

**Synthese, Test und Einsatz chiraler
Fluoreszenzsubstrate zur Beurteilung
enzymatischer Prozesse in unterschiedlichen
Reaktionsphasen**

**Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFT**

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Torsten Knüttel

geboren am 27. April 1973

in Hannover

Hannover, Oktober 2002

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. H. c. Karl Schügerl

Tag der Prüfung: 28.10.2002

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hannover, im Juni 2002

.....
(Torsten Knüttel)

Abstract:

Torsten Knüttel

Synthese, Test und Einsatz chiraler Fluoreszenzsubstrate zur Beurteilung enzymatischer Prozesse in unterschiedlichen Reaktionsphasen

Schlagwörter: α -Chymotrypsin; Esterase; Coumarin; On-line-Erfassung; 2D-Fluoreszenz; Enantioselektive Hydrolyse

Enantioselektive Reaktionen können bis heute nur über GC- oder HPLC-Methoden registriert werden, daher ist es das Ziel dieser Arbeit, eine enantioselektive Reaktion zu entwickeln, die on-line analytisch verfolgt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit werden pseudo-Enantiomere synthetisiert, die 2D-fluoreszenzspektroskopisch detektierbar sind. Aus den Umsatzverläufen der eingesetzten Substrate lassen sich sofort Aussagen über die Enantioselektivität des eingesetzten Enzyms treffen. Dabei werden folgende fluoreszenzspektroskopisch detektierbare Substrate synthetisiert und eingesetzt:

- L-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin
- D-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin
- L-Phenylalanin-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin
- D-Phenylalanin-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substituenten R-CH₃ und R-CF₃ besitzen die Coumarinsubstrate und deren Spaltprodukte unterschiedliche Fluoreszenzmaxima im 2D-Fluoreszenzspektrum.

Die kinetischen Parameter v_{\max} und K_M werden für jede einzelne Umsetzung im wässrigen Medium bestimmt und miteinander verglichen. Bei einem gleichzeitigen Einsatz beider Coumarinsubstrate werden zusätzlich zu der on-line-Überwachung der Reaktion die Enantioselektivitäten, die Enantiomerenüberschüsse der Substrate und Produkte und die Umsätze ermittelt. In weiteren Untersuchungen wird die Reaktion auf das organische Medium Toluol übertragen. Dabei wird versucht, die Enantioselektivität der enzymatischen Reaktion durch „substrate engineering“ zu beeinflussen und etwaige Änderungen in der Enzymenantioselektivität on-line zu detektieren.

Abstract:

Torsten Knüttel

Synthesis, test and application of chiral fluorescence substrates to evaluate enzymatic processes in different reaction media

Key words: α -Chymotrypsin; Esterase; Coumarin; On-line-monitoring; 2D-fluorescence; Enantioselective hydrolysis

The use of enzymes for the synthesis of organic compounds has become of increasing relevance in the last decades. Numerous studies revealed, that enzymatic reactions can be monitored on-line, however, it is largely not possible to detect enantiomeric conversions on-line via spectroscopic methods. Therefore, off-line-sampling with an immediate analysis (GC, MC, HPLC or UV-VIS) is still necessary.

The aim of this work was to develop a quasi-enantiomeric reaction, that can be followed on-line via 2D-fluorescence spectroscopy. During this reaction, conclusions about the converted substrates can be drawn immediately. Therefore, fluorescence spectroscopic detectable substrates, L-/D-phenylalanine-7-amido-4-methylcoumarin (L-/D-PheAMC) and L-/D-phenylalanine-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (L-/D-PheAFC), were synthesised and used for applications in aqueous systems. The L-/D-coumarin substrates show different fluorescence behaviours, since they carry different fluorescence labels R-CH₃ and R-CF₃. Also, the AMC and AFC products show different positions in their fluorescence maxima, hence it is possible to draw conclusions about the enantioselectivity of the used enzymes. Several proteases are tested to detect suitable biocatalysts for the enzymatic decompositions of the coumarin derivatives. Every coumarin substrate is separated, and the received enzymatic parameters K_M and v_{max} in water are compared. The enantioselectivity and the enantiomeric excess of the enzymatic reactions are investigated. In further experiments, the methyl and trifluoromethyl substituted coumarins are separated simultaneously on-line, the enantioselectivities, enantiomeric excesses and kinetic parameters are examined. Furthermore, the enzymatic reactions are investigated in the organic solvent toluol. The kinetic parameters are measured and the ee-parameter of the substrate and the product investigated. The coumarin substrates are hydrolysed simultaneously and in further investigations the enantioselectivity is influenced by enlarging one substrate via salt formation. This influence is measured on-line with the 2D-fluorescence spectroscopy.

Danksagung:

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom Juni 1999 bis März 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich für die mir gebotenen Möglichkeiten und Freiräume für die Durchführung der Arbeit danken.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. em. Dr. Dr. H. c. Karl Schügerl bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. H. H. Meyer vom Institut für Organische Chemie für die Synthese aller benötigten Substrate.

Meinen langjährigen Freunden Christian Harbeck und Jörg Schaper, die immer Ihre Hilfe anboten wenn sie benötigt wurde, möchte ich besonders danken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Außerdem möchte ich bedanken bei ...

- ... Dörte Solle für die Einweisung in die Welt der Chemometrik.
- ... Martina Weiß für die großartige Unterstützung an der HPLC.
- ... den Werkstätten des Instituts für die ausgezeichnete Arbeit bei der Reaktorkonstruktion.
- ... allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie und insbesondere den Mitgliedern des IS-Labors für das angenehme Arbeitsklima („piece of cake“).

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für Ihre Unterstützung bei all meinen Vorhaben.

Zuletzt möchte ich Seline danken für Ihr Verständnis, Ihre Zuneigung und Unterstützung.

1.	Einleitung	1
2.	Zielsetzung	3
3.	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Enzyme	5
3.1.1	Proteasen, Esterasen	7
3.2	Enzymkinetik	9
3.2.1	Das Michaelis-Menten-Modell	9
3.2.2	Kinetik von Zwei-Substrat-Reaktionen	9
3.2.3	Enzymhemmung	12
3.3	Enzymimmobilisierung	14
3.4	Modelle des aktiven Zentrums	15
3.5	Enzymatische Reaktionen in unkonventionellen Lösemitteln	17
3.5.1	Mögliche Lösemittelsysteme für Stoffumwandlungen	17
3.5.2	Einfluß des Wassergehalts im Gesamtsystem auf enzymkatalysierte Umsetzungen	18
3.5.3	Enzymatische Reaktionen in organischen Lösemitteln	19
3.6	Analytik	21
3.6.1	Analytik zur Erfassung von Enantiomeren	21
3.6.2	Verfahren zur on-line Analytik: Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie	22
3.6.3	Verfahren zur off-line Analytik: Chromatographische Methoden zur Enantiomerenbestimmung	23
3.7	Gegenstand der Chemometrik	24
3.7.1	Multivariate Datenanalyse	24
3.7.2	Die Hauptkomponentenanalyse	25
3.7.3	Die Sensitivitätsanalyse	25
4.	Matherial und Methoden	26
4.1	Die Fluoreszenzspektroskopie zur Prozeßbeobachtung	26
4.2	Der Reaktor mit Lichtleiteraufsatz	27
4.3	Verwendete Substrate	28
4.3.1	Vorkommen, Bedeutung und Einsatz von Coumarinderivaten	29
5.	Ergebnisse	31
5.1	Vorbemerkungen	31
5.2	Substratauswahl	32
5.2.1	Eigenschaften der Substrate	32
5.3	Bestimmung der Nachweisgrenzen	35
5.3.1	Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen für die Substrate L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC	35
5.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AMC und AFC	36
5.4	Stabilität der Substrate im wäßrigen Medium	37
5.4.1	pH-Stabilität	37
5.4.2	Temperaturstabilität im wäßrigen Medium	38
5.5	Auswahl der Enzyme	39
5.5.1	Ergebnisse der Umsetzungen von L-PheAMC mit verschiedenen Enzymen in KPP	39
5.5.2	Ergebnisse der Umsetzungen von D-PheAFC mit verschiedenen Enzymen in KPP	40
5.5.3	Variation der Enzymmenge in KPP	41
5.6	Fluoreszenzspektroskopische on-line-Analytik der enzymatischen Umsetzung von L-/D-PheAMC / L-/D-PheAFC in wäßrigem Medium	42
5.6.1	Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP	42
5.6.2	Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in KPP	46
5.6.3	Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit der Esterase PLE in KPP	49
5.6.4	Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE in KPP	51
5.7	Bestimmung kinetischer Daten	53
5.7.1	Bestimmung der kinetischen Daten von α -Chymotrypsin	53
5.7.2	Hemmung von α -Chymotrypsin	54
5.7.3	Bestimmung der kinetischen Daten der Esterase PLE	55
5.8	Gleichzeitige enzymatische Umsetzung der Coumarinsubstrate im wäßrigen Medium	56
5.8.1	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in KPP	56
5.8.2	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAFC / D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP	58
5.8.3	Vergleich von eeS, eeP, E und U der Hydrolysen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP	61
5.8.4	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit der Esterase PLE	62
5.8.5	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAFC / D-PheAMC mit der Esterase PLE	64

5.8.6	Vergleich von eeS, eeP, E und U der Hydrolysen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit der Esterase PLE in KPP.....	67
5.9	Übertragung der enzymatischen Hydrolyse der Coumarinsubstrate auf organische Lösemittel.....	68
5.9.1	Auswahl der Lösemittel	69
5.9.2	Stabilität von α -Chymotrypsin und PLE in KPP und Toluol	72
5.9.3	Einfluß des Wassergehaltes im Gesamtsystem auf die Hydrolysegeschwindigkeit.....	75
5.10	Messung der Wasseraktivität bei der Umsetzung von L-PheAMC mit PLE.....	76
5.11	Lage der Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate /-produkte im 2D-Fluoreszenzspektrum in Toluol	78
5.12	Fluoreszenzspektroskopische on-line Analytik der enzymatischen Umsetzung von L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC in Toluol	79
5.12.1	Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin	80
5.12.2	Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin.....	82
5.12.3	Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit der Esterase PLE.....	84
5.12.4	Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE	86
5.13	Bestimmung kinetischer Daten in Toluol	88
5.13.1	Bestimmung der kinetischen Daten von α -Chymotrypsin.....	88
5.13.2	Bestimmung der kinetischen Daten der Esterase PLE	90
5.14	Gleichzeitige enzymatische Umsetzung der Coumarinsubstrate in Toluol	91
5.14.1	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol	91
5.14.2	Vergleich von eeS, eeP, E und U der Umsätze von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in Toluol	96
5.14.3	Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit der Esterase PLE	97
5.14.4	Vergleich von eeS, eeP, E und U der Umsätze von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit der Esterase PLE in Toluol.....	101
5.15	Erhöhung der enzymatischen Enantioselektivität in organischem Medium durch Variation der Substratsalzgrößen	102
5.16	Verwendung eines chemometrischen Modells zur Reaktionsvorhersage der enzymatischen Hydrolyse der Coumarinderivate	105
5.16.1	Die Sensitivitätsanalyse.....	105
5.16.2.	Die chemometrischen Vorhersagen aus den Einzelumsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin und PLE	107
5.16.2.	Die chemometrischen Vorhersagen aus den gleichzeitigen Umsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin und PLE	111
6.	Zusammenfassung.....	113
7.	Diskussion und Ausblick	117
8.	Anhang	122
8.1	Abkürzungen und Zeichenerklärungen	122
8.2	Verwendete Chemikalien.....	123
8.3	Fluorophore.....	124
8.4	Verwendete Enzyme.....	124
8.5	Vergleich der eingesetzten Enzyme.....	125
8.6	Colyophilisation	126
8.7	Probenaufarbeitung aus den enzymatischen Umsetzungen der Coumarinsubstrate	126
8.8	Darstellung der Coumarinderivate.....	127
8.9	Aktivitätsbestimmungen der Enzyme mit der pH-Stat Methode	128
8.10	Enantioselektivität	128
8.11	Betriebsparameter für die HPLC-Untersuchungen	129
8.12	Geräteverzeichnis	131
9.	Literaturverzeichnis.....	133

1. Einleitung

Die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen mit einem oder mehreren chiralen Zentren, welche im medizinischen Bereich Verwendung finden, ist eine der schwierigsten Aufgaben in der modernen organischen Chemie. Laut EG-Richtlinien müssen pharmakologische Wirkstoffe enantiomerenrein eingesetzt werden. Somit wurden in den letzten Jahren verstärkt Biokatalysatoren zur Synthese hochkomplexer Moleküle eingesetzt, da diese eine natürliche hohe Regioselektivität, Enantioselectivität und Spezifität aufweisen [Liese *et al.*; 2000]. In der Nahrungsmittel-, pharmazeutischen und Feinchemikalienindustrie sind Enzyme seitdem als wirkungsvolle Werkzeuge etabliert.

Die hohe Bedeutung von Biokatalysatoren verursacht die Suche nach immer neuen Enzymen, welche singuläre Aktivitäten aufweisen sollen. Dabei besteht ein hohes Interesse an der Enantioselectivität der eingesetzten Enzyme, wenn diese einem racemischen Gemisch, welches eine mögliche Vorstufe zur Synthese eines potentiell wirksamen pharmazeutischen Wirkstoffes darstellt, zugesetzt werden. Eine solche Suche kann sich jedoch als zeitintensiv erweisen, wenn die Aktivität einer ganzen Enzymlibliothek gegenüber einer Reihe von Substraten zur Entdeckung von wirksamen Biokatalysatoren, zur künstlichen Weiterentwicklung dieser Katalysatoren („enzyme engineering“ durch gerichtete Evolution [Bornscheuer; 1998]), oder zur Prozeßoptimierung getestet werden muß. Die Zahl möglicher Enzymvarianten, die zum Beispiel durch die gerichtete Evolution erzeugt werden können, wächst exponentiell mit der Größe des Enzyms und der Zahl der Aminosäureketten, die durch die Methode der gerichteten Evolution ausgetauscht werden sollen. Für ein kleines Protein aus 200 Aminosäuren können bereits bei nur drei Substitutionen theoretisch über 9 Milliarden Varianten hergestellt werden [Kuchner und Arnold; 1997]. Diese können in der Regel nicht mehr mit herkömmlichen, zeitintensiven Methoden wie HPLC oder Gaschromatographie analysiert werden. Hier kann eine Selektion beispielsweise auf einer veränderten Antibiotika-Resistenz oder auf dem Wachstum auf Mangelmedium erfolgen. Für das Screening nach Informationen über die Enzymeigenschaften, wie zum Beispiel verbesserter Stereoselektivität, werden verschiedene kolorimetrische Methoden beschrieben. Hydrolytisch arbeitende Enzyme können unter anderem mit chromogenen (Nitrophenyl) Substraten detektiert werden, aus denen durch die Hydrolyse farbige Produkte entstehen [Michal *et al.*; 1983]. Auch die Fluoreszenzspektroskopie dürfte das Auffinden aktiver Enzymvarianten in einer Bibliothek

erleichtern, hierbei kann die bei der Reaktion auftretende Änderung in der Fluoreszenz für einzelne Moleküle verfolgt werden [Harris *et al.*; 2000].

Neben dem Screening von Enzybibibliotheken nach aktiven Biokatalysatoren werden gleichzeitig auch erhöhte Anforderungen an die Verfeinerung und Weiterentwicklung von Steuerungsprozessen und analytischen Methoden gestellt. Verstärkt werden optische Sensoren bei biotechnologischen Prozessen verwendet. Mit ihnen ist eine einfache on-line-Prozeßbeobachtung und –regelung möglich. Dabei kann die Messung ohne Zeitverzögerung erfolgen. Hier ist besonders die 2D-Fluoreszenzspektroskopie hervorzuheben. Bisherige Probleme bei der Prozeßkontrolle, wie eine mögliche Kontamination bei der Probenahme, entfallen hierbei, da kein direkter Eingriff in den Prozeß erfolgt (nicht invasive Technik) [Lindemann; 1998].

2. Zielsetzung

Auf die zunehmende Bedeutung von Enzymen zur Herstellung enantiomerenreiner pharmakologischer Wirkstoffe wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. In der Literatur werden dabei verschiedene Methoden zur on-line Erfassung enzymatischer Umsetzungen beschrieben. Bornscheuer *et al.* [1996] verfolgten die lipasenkatalysierte Umsetzung von 3-Hydroxyoctanoylsäuremethylester in überkritischem Kohlendioxid über die Absorption des entstehenden Nebenprodukts Acetaldehyd mit Hilfe eines UV-Photometers. Mit der dort beschriebenen Reaktion kann jedoch nur die Umsetzung der Substrate in die Produkte on-line-analytisch erfaßt werden, es ist nicht möglich, die einzelnen Enantiomere der Substrate spektroskopisch zu detektieren. Dazu ist auch weiterhin eine off-line-Probenahme mit anschließender gaschromatographischer Analyse notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die mögliche Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur on-line-Analytik von enzymkatalysierten Reaktionen im wäßrigen Medium und organischen Lösemitteln untersucht werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der on-line-Erfassung der Enantioselektivität des eingesetzten Biokatalysators. Unter Einsatz mehrerer fluoreszenzspektroskopisch detektierbarer Substrate wird versucht, die bevorzugt vom Enzym katalysierte Reaktion on-line zu verfolgen. Abbildung 2.1 zeigt das Modellsystem.

