2004 K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Springer-Verlag Berlin **2004**.
- Farhangrazi 1997 Z. S. Farhangrazi, R. Sinclair, I. Yamazaki, L. S. Powers, *Biochemistry* **1997**, *31*, 10763.
- Farrell 1990 N. Farrell, D. M. Kiley, W. Schmidt, M. P. Hacker, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 397.
- Fernández 2003 I. Fernández, N. Khiar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3651.
- Franssen 1992 M. C. R. Franssen, H. C. van der Plas, *Adv. Appl. Microbiol.* **1992**, *37*, 41.
- Franssen 1994 M. C. R. Franssen, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 87.
- Fu 1992 H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265.
- Fukunishi 1991 K. Fukunishi, K. Kitada, I. Naito, *Synthesis* **1991**, 237.
- Gallagher 1923 P. H. Gallagher, *Biochem. J.* **1923**, *17*, 515.
- Galzigna 1996 L. Galzigna, V. Rizzoli, M. P. Schiappelli, M. P. Rigobello, M. Scarpa, A. Rigo, *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20*, 807.
- Gassman 1974 P. G. Gassman, T. J. van Bergen, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5508.
- Geigert 1983-a J. Geigert, S. K. DeWitt, S. L. Neidلمان, G. L. Demetrios, D. J. Dalietos, M. Moreland, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1983**, *116*, 82.
- Geigert 1983-b J. Geigert, S. L. Neidلمان, D. J. Dalietos, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2273.
- Geigert 1983-c J. Geigert, D. J. Dalietos, S. L. Neidلمان, T. D. Lee, J. Wadsworth, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1983**, *114*, 1104.
- Geigert 1986 J. Geigert, T. D. Lee, D. J. Dalietos, D. S. Hirano, S. L. Neidلمان, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *136*, 778.
- Gerhartz 1990 W. Gerhartz, *Enzymes in Industry*, VCH Weinheim, **1990**.
- Gill 1999 I. Gill, E. Pastor, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *41*, 9487.
- Goehring 1985 R. R. Goehring, Y. P. Sachdeva, J. S. Pisipati, M. C. Sleevi, J. F. Wolfe, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 435.
- Grey 2007 C. E. Grey, M. Hedström, P. Adlercreutz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1055.
- Grey 2008 C. E. Grey, F. Rundbäck, P. Adlercreutz, *J. Biotechnol.* **2008**, *135*, 196.
- Groves 1990 J. T. Groves, P. Viski, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3628.
- Hager 1966 L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, H. Eberwein, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1769.
- Halterman 1991 R. L. Halterman, S.-T. Jan, H. L. Nimmons, *Synlett* **1991**, *11*, 791.

- Hamada 1981 T. Hamada, Y. Okuno, M. Ohmori, T. Nishi, O. Yonemitsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 128.
- Hamann 1997 H. J. Hamann, E. Höft, D. Mostowicz, A. Mishnev, Z. Urbanczyk-Lipkoswska, M. Chmielewski, *Tetrahedron* **1997**, 53, 185.
- Hansch 1995 C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, American Chemical Society Washington **1995**, Vol 2, 3-49.
- Hartmeier 1986 W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg **1986**.
- Hashimoto 1986 S. Hashimoto, Y. Tatsuno, T. Kitagawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 2417.
- Hilker 2004 I. Hilker, V. Alphan, R. Wohlgemuth, R. Furstoss, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 203.
- Hiroi 1994 K. Hiroi, Y. Arinagi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 153.
- Hofrichter 2006 M. Hofrichter, R. Ullrich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, 276.
- Holland 1988 H. L. Holland, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 473.
- Holland 1995 H. L. Holland, F. M. Brown, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1569.
- Holland 1999 H. L. Holland, P. R. Andreana, F. M. Brown, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 2833.
- Holland 2001 H. L. Holland, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 171.
- Horn 2008 A. Horn, S. Kumar, A. Liese, U. Kragl in *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, 2<sup>nd</sup>. Ed., G. Ertl, H. Knözinger, F. Schüth, J. Weitkamp (Editorial), Wiley-VCH Weinheim **2008**, Vol. 8, 3831.
- Houlihan 1972 W. J. Houlihan, *Indoles*, Wiley-Interscience New York 1972.
- Hua 1996 D. H. Hua, *Adv. Heterocycl. Nat. Prod. Synth.* **1996**, 3, 151.
- Itoh 1993 N. Itoh, N. Morinaga, T. Kouzai, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1993**, 29, 785.
- IUBMB 1992 Internantional Union of Biochemistry an Molecular Biology, Nomenclature Committee, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press San Diego **1992**.
- Kaczorowska 2005 K. Kaczorowska, Z. Kolarska, K. Mitka, P. Kowalski, *Tetrahedron* **2005**, 61, 8315.
- Kagan 1992 H. B. Kagan, B. Ronnan, *Rev. Heteroat. Chem.* **1992**, 7, 92.
- Kale-Pradhan 2002 P. B. Kale-Pradhan, H. K. Landry, W. T. Sypula, *Ann. Pharmacother.* **2002**, 36, 655.
- Kalliney 1995 S. Kalliney, A. Zaks, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4163.
- Katchalski-Katzir 1993 E. Katchalski-Katzir, *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 471.
- Katsuki 1980 T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5974.
- Kinne 2008 M. Kinne, R. Ullrich, K. E. Hammel, K. Scheibner, M. Hofrichter, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5950.
- Kita 1994 Y. Kita, N. Shibata, S. Fukui, S. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9733.
- Kitagawa 1994 T. Kitagawa, Y. Mizutani, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 135/136, 685.
- Kirner 1994 S. Kirner, K.-H. van Pée, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 352.