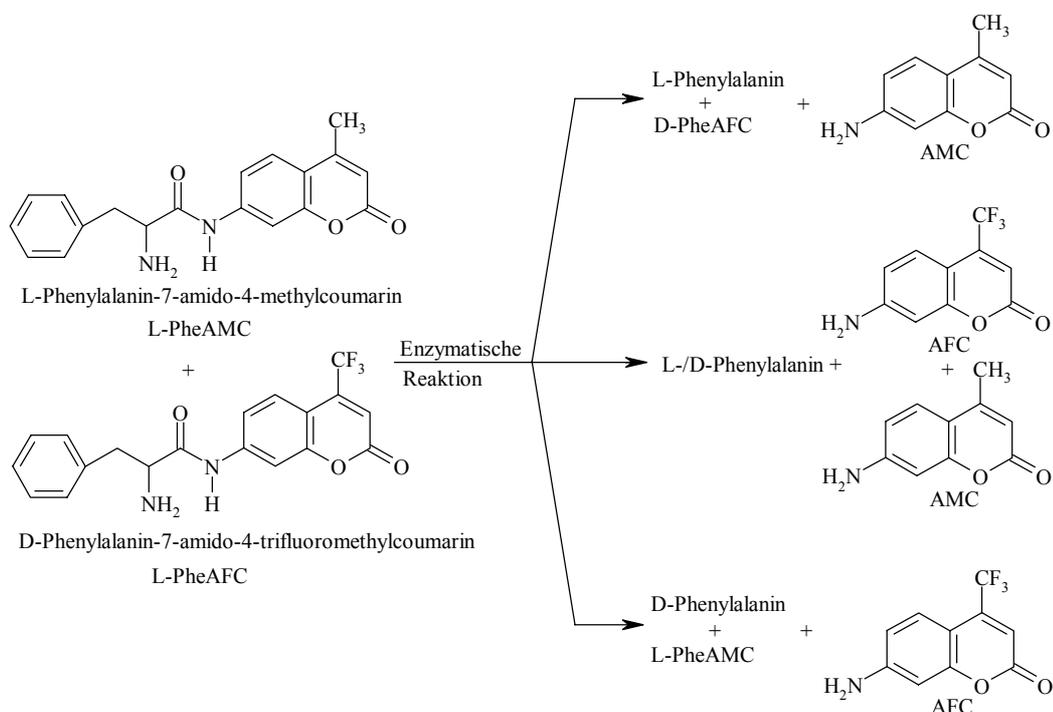


Abb. 2.1: Enzymatische Umsetzung der Coumarinsubstrate

Die eingesetzten Substrate unterscheiden sich in ihrer absoluten Konfiguration der Aminosäuren und den Substituenten der Coumarineinheiten. Durch die unterschiedlichen Substituenten besitzen die Substrate verschiedene Peakmaxima im Fluoreszenzspektrum. Das Ziel der Experimente besteht darin, daß das Enzym ein Substrat bevorzugt umsetzt, so daß die Spaltprodukte AMC oder AFC entstehen, welche sich ebenfalls durch ihre Peaklagen im 2D-Fluoreszenzspektrum untereinander und gegenüber den Substraten unterscheiden. Durch ein Anwachsen entweder des AMC- oder des AFC-Peaks im Spektrum können dann Rückschlüsse darauf gezogen werden, welches Substrat das Enzym bevorzugt umgesetzt hat. Unselektive Biokatalysatoren können dabei auch beide Coumarinsubstrate hydrolysieren, so daß beide Spaltprodukte, AMC und AFC, entstehen.

Zuerst sollen geeignete Enzyme gefunden werden, die eine effektive Hydrolyse der Substrate im wäßrigen Medium erlauben. Die kinetischen Parameter dieser Enzyme werden dann in Einzelversuchen bestimmt und miteinander verglichen, danach erfolgt ein gleichzeitiger Einsatz beider Coumarinderivate. Nach Abschluß der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen im wäßrigen Medium werden die Reaktionen auf organische Lösemittel übertragen. Dort soll eine Optimierung des Reaktionssystems durch „medium engineering“ erfolgen, dies geschieht durch Variation der Lösemittel und des Wassergehalts. Neben der Bestimmung der kinetischen Parameter liegt das Hauptaugenmerk in allen Versuchen auf der on-line-Erfassung der enantioselektiven Hydrolyse.

In weiteren Untersuchungen soll anschließend die Enantioselektivität der eingesetzten Biokatalysatoren durch „substrate engineering“ beeinflusst werden, auch hier wird versucht, die hervorgerufenen Änderungen in den Umsetzungen on-line zu erfassen. Zum Abschluß wird versucht, über ein chemometrisches Modell die Ergebnisse aus den enzymatischen Hydrolysen zu verifizieren.

Moris-Varas *et al.* [1999] versuchten ebenfalls die Enantioselektivität enzymatischer Hydrolysen abzuschätzen. Die Autoren benutzten dabei pH-Indikatoren, die durch die enzymatische Hydrolyse gebildete Säure verursachte eine Absenkung des pH-Wertes, die eine farbliche Veränderung der Reaktionslösung hervorrief. Durch den Einsatz getrennt voneinander vorliegender Enantiomere konnte eine on-line Bestimmung der Enantioselektivität des eingesetzten Enzyms erfolgen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Enzyme

Enzyme sind Biokatalysatoren, die alle lebensnotwendigen Stoffwechselumwandlungen in lebenden Organismen ausführen. Sie sind in der Regel Proteine, jedoch wurden bereits katalytisch aktive RNA-Moleküle entdeckt. Enzyme bestehen aus einem Proteinnetzwerk. Die Umsetzung eines Substrats erfolgt in einer spezifischen Region, dem aktiven Zentrum. In diesem können die katalytisch wirksamen Aminosäurereste und Kofaktoren die funktionellen Gruppen der Substrate beeinflussen, die bei der Reaktion umgesetzt werden. Erfolgt die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, wird die Aktivierungsenergie des Übergangszustandes, welche die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt, durch den Biokatalysator herabgesetzt. Durch die temporär veränderte Geometrie und Elektronenverteilung der Substratmoleküle erfolgt eine erhöhte Affinität des Enzyms zum Substrat, welche die Energieerniedrigung zur Folge hat [Alberts *et al.*; 1995]. Die durch die Bindung an das Enzym veränderte Substratstruktur, die räumliche Nähe der beteiligten funktionellen Gruppen und der Einfluß der Kofaktoren führen dazu, daß die enzymkatalysierte Reaktion im Vergleich zur nichtkatalysierten Reaktion um das bis zu 10^{10} fache beschleunigt wird.

Desweiteren zeichnen sich Enzyme durch folgende Eigenschaften aus:

- Sie katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen
- Sie arbeiten unter milden Bedingungen
- Sie sind häufig substratspezifisch
- Sie sind oft chemo-, regio-, diastereo- und enantioselektiv

In industriellen Verfahren werden Enzyme für präparative Anwendungen eingesetzt [Liese *et al.*; 2000], des weiteren in der Analytik, insbesondere in der Diagnostik. Enzyme werden in steigendem Umfang auch therapeutisch verwendet. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile enzymtechnischer Verfahren im Vergleich zu rein chemischen Verfahren.

Tab. 3.1: Vor- und Nachteile von Enzymen im Vergleich zu chemischen Katalysatoren
[Buchholz und Kasche; 1997]

Vorteile:	<ul style="list-style-type: none">• Stereoselektivität \leftrightarrow Enantioselektivität• Niedrige Temperaturen erforderlich• Aktiv bei pH 2 – 12• Weniger Nebenprodukte• Biologisch leicht abbaubar• Wiederverwendbarkeit (Immobilisierung)
Nachteile:	Empfindlichkeit gegenüber <ul style="list-style-type: none">• hohen Temperaturen• extremen pH-Werten• aggressiven Chemikalien Einige Enzyme <ul style="list-style-type: none">• sind nach wie vor teuer• benötigen teure Kofaktoren

Von den ca. 3000 bekannten Enzymen werden etwa 20 in größeren Mengen für enzymtechnische und therapeutische Anwendungen produziert [Buchholz und Kasche; 1997]. Die Isolierung der Biokatalysatoren aus tierischem und pflanzlichem Gewebe ist die klassische Art der Enzymgewinnung, gentechnische Verfahren ermöglichen jedoch eine kostengünstigere Produktion von Enzymen im technischen Maßstab bei gleichbleibender oder höherer Qualität. Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Primärstruktur, der Enzymfunktion und der Wechselwirkung zwischen Substrat und aktivem Zentrum haben die Grundlagen für das Protein-Design geliefert. Mit gentechnischen Methoden ist es möglich, die Primärstruktur der Biokatalysatoren gezielt zu verändern, um die Substratspezifität, die pH- und thermische Stabilität zu verbessern. Der räumliche Aufbau eines Enzyms kann durch Röntgenstrukturanalyse des Proteinkristalls und NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Hahn *et al.* [1990] zeigten, daß mit Kenntnis der sterischen Konformation des aktiven Zentrums kurze Peptidketten synthetisiert werden können, die eine entsprechende Orientierung der Aminosäuren aufweisen. Solche sogenannten Synzyme sollen enzymatische Aktivität besitzen.

3.1.1 Proteasen, Esterasen

Die Proteolyse bezeichnet den vollständigen Abbau von Proteinen zu freien Aminosäuren, die proteolytischen Enzyme werden nach ihrem Angriffspunkt innerhalb der Substratmoleküle in Endopeptidasen und Exopeptidasen unterteilt [Koolman und Röhm; 1994]. Endopeptidasen spalten Peptidbindungen im Inneren von Peptidketten, im Gegensatz dazu greifen Exopeptidasen Peptide vom Ende her an. Die in dieser Arbeit verwendete Endoprotease α -Chymotrypsin [EC 3.4.21.1] ist L-spezifisch und spaltet bevorzugt Peptidbindungen der aromatischen Seitenkette von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, gleichzeitig spaltet sie auch Esterbindungen. Die biologische Aufgabe des Chymotrypsins ist die Katalyse der Hydrolyse von Proteinen im Dünndarm [Stryer; 1991], es ist ein 25-kd-Enzym und besteht aus drei Polypeptidketten, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Röntgenkristallographische Untersuchungen zeigten, daß die drei Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat im Chymotrypsin eine katalytische Triade bilden und für die Bindung und Umsetzung des Substrats im aktiven Zentrum verantwortlich sind [Blow; 1976]. Die Hydrolyse beginnt mit einem Angriff des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe von Serin 195 auf die Carbonylbindung des Substrates. Gleichzeitig wird ein Proton von Serin 195 auf das Histidin 57 übertragen, es bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand aus. Das Aspartat 102 hält das His 57 in der richtigen Position, indem es dessen positive Ladung im Übergangszustand neutralisiert. Das protonierte His 57 überträgt anschließend das Proton auf das Stickstoffatom der Peptidbindung, die daraufhin gespalten wird. Die Aminkomponente diffundiert ab, das Enzym ist acyliert. In der folgenden Deacylierung wird ein Wassermolekül im aktiven Zentrum angelagert und die Acylierung umgekehrt [Stryer; 1991]. Abbildung 3.1 veranschaulicht den Mechanismus der enzymkatalysierten Hydrolyse durch α -Chymotrypsin.

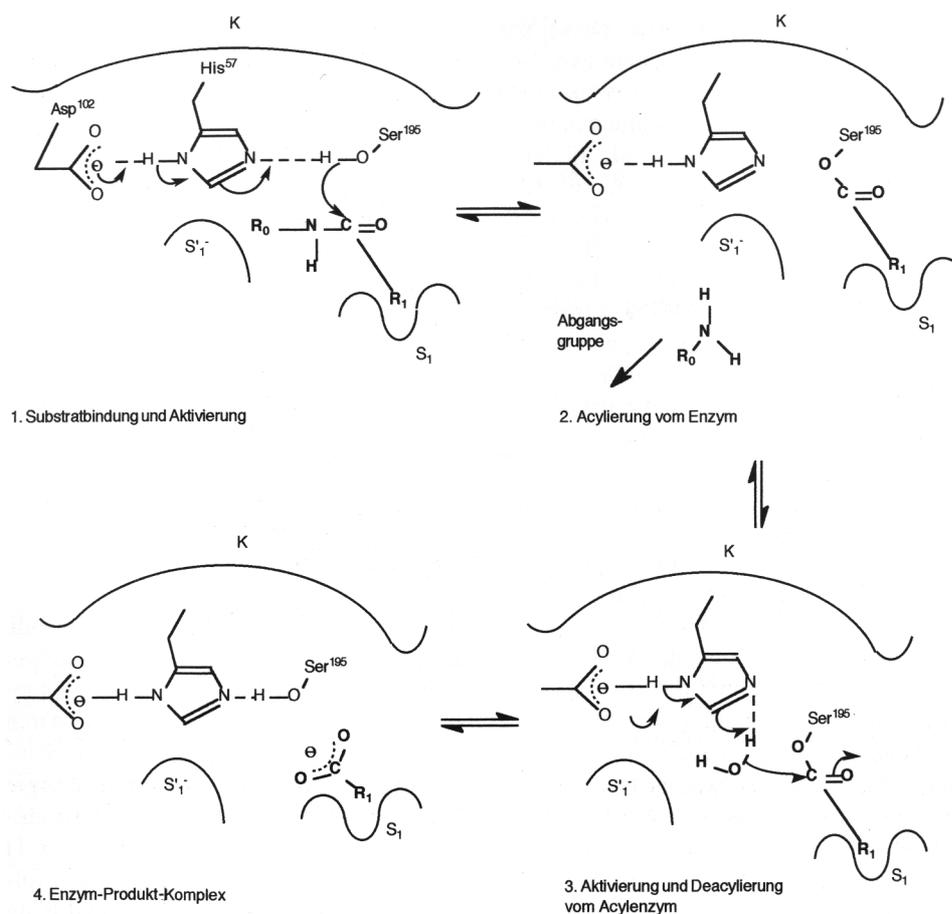


Abb. 3.1: Mechanismus der enzymkatalysierten Hydrolyse von α -Chymotrypsin
[Buchholz und Kasche; 1997]

Esterasen (systematischer Name: Carboxylester-Hydrolasen, EC 3.1.1.1) katalysieren die Hydrolyse von Carbonsäureestern in homogenen Lösungen. Sie sind den Lipasen in bezug auf Herkunft, Isolation und biochemischen Eigenschaften wie α/β -Hydrolasefaltung und Substratspezifität ähnlich [Fojan *et al.*; 2000]. Die in dieser Arbeit verwendete Schweineleberesterase (PLE, *Porcine liver esterase*) ist ein wichtiger Katalysator für regio- und enantioselektive Reaktionen in organischen Synthesen [Faber; 1997]. Esterasereaktionen gehorchen dem gleichen Mechanismus wie die Reaktionen der Proteasen, auch hier sind die drei Aminosäuren Histidin, Serin und Aspartat für eine Umsetzung der Substrate im aktiven Zentrum verantwortlich.

3.2 Enzymkinetik

3.2.1 Das Michaelis-Menten-Modell

Das 1916 von Leonor Michaelis und Maud Menten entwickelte Modell beschreibt die Kinetik enzymatischer Reaktionen. Das Modell geht von einfachen Bedingungen aus wie z.B. einer Ein-Substrat-Reaktion, bei der ein Enzym-Substrat-Komplex als Zwischenprodukt entsteht, und konstanter Enzymkonzentration aus.



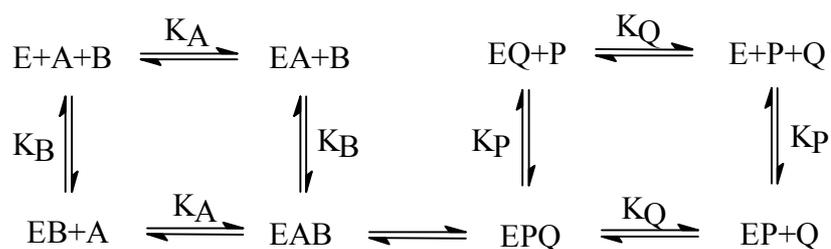
Unter der Annahme, daß die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes konstant bleibt (steady state), läßt sich die Michaelis-Menten-Gleichung erstellen:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (3.1)$$

Die Gleichung gibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit v in Abhängigkeit der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} , der Substratkonzentration $[S]$ und der Michaelis-Menten-Konstante K_M an.

3.2.2 Kinetik von Zwei-Substrat-Reaktionen

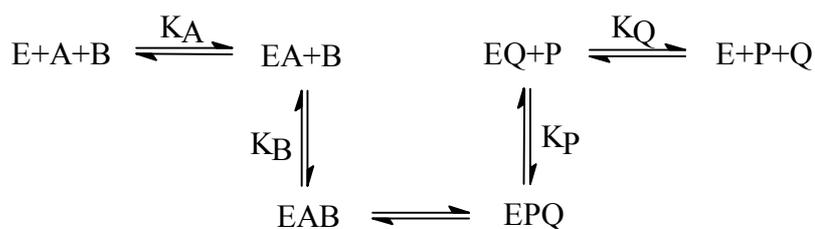
Teile der in dieser Arbeit untersuchten Reaktionen sind Zwei-Substrat-Reaktionen in organischen Lösemitteln. Das Modell nach Michaelis-Menten kann hier nicht verwendet werden, da in der Ableitung der kinetischen Parameter die Konzentration des zweiten Substrates unberücksichtigt bleibt. Drei verschiedene Reaktionsmechanismen werden in der Literatur hauptsächlich beschrieben und im nachfolgenden behandelt.

Der zufällige Bi-Bi-Mechanismus

Die Substrate A und B addieren sich nacheinander an das Enzym E zum Enzym-Substrat-Komplex EAB, die Reihenfolge der Addition ist gleichgültig. A bindet an das freie Enzym mit der Dissoziationskonstante K_A , B mit der Dissoziationskonstante K_B . Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist die langsame Umwandlung von EAB in EPQ. Nach der Reaktion zum Enzym-Produkt-Komplex EPQ lösen sich die Produkte in beliebiger Reihenfolge vom Enzym.

Das Geschwindigkeitsgesetz für den zufälligen Bi-Bi-Mechanismus lautet [Segel; 1975]:

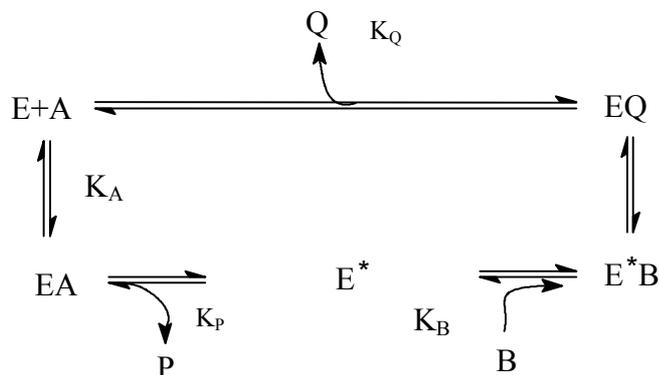
$$\frac{v_r}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]} \quad (3.2)$$

Der geordnete Bi-Bi-Mechanismus

Bei diesem Mechanismus ist die Reihenfolge der Addition der Substrate an das Enzym entscheidend. Zuerst muß A an das Enzym gebunden werden, wodurch es zu einer konformativen Änderung des Enzyms kommt. Erst danach kann sich B an den EA-Komplex addieren. Wiederum ist die Umwandlung von EAB in EPQ der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Das Geschwindigkeitsgesetz lautet [Segel; 1975]:

$$\frac{v_r}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B[A] + [A][B]} \quad (3.3)$$

Der Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus



Zuerst bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex EA. Im darauffolgenden Schritt reagiert dieser unter Eliminierung von P zu einer kovalent modifizierten Form des Enzyms E*, die das zweite Substrat B unter Ausbildung von E*B addiert. Aus diesem Komplex wird anschließend das Produkt Q eliminiert und das Enzym E zurückgebildet. Am Beispiel der α -Chymotrypsin-katalysierten Hydrolyse bindet im ersten Schritt das Substrat an das Enzym E, danach spaltet sich die Aminkomponente P ab. Anschließend bindet sich das Wasser B an das Acyl-Enzym E*, im letzten Schritt wird das Produkt Q abgespalten. Das Geschwindigkeitsgesetz für diesen Mechanismus ergibt sich zu [Segel; 1975]:

$$\frac{v_r}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_B[A] + K_A[B] + [A][B]} \quad (3.4)$$

Häufig werden Substrate als Überschußkomponente eingesetzt, um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte zu verschieben. Solch eine Maßnahme wirkt sich auch auf die Kinetik der Reaktion aus. Durch Umformen der rechten Seite der Gleichung (3.4) ergibt sich:

$$\frac{v_r}{v_{\max}} = \frac{[B]}{K_B + \frac{K_A[B]}{[A]} + [B]} \quad (3.5)$$

Mit der Überschußkomponente A kann der Term $1/[A]$ vernachlässigt werden, und aus Gleichung (3.5) ergibt sich ein Geschwindigkeitsgesetz in der Form der Michaelis-Menten-Gleichung (3.1). Durch Einsatz eines Substrates als Überschußkomponente lassen sich auch

die Kinetik des zufälligen Bi-Bi-Mechanismus und des geordneten Bi-Bi-Mechanismus in die Michaelis-Menten Kinetik überführen.

3.2.3 Enzymhemmung

Das aktive Zentrum von Enzymen kann direkt oder indirekt von Stoffen beeinflusst und verändert werden, Aktivatoren erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit, Hemmstoffe erniedrigen sie. In biologischen Systemen stellt die Hemmung von Enzymen einen bedeutenden Kontrollmechanismus dar, viele Medikamente und toxische Stoffe wirken, indem sie Enzyme hemmen. Irreversible Inhibitoren binden oft kovalent an das aktive Zentrum der Biokatalysatoren, bei der reversiblen Hemmung unterscheidet man zwischen kompetitiver, nicht-kompetitiver, unkompetitiver Hemmung, sowie Mischtypen [Bisswanger; 2000] Abbildung 3.2 stellt die möglichen Wechselwirkungen an Enzymen dar:

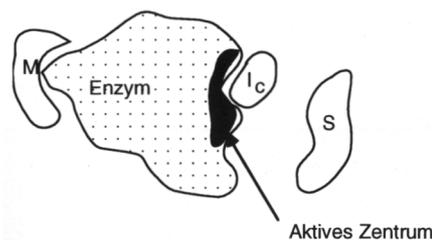


Abb. 3.2: Mögliche Wechselwirkungen zwischen Hemmstoffen und Enzymen
[Buchholz und Kasche; 1997]

I_C = Kompetitiver Hemmstoff

M = Modulator (Aktivator, nicht-kompetitiver Hemmstoff)

S = Substrat

Bei der kompetitiven Hemmung besitzen Substrat und Hemmstoff eine ähnliche Struktur, beide konkurrieren um eine Bindung am aktiven Zentrum. Der gebundene kompetitive Inhibitor verringert die Katalysegeschwindigkeit, da er den Anteil an freiem Enzym erniedrigt. Die kompetitive Hemmung kann durch eine Erhöhung der Substratkonzentration aufgehoben werden.

Modulatoren können sich an andere Bindungsstellen am Enzym anlagern und dessen Konformation verändern. Das aktive Zentrum ist dabei nicht blockiert, enzymkatalysierte

Reaktionen können weiterhin ablaufen. Wegen der veränderten Struktur des aktiven Zentrums können jedoch Veränderungen in den Reaktionsgeschwindigkeiten auftreten. Steigt die Geschwindigkeit mit der Modulatorkonzentration, liegt eine Enzymaktivierung vor, ein Beispiel sind Ca^{2+} -Metallionen für Trypsin. Sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Modulatorzugabe, liegt eine nicht-kompetitive Hemmung vor, dabei wird die Wechselzahl eines Enzyms (K_{cat} , maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung) erniedrigt. Bei der unkompetitiven Hemmung bindet der Hemmstoff an den Enzym-Substrat-Komplex, dabei wird die Inhibitor-Bindungsstelle erst in Wechselwirkung mit dem Substrat gebildet. Weiterhin können Mischformen in der Enzymhemmung auftreten, hierbei wirkt der Inhibitor sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv.

Um zu bestimmen ob und welche Hemmung vorliegt, wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Substrat- und Inhibitorkonzentration gemessen und in einer doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk dargestellt.

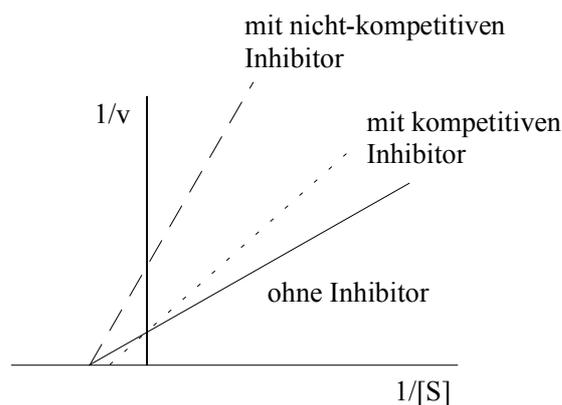


Abb. 3.3: Unterscheidung zwischen verschiedenen Hemmtypen bei der Auftragung nach Lineweaver Burk

Bei der kompetitiven Hemmung bleibt v_{max} unverändert, die Michaelis-Menten-Konstante K_M steigt an. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bleibt K_M unverändert, v_{max} wird jedoch verringert. Weitere Auftragungen zur Untersuchung von Inhibitoraktivitäten finden sich in Bisswanger [2000].

3.3 Enzymimmobilisierung

Enzyme lassen sich immobilisieren, indem sie in ihrer gelösten Form in einen definierten Raum eingeschlossen werden oder indem sie auf Trägermaterialien fixiert werden, so daß sie in einer unlöslichen Form vorliegen. Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die Prinzipien der Immobilisierung von Enzymen:

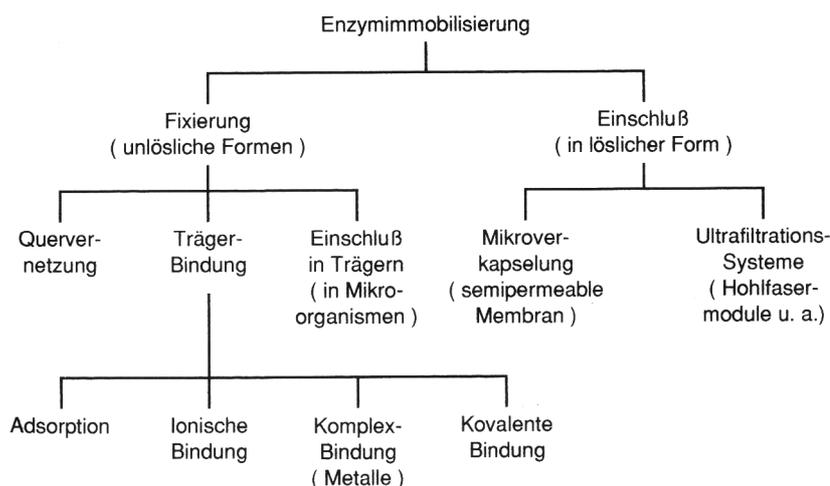


Abb. 3.4: Prinzipien der Enzymimmobilisierung [Buchholz und Kasche; 1997]

Gerade für wirtschaftlich-technische Anwendungen sind immobilisierte Enzyme interessant, sie besitzen eine erhöhte Langzeitstabilität, lassen sich leichter aus dem Reaktionsgemisch abtrennen, durch ihre Wiederverwendbarkeit reduzieren sich die Kosten für die Biokatalysatoren und sie können in kontinuierlichen Verfahren eingesetzt werden. Dem gegenüber steht jedoch die Gefahr der Inaktivierung der Biokatalysatoren, außerdem ist eine Immobilisierung von Enzymen kostenintensiv [Adlercreutz; 1992]. Einen Überblick über die verschiedenen Immobilisierungsmethoden gibt Hartmeier [1986], spezielle Darstellungsmethoden zur Immobilisierung von der Esterase PLE finden sich in Sousa *et al.* [2001], Pietzsch *et al.* [1999] und Jungen *et al.* [1999]. Die Immobilisierung von α -Chymotrypsin wird unter anderem in Barros *et al.* [1999], Diego *et al.* [1998] und Freeman *et al.* [1998] beschrieben.

3.4 Modelle des aktiven Zentrums

Die Kenntnis über die räumliche Struktur des aktiven Zentrums eines Enzyms ist nützlich, wenn man Aussagen treffen möchte, inwieweit ein bestimmtes Substrat vom Biokatalysator umgesetzt wird. Eine einfache Möglichkeit ein Bild des aktiven Zentrums zu bekommen, besteht darin verschiedene Substrat-Analoga zu synthetisieren und durch das Enzym umsetzen zu lassen. Systematisch werden dabei Verbindungen untersucht, die sich durch das Hinzufügen oder Abtrennen einzelner Strukturteile, teilweise mit unterschiedlichem Raumbedarf, veränderter Polarität und Fähigkeit zu Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, unterscheiden. Dadurch ergibt sich ein Negativabdruck der enzymatischen Bindungsregion, aus der weiter Rückschlüsse auf die räumliche Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms gezogen werden können.

Für die Schweineleberesterase PLE wurde ein dreidimensionales Modell des aktiven Zentrums von Toone *et al.* [1990] entwickelt, dabei besteht das aktive Zentrum aus Regionen mit verschiedenen Taschen, in die Substrate mit ihren unterschiedlich polaren Substituenten fixiert werden können (Abb. 3.5). Unterschieden wird dabei zwischen zwei hydrophoben Bereichen, der großen Tasche H_L und einer kleinen Tasche H_S . An der Vorderseite des Modells findet sich außerdem eine polare Region P_F , auf der Rückseite die Bindungsstelle P_B . Die Region über dem Modell ist offen und zugänglich für alle weiteren Substratsubstituenten.

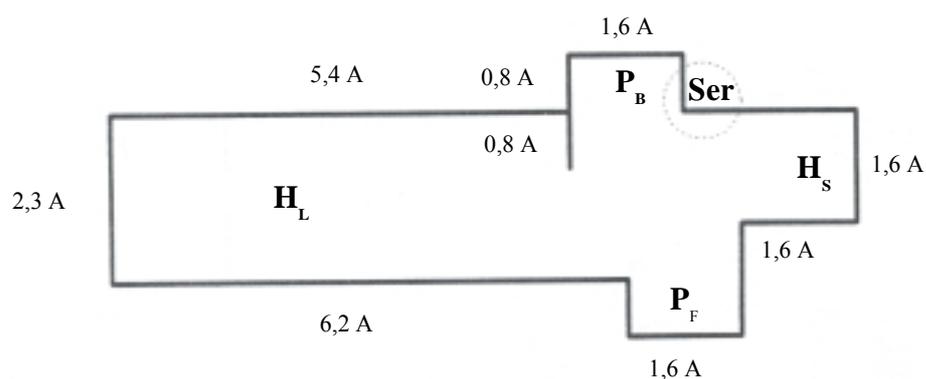


Abb. 3.5: Modell des aktiven Zentrums von PLE [Toone *et al.*; 1991]

Unter Anwendung dieses Modells läßt sich vorhersagen, welches Enantiomer eines chiralen Esters bevorzugt umgesetzt wird, 1991 erweiterten Toone *et al.* [1991] die Dimensionen der großen hydrophoben Bindungsregion H_L . Anwendungen des Modells finden sich u.a. bei Moravcova *et al.* [2000], Kielbasinski [2000] und Breznik *et al.* [1997].

Für die Protease α -Chymotrypsin wurde ein Modell des aktiven Zentrums von Kim [1993] vorgestellt. In diesem wird zwischen einer Bindungsstelle für Wasserstoff, einer hydrophoben Tasche, einer schmalen Einbuchtung mit geringem Volumen und einer katalytischen Tasche unterschieden. Die hydrophobe Tasche befindet sich dabei in Inneren des Enzyms, die anderen Bindungsstellen sind an der Oberfläche angeordnet. Abbildung 3.6 zeigt das Modell für das aktive Zentrum von α -Chymotrypsin:

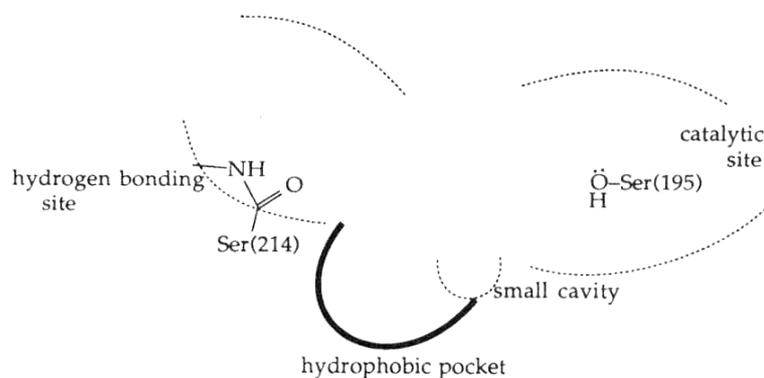


Abb. 3.6: Modell des aktiven Zentrums von α -Chymotrypsin [Kim; 1993]

Anhand des Modells wurden von Kim [1999] auf Basis der Substratspezifität Inhibitoren für α -Chymotrypsin synthetisiert.

3.5. Enzymatische Reaktionen in unkonventionellen Lösemitteln

3.5.1 Mögliche Lösemittelsysteme für Stoffumwandlungen

Der Einsatz von Enzymen in nicht-wässrigen Lösemitteln ist in den letzten Jahren verstärkt untersucht worden, die Anzahl der Publikationen auf diesem Gebiet ist nur schwer zu überschauen. Ausgewählte Beispiele finden sich bei Laane [1987], Laane *et al.* [1987], Mozhaev [1998] und Castro [1999]. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über mögliche Systeme, in denen enzymatische Umsetzungen durchgeführt werden können:

Tab. 3.2: Mögliche Systeme für enzymatische Reaktionen [Buchholz und Kasche; 1997]

Zwei-Phasen-Systeme			Ein-Phasen-Systeme		
Lösemittel nicht mischbar mit Wasser/Puffer	Micellen in organischen Lösemitteln	Enzym mit Wasser in organischen Lösemitteln	Enzym an hydrophober Oberfläche adsorbiert	Puffer gesättigt mit organischem Lösemittel	Puffer mit Lösemittel mischbar mit Wasser

Adlercreutz *et al.* [1987] geben eine weiterführende Übersicht über mögliche Lösemittelsysteme für enzymkatalysierte Reaktionen. Auch überkritische Gase, wie CO₂, sind interessante Lösemittel, die in den letzten Jahren für biokatalysierte Umsetzungen verstärkt genutzt wurden [Hartmann *et al.*; 1999]. Außerdem werden immer häufiger auch ionische Flüssigkeiten als Reaktionsmedium für enzymatische Umsetzungen eingesetzt [Schöfer *et al.*; 2001], [Wasserscheid *et al.*; 2000]

Nicht-wässrige Lösemittel können enzymkatalysierte Prozesse direkt und indirekt beeinflussen. Die direkten Beeinflussungen erfolgen über Wechselwirkungen von Lösemittelmolekülen mit der Enzymoberfläche, solche Bindungen können zu Strukturveränderungen im aktiven Zentrum des Biokatalysators führen. Das gleiche Lösemittel kann bei verschiedenen Enzymen unterschiedliche Veränderungen in den Bindungsstellen hervorrufen. Indirekt beeinflussen nicht-wässrige Lösemittel die Endpunkte von enzymkatalysierten Reaktionen, sowie auch die Verteilungsgleichgewichte der Substrate und Produkte in dem ausgewählten Zwei-Phasen-System.

3.5.2 Einfluß des Wassergehalts im Gesamtsystem auf enzymkatalysierte Umsetzungen

Damit enzymatische Umsetzungen in nicht-wässrigen Lösemitteln durchgeführt werden können, ist eine bestimmte Menge am Enzym gebundenes Wasser erforderlich, auch für Hydrolysen ist Wasser als Substrat nötig. Abbildung 3.7 zeigt die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion als Funktion des Wassergehaltes bei gleichbleibender Enzymmenge:

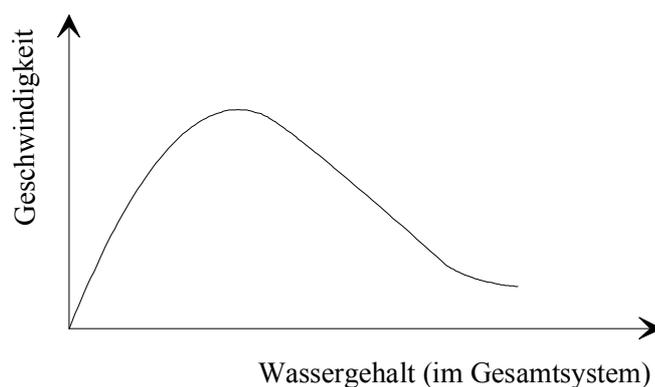


Abb. 3.7: Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit enzymkatalysierter Umsetzungen vom Wassergehalt im Gesamtsystem [Buchholz und Kasche; 1997]

Die Reaktionsgeschwindigkeit durchläuft mit steigendem Wassergehalt im Gesamtsystem ein Maximum. Das Enzym, welches in einem nicht-wässrigen Lösemittel eingesetzt wird, ist von einer Hülle aus Wassermolekülen umgeben, die durch Wasserstoffbrückenbindungen an die Oberfläche des Biokatalysators gebunden sind. Diese Hülle ist für die Aufrechterhaltung der Proteinstruktur nötig und somit essentiell für die Enzymaktivität [Mozhaev; 1998], [Laane; 1987]. Bei geringem Wassergehalt konkurrieren das Enzym und das Lösemittel um das in der organischen Phase gelöste Wasser, hydrophile Lösemittel können dabei dem Enzym die essentiellen Wassermoleküle entziehen. Mit steigendem Wassergehalt nimmt die Enzymaktivität zu, bis genügend Wasser gebunden ist. Steigt der Wassergehalt weiter, bildet sich in dem Lösemittel eine zweite wässrige Phase, in der das Enzym gelöst vorliegt, der Biokatalysator wird verdünnt. Somit sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit. Weiterhin wird der Stofftransport durch die Ausbildung der zweiten Phase limitiert. Die zur Aufrechterhaltung der Aktivität nötige Wassermenge muß für das jeweilige Lösemittelsystem ermittelt werden. Aussagen über die Verteilung des Wassers im System zwischen dem Lösemittel, dem Enzym und dem evtl. Trägermaterial können über die Wasseraktivität a_w getroffen werden. Im

Gleichgewicht ist die Wasseraktivität in allen Phasen gleich groß, dadurch wird eine bestimmte Hydratisierungsstufe des Enzyms erreicht, die unabhängig vom Lösemittel ist [Adlercreutz; 1992]. Die Wasseraktivität ist definiert als das Verhältnis der Fugazitäten von Wasser in einer Mischung zu der von reinem Wasser. Unter Annahme idealen Verhaltens können die Fugazitäten durch die jeweiligen Dampfdrücke über dem System und über reinem Wasser ersetzt werden. Die relative Feuchte in der Gasphase über einem Lösemittelsystem, ausgedrückt durch den Quotienten der Dampfdrücke im Gleichgewicht, entspricht somit der Wasseraktivität a_w [Kahn *et al.*; 1990]. Sjursnes *et al.* [1992] kontrollierten die Wasseraktivität durch den Einsatz von Salzen mit unterschiedlichen Hydratwassergehalt, die Messung der Wasseraktivität kann durch Feuchtesensoren erfolgen. Turner *et al.* [2000] zeigten für verschiedene Biokatalysatoren, daß eine niedrige Wasseraktivität mit einer hohen Temperaturstabilität der Proteine korreliert, α -Chymotrypsin denaturierte z.B. in einem trockenen Lösemittelsystem mit $a_w = 0,33$ somit erst bei 111°C , in Wasser jedoch bereits bei 53°C . Wahrscheinlich kommt es bei höheren Wasserkonzentrationen im System zu wasserinduzierten Denaturierungen.