- Kleemann 2000 A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances 4<sup>th</sup> ed.*, Thieme-Verlag Stuttgart **2000**.
- Klibanov 1997 A. M. Klibanov, *TIBTECH* **1997**, *15*, 97.
- Kluge 2007 M. Kluge, R. Ullrich, K. Scheibner, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 1473.
- Kluge 2009 M. Kluge, R. Ullrich, C. Dolge, K. Scheibner, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 1071.
- Kobayashi 1987 S. Kobayashi, M. Nakano, T. Kimura, A. P. Schaap, *Biochemistry* **1987**, *26*, 5019.
- Kohlmann 2006 C. Kohlmann, S. Lütz, *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 170.
- Koskinen 1996 A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov, *Enzymatic Reactions in Organic Media, 1st Ed.*, Blackie Academic & Professional Glasgow **1996**.
- Kubec 2000 R. Kubec, M. Svobodova, J. Velisek, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 428.
- Kyung 1997 K. H. Kyung, D. C. Han, H. P. Fleming, *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 406.
- Laane 1986 C. Laane, A. Weyland, M. Franssen, *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8*, 345.
- Lambeir 1985 A. Lambeir, H. B. Dunford, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *147*, 93.
- Liese 2002 A. Liese in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 2<sup>nd</sup> Ed.*, K. Drauz, H. Waldmann (Editorial), Wiley-VCH Weinheim **2002**, *Vol. 3*, 1419-1459.
- Liese 2003 A. Liese, *Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis*, Forschungszentrum Jülich GmbH **2003**, *Vol. 7*, 93-98.
- Liese 2006 A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Wiley-VCH Weinheim **2006**.
- Lee 1995 K. Lee, J. M. Brand, D. T. Gibson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 9.
- Lewis 1989 A. J. Lewis, N. S. Doherty, N. R. Ackerman, *Therapeutics Approaches to Inflammatory Diseases*, Elsevier New York **1989**, 229.
- Lewis 2001 D. F. V. Lewis, *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*, Taylor & Francis London **2001**.
- Light 1982 D. R. Light, D. J. Waxman, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2490.
- Littlechild 1999 J. Littlechild, *Curr. Opin. Chem Biol.* **1999**, *3*, 28.
- Lütz 2004 S. Lütz, E. Steckhan, A. Liese, *Electrochem. Comm.* **2004**, *6*, 583.
- Ma 1988 X. Ma, S. E. Rokita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *157*, 160.
- Manoj 2001 K. M. Manoj, L. P. Hager, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1547*, 408.
- Manson 1957 H. S. Manson, I. Onopryenko, D. R. Buhler, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *24*, 225.
- Mashino 1990 T. Mashino, S. Nakamura, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3163.
- Meunier 1985 G. Meunier, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2558.

- Meunier 1991 B. Meunier in *Peroxidases in Chemistry and Biology*, J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham (Editorial), CRC Press Boston **1991**, 201.
- Miller 1992 V. P. Miller, G. D. DePillis, J. C. Ferrer, A. G. Mauk, P. R. Ortiz De Montellano, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 8936.
- Miller 1995 V. P. Miller, R. A. Tschirret-Guth, P. R. Ortiz De Montellano, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 319, 333.
- Mioskowski 1980 C. Mioskowski, G. Solladie, *Tetrahedron* **1980**, 36, 227.
- Mislow 1984 K. Mislow, J. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3319.
- Morgan 2002 J. A. Morgan, Z. Lu, D. S. Clark, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* **2002**, 18, 147.
- Morris 1966 D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1763.
- Murphy 2003 C. D. Murphy, *J. Appl. Microbiol.* **2003**, 94, 539.
- Nakajima 1985 R. Nakajima, I. Yamazaki, B. W. Griffin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 128, 1.
- Nakajima 1997 T. Nakajima, *J. Occup. Health* **1997**, 39, 83.
- Natura 1991 Y. Natura, F. Tani, K. Maruyama, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 2, 533.
- Neidلمان 1981 S. L. Neidلمان, W. F. Amon, J. Geigert, US Patent **1981** 4, 284, 723.
- Neumann 1972 N. P. Neumann, *Methods in Enzymol. B: Enzyme Structure* **1972**, 25, 393.
- Newmyer 1995 S. L. Newmyer, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 19430.
- Noda 1994 K. Noda, N. Hosoya, R. Irie, Y. Yamashita, T. Katsuki, *Tetrahedron* **1994**, 50, 9609.
- Noyori 2003 R. Noyori, M. Aoki, K. Sato, *Chem. Commun.* **2003**, 16, 1977.
- Ortega 1990 M. P. Ortega, M. D. C. Garcia, M. A. Gijon, M. F. D. Casa-Juana, J. G. Priego, M. S. Crespo, C. Sunkel, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, 255, 28.
- Ottolina 1995 G. Ottolina, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, S. Dallavalle, H. L. Holland, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1375.
- Ozaki 1995 S. Ozaki, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7056.
- Pai 2002 R. A. D. Pai, M. F. Malone, *AIChE Journal* **2002**, 48, 514.
- Palcic 1980 M. M. Palcic, R. Rutter, T. Araiso, L. P. Hager, H. B. Dunford, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 94, 1123.
- Palucki 1992 M. Palucki, P. Hanson, E. N. Jacobsen, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7111.
- Pasta 1994 P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, 1209, 203.
- Pasta 1999 P. Pasta, G. Carrea, E. Monzani, N. Gaggero, S. Colonna, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 62, 489.
- Pitchen 1984 P. Pitchen, E. Dunach, N. N. Deshmukh, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 8188.
- Posner 1983 G. H. Posner in *Asymmetric Synthesis*, J. D. Morrison (Editorial), Academic Press New York **1983**, Vol. 2, 225-241.
- Posner 1987 G. H. Posner, *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 72.
- Posner 1988 G. H. Posner in *The Chemistry of Sulfoxes and Sulfoxides*, S. Patai, Z. Rappaport, C. J. M. Stirling (Editorial), John Wiley & Sons New York **1988**, 823-851.