3.5.3 Enzymatische Reaktionen in organischen Lösemitteln

Der Einsatz von Enzymen für Synthesen in organischen Lösemitteln mit geringem Wassergehalt ist in den letzten zehn Jahren verstärkt genutzt worden, die wichtigsten Einflußgrößen sind dabei die Auswahl des Lösemittels, der Wassergehalt und die Temperatur. Laane *et al.* [1987] schlugen zur Charakterisierung von unterschiedlichen Lösemitteln den Verteilungskoeffizienten P eines Lösemittels im Oktanol/Wasser Gemisch vor. Untersuchungen zeigten, daß mit ansteigendem Verteilungskoeffizienten, ausgedrückt in der logarithmierten Form $\log P$, die biokatalytische Aktivität zunimmt. Folgende Einteilungen wurden dabei vorgenommen:

- Lösemittel mit einem $\log P < 2$ inaktivieren die eingesetzten Biokatalysatoren
- Lösemittel mit einem $\log P$ zwischen 2 und 4 beeinflussen die katalytische Aktivität, jedoch läßt sich keine genaue Aussage über das Ausmaß treffen
- In Lösemitteln mit einem $\log P > 4$ bleibt die katalytische Aktivität erhalten

Eine Einteilung von verschiedenen Lösemitteln nach log P-Werten findet sich in Laane *et al.* [1987], die Anwendung dieser Werte sind vielfach in der Literatur beschrieben, unter anderem in Levitsky *et al.* [2000], Ross *et al.* [2000] und Castro [1999]. Nakaya *et al.* [2001] untersuchten den log P von überkritischen Kohlendioxid, dieser steigt von 0,9 bei 3 MPa auf 2,0 bei 11 MPa. Jedoch sind auch Abweichungen der Aktivität von Biokatalysatoren und den log P-Werten der Lösemittel beschrieben worden [Narayan *et al.*; 1993], so fanden z. B. Laslo *et al.* [1998] keine Korrelation zwischen dem log P und dem Umsatz bei der durch α -Chymotrypsin katalysierten Synthese von N-acetyl-L-tyrosinmethylester. Als weitere Kenngrößen werden die Dielektrizitätskonstante und das Dipolmoment des Lösemittels zur Erklärung der experimentellen Befunde genannt [Fitzpatrick; 1991], [Narayan *et al.*; 1993]. Durch den Zusatz von Additiven zu organischen Lösemittelsystemen läßt sich die katalytische Aktivität erhöhen, Van Unen *et al.* [1998] lyophilisierten α -Chymotrypsin in Gegenwart von Kronenethern, wobei durch die Zugabe von 18-Krone-6 die enzymatische Aktivität bei der Dipeptidbildung in Acetonitril um das 450fache gesteigert wurde. Diese Steigerung erklären die Autoren durch die Komplexierung von Ammoniumgruppen der Lysinreste auf der Enzymoberfläche durch den Kronenether, eine Ausbildung intramolekularer Salzbrücken mit anionischen Rückständen vom Enzym wird verhindert. Diese Salzbrücken würden Veränderungen in der Struktur des Biokatalysators hervorrufen und somit die Aktivität herabsetzen. In Tabelle 3 sind Vor- und Nachteile enzymatischer Umsetzungen in organischen Lösemitteln aufgeführt:

Tab 3.3: Vor-/Nachteile enzymatischer Umsetzungen in organischen Lösemitteln [Bornscheuer; 1993]

Vorteile

- Gesteigerte Löslichkeit unpolarer Substanzen
 - Verschiebung des Gleichgewichts
 - Häufig keine Immobilisierung nötig
 - Einfachere Wiedergewinnung des Katalysators
 - Einfachere Produktgewinnung
 - Einfache Handhabung
 - Steigerung der Temperaturstabilität der Enzyme
 - Änderungen in der Substratspezifität des Biokatalysators
-

Nachteile

- Häufig geringe Aktivitäten des Katalysators, lange Reaktionszeiten
- Nicht alle Enzyme eignen sich zum Einsatz in organischen Lösemitteln
- Optimierung häufig notwendig
- Änderungen in der Substratspezifität des Biokatalysators

3.6 Analytik

3.6.1 Analytik zur Erfassung von Enantiomeren

In dieser Arbeit werden pseudo-enantiomere Substrate enzymatisch umgesetzt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der on-line Erfassung der gebildeten Produkte, so daß je nach eingesetzten Enzym bis zu vier Verbindungen zu analysieren sind; (Abb. 3.8).

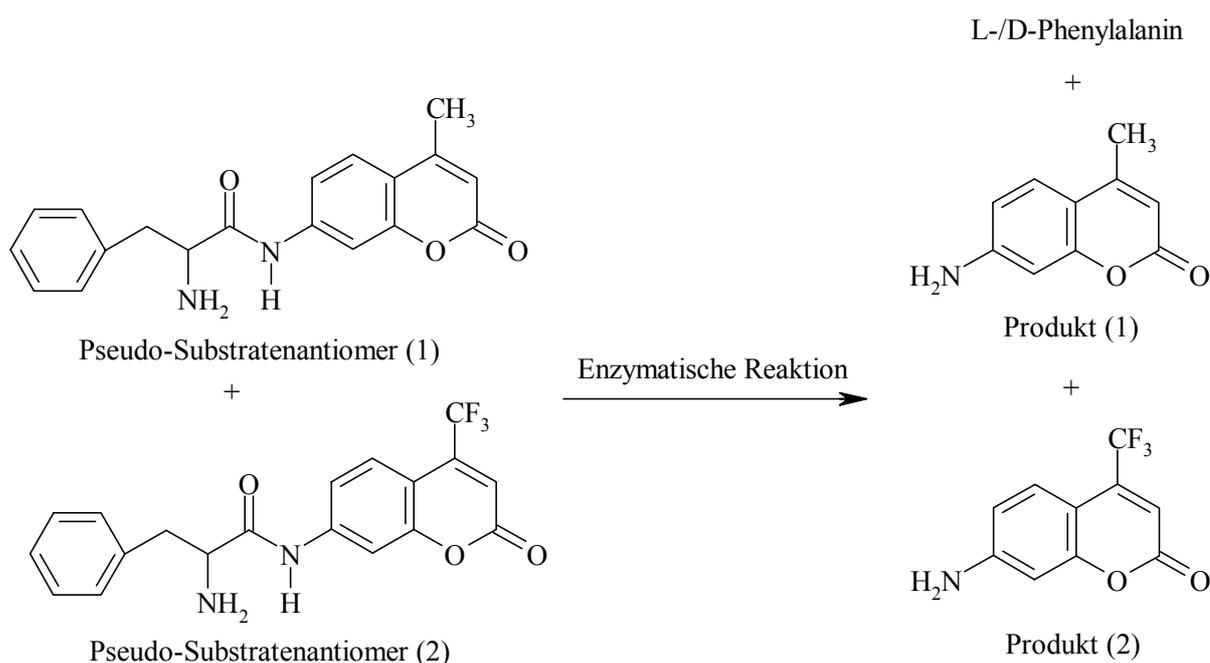


Abb. 3.8: Die vier zu erfassenden Verbindungen

Das bei der Umsetzung entstehende Aminosäurengemisch aus L-/D-Phenylalanin ist für die on-line Erfassung / Analytik uninteressant. Als charakteristische Größen für die Enantiomerenbestimmung dienen die Enantioselektivität E der enzymatischen Umsetzung, die Enantiomerenüberschüsse ee (enantiomeric excess) und der Umsatz U . Die Formeln für die Berechnungen dieser Größen finden sich im Anhang (Kap.). Zur vergleichenden Analytik

wird die Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) eingesetzt, um E, U und ee zu bestimmen. Hierbei handelt es sich um ein off-line Analyseverfahren, d. h. eine direkt zeitliche Erfassung der Reaktion ist nicht möglich. Aus diesem Grund wird die 2D-Fluoreszenzspektroskopie als Verfahren zur on-line Bestimmung etabliert. Die beiden genannten Methoden werden im Folgenden kurz beschrieben.

3.6.2 Verfahren zur on-line Analytik: Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz bedeutet die spontane, ungerichtete Emission von Licht, die nur so lange auftritt wie die fluoreszierenden Moleküle durch Lichtabsorption in höhere elektronische Zustände angeregt werden [Wedler; 1987]. Die verschiedenen fluoreszierenden Moleküle (Fluorophore) unterscheiden sich in der Lage ihrer Fluoreszenzmaxima im Spektrum (Anregungs- und Emissionswellenlänge) und ihrer Quantenausbeute, welche das Verhältnis aus Anzahl emittierter Photonen zur Anzahl absorbierter Photonen darstellt. Diese für jedes Fluorophor charakteristischen Größen gelten jedoch nur unter definierten chemischen und physikalischen Bedingungen, die Einflüsse auf diese Größen sind komplex. Neben der Temperatur oder dem pH-Wert können auch das Lösemittel oder der sogenannte „Inner-Filter-Effekt“ (Reflexions- und Absorptionserscheinungen bei getrübbten Lösungen) diese Größen verändern, was sich in einer möglichen veränderten Lage des Fluoreszenzmaximums und der Intensität wieder spiegeln kann.

Bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erstreckt sich die Messung über einen großen Excitations- und Emissionsbereich. Verschiedene Fluorophore lassen sich mit Hilfe dieser Technologie nebeneinander detektieren, wodurch z.B. bei Kultivierungen in wäßrigen Medien eine Vielzahl an Informationen über den Kultivierungsverlauf erhalten werden [Marose; 1995]. Weitere Anwendungsgebiete der 2D-Fluoreszenz finden sich u. a. in der Medizin [Wolfbeis *et al.*; 1985], in der Mikrobiologie [Pau *et al.*; 1988] und bei Untersuchungen zur Proteinfaltung [Lindemann; 1998]. Für biotechnologische Anwendungen wird in einem Wellenlängenbereich von ca. 250 nm bis 600 nm gemessen, da in dieser Region eine Vielzahl von relevanten Fluorophoren detektiert werden können. Die Darstellung der 2D-Spektren erfolgt als topographische Karte, die Bereiche mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität werden durch verschiedene Farben dargestellt.

3.6.3 Verfahren zur off-line Analytik: Chromatographische Methoden zur Enantiomerenbestimmung

Neben der Chromatographie eignen sich die Polarimetrie, die differentielle Mikrokalorimetrie, NMR-Spektroskopie und die Kapillarelektrophorese zur Enantiomerenanalytik. Die Vorteile der Chromatographie liegen in der sehr hohen Empfindlichkeit, der kurzen Analysedauer und ihrer hohen Reproduzierbarkeit trotz kleiner Probemengen.

Die Trennung eines Stoffgemisches beruht bei der Chromatographie auf der unterschiedlichen Verteilung von Substanzen innerhalb zweier Phasen. Eine mobile Phase wird an einer stationären Phase vorbeigeführt, dabei findet ein Stoffaustausch zwischen den Phasen statt. Wird eine Probe aufgebracht, so wandert diese in der mobilen Phase mit, Ad- und Desorptionsprozesse führen zu einem ständigen Aufenthaltswechsel der Probenmoleküle zwischen beiden Phasen. Der Verteilungskoeffizient zwischen beiden Phasen bestimmt dabei die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle. Eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten sowohl der mobilen Phase als auch des Trägermaterials zeichnet die chromatographischen Methoden aus.

Die High Performance Liquid Chromatography

Bei der HPLC wird die Probe unter hohem Druck in einen kontinuierlichen Strom der mobilen Phase injiziert. Neben wäßrigen Puffermedien werden häufig organische Lösemittel wie Acetonitril oder Methanol als mobile Phasen verwendet, die Trennung erfolgt in kurzen, dicht gepackten Säulen. Die Trennleistung ist abhängig von der Zusammensetzung und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und vom verwendeten Trägermaterial. Oftmals werden Lösemittelgradienten eingesetzt um die Trennung der einzelnen Stoffe zu beeinflussen, mit der Änderung der mobilen Phase erfolgt gleichzeitig eine Änderung der Verteilungskoeffizienten zwischen dem Analyt, dem Trägermaterial und der mobilen Phase. Die Detektion erfolgt in der Regel mittels UV-, Brechungsindex- oder Fluoreszenzdetektoren. Eine Übersicht über verschiedene HPLC-Techniken finden sich in Meyer [1992].

3.7 Gegenstand der Chemometrik

Die Chemometrik ist ein relativ junges Wissenschaftsgebiet, das Ende der sechziger-, Anfang der siebziger Jahre begründet wurde und sich bald als eigenständiges Arbeitsfeld etablierte. Mit dem Fortschritt der Mess- und Gerätetechnik, der Laborautomation und der Einführung von Rechentechniken in chemische Laboratorien gingen Bemühungen einher, moderne Prinzipien der Mathematik, der Messtheorie und der Informationstheorie für die Chemie zu erschließen und einzusetzen. Dabei sollte die Effizienz chemischer Messungen, insbesondere auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik verbessert werden.

Heute ist die Chemometrik eine chemische Teildisziplin, die mathematische und statistische Methoden nutzt, um chemische Verfahren und Experimente optimal zu planen, durchzuführen und auszuwerten, um so ein Maximum an chemisch relevanten Informationen aus den experimentellen Messdaten zu gewinnen [Hitzmann *et al.*; 1998]. Eine ausführliche Übersicht zu den Grundlagen und Anwendungen der Chemometrik findet sich in Danzer *et al.* [2001].

3.7.1 Multivariate Datenanalyse

Charakteristisch für heutige Probleme, u. a. in der Syntheseplanung oder der Analytischen Chemie, ist, daß zahlreiche Einflußgrößen in die Betrachtung einzubeziehen sind. Viele reaktionsspezifische Variablen wirken nicht unabhängig voneinander und müssen dementsprechend in ihren gegenseitigen Zusammenhängen und Abhängigkeiten modelliert und ausgewertet werden. Auch liefern analytische Messungen zunehmend größere Datenmengen, aus denen das komplexe Zusammenwirken von meist mehreren Einflußgrößen herausgearbeitet werden muß. Die Anwendung von multivariaten Methoden der Statistik und der Datenanalyse ist deshalb zu einem wichtigen Bestandteil der Chemometrik geworden, diese berücksichtigen in der Berechnung und Darstellung simultan eine große Anzahl von Variablen [Hitzmann *et al.*; 1998]. Einige dieser Verfahren sind: Faktorenanalyse und Hauptkomponentenanalyse, Korrespondenzanalyse, Diskriminanzanalyse und Clusteranalyse. Den Kern der multivariaten Datenanalyse bildet die multilineare Regression (MLR). Im Gegensatz zur linearen Regression wird bei der MLR der vorherzusagende Wert einer Prozeßgröße y (hier: Konzentration) aus mehreren gemessenen Größen x (hier Fluoreszenzspektren) berechnet. Wird die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Analytik eingesetzt, berechnet die MLR unter Verwendung der Hauptkomponentenanalyse den

Zusammenhang zwischen off-line gemessenen Prozeßgrößen und den on-line bestimmten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI).

3.7.2 Die Hauptkomponentenanalyse

In der Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis) werden die Meßwerte in ein neues Koordinatensystem von geringerer Dimension transformiert. Dabei findet auch eine massive Reduzierung der Datenmenge statt, die ursprüngliche Informationen der Variablen bleiben jedoch weitgehend erhalten. Zur Berechnung der Hauptkomponenten, welche die Informationen aus den Meßdaten beinhalten, werden dabei Algorithmen (z. B. NIPALS) verwendet. Die Hauptkomponenten werden hierbei sukzessiv durch Beschreibung der maximal möglichen Varianz berechnet. Im Anschluß läßt sich mit den Hauptkomponenten durch die multilineare Regression eine Vorhersage der Prozeßgrößen ableiten. Dabei ist auch die Anzahl der bestimmten Hauptkomponenten entscheidend, wird eine zu geringe Anzahl verwendet, ist die Vorhersage mit einem großen Fehler behaftet. Mit steigender Hauptkomponentenzahl steigt der Fehler der Vorhersage erneut an, eine Bestimmung der Anzahl signifikanter Hauptkomponenten ist Voraussetzung für eine optimale Vorhersage der Prozeßgrößen. Mit den Hauptkomponenten wird im Anschluß eine Partial-Least-Squares Regression (PLS) durchgeführt, hierbei wird die Korrelation zwischen den Meßwerten maximiert, es ergeben sich für komplexe Zusammenhänge bessere Modelle.

3.7.3 Die Sensitivitätsanalyse

Bei der Sensitivitätsanalyse wird zunächst eine Vorhersage der Prozeßgröße berechnet. Anschließend wird jeweils ein Meßwert variiert und eine erneute Vorhersage durchgeführt. Dabei kann der Wert um einen prozentualen Faktor oder um einen absoluten Wert variiert werden. Diese Variation wird für alle Meßpunkte durchgeführt. Bei einem für die Berechnung der Prozeßgröße relevanten Meßpunkt wird die Variation eine erheblich größere Änderung der Vorhersage hervorrufen als bei einem nicht relevanten Meßpunkt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgen in diesem Fall als Sensitivitätsspektren mit Höhenlinien, in der die Änderungen der Prozeßgröße wieder den Emission- und Exzitationswellenlängen zugeordnet werden [Kollecker; 1999].

4. Material und Methoden

4.1 Die Fluoreszenzspektroskopie zur Prozeßbeobachtung

Für alle Messungen wird das kommerziell erhältliche Spektrophotometer Hitachi F-4500 für den Einsatz mit einem Lichtleiter umgerüstet [Hilmer; 1995]. Als Verbindung zwischen dem Reaktor und dem Fluoreszenz-Spektrophotometer dient ein flexibler Lichtleiter (Firma Lumatec). Hierbei handelt es sich um einen Flüssiglichtleiter von zwei Meter Länge, welcher mit dem F-4500 über ein speziell angefertigten Adapter (Werkstatt TCI, Hannover) verbunden ist.

Die 150 Watt Xenonlampe des Spektrophotometers liefert ein nahezu kontinuierliches Spektrum. Das ausgestrahlte Licht gelangt in den Exzitationsmonochromator, durch den die Wellenlänge und die Bandbreite („Slit“) eingestellt werden. Durch einen Strahlenteiler wird das Licht einmal auf den Referenzphotomultiplier gelenkt, der dazu dient, die Intensitätsschwankungen der Lichtquelle zu kompensieren. Der andere Teil des Lichts gelangt durch den Lichtleiter zum Reaktor, wobei ein Verschuß am Zugang des Lichtleiters eine ständige Bestrahlung der Probe zwischen den Messungen verhindert. Das den Reaktor verlassende Fluoreszenzlicht passiert den Emissionsmonochromator, der nur eine bestimmte Wellenlänge und Bandbreite des Lichtstrahls durchläßt, und trifft anschließend auf den Photomultiplier.

Alle Fluoreszenzspektren werden bei den folgenden Geräteeinstellungen gemessen:

- Scan-Geschwindigkeit : 30000 nm/sec
- Schrittweite der Exzitationswellenlänge : 5 nm
- Schrittweite der Emissionswellenlänge : 10 nm
- Exzitations-Slit : 10 nm
- Emissions-Slit : 20 nm
- Photomultiplierspannung : 700 Volt

Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanlage, die Konfiguration des Spektrometers, die Datenaufnahme und die Datensicherung werden mit Hilfe eines Computers durchgeführt.

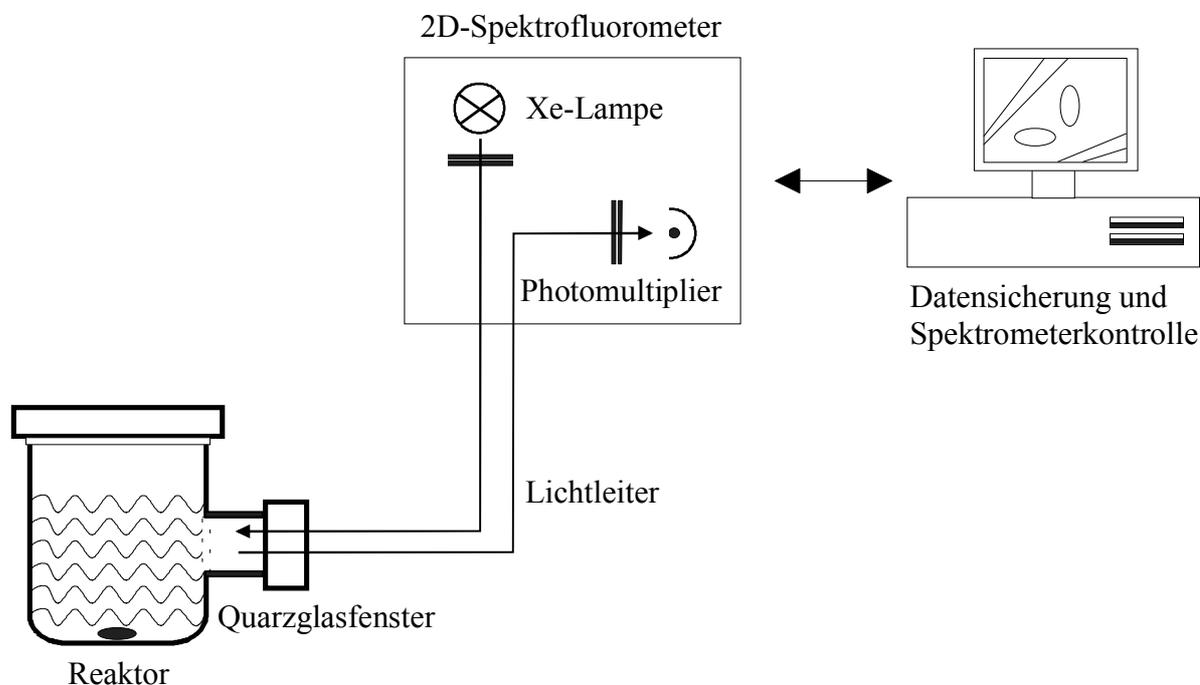


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage

4.2 Der Reaktor mit Lichtleiteraufsatz

Für die Fluoreszenzmessungen in wässrigem und organischem Medium wird ein Edelstahlzylinder mit einem Volumen von 15 ml verwendet. Etwa 2 cm über dem Boden befindet sich eine Bohrung, in die der Lichtleiter eingeführt werden kann, so daß ein Lichteindringen von außen nicht möglich ist. Den Lichtdurchgang ermöglicht eine Quarzglasscheibe. Der Reaktor wird mit einem Deckel verschlossen. Um bei den Messungen Reflexionen mit den metallischen Wänden zu vermeiden, wird eine schwarze Teflonmanschette im Reaktor befestigt [Knüttel; 1999].

4.3 Verwendete Substrate

Folgende Coumarinverbindungen werden in dieser Arbeit als Modellssubstrate eingesetzt:

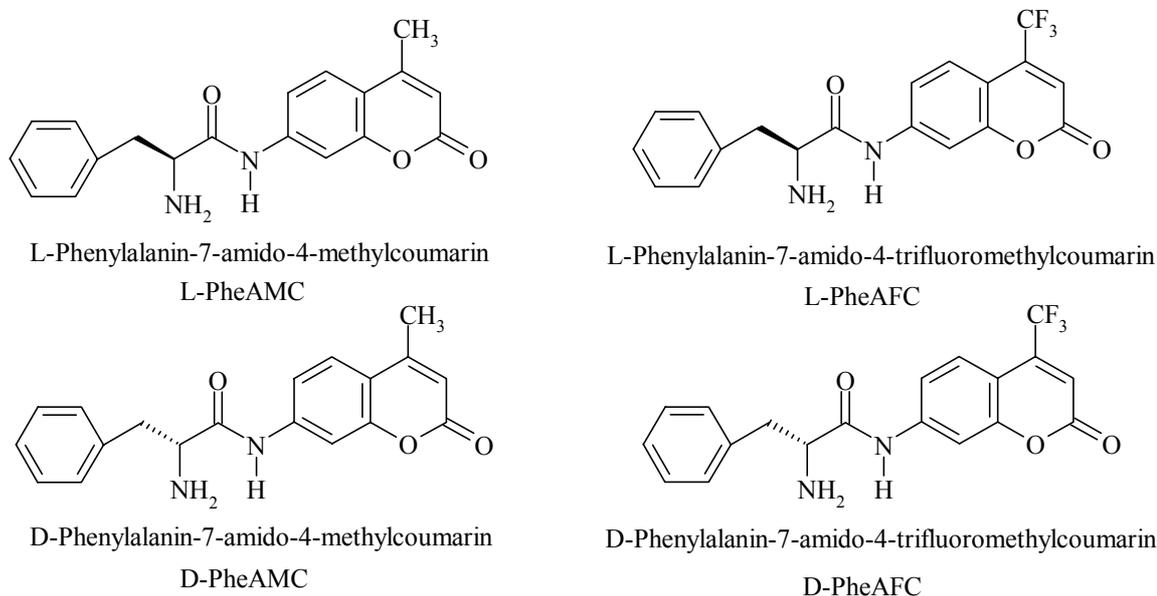


Abb. 4.2: Die eingesetzten Modellssubstrate

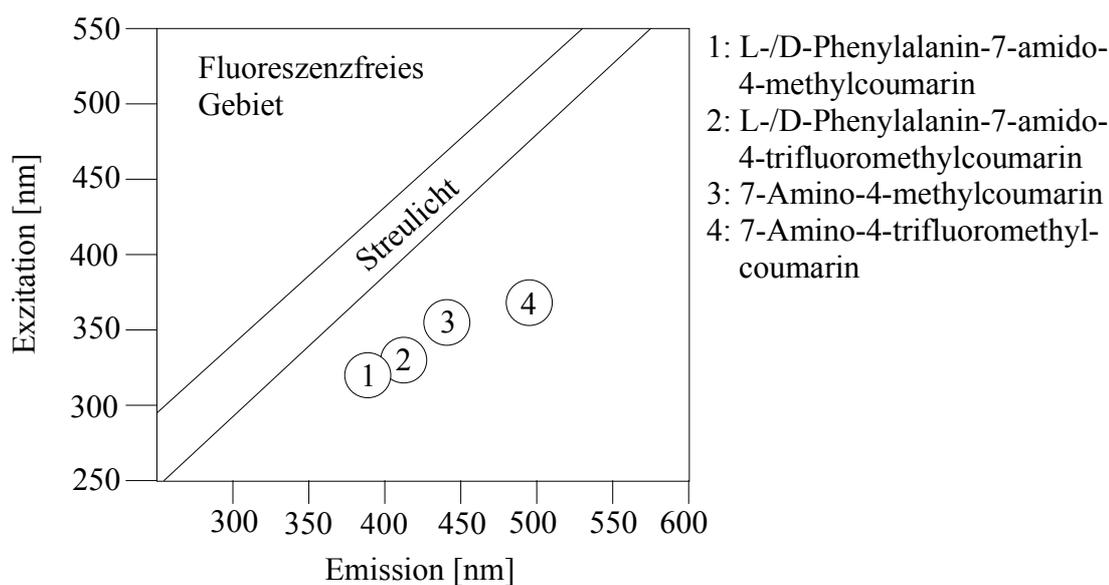
Aufgrund der Länge der Substratnamen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Abkürzungen bevorzugt verwendet. Bis auf L-PheAMC wurden alle Substrate von Herrn Prof. H. H. Meyer (Institut für Organische Chemie, Universität Hannover) zur Verfügung gestellt.

Bei der enzymatischen Umsetzung der Coumarinsubstrate im wässrigen System und in organischen Lösemitteln wird die Exzitation im Wellenlängenbereich von 280 nm bis 450 nm und die Emission von 300 nm bis 600 nm vermessen. Es werden die oben abgebildeten Substrate sowie die bei der Reaktion frei werdenden Produkte 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) und 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) fluoreszenzspektroskopisch erfasst.

Eine Übersicht über die Fluorophore gibt Tabelle 4.1, die Lage ihrer Fluoreszenzmaxima im 2D-Spektrum im wässrigen System ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

Tab. 4.1: Verwendete Fluorophore

Fluorophore	Ex.- / Em.-Maximum
L-/D-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin (L-PheAMC)	325 / 390 nm
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	340 / 440 nm
L-/D-Phenylalanin-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (D-PheAFC)	335 / 430 nm
7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC)	365 / 490 nm

**Abb. 4.3:** Die Lage der Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate und -produkte im 2D-Spektrum im wässrigen System

4.3.1 Vorkommen, Bedeutung und Einsatz von Coumarin-Derivaten

1922 wurde erstmals über ein Viehsterben in Nordamerika berichtet, das durch starke Blutungen der Tiere verursacht worden war. Die Suche nach der Ursache führte zur Isolierung eines gerinnungshemmenden Stoffes aus faulendem Süßklee, Dicoumarol (Bishydroxycoumarin), einem Abbauprodukt des Coumarins. Coumarin ist in vielen Pflanzen als Glykosid enthalten, nach der Mahd wird dieses enzymatisch gespalten und Coumarin entweicht als Duftstoff. Stoffe des Coumarin-Typs verdrängen aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit Vitamin K, welches für die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X in der Leber wichtig ist [Forth *et al.*; 1996], in der Medizin werden sie deshalb als indirekte Antikoagulantien eingesetzt (volle Wirkung erst 36 – 48 Std. nach Verabreichung). Einige

therapeutisch wichtige Coumarin-Derivate sind: Phenprocoumarol (Marcumar[®]), Warfarin-Natrium (Coumadin[®]) und Acenocoumarol (Sintrom[®]). Antikoagulantien vom Coumarin-Typ werden auch zur Vertilgung von Ratten und Mäusen eingesetzt, ihr Vorteil liegt darin, daß die ausgebrachten Dosen für Erwachsene, Kinder und Haustiere in der Regel unbedenklich sind. Aufgrund ihrer natürlichen Fluoreszenz werden Coumarin-Derivate häufig in analytischen Anwendungen eingesetzt. U. a. wird zum Labeln von verschiedenen Proteinen 7-Amino-4-methylcoumarin-Essigsäure (AMCA) verwendet, unter milden Bedingungen wird es dabei mit Lysinresten auf der Proteinoberfläche verknüpft. Khalfan *et al.* [1986] setzten AMCA zum Labeln von Antikörpern ein. Mit Hilfe von verschiedenen Coumarin-Derivaten wurden Studien über Konformationsänderungen bei Proteinen durchgeführt [Forster *et al.*; 1993]. Eine sehr sensitive Methode zur Enzymerkennung basiert auf der Freisetzung fluoreszierender Produkte aus fluoreszierenden Reaktanten, Zimmerman *et al.* [1976] setzten Peptid-AMC Substrate (AMC = 7-Amino-4-methylcoumarin) zur Detektion von α -Chymotrypsin ein. Mit Hilfe dieser Coumarinderivate konnte die Protease bis zu einer Menge von 25 ng fluoreszenzspektroskopisch erfaßt werden. Auch zur Erfassung von verschiedenen fekalen Coliformen in Trink- und Grundwasser wurden AMC-Derivate benutzt [Park; 1995]. AFC-Peptid-Substrate (AFC = 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin) wurden zur Untersuchung von Proteinase-Aktivitäten in Gewebezellen eingesetzt [Gossrau; 1983] und u.a. zur Detektion von Cathepsin B, L und H (lysosomale Enzyme, die zur Gruppe der Cystein-Proteinasen gehören) verwendet [Tchoupe; 1991]. Weiterhin wurden Coumarin-Derivate als pH-Indikatoren eingesetzt [Dement; 1995], als Metalldetektoren verwendet [Bhat *et al.*; 1960], [Jain *et al.*; 1963] und mit Hilfe der *in situ* Fluorometrie zur Charakterisierung von Bioreaktoren genutzt [Scheper *et al.*; 1986]. Coumarine verhinderten den interzellulären Transfer von HIV *in vitro* [Bourinbaïar; 1993], außerdem verhinderte ihr Einsatz die Einführung von HIV-Viren in Zellen, indem sie mit HIV verbundene Proteasen inhibierten [Thaisrivongs; 1994]. Eine ausführliche Übersicht über den Einsatz von Coumarin-Derivaten in verschiedenen analytischen Einsatzgebieten findet sich in O`Kennedy und Thornes [1997].

5. Ergebnisse

5.1 Vorbemerkungen

Die in diesem Kapitel beschriebenen enzymatischen Umsetzungen von pseudo-Enantiomeren werden zuerst im wäßrigen Medium durchgeführt und später auf unpolare organische Lösemittel übertragen. Die Reaktionsverläufe werden on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt und off-line chromatographisch verifiziert. Durch die fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der Produkte ist es möglich sofort Rückschlüsse auf die umgesetzten Substrate zu ziehen, und somit die Enantioselektivität des eingesetzten Enzyms schnell zu bestimmen.

Als Modellsubstrate werden L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC (Kapitel 4.3) verwendet. In den folgenden Abschnitten ist die schrittweise Optimierung des Reaktionssystems durch Variation von Enzym, Katalysatormenge, Temperatur, Lösemittel und Wassergehalt dargestellt. Alle Untersuchungen finden als Batchversuche in einem 15 ml Reaktor statt, die eingesetzten Enzyme werden als Pulver in der Reaktionslösung durch Rühren suspendiert. Die verwendeten organischen Lösemittel werden vor ihrem Einsatz über Molekularsieb getrocknet.

Mittels der optimierten Umsetzungen im wäßrigen System werden kinetische Daten der eingesetzten Biokatalysatoren bestimmt und miteinander verglichen. Bei einem gleichzeitigen Einsatz der L- und D-Coumarinsubstrate werden die Enantiomerenüberschüsse, die Umsätze und die Enantioselektivitäten untersucht. Im Anschluß daran werden die Reaktionen auf organische Lösemittelsysteme übertragen und die kinetischen Parameter erneut bestimmt. Alle verwendeten Substrate sind Salze, welche im wäßrigen Medium dissoziieren. In organischen Medien erfolgt keine Dissoziation, die Ionenpaare bleiben zusammen. Dies wird dazu genutzt, um in weiteren Versuchsreihen die Größe der Gegenionen der Coumarinsubstrate zu variieren. Die Auswirkung dieser Größenunterschiede der Substrate auf die Enantioselektivität des eingesetzten Katalysators wird on-line erfaßt und ausgewertet. Weiterhin werden die Ergebnisse aus den fluoreszenzspektroskopischen Messungen für chemometrische Modelluntersuchungen verwendet. Aus dem Modell wird eine Reaktionsvorhersage getroffen. Bei Umsetzungen mit unspezifischen Enzymen können die on-line erhaltenen Ergebnisse durch die chemometrischen Vorhersagen interpretiert und verifiziert werden.

5.2 Substratauswahl

5.2.1 Eigenschaften der Substrate

Folgende Bedingungen müssen Fluoreszenzsubstrate erfüllen, damit pseudo-enantioselektive Reaktionen on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erfaßt werden können:

- Die eingesetzten Substrate müssen sich in ihrer absoluten Konfiguration unterscheiden, so daß eine enantioselektive Reaktion simuliert werden kann.
- Die Fluoreszenzanregung sollte im UV/VIS-Bereich liegen.
- Die Spaltprodukte der enzymatischen Reaktion sollten sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften von denen der Substrate möglichst stark unterscheiden.