- Poulos 1987 T. L. Poulos, *Adv. Inorg. Biochem.* **1987**, 7, 1.
- Pyne 1990 S. G. Pyne, P. Bloem, S. L. Chapman, C. E. Dixon, R. Griffith, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1086.
- Ragheb 2003 A. Ragheb, M. A. Brook, M. Hrynyk, *Chem. Comm.* **2003**, 18, 2314.
- Ramakrishnan 1983 K. Ramakrishnan, M. E. Oppenhuizen, S. Saunders, J. Fisher, *Biochemistry* **1983**, 22, 3271.
- Rauscher 2000 K. Rauscher, J. Voigt, I. Wilke, R. Friebe, *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, 11. Auflage, Harri Deutsch Verlag Frankfurt am Main **2000**.
- Rayner 1968 D. R. Rayner, A. J. Gordon, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 4854.
- Renfrey 2002 S. Renfrey, J. Featherstone, *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 175.
- Ruano 1991 J. L. G. Ruano, A. M. M. Castro, J. H. Rodriguez, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3195.
- Ruano 1999 J. L. G. Ruano, B. Cid, *Top. Curr. Chem.* **1999**, 204, 1.
- Ryu 1992 K. Ryu, J. S. Dordick, *Biochemistry* **1992**, 31, 2588.
- Salazar 2003 O. Salazar, P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Chem. Biol. Chem.* **2003**, 4, 891.
- Samra 1999 B. K. Samra, M. Andersson, P. Adlercreutz, *Biocatal. Biotrans.* **1999**, 17, 381.
- Saunders 1964 B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle, B. P. Stark, *Peroxidase*, Butterworth's Washington **1964**.
- Savenkova 1998 M. I. Savenkova, J. M. Kuo, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* **1998**, 37, 10828.
- Schmall 1989 M. W. Schmall, L. S. Gorman, J. S. Dordick, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 999, 267.
- Schmitke 1996 J. L. Schmitke, C. R. Westcott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3360.
- Schugerl 1986 K. Schugerl, R. Hansel, E. Schlichting, W. Halwachs, *Chemie Ingenieur Technik* **1986**, 58, 308.
- Secundo 1993 F. Secundo, G. Carrea, S. Riva, E. Battistel, D. Bianchi, *Biotechn. Lett.* **1993**, 155, 865.
- Seelbach 1997-a K. Seelbach, *Chloroperoxidase- Ein industrieller Katalysator? Regio- und enantioselektive Oxidationen*, Dissertation Universität Bonn **1997**.
- Seelbach 1997-b K. Seelbach, M. P. J. van Deurzen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, U. Kragl, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 55, 283.
- Segel 1993 I. H. Segel, *Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium a steady-state enzyme systems*, New Edition, John Wiley & Sons New York **1993**.
- Shaw 1959 P. D. Shaw, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2565.
- Sheng 1997 D. Sheng, M. H. Gold, *Biochem. Biophys.* **1997**, 345, 126.
- Sheldon 1993 R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker New York **1993**.
- Shimizu 1994 M. Shimizu, Y. Kooriyama, T. Fujisawa, *Chem. Lett.* **1994**, 2419.
- Smidsrød 1990 O. Smidsrød, G. Skåk-Bræk, *TIBTECH* **1990**, 8, 71.
- Solladié 1981 G. Solladié, *Synthesis* **1981**, 185.

- Solladié 1983 G. Solladié in *Asymmetric Synthesis*, J. D. Morrison (Editorial), Academic Press New York **1983**, Vol. 2, 157.
- Solladié 1985-a G. Solladié, G. Demailly, C. Greck, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 4, 435.
- Solladié 1985-b G. Solladié, G. Demailly, C. Greck, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 1522.
- Solladié 1987 G. Solladié, J. Hutt, A. Girardin, *Synthesis* **1987**, 173.
- Solladié 1994-a G. Solladié, N. Huser, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5297.
- Solladié 1994-b G. Solladié, N. Huser, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 255.
- Solladié 1995 G. Solladié, M. C. Carreno in *Organosulfur Chemistry*, P. C. B. Page (Editorial), Academic Press New York, **1995**, 1-42.
- Spohn 1998 U. Spohn, D. Janasek, *BIOforum* **1998**, 21, 108.
- Stinson 1992 S. C. Stinson, *Chem. Eng. News* **1992**, 70, 46-48.
- Straathof 2002 A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 548.
- Sun 1994 W. Sun, T. A. Kadima, M. A. Pickard, H. B. Dunford, *Biochem. Cell. Biol.* **1994**, 72, 321.
- Sundaramoorthy 1995 M. Sundaramoorthy, J. Turner, T. L. Poulos, *Structure* **1995**, 3, 1367.
- Sundberg 1970 R. J. Sundberg, *The Chemistry of Indoles*, Academic Press New York **1970**.
- Svehla 1996 G. Svehla, *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis 7<sup>th</sup> Edition*, Longman Harlow **1996**, 245.
- Tanaka 1993 A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, Marcel Dekker New York **1993**.
- Ullrich 2004 R. Ullrich, J. Nüske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 4575.
- Ullrich 2005 R. Ullrich, M. Hofrichter, *FEBS* **2005**, 579, 6247.
- Ullrich 2007 R. Ullrich, M. Hofrichter, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 271.
- Ullrich 2008 R. Ullrich, C. Dolge, M. Kluge, M. Hofrichter, *FEBS* **2008**, 582, 4100.
- Valderrama 2002 B. Valderrama, M. Ayala, R. Vazquez-Duhalt, *Chemistry & Biology* **2002**, 9, 555.
- van Beilen 2003 J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 170.
- van Deurzen 1996 M. P. J. van Deurzen, *Selective Oxidations catalyzed by Chloroperoxidase*, Dissertation Technische Universität Delft **1996**.
- van Deurzen 1997-a M. P. J. van Deurzen, F. van Rantwijk, R. Sheldon, *Tetrahedron* **1997**, 53, 13183.
- van Deurzen 1997-b M. P. J. van Deurzen, K. Seelbach, F. van Rantwijk, U. Kragl, R. Sheldon, *Biocatal. Biotrans.* **1997**, 15, 1.
- van Deurzen 1997-c M. P. J. van Deurzen, I. J. Remkes, F. van Rantwijk, R. Sheldon, *J. Mol. Catal. A: Chemical* **1997**, 117, 329.
- van de Velde 1999 F. Van de Velde, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, 6, 453.
- van de Velde 2000-a F. Van de Velde, N. D. Lourenco, M. Bakker, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69, 286.
- van de Velde 2000-b F. Van de Velde, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 80, 81.