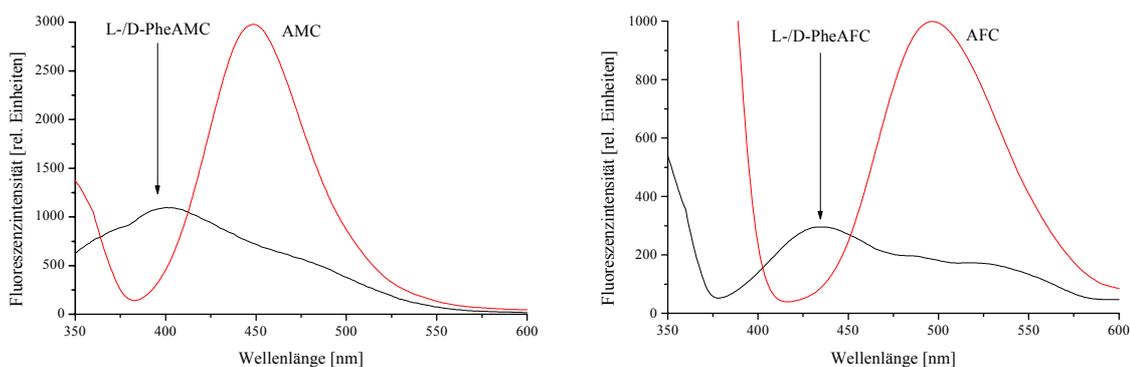
Scheper *et al.* [1986] beschreiben Fluorophore, welche sich aus Phenylelessigsäure und zwei verschiedenen Coumarinderivaten zusammensetzten. Die verwendeten Substrate besitzen dabei eine Anregungswellenlänge von ca. 380 bis 440 nm, die Emissionswellenlänge der Spaltprodukte liegt bei 440 bis 459 nm. Eine fluoreszenzspektroskopische Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den eingesetzten Substraten und den entstehenden Produkten ist somit möglich. Ausgehend von den verwendeten Fluorophoren 7-Amino-4-methylcoumarin- und 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin werden diese Moleküle mit L-/D-Phenylalanin über Peptidbindungen verknüpft, so daß die erhaltenen Zielmoleküle über eine absolute Konfiguration verfügen. Die Substrate werden „schematisch“ als Enantiomere betrachtet.

Die eingesetzten Coumarinderivate unterscheiden sich weiterhin in einem ihrer Substituenten, nämlich in der $-\text{CH}_3$ - und $-\text{CF}_3$ -Gruppe. Durch diesen unterschiedlichen Substituenten besitzen sowohl die Substrate als auch deren Spaltprodukte verschiedene Peakmaxima im Fluoreszenzspektrum. Die Methyl- und Trifluoromethylsubstituenten unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße nicht allzu stark voneinander. Ein zu großer Unterschied zwischen den Radien der Substituenten beeinflusst die Enantioselektivität der eingesetzten Enzyme [Ueji *et al.*; 1999], da die Substrate sich unterschiedlich stark im aktiven Zentrum anlagern. Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht über die Van der Waals-Radien der verwendeten Substituenten:

Tab. 5.1: Van der Waals-Radien der Substituenten

Substituent	Van der Waals-Radius [\AA]
-CH ₃	1,79
-CF ₃	2,22

Abbildung 5.1 zeigt die Emissionsspektren der Substrate L-/D-PheAMC / L-/D-PheAFC und ihrer Spaltprodukte AMC und AFC. Es zeigt sich, daß die Fluorophore L-/D-PheAMC ihre Fluoreszenzmaxima bei $\lambda_{EM} = 390$ nm aufweisen, das Fluoreszenzmaximum des Produktes liegt bei $\lambda_{EM} = 440$ nm. Die Coumarinderivate L-/D-PheAFC besitzen ihr Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{EM} = 430$ nm, das Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{EM} = 490$ nm.

**Abb. 5.1:** Emissionsspektren der Fluorophore in KPP

Die Konzentration aller Fluorophore im wäßrigen Medium beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, deutlich sind dabei die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten (FI) zwischen den Substraten und den Produkten zu erkennen. Die Coumarinderivate L-/D-PheAMC zeigen eine relative FI von 1114, die relative FI der Fluorophore L-/D-PheAFC beträgt dagegen 300. Das Spaltprodukt AMC zeigt mit einer relativen FI von rund 3100 eine um den Faktor drei höhere FI als die Substrate [Scheper *et al.*; 1986], [O'Kennedy und Thornes; 1997]. Ebenso ist die relative FI von AFC ca. dreimal höher als die der Substrate L-/D-PheAFC. Durch die Verschiebung der Fluoreszenzmaxima der Produkte AMC und AFC in Richtung höherer Wellenlängen ist eine Unterscheidung zwischen den eingesetzten Substraten und den entstehenden Produkten möglich.

In Abbildung 5.2 sind die 2D-Fluoreszenzspektren der verwendeten Substrate L-/D-PheAMC, L-/D-PheAFC und der Produkte AMC und AFC in Wasser dargestellt, die Konzentration der Fluorophore beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

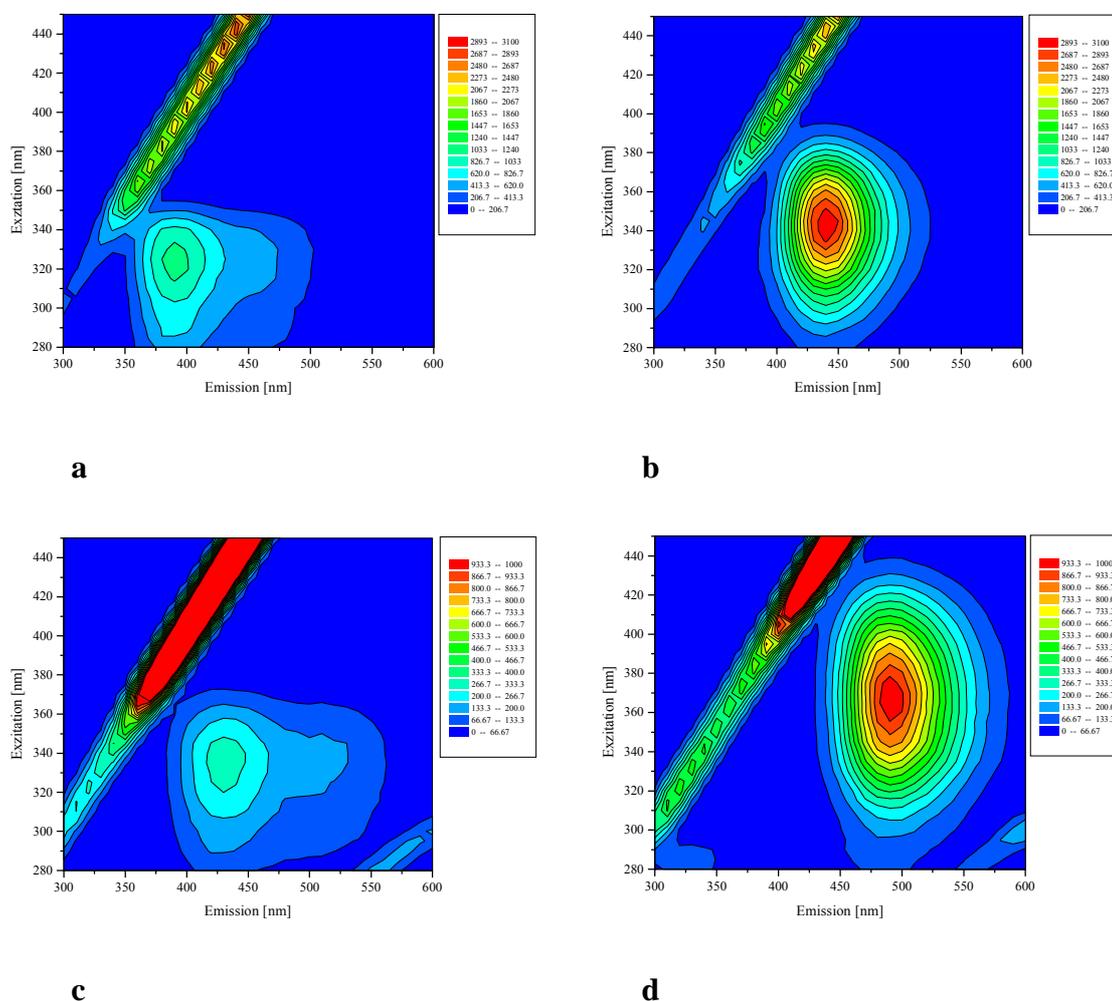


Abb. 5.2: 2D-Fluoreszenzspektren der Fluorophore in KPP

a: L-/D-PheAMC

b: AMC

c: L-/D-PheAFC

d: AFC

Deutlich sind hier die unterschiedlichen Lagen der Fluoreszenzmaxima der einzelnen Substrate und Produkte im 2D-Spektrum zu erkennen, die Exzitationswellenlängen von L-/D-PheAMC liegen bei $\lambda_{EX} = 325$ nm, die Anregungswellenlängen von L-/D-PheAFC liegen bei $\lambda_{EX} = 340$ nm. Die Exzitationswellenlängen der Produkte sind in Richtung höherer Wellenlängen verschoben. Die Anregung des Produkts AMC findet bei $\lambda_{EX} = 345$ nm statt, die von AFC bei $\lambda_{EX} = 365$ nm. Auch finden sich bei den Substraten bereits Verschiebungen

der Fluoreszenzpeaks in Richtung der Produkte, dabei kann es sich möglicherweise um Produktverunreinigungen im Feststoff der Substrate handeln. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Fluorophore, welche eine AMC-Gruppe als Substituenten besitzen, eine höhere FI besitzen als die Fluorophore mit einer AFC-Gruppe.

Abschließend läßt sich feststellen, daß zwischen den Substraten und Produkten im 2D-Fluoreszenzspektrum unterschieden werden kann, jedoch liegen die Exzitations- und Emissionswellenlängen der Coumarinsubstrate L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC relativ dicht beieinander, so daß bei einem gleichzeitigen Einsatz der Fluorophore Überschneidungen der Fluoreszenzmaxima im Spektrum zu erwarten sind. Bei einem Einsatz eines unselektiven Enzyms kann dadurch eine Zuordnung der on-line umgesetzten Substrate erschwert werden.

5.3 Bestimmung der Nachweisgrenzen

5.3.1 Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen für die Substrate L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC

Für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Coumarinsubstrate werden die einzelnen Fluorophore so weit verdünnt, bis im 2D-Spektrum kein Fluoreszenzmaximum mehr zu erkennen ist. Dabei ergeben sich folgende Konzentrationen:

Tab. 5.2: Untere Nachweisgrenzen der Coumarinsubstrate

Substrate	Ex./Em.Maximum [nm]	Untere Nachweisgrenze [mol/l]	RFI [Einheiten]
L-/D-PheAMC	325 / 390	$3,4 \cdot 10^{-8}$	9,4
L-/D-PheAFC	340 / 430	$2,1 \cdot 10^{-7}$	4,9

Tabelle 5.2 zeigt, daß aufgrund der höheren FI der AMC-substituierten Coumarinderivate die Nachweisgrenze dieser Substrate niedriger liegt. Unterhalb dieser Konzentrationen ist eine Detektion der Fluorophore nicht mehr möglich. Für alle weiteren Untersuchungen wird für alle Substrate eine Ausgangskonzentration von $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l gewählt. Bei Untersuchungen mit ähnlichen Coumarinsubstraten wurde bei höheren Fluorophorkonzentrationen eine Substrathemmung festgestellt [Scheper *et al.*; 1988].

5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von AMC und AFC

Abbildung 5.3 zeigt die Kalibration von 7-Amino-4-methylcoumarin mit verschiedenen Konzentrationen an AMC.

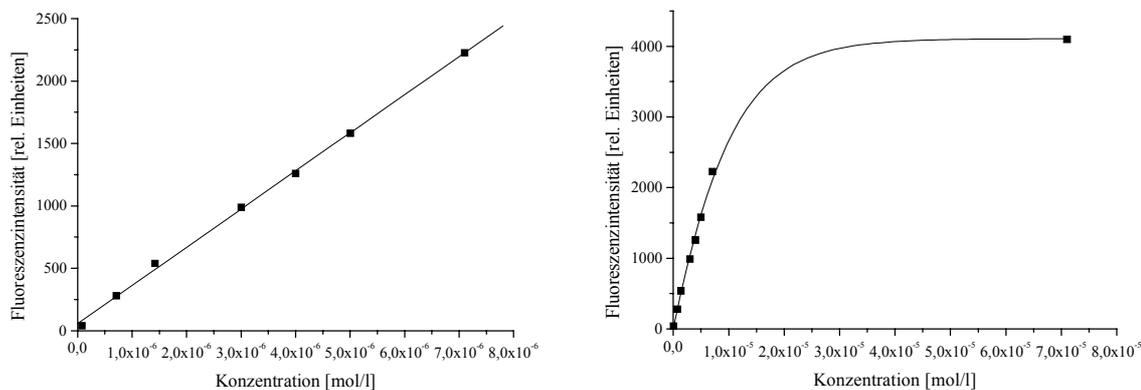


Abb. 5.3: FI in Abhängigkeit der Konzentration von AMC

Betrachtet man den Verlauf der FI in Abhängigkeit von der AMC-Konzentration wird deutlich, daß die Fluoreszenzintensität zunächst linear mit der Konzentration ansteigt. Ab einer AMC-Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ist dieser lineare Zusammenhang nicht mehr gegeben. Für AMC entspricht diese Konzentration einer FI von ca. 3100. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluorophorkonzentration und der Fluoreszenzintensität besteht daher nur bei stark verdünnten Lösungen. Auch bei dem Fluorophor AFC besteht ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l kein linearer Zusammenhang mehr zwischen der AFC-Konzentration und der FI, diese Konzentration entspricht einer FI von ca. 740.

Bei der ausgewählten Substratkonzentration von $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l entsteht für die Produkte AMC und AFC eine FI von ca. 3200 und 700. Diese FI liegt teilweise nicht mehr in dem FI-Bereich, für den laut den Ausführungen ein linearer Zusammenhang vorliegt. Da die FI von AMC jedoch nur geringfügig von dem linearen Bereich entfernt ist wird für spätere kinetische Betrachtungen ein linearer Zusammenhang angenommen. Der aus dieser Annahme resultierende Fehler von 3 % ist so gering, daß er im Folgendem nicht weiter betrachtet wird.

5.4 Stabilität der Substrate im wässrigen Medium

5.4.1 pH-Stabilität

Da im Laufe der Umsetzung der pH-Wert des Systems bedingt durch die Produktion von L-/D-Phenylalanin absinkt, wird ein Kaliumdihydrogenphosphat/Dikaliumhydrogenphosphat-Puffersystem (KPP) verwendet, dessen Pufferkapazität 0,5 M beträgt [Scheper *et al.*; 1988]. Aufgrund der wässrigen Umgebung können Autoprotolysereaktionen bei den Substraten auftreten. Abbildung 5.4 zeigt die Langzeitstabilität von L-PheAMC im KPP-System bei verschiedenen pH-Werten.

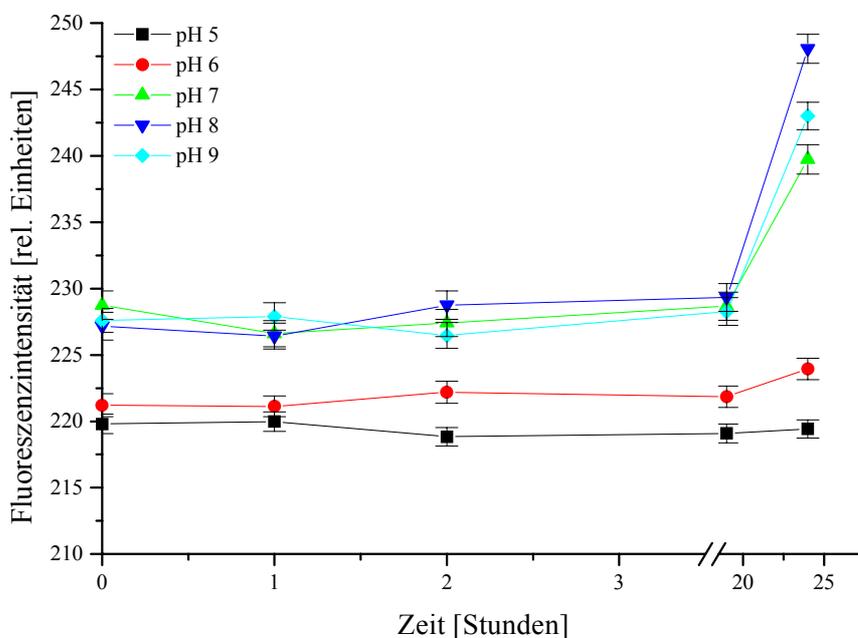


Abb. 5.4: Stabilität von L-PheAMC in KPP bei unterschiedlichen pH-Werten

Zur Untersuchung wird die FI-Zunahme von AMC bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$ gemessen, die Konzentration von L-PheAMC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Es zeigt sich, daß bei einem pH-Bereich von 7 – 9 nach 25 Std. die FI von AMC zunimmt. Im wässrigen Medium findet somit eine Autoprotolyse der Coumarinsubstrate statt. Kuromizu *et al* [1985] beschreiben ebenfalls Zersetzungserscheinungen bei ähnlichen Fluorophoren im wässrigen Medium. Kinetische Untersuchungen müssen bei konstantem pH-Wert durchgeführt werden

da die K_{cat} - und K_{M} -Werte pH-abhängig sind [Buchholz und Kasche; 1997]. Daher wird der pH-Wert in den folgenden Versuchen auf pH 7,6 eingestellt

5.4.2 Temperaturstabilität im wässrigen Medium

Ein Temperaturanstieg bei enzymatischen Umsetzungen ist in der Regel mit einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit verbunden. Jedoch kann bei zu hohen Temperaturen die Tertiärstruktur des Biokatalysators so stark verändert werden, daß als Folge die Reaktionsgeschwindigkeit absinkt. Auch die Autoprotolyse der Fluorophore ist temperaturabhängig. Um eine möglichst schnelle Umsetzung der Substrate im wässrigen Medium zu gewährleisten ist in Abbildung 5.5 die Temperaturstabilität von L-PheAMC innerhalb eines Temperaturbereiches von 25 – 45 °C dargestellt.

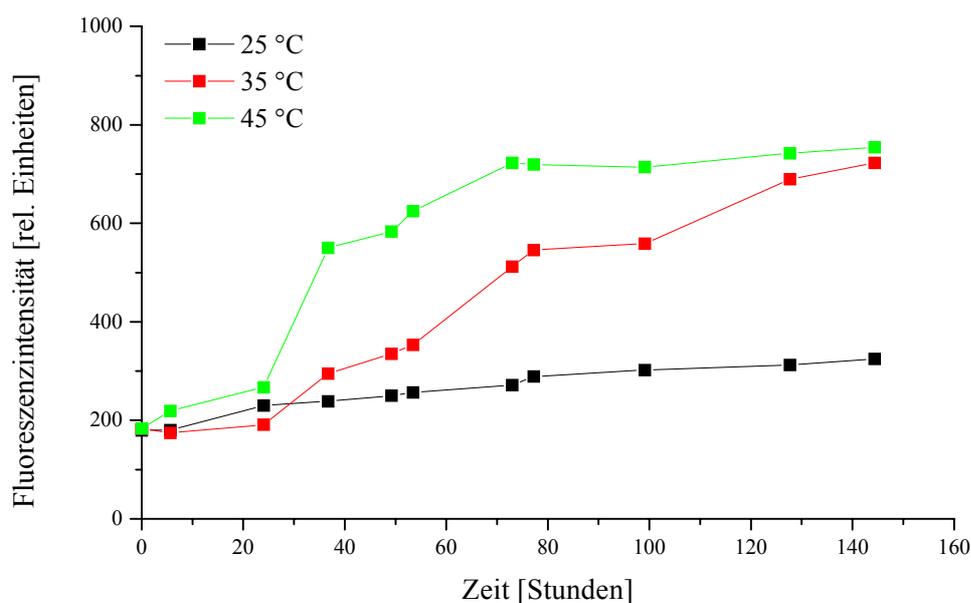


Abb. 5.5: Temperaturstabilität von L-PheAMC in KPP

Auch in diesem Versuch wird die FI-Zunahme von AMC bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 440 \text{ nm}$ gemessen, die Konzentration von L-PheAMC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Deutlich ist eine erhöhte Zunahme der FI von AMC bei höheren Temperaturen zu erkennen. Eine Temperaturerhöhung ist somit mit einer Zersetzung des Substrates verbunden, womit gleichzeitig die FI herabgesetzt (Kap. 3.1) wird. Bei einer Temperatur von 45 °C hat sich das Substrat bereits nach 70 Stunden vollständig zersetzt und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität von AMC ist

danach nicht mehr zu beobachten. Bei 35 °C ist die Zersetzung von L-PheAMC auch nach 140 Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen. Bei 25 °C hingegen steigt die FI von AMC nur geringfügig an, was auf eine sehr geringe Zersetzungsrate hinweist. Alle nachfolgenden Untersuchungen im wäßrigen Medium werden somit bei 25 °C durchgeführt.

5.5 Auswahl der Enzyme

5.5.1 Ergebnisse der Umsetzung von L-PheAMC mit verschiedenen Enzymen in KPP

Aus der Vielzahl der erhältlichen Enzyme werden Katalysatoren ausgewählt, mit denen bereits Umsetzungen von Peptiden und strukturverwandten Verbindungen erfolgreich durchgeführt werden konnten [Castro; 1999], [Zimmermann *et al.*; 1977]. Abbildung 5.6 gibt einen Überblick über alle untersuchten Umsetzungen von L-PheAMC ($c = 2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in KPP und deren Ergebnisse.

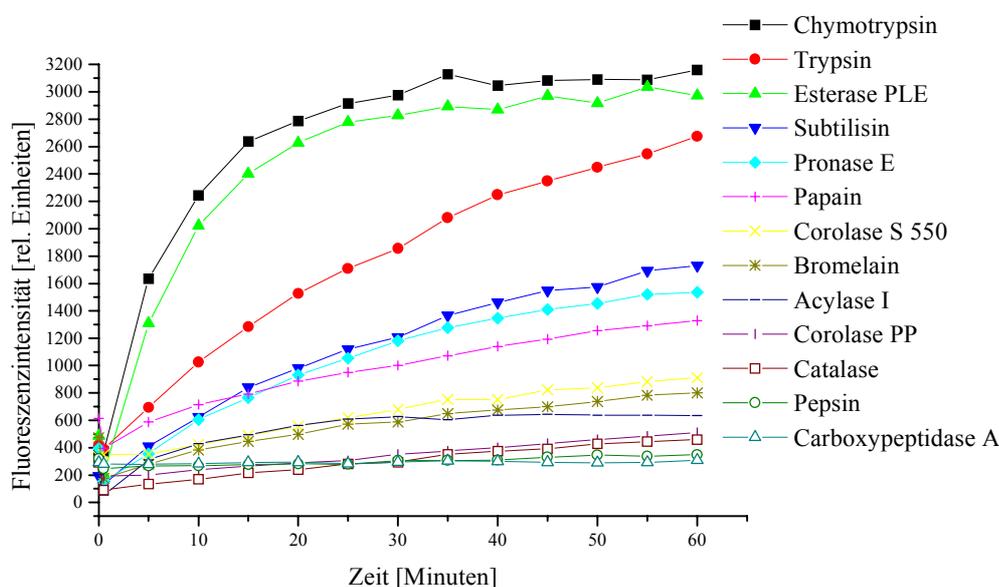


Abb. 5.6: Umsetzung von L-PheAMC mit verschiedenen Enzymen in KPP

Die verwendeten Mengen an Enzym variieren, da die spezifischen Aktivitäten [U/mg] der Proteasen und Esterasen sehr unterschiedlich sind. Je Versuch werden 2000 U eingesetzt. Bei der Hydrolyse wird der Wellenlängenbereich $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm des Spaltprodukts AMC detektiert [Smith; 1980].

Die Ergebnisse in Abbildung 5.5 zeigen, daß von den 13 eingesetzten Biokatalysatoren die Protease α -Chymotrypsin und die Esterase aus *Porcine liver* die besten Umsätze erzielen. Bei der Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin ist nach 30 Minuten kein Anstieg mehr in der Fluoreszenzintensität des Produkts AMC zu erkennen. Das Produkt zeigt eine FI von ca. 3100. Die Umsetzung mit der Esterase PLE ist bereits nach 25 Minuten die Hydrolyse des Coumarinsubstrates abgeschlossen. Hier liegt die FI des Produktes bei ca. 3000. Die Umsetzungen mit den restlichen Enzymen zeigen nach einer Stunde noch kein stationäres Verhalten. Demnach sind Hydrolysen der Substrate hier noch nicht beendet.

5.5.2 Ergebnisse der Umsetzung von D-PheAFC mit verschiedenen Enzymen in KPP

Für die Umsetzung des D-Coumarinsubstrates werden die gleichen 13 Enzyme wie bei der Umsetzung von L-PheAMC verwendet. Abbildung 5.7 zeigt die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolysen.

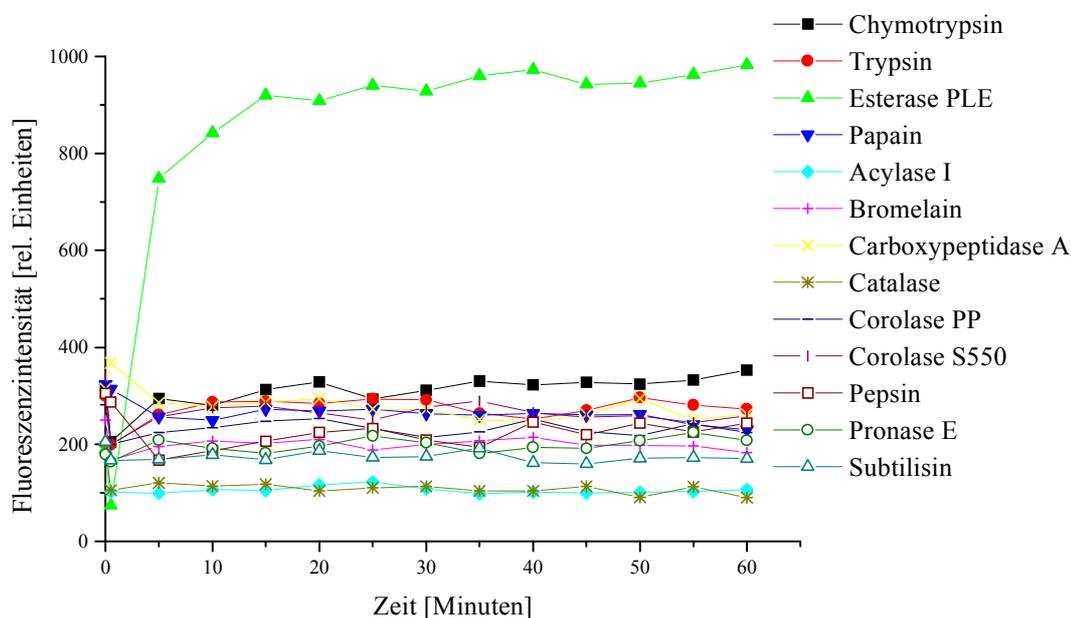


Abb. 5.7: Umsetzung von D-PheAFC mit verschiedenen Enzymen in KPP

Die Umsetzung wird in KPP bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 490 \text{ nm}$, dem Fluoreszenzmaximum des Spaltprodukts AFC, verfolgt [Smith; 1980]. Die Konzentration von D-PheAFC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, von jedem Enzym werden 2000 U eingesetzt.

Eindeutig ist zu erkennen, daß nur die Esterase PLE das D-Substrat hydrolysiert. Bei allen anderen Enzymen findet keine Umsetzung von D-PheAFC statt. Die Hydrolyse des Substrates ist bereits nach 15 Minuten mit einer FI von AFC von ca. 900 abgeschlossen. Danach ist kein weiterer Anstieg in der FI des Produktes sichtbar und die Umsetzung ist beendet.

5.5.3 Variation der Enzymmenge in KPP

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Menge des eingesetzten Enzyms α -Chymotrypsin variiert. Die ursprünglich im Screening verwendete Enzymmenge von 2000 U erniedrigen durch einen Inner-Filter-Effekt die FI der Reaktionslösung. Aus diesem Grund soll durch Variation der Enzymmenge die optimale Menge des Katalysators bestimmt werden, mittels der die Hydrolyse schnell und ohne FI-Erniedrigung stattfindet (Abbildung 5.8).

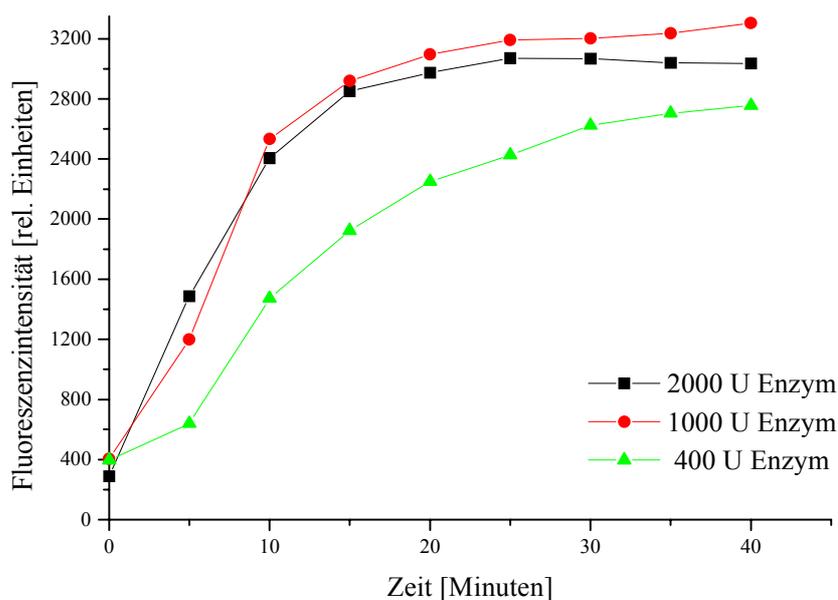


Abb. 5.8: Variation der Enzymmenge von α -Chymotrypsin bei der Umsetzung von L-PheAMC in KPP, Detektion von AMC bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm

Die Ergebnisse zeigen, daß bei einem Einsatz von 400 U die Umsetzung nach 40 Minuten noch nicht vollständig abgelaufen ist. Werden 1000 U eingesetzt, ist bereits nach 25 Minuten L-PheAMC vollständig zu AMC gespalten. Eine Erhöhung der Enzymmenge auf 2000 U zeigt keine signifikante Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeit, jedoch wird die FI geringfügig erniedrigt, hervorgerufen durch den Inner-Filter-Effekt. In den folgenden

Versuchen werden deshalb 1000 U α -Chymotrypsin eingesetzt. Für Umsetzungen mit der Esterase müssen aufgrund der höheren Reinheit und Aktivität von PLE gegenüber α -Chymotrypsin keine Optimierung der Enzymmenge erfolgen. Es werden für die Versuche ebenfalls 1000 U verwendet.

5.6 Fluoreszenzspektroskopische on-line-Analytik der enzymatischen Umsetzung von L-/D-PheAMC / L-/D-PheAFC in wässrigem Medium

Die enzymatischen Spaltungen der Coumarinderivate wird nun on-line-analytisch verfolgt. Dazu werden zuerst Einzelreaktionen getrennt untersucht und die kinetischen Parameter bestimmt. Mittels eines gleichzeitigen Einsatz beider Coumarinsubstrate werden zusätzlich die Enantioselektivitäten und die Enantiomerenüberschüsse ermittelt.

Von den eingesetzten Biokatalysatoren werden jeweils 1000 U in 1 ml KPP-Puffer (0,5 M, pH 7,6) gelöst und verwendet. Die Konzentrationen der Coumarinsubstrate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

5.6.1 Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP

Folgende Einzelreaktionen werden zunächst betrachtet:

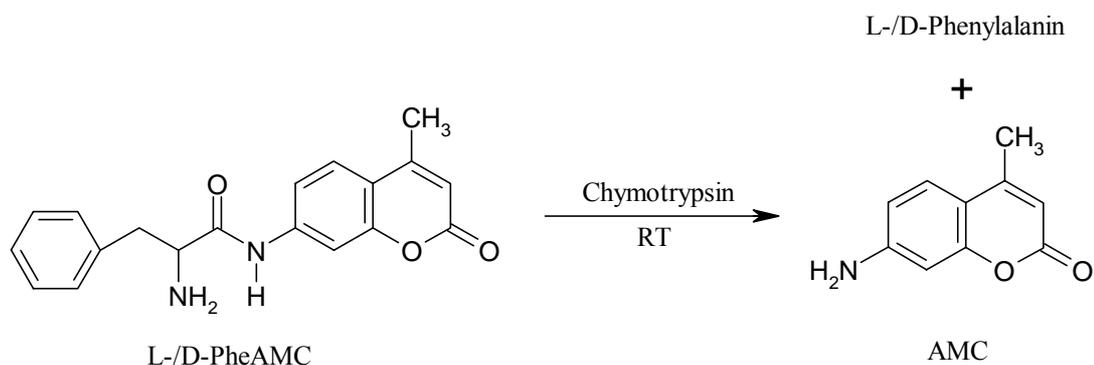


Abb. 5.9: Enzymatische Umsetzung von L-/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin

Zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAMC-Lösung werden 1000 U α -Chymotrypsin nativ zugegeben. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

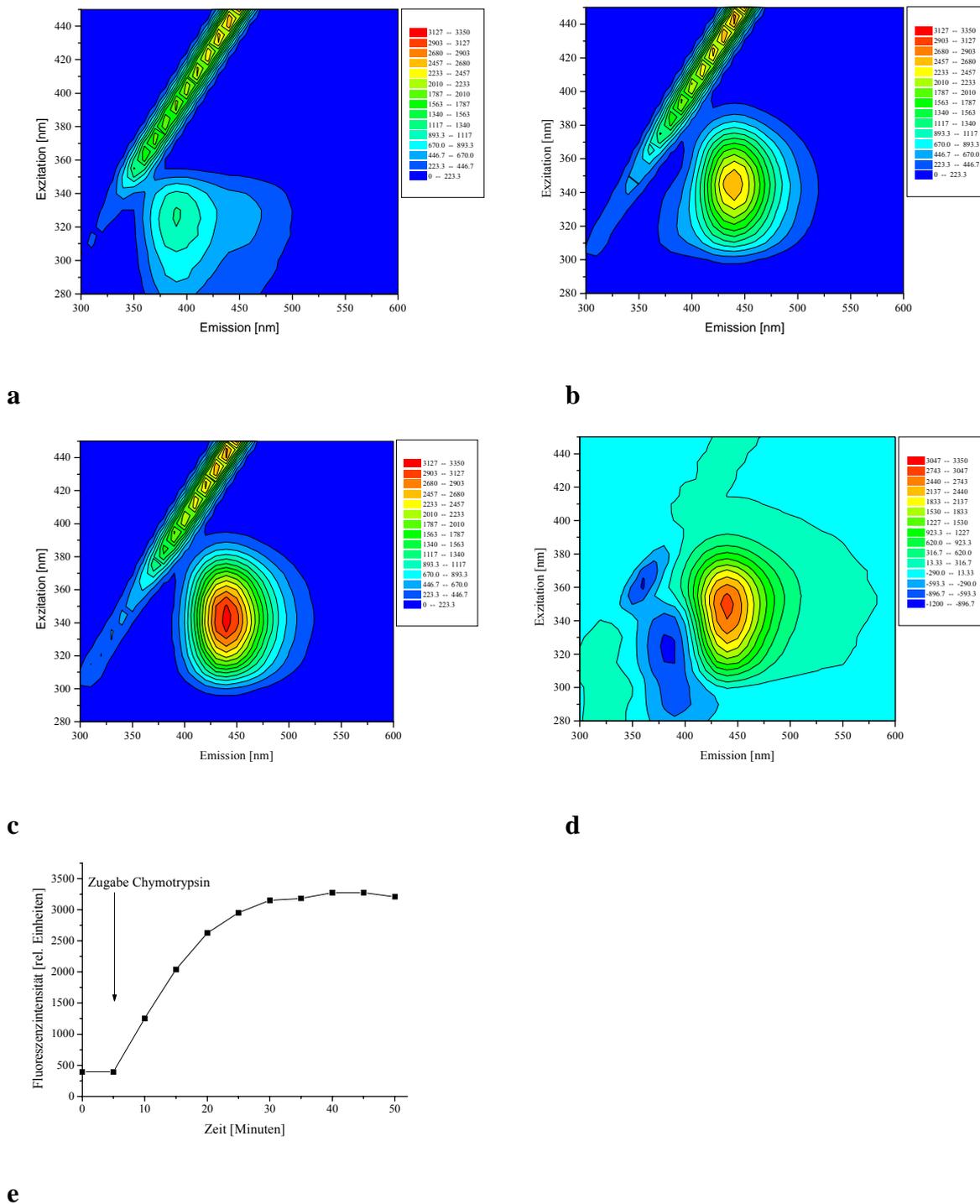


Abb. 5.10: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin
a: L-PheAMC in KPP **b:** 10 Minuten nach Enzymzugabe
c: 45 Minuten nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum a - c
e: Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$

Aus Abbildung 5.10 ist zu erkennen, daß das Coumarinderivat L-PheAMC ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{EX}} = 325 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 390 \text{ nm}$ mit einer relativen FI von 1141 aufweist. Der Peak befindet sich nah an der Rayleigh-Bande und ist zu tieferen und höheren Emissionswellenlängen hin gedehnt. Nach der Enzymzugabe entsteht der neue Peak von AMC bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 440 \text{ nm}$. Dieses ist im Differenzspektrum (Abbildung 5.10 d) deutlich zu erkennen. Das eingesetzte Enzym α -Chymotrypsin fluoresziert im Proteinbereich bei $\lambda_{\text{EX}} = 300 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}$ mit einer relativen FI (RFI) von 350. Das Maximum ist aufgrund der Skalierung des 2D-Spektrums nicht zu erkennen. Abbildung 5.10 e zeigt, daß 30 Minuten nach der Enzymzugabe das eingesetzte Substrat L-PheAMC vollständig zu AMC umgesetzt wurde. Das Produkt fluoresziert nach 45 Minuten bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 440 \text{ nm}$ mit einer relativen FI von 3213. Im Differenzspektrum (Abbildung 5.10 d) ist die Abnahme des Substratpeaks bei 325 nm und $\lambda_{\text{EM}} = 390 \text{ nm}$ um eine RFI von ca. 1100 und die Zunahme des Produktpeaks bei Ex./Em. = 345/440 nm sichtbar. Aufgrund einer höheren FI des Produkts gegenüber dem Substrat findet eine Überschneidung der Peaks von AMC und L-PheAMC statt, welche eine Unterscheidung zwischen den Fluoreszenzmaxima erschwert. Trotz dieser Überschneidungen ist die Reaktion mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz gut zu verfolgen.