- van de Velde 2001 F. Van de Velde, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tibtech* **2001**, 19, 73.
- van Peé 2003 K.-H. van Peé, S. Zehner in *The handbook of environmental chemistry*, G. W. Gribble (Editorial) Springer Berlin, Heidelberg, New York **2003**, 171-199.
- van Rantwijk 2000 F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 554.
- Wandrey 2000 C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Organic Process Report & Development* **2000**, 4, 286.
- Wang 1996 H. Y. Wang, T. Kobayashi, H. Saitoh, N. Fujii, *J. Appl. Polymer Sci.* **1996**, 60, 2339.
- Wehring 1996 A. W. Wehring, K. Weidmann in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, M. Wolff (Editorial), John Wiley & Sons New York **1996**, Vol. 2, 119.
- White 1982 R. E. White, M. J. Coon, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3073.
- Wiesner 1986 W. Wiesner, K.-H. van Peé, F. Lingens, *FEBS Lett.* **1986**, 209, 321.
- Wikete 2007 C. Wikete, P. Wu, G. Zampella, L. De Gioia, G. Licini, D. Rehder, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 196.
- Wiseman 1973 E. W. Wiseman, J. Chaini, J. M. McManus, *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 131.
- Wong 1994 C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry (Tetrahedron Organic Chemistry Series Vol. 12)*, Pergamon Oxford **1994**.
- Yamazaki 1996 Y. Yamazaki, C. Hesse, H. Okuno, W.-R. Abraham, *Appl. Mikrobiol. Biotechnol.* **1996**, 45, 595.
- You 2001 J.-O. You, S.-B. Park, S. Haam, C.-H. Chung, W.S. Kim, *J. Microencapsulation* **2001**, 18, 521.
- Zaks 1995 A. Zaks, D. R. Dodds, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10419.
- Zemel 1993 H. Zemel, J. F. Quinn, *Chem. Eng. News* **1993**, 71, 36.
- Zhao 1987 S. H. Zhao, O. Samuel, H. B. Kagan, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5135.
- Zhao 1989 S. H. Zhao, O. Samuel, H. B. Kagan, *Org. Synth.* **1989**, 68, 49.
- Zinke 2004 H. Zinke, *Weißer Biotechnologie-Neue Produkte, gesellschaftlicher Nutzen und Wertschöpfungspotentiale*, Zeitschrift für Biopolitik, BIOCUM Verlag Berlin **2004**.
- Zmijewski 1997 M. J. Zmijewski, J. Vicenzi, B. E. Landen, W. Muth, P. Marler, B. Anderson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 162.

## 9 Anhang

### 9.1 Definitionen

In der vorliegenden Arbeit werden zur Charakterisierung des enzymkatalysierten Verfahrens bestimmte reaktionstechnische Terme und kinetische Konstanten ermittelt. Im Folgenden sollen diese kurz erläutert werden.

#### Der Umsatz und die Ausbeute

Der Umsatz ( $U$ ) beschreibt den umgesetzten Anteil der Stoffmenge des Substrates ( $n_S$ ) zu einem bestimmten Zeitpunkt, bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge des Substrates ( $n_{S0}$ ) (Glg. 6).

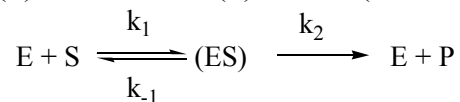
$$U = \frac{n_{S0} - n_S}{n_{S0}} \quad (6)$$

Die Ausbeute ( $\eta$ ) ist der Anteil Stoffmenge eines Produktes ( $n_P$ ), das zu einem bestimmten Zeitpunkt aus der eingesetzten Stoffmenge des Substrates ( $n_{S0}$ ) durch die chemische Reaktion umgewandelt wurde (Glg. 7) [Liese 2006].

$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P0}}{n_{S0}} \quad (7)$$

#### Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und die Wechselzahl ( $k_{cat}$ )

Um die genaue Kinetik der Enzym-Substrat-Reaktion aufstellen zu können, muss der genaue Enzymmechanismus bekannt sein. Die meisten enzymkatalysierten Reaktionen sind Zwei-Substrat-Mechanismen [Segel 1993]. An dieser Stelle soll nur die Michaelis-Menten-Gleichung (Glg. 13) für die enzymkatalysierte Ein-Substrat-Reaktion eingeführt werden, die über die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ((ES)) und die enzymkatalysierte Umwandlung des Substrates (S) zum Produkt (P) abläuft (Abb.9.1).



**Abb. 9.1. Die Bildung und der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes (ES).**

Unter der Annahme, dass es sich bei dem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes um Reaktionen erster Ordnung und bei Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes um eine Reaktion zweiter Ordnung handelt, können folgende Differenzialgleichungen aufgestellt werden.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (8)$$

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - [ES] \cdot (k_{-1} + k_2) \quad (9)$$

Eine weitere Annahme ist das Fließgleichgewicht (Steady-State) des Enzym-Substrat-Komplexes, was besagt, dass der Komplex nach einer schnellen initialen Bildung konstant bleibt.

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (10)$$

Aus der Gleichung 9 und 10 sowie der Massenbilanz des Enzyms ( $[E] = [E_0] - [ES]$ , mit  $[E_0]$  als totaler Enzymkonzentration) folgt:

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right) + [S]} = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$



Wird Gleichung 11 in Gleichung 8 eingesetzt, ergibt sich:

$$v = k_2 \cdot \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

Bei hohen Substratkonzentrationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit des Substrates nicht weiter proportional zu der Enzymkonzentration  $[E_0]$ , sondern erreicht in dem so genannten Sättigungsbereich eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$ . Aus  $v_{\max} = k_2 \cdot [E_0]$  resultiert dann die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (13)$$

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) ist die Substratkonzentration bei der  $\frac{1}{2} v_{\max}$  erreicht ist und, infolge des Steady-State-Prinzips, die Hälfte aller Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt sind.

Ein Enzym kann die Umsetzung unterschiedlicher Substrate katalysieren und besitzt die außergewöhnliche Fähigkeit zwischen verschiedenen Substraten zu unterscheiden. Je kleiner die Substratkonzentration der Michaelis-Menten-Konstante ist, desto schneller ist 50 % der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erreicht und desto höher ist die Affinität des Enzyms ein Substrat zu binden.

Bei hohen Substratkonzentrationen gilt  $v_{\max} = k_2 \cdot [E_0]$ , wobei  $k_2$  die scheinbare Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes zum Produkt darstellt. Sie wird daher auch als die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  definiert, die angibt wie groß die Anzahl der Moleküle ist, die pro Sekunde durch ein Enzymmolekül unter Substrat gesättigten Bedingungen umgewandelt werden.

Mit Hilfe der Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) und der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) kann die Leistungsfähigkeit des einzelnen Enzymmoleküls charakterisiert werden. Das Verhältnis  $k_{\text{cat}}/K_m$  ergibt die so genannte Spezifitätskonstante eines Enzyms. Sie ist die scheinbare Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung bei der Bindung eines Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms und wird daher als Maß für die Substratspezifität eines Enzyms herangezogen [Buchholz 2005-a].

### Der Enantiomerenüberschuss in der asymmetrischen Synthese

Enzyme sind große chirale Moleküle mit einzigartigen Stereostrukturen in der Umgebung des aktiven Zentrums und besitzen daher die Fähigkeit zwischen zwei stereogenen Zentren oder zwischen enantiotopen Gruppen oder Seiten zu differenzieren. Unterscheidet ein Enzym selektiv zwischen zwei Enantiomeren eines Racemates, führt die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit zur kinetischen Isomerentrennung. Dabei wird ein Enantiomerenpaar umgewandelt, während das andere unangetastet bleibt. In der asymmetrischen Synthese wird die Umsetzung prochiraler Edukte in chirale Produkte katalysiert. In einer enantioselektiven enzymatischen Reaktion konkurrieren entweder zwei stereogene oder prochirale Substrate um das aktive Zentrum des Enzyms. Aus dem Verhältnis der beiden Spezifitätskonstanten  $k_{\text{cat}}/K_m$  ergibt sich die Enantioselektivität des Enzyms. Je stärker das Enzym zwischen den beiden chiralen bzw. prochiralen Verbindungen unterscheiden kann, desto höher ist der Enantiomerenüberschuss (Glg. 14).

$$ee_R = \frac{n_R - n_S}{n_R + n_S} \quad (14)$$

Mit dem Enantiomerenüberschuss (ee-Wert) wird die Enantiomerenreinheit einer optisch aktiven Substanz beschrieben [Sheldon 1993].

### Die Zyklenzahl und Raum-Zeit-Ausbeute

Enzyme, die im industriellen Maßstab Anwendung finden, müssen verfügbar sein und hochselektiv arbeiten. Zwei wichtige charakteristische Größen, die ein Aussagen über die Effizienz eines Biokatalysators treffen, sind die Zyklenzahl (Glg. 15) und die Raum-Zeit-Ausbeute (Glg. 16).

$$ttn = \frac{n_p}{n_{Kat}} \quad (15)$$

Die Zyklenzahl ( $ttn$ , [*engl.*]: total turnover number) beschreibt das Verhältnis der Stoffmenge des erhaltenen Produktes ( $n_p$ ) zur eingesetzten Stoffmenge des Katalysators ( $n_{Kat}$ ). Die  $ttn$  ist ein Maß für die Produktivität des eingesetzten Katalysators. Je kostenintensiver ein Biokatalysator ist, desto größer sollte die Zyklenzahl sein, um die Produktkosten gering zu halten.

Die Produktionskosten, zu denen das Material, Lösungsmittel, der Platz-, Arbeits- und Zeitaufwand gehören, werden mit der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) beschrieben.

$$RZA = \frac{m_p}{V_R \cdot \tau} \quad (16)$$

Je größer das Verhältnis der isolierten Produktmasse ( $m_p$ ) zum Reaktionsvolumen ( $V_R$ ) und zur Verweilzeit ( $\tau$ ) ist, desto geringer sind die Investitionskosten der Anlage. In vielen enzymkatalysierten Prozessen werden unpolare Substrate umgesetzt, die in wässrigen Medien nur sehr gering löslich sind. Das führt entweder zu langen Reaktionszeiten, da das schlecht lösliche Substrat für den Katalysator kaum zugänglich ist oder sehr große Reaktionsvolumina werden eingesetzt, was wiederum zusätzlich die Aufarbeitungskosten des Produktes erhöht.

### Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  (auch molarer Absorptionskoeffizient genannt) einer UV-aktiven Substanz wurden ausgehend von einer Stammlösung mehrere Verdünnungen hergestellt. Alle so erhaltenen Lösungen einer bestimmten Konzentration wurden bei konstanter Temperatur (25 °C) und der gewünschten Wellenlänge photometrisch vermessen. Als Nullwert diente eine mit entionisiertem Wasser gefüllte Quarzküvette.

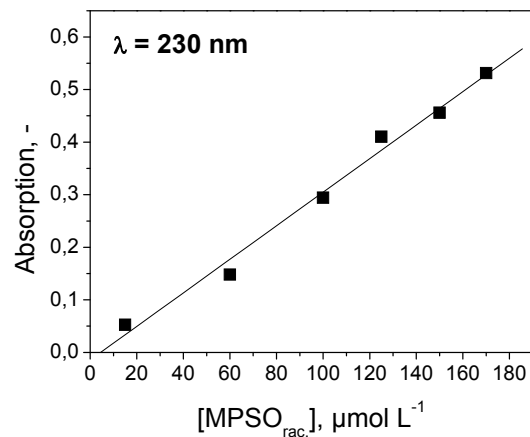
Die erhaltene Regressionsgerade zeigt die Abbildung 9.2. Es ergibt sich folgende Abhängigkeit:

$$y = 0,00319x - 0,0142$$

Der Extinktionskoeffizient wird über das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt:

$$E = \varepsilon \cdot d \cdot c \quad (17)$$

$E$  ist die Extinktion des am Photometer gemessenen Lichtes,  $\varepsilon$  der molare Absorptionskoeffizient,  $d$  die Schichtdicke der Messküvette und  $c$  die Konzentration der Lösung in der Messküvette.



**Abb. 9.2. Regressionsgerade von racemischem Methylphenylsulfoxid bei 25 °C und einer Wellenlänge von  $\lambda = 230$  nm.**

## 9.2 Abbildungen

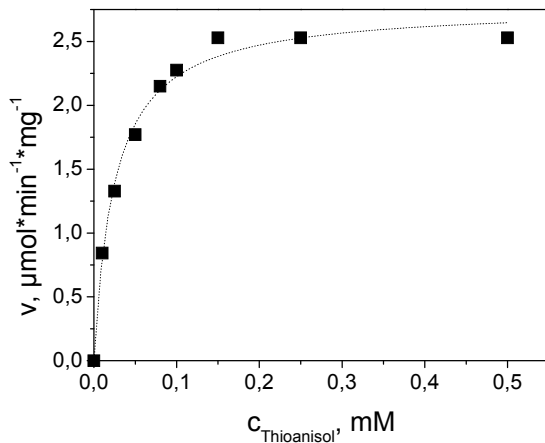


Abb. 9.3. Substrat-Abhängigkeit der *AaP*-Aktivität bei der Sulfoxidation von Thioanisol.

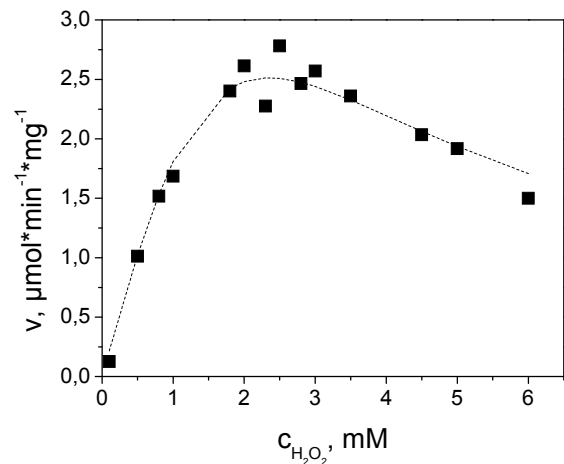
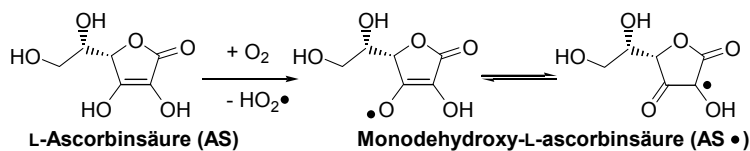


Abb. 9.4. Der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einfluss auf die *AaP*-Aktivität bei der Sulfoxidation von 0,1 mM Thioanisol.

Aktivierung:



radikalische Fortpflanzung:

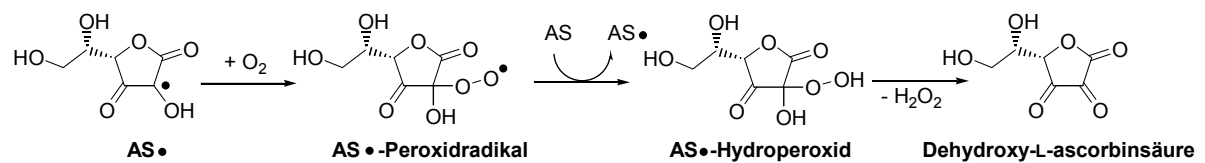


Abb. 9.5. Die Autoxidation von Ascorbinsäure.

## 9.3 Die Berechnung der Enzymkonzentration

Die Enzymkonzentration berechnet sich aus der molaren Masse der *AaP* (46 kDa [Ullrich 2004]) und dem Anteil des aktiven Enzymproteins in der Enzymcharge. Die Enzymkonzentration in reinen Enzympräparaten entspricht der Proteinkonzentration. Im Rohenzym, das aus der Fermentationsbrühe gewonnen wird und nicht gereinigt ist, befinden sich neben dem aktiven Enzymprotein nicht aktive Proteine. Hauptsächlich zählt dazu modifiziertes Sojaprotein aus dem Fermentationsprozess. Aus dem Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten des Rohenzym und des reinen Präparates erhält man den Anteil des aktiven Enzyms vom ermittelten Proteingehalt. Am Beispiel der Enzymcharge *AaP*-2008 soll die Berechnung der Enzymkonzentration des Rohenzym gezeigt werden:

Reines Enzympräparat:	spez. <i>AaP</i> -Aktivität <sup>n</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Protein</sub> :	100
Rohenzym:	spez. <i>AaP</i> -Aktivität <sup>n</sup> , U·mg <sup>-1</sup> <sub>Protein</sub> :	2,54
	Proteingehalt, mg·mg <sup>-1</sup> :	0,28

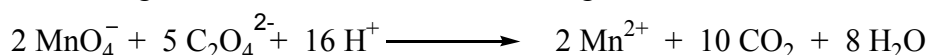
<sup>n</sup> Bestimmung der Enzymaktivität über den photometrischen Thioanisol-Assay (M 7.3.2.1).

0,6 mg·mL<sup>-1</sup> des lyophilisierten Rohenzym wurden im Zitronensäure-Phosphat-Puffer (pH 6,8) gelöst. Im Puffer befinden sich demnach 0,17 mg Protein. Nur 2,5 % des bestimmten Proteins des Rohenzym sind im Veratrylalkohol-Assay enzymatisch aktiv, so dass sich nur  $4,25 \cdot 10^{-3}$  mg *AaP*-Protein in 1 mL Puffer befinden. Die Enzymkonzentration beträgt demnach 92 nmol·L<sup>-1</sup>.

Die Enzymaktivität wird für gewöhnlich in Unit (U) angegeben. 1 U ist die Menge Enzym, die unter definierten Bedingungen 1 μmol·L<sup>-1</sup> Substrat pro Minute umsetzt. Da die Angabe der Enzymaktivität in Unit keine vergleichbare Größe ist, soll in dieser Arbeit die Enzymkonzentration als Maß für die eingesetzte Menge Enzyms verwendet werden. Die Enzymkonzentration steht auch losgelöst von der verwendeten Enzymcharge. Somit entspricht 1 Unit *AaP* bezogen auf den Thioanisol-Assay einer Enzymkonzentration von 72 nM. Um 72 nM *AaP* in 1 mL Puffer herzustellen, mussten 0,69 mg, 1,035 mg und 0,465 mg von der *AaP*-2006-, *AaP*-2007- und *AaP*-2008-Charge eingewogen werden.

#### 9.4. Permanganometrische Titration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Kaliumpermanganat ist keine Urtitersubstanz. Mit Hilfe von 0,02 M Natriumoxalat wurde der Faktor einer 0,02 M Permanganat-Maßlösung bestimmt (Abb. 9.6). Dazu wurde ein genau definiertes Volumen (20 mL) des Oxalates vorgelegt und mit 50 mL destilliertem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde mit Schwefelsäurelösung (20 % (v/v) in Wasser) stark angesäuert, zwischen 75 °C und 85 °C erhitzt und langsam mit der Permanganatlösung titriert, bis sich das Permanganat mindestens 20 Sekunden lang nicht mehr entfärbte.

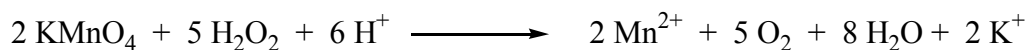


**Abb. 9.6. Titerbestimmung der Permanganatlösung mit Natriumoxalat in stark schwefelsaurer Lösung.**

Aus dem Verbrauch der Kaliumpermanganatlösung, wurde, wie in Gleichung 18 dargestellt, die vorliegende Konzentration der Kaliumpermanganat-Maßlösung berechnet. Aus dem ermittelten und dem theoretischen Verbrauch der Permanganatlösung kann der Korrekturfaktor der Maßlösung berechnet werden.

$$5n(\text{MnO}_4^-) = 2n(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) \quad (18)$$

Für die manganometrische Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wurden 50 mL einer verdünnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mit 15 mL 20 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt (Abb. 9.7).



**Abb. 9.7. Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes in stark schwefelsaurer Lösung mit Kaliumpermanganat.**

Die Titration erfolgte bei Raumtemperatur durch langsames Zutropfen der Kaliumpermanganat-Maßlösung bis sich diese nicht mehr entfärbte. Aus dem Verbrauch der Maßlösung lässt sich aus der in Gleichung 19 dargestellten molaren Äquivalenz, die sich aus der Stöchiometrie der Redoxgleichung ergibt, die Konzentration der Wasserstoffperoxidlösung berechnen.

$$5n(\text{MnO}_4^-) = 2n(\text{H}_2\text{O}_2) \quad (19)$$

## 9.5 Herstellung der Reaktionsmedien

Die Pufferlösungen wurden alle mit entionisiertem Wasser hergestellt. Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter geprüft und mit Hilfe der entsprechenden Pufferstammlösungen korrigiert.

### Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvain

Die Stammlösungen 0,1 M Zitronensäurelösung (Lösung A) und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung (Lösung B) wurden in entionisiertem Wasser hergestellt. Über die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse der beiden Stammlösungen wurde der pH-Wert des Puffers eingestellt (Tab. 9.1).

**Tab. 9.1. Einstellung des pH-Wertes im McIlvain-Puffer bei 18 °C [Rauscher 2000].**

pH-Wert	A, % (v/v)	B, % (v/v)	pH-Wert	A, % (v/v)	B, % (v/v)
2,2	98,0	2,0	6,0	36,8	63,2
3,0	79,5	20,5	6,8	22,7	77,3
4,0	61,4	38,6	7,0	17,6	82,4
5,0	48,5	51,5	8,0	2,7	97,3
5,5	43,1	56,9			

### Phosphat-Puffer

Lösung A: 0,067 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung

Lösung B: 0,067 M Dikaliumhydrogenphosphatlösung

**Tab. 9.2. Einstellung des pH-Wertes im Phosphat-Puffer bei 18 °C [Rauscher 2000].**

pH-Wert (bei 18 °C)	Lösung A, % (v/v)	Lösung B, % (v/v)
6,8	53,4	46,6
8,0	3,7	96,3

### Essigsäure-Acetat-Puffer

Lösung A: 0,2 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung

Lösung B: 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphatlösung

**Tab. 9.3. Einstellung des pH-Wertes im Essigsäure-Acetat-Puffer bei 18 °C [Rauscher 2000].**

pH-Wert (bei 18 °C)	Lösung A, % (v/v)	Lösung B, % (v/v)
5,0	22,75	77,25
7,0	17,65	82,35
8,0	2,75	97,25

### Carbonat-Puffer

Lösung A: 0,1 M Dinatriumcarbonatlösung

Lösung B: 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung

**Tab. 9.4. Einstellung des pH-Wertes im Carbonatpuffer bei 18 °C [Rauscher 2000].**

pH-Wert (bei 18 °C)	Lösung A, % (v/v)	Lösung B, % (v/v)
9,3	10,0	90,0
10,8	87,9	12,1

## 9.6 Chemikalienliste

Tab. 9.5. Chemikalienliste.

Chemikalienname, Reinheit	Hersteller
Aceton, > 99,4 %	J.T. Baker
Acetonitril, > 99,8%	J.T. Baker
<i>Agrocybe aegerita</i> Peroxidase	JenaBios GmbH
Amberlite FPA 51	Rohm and Haas Company
Ameisensäure 0,1 % (v/v) in LC-H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Corporation
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Corporation
Benzaldehyd, 99%	Sigma-Aldrich Corporation
Benzochinon, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
Benzoessäure, 99 %	Sigma-Aldrich Corporation
Benzofuran, 99 %	Merck KGaA
Benzothiophen, 95 %	Sigma-Aldrich Corporation
Benzylalkohol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
Benzylmethylsulfid, 98 %	Acros Organics
[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	Solvent Innovation GmbH
4-Brombenzaldehyd, 99 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Brombenzylalkohol, 99 %	Acros Organics
2-Bromthioanisol, 99%	Acros Organics
3-Bromthioanisol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Bromthioanisol, 97 %	Acros Organics
2-Bromphenol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Bromphenol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
1-Butanol, > 99,4 %	J.T. Baker
2-Butanol, > 99 %	Merck KGaA
<i>tert</i> -Butanol, > 99 %	Fisher Scientific
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid, 70 % (v/v) in Wasser	Acros Organics
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid, 5,0 – 6,0 M in <i>n</i> -Decan	Sigma-Aldrich Corporation
Calcium D-gluconat, > 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Chlorbenzaldehyd, 98 %	Alfar Aesar GmbH & Co KG
4-Chlorbenzylalkohol, 99%	Acros Organics
2-Chlorthioanisol, 96 %	Sigma-Aldrich Corporation
3-Chlorthioanisol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Chlorthioanisol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
Zitronensäure	KMF Laborchemie Handels GmbH
Cyclopropylphenylsulfid, 98 %	Acros Organics
Diisopropylether	Sigma-Aldrich Corporation
Dikaliumhydrogenphosphat, p.a.	Merck KGaA
3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 99 %	Acros Organics
3,4-Dimethoxybenzylalkohol, 96 %	Acros Organics
3,4-Dimethoxybenzylsäure, 99 %	Acros Organics
Dimethylsulfoxid, p.a., > 99,9 %	Sigma-Aldrich Corporation
Dinatriumcarbonat, p.a.	VEB Laborchemie Apolda
Dinatriumhydrogenphosphat, p.a.	Merck KGaA
1,4-Dioxan, > 99%	Sigma-Aldrich Corporation
Duolite A568	Rohm and Haas Company
[ECOENG 212]	Solvent Innovation GmbH
[ECOENG 41M]	Solvent Innovation GmbH
[ECOENG 500]	Solvent Innovation GmbH

---

[EMIM][TOS]	Solvent Innovation GmbH
Ethanol, LiChrosolv, 99,3 %	Merck KGaA
Ethanol, p.a. > 99,9 %	Merck KGaA
Ethylacetat, Ultra Resi-Analyzed, 99,6 %	J. T. Baker
Ethylenglycol, p.a., > 99,9 %	Acros Organics
Ethylphenylsulfid, 97 %	Acros Organics
4-Fluorbenzylalkohol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
2-Fluororthoanisol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Fluororthoanisol, 97 %	Acros Organics
Glutarialdehyd, 50 % in H <sub>2</sub> O	Merck KGaA
1-Heptan, LiChrosolv, 99,3 %	Merck KGaA
1-Hexan, LiChrosolv, 98,0 %	Merck KGaA
Hydrochinon, 99,5 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Hydroxybenzaldehyd, 98 %	Acros Organics
2-Hydroxybenzylalkohol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
3-Hydroxybenzylalkohol, 99 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Hydroxybenzylalkohol, 97 %	Acros Organics
4-Hydroxybenzylsäure, 99 %	Acros Organics
Indol, 99 %	Acros Organics
Isooctan	VEB Laborchemie Apolda
Kaliumbromid, p.a.	Merck KGaA
Kaliumchlorid, p.a.	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck KGaA
Kaliumiodid, p.a.	Merck KGaA
Kaliumpermanganat, p.a.	Merck KGaA
Kieselgel 60 (0,063 – 0,100 mm)	Merck KGaA
Manugel <sup>®</sup> DJX, Natrium-Alginat E401	ISP Global Technologies GmbH
Methanol, Ultra Resi-Analyzed, 99,8 %	J. T. Baker
4-Methoxybenzaldehyd, 99 %	Acros Organics
2-Methoxybenzylalkohol, 99 %	Acros Organics
3-Methoxybenzylalkohol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Methoxybenzylalkohol, 98 %	Acros Organics
2-Methoxythioanisol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Methoxythioanisol, 99 %	Acros Organics
4-Methylbenzylalkohol, 98 %	Acros Organics
Methyl- <i>tert</i> -butylether	KMF Laborchemie Handels GmbH
4-Methylethylpyridiniumdiethylphosphat	Solvent Innovation GmbH
2-(Methylmercapto)benzimidazol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-(Methylmercapto)benzaldehyd, 95 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-(Methylmercapto)phenol, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
3-Methyl-4-(methylthio)-phenol, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
Methylphenylsulfon, > 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
Methylphenylsulfoxid, 98 %	Acros Organics
4-(Methylthio)anilin, 98 %	Alfar Aesar <sup>®</sup>
2-(Methylthio)benzylamin, 97 %	Maybridge Ltd. Trevillet
6-Methylthiochroman-4-on, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
2-Methylthiophen, 98 %	Sigma-Aldrich Corporation
4-Methylthioanisol, 99%	Acros Organics
Mowiol <sup>®</sup> 20-98, Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich Corporation
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Corporation
Natriumoxalat, > 99 %	Sigma-Aldrich Corporation

---

Natriumsulfit	VEB Laborchemie Apolda
4-Nitrobenzylalkohol, 99 %	Sigma-Aldrich Corporation
Peressigsäure-Lösung, 40 % (v/v) in Wasser	Sigma-Aldrich Corporation
Phenol	Sigma-Aldrich Corporation
1,3-Propandiol	Sigma-Aldrich Corporation
2-Propanol	Sigma-Aldrich Corporation
Propylencarbonat, > 99 %	Merck KGaA
Schwefelsäure, p.a., 95 – 97 %	KMF Laborchemie Handels GmbH
Sylgard® 184	Dow Corning
Tetrahydrofuran, > 99,8%	J. T. Baker
Thioanisol, 99 %	Acros Organics
Thiophenol, 99%	Acros Organics
4-Toluenthiol, 98 %	Acros Organics
Triethylenglycol	J. T. Baker
2,2,4-Trimethylpentan, Uvasol®	Merck KGaA
TRISOPERL®, Amino-195	VitraBio GmbH
Vinylphenylsulfid, 97 %	Sigma-Aldrich Corporation
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck KGaA

## 9.7 Geräteliste

### 9.6. Geräteliste.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Heizplatte mit Magnetührwerk	IKATHERM®	IKA®
HPLC-Autosampler	-	Knauer GmbH
HPLC-Mischkammer	Dynamic Mixing Chamber	Knauer GmbH
HPLC-Pumpe	Mini-Star K-500/1	Knauer GmbH
HPLC-Säulenofen	-	Knauer GmbH
HPLC-UV-VIS-Detektor	K-2501	Knauer GmbH
Kontaktthermometer	IKATRON® ETS-D4-fuzzy	IKA®
Laborwaage	BP 121 S	Sartorius AG
Magnetührplatte	Variomag® Poly	Komet
Photometer	Specord 2000	Analytic Jena AG
Rotationsverdampfer	Laborota 4001	Heidolph Instruments
Sauerstoffsensord	OXY-4 mini	PreSens GmbH
Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Taschen-pH-Meter	pH 340i	WTW GmbH
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Thermoschüttler	memmert	Memmert GmbH Co AG



---

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln oder Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 3.06.2009