In einer anschließenden Versuchsreihe wird die enzymatische Umsetzung von D-PheAMC mit der Protease α -Chymotrypsin in KPP durchgeführt. Die Reaktion wird 19 Stunden fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, die Konzentration des D-Substrats beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, es werden 1000 U Enzym nativ eingesetzt. Abbildung 5.11 zeigt die aufgenommenen Fluoreszenzspektren.

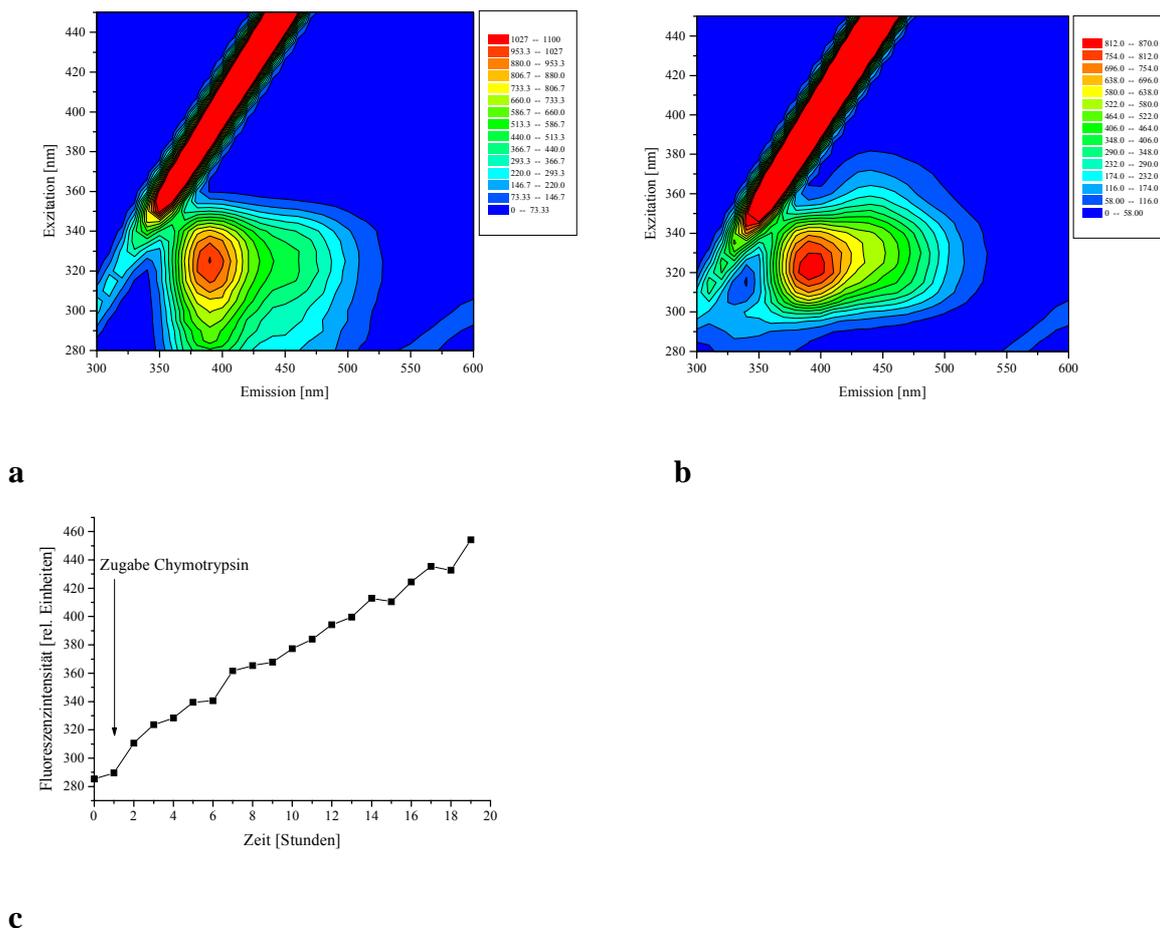


Abb. 5.11: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAMC mit α -Chymotrypsin
a: D-PheAMC in KPP **b:** 19 Stunden nach Enzymzugabe
c: Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$

Abbildung 5.11 b zeigt, daß sich nach 19 Stunden der Peak des Fluorophors D-PheAMC teilweise in Richtung des Fluoreszenzmaximums von AMC hin ausgeweitet hat. Die Reaktion ist sehr langsam, denn nach 18 Stunden wird das Substrat noch nicht vollständig von der Protease α -Chymotrypsin umgesetzt. Die FI von AMC hat sich innerhalb dieser Zeit von 314 auf 462 erhöht. Nach Literaturangaben werden D-Phenylalaninderivate mit einer $10^6 - 10^7$ fach geringeren Geschwindigkeit von α -Chymotrypsin umgesetzt [Boyer; 1971]. Wie in Kapitel 5.4.1 bereits beschrieben, unterliegen die Substrate im wäßrigen Medium einer Autoprotolyse. Das Substrat D-PheAMC zersetzt sich während der Reaktionszeit, dadurch wird der Anstieg der FI von AMC detektiert.

5.6.2 Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in KPP

Im Anschluß wird die Umsetzung von L-PheAFC mit α -Chymotrypsin betrachtet. Dazu werden zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAFC-Lösung 1000 U α -Chymotrypsin nativ zugegeben. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.13 dargestellt.

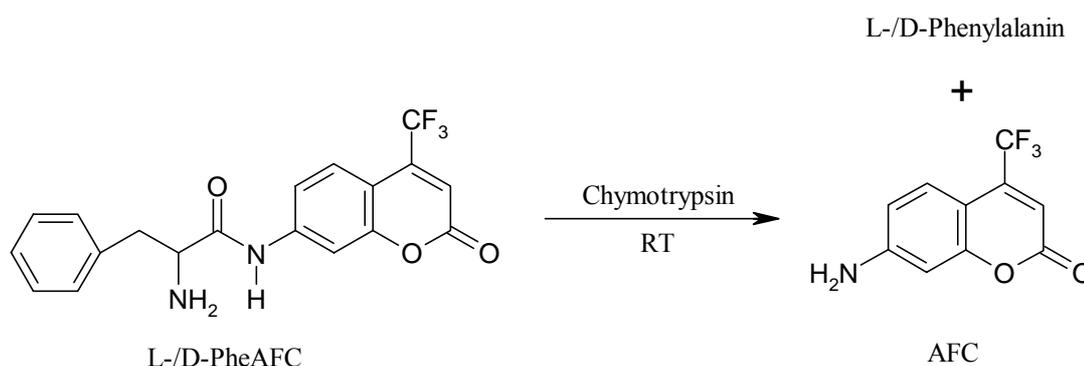


Abb. 5.12: Enzymatische Umsetzung von L-/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin

In der folgenden Abbildung 5.13 a ist zu erkennen, daß das eingesetzte Substrat L-PheAFC ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{EX} = 335$ nm und $\lambda_{EM} = 430$ nm zeigt. Die relative FI beträgt 238. Der Trifluoromethylsubstituent im Substrat verschiebt somit das Fluoreszenzmaximum gegenüber dem Methylsubstituenten in Richtung höherer Wellenlängen. Bei gleichen Fluorophorkonzentrationen besitzt das Substrat mit dem CF_3 -Substituenten jedoch eine um den Faktor 4,8 geringere FI. Der Reaktionsverlauf nach der Enzymzugabe zeigt, daß das Substrat L-PheAFC nach ca. 25 Minuten nahezu vollständig zum Produkt AFC mit einer FI von ca. 700 umgesetzt worden ist (Abb. 5.13 e). Im Differenzspektrum 5.13. d ist die Zunahme des AFC-Peaks und die Abnahme des Fluoreszenzmaximums vom Substrat L-PheAFC deutlich zu erkennen.

In der abschließenden Versuchsreihe mit α -Chymotrypsin wird die Umsetzung von D-PheAFC in KPP untersucht. Auch hier wird die Hydrolyse 19 Stunden mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Die Konzentration von D-PheAFC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, es werden 1000 U Protease nativ eingesetzt. Abbildung 5.14 zeigt die 2D-Spektren, welche den Reaktionsverlauf darstellen.

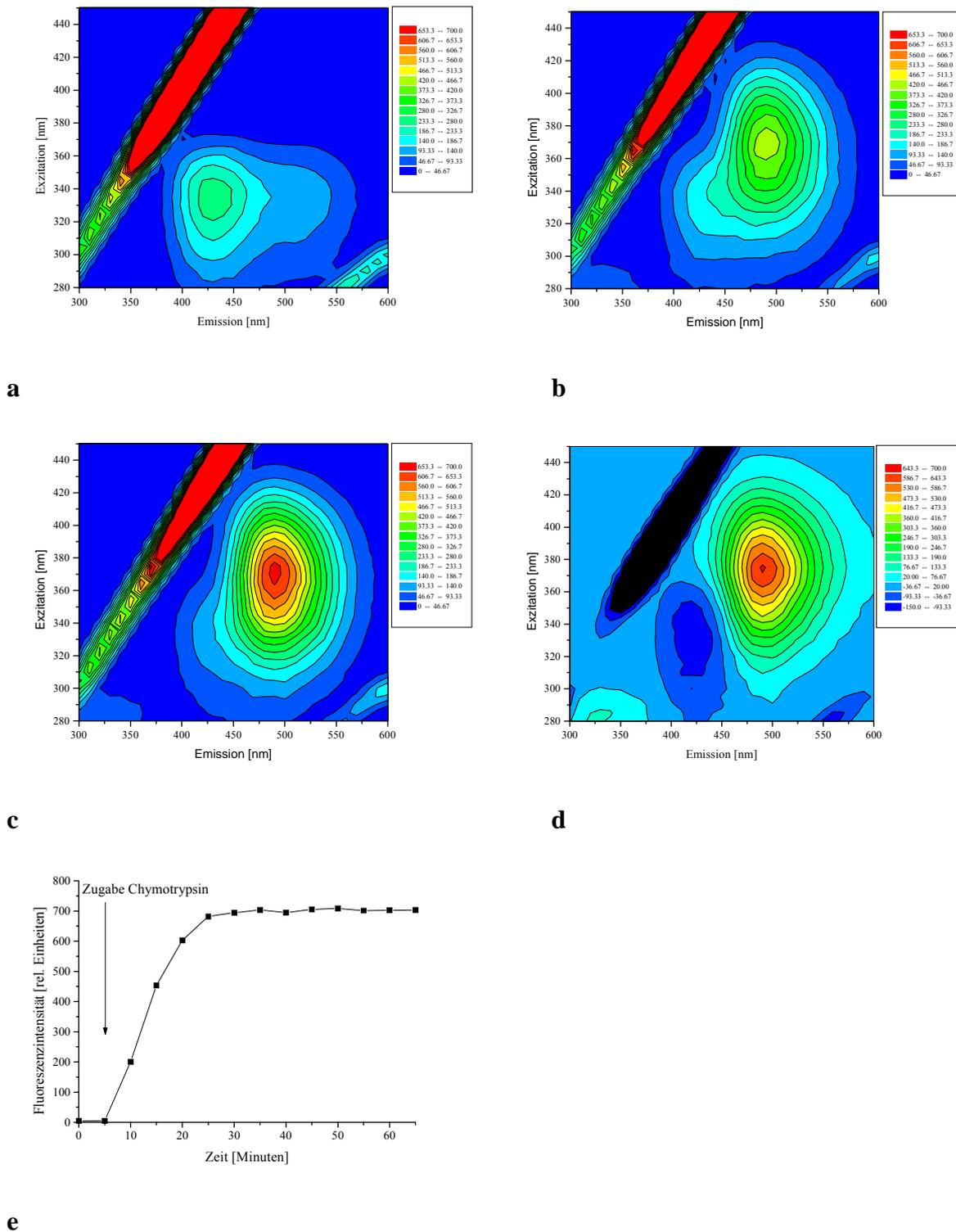


Abb. 5.13: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAFC mit α -Chymotrypsin
a: L-PheAFC in KPP **b:** 15 Minuten nach Enzymzugabe
c: 60 Minuten nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum a – c
e: Zunahme der FI von AFC detektiert bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$

Abbildung 5.14 zeigt, daß auch in diesem Fall das D-Substrat von der Protease α -Chymotrypsin nach 19 Stunden nicht vollständig zu AFC hydrolysiert wird. Das Coumarinsubstrat D-PheAFC besitzt das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{EX} = 335 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 430 \text{ nm}$ mit einer relativen FI von 258. Nach 19 Stunden hat sich der Peak teilweise in Richtung des Spaltprodukts AFC bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$ verschoben. Die FI hat sich nach 19 Stunden von 53 auf 79 erhöht. Wie bereits in Kapitel 5.6.1 beschrieben, ist die Umsetzung auf eine Autoprotolyse des Substrates im wäßrigen Medium zurückzuführen, da α -Chymotrypsin L-spezifisch reagiert.

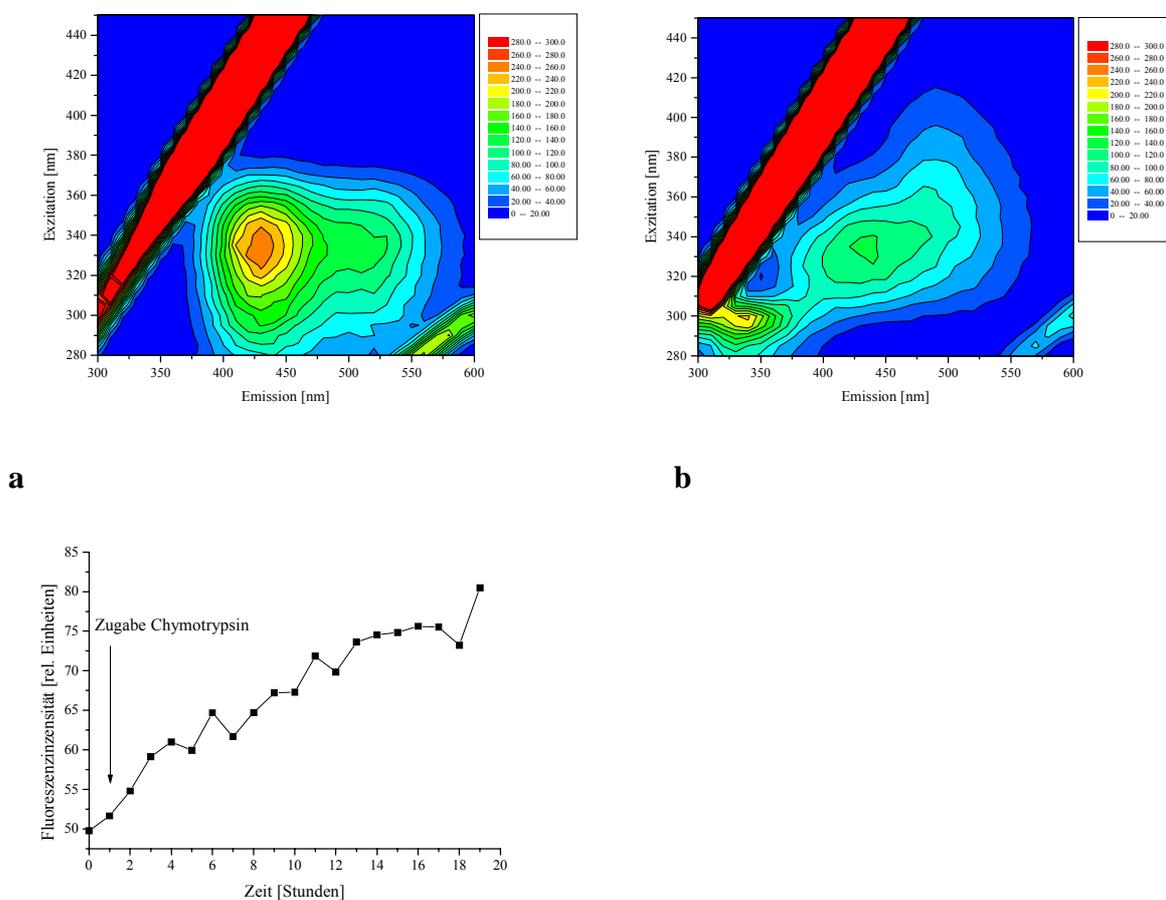


Abb. 5.14: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAFC mit α -Chymotrypsin
a: D-PheAFC in KPP **b:** 19 Stunden nach Enzymzugabe
c: Zunahme der FI von AFC detektiert bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die jeweiligen Umsetzungen der Coumarinsubstrate mit α -Chymotrypsin mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie effizient erfaßt werden können. Eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Edukten und Produkten ist aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima im 2D-Spektrum gut möglich. Innerhalb der Versuche konnte die L-Spezifität der Protease α -Chymotrypsin on-line erfaßt und bestätigt werden. Die kinetischen Betrachtungen der einzelnen Umsetzungen werden in Kap. 5.7.1 beschrieben.

In der sich anschließenden Versuchsreihe werden die enzymatischen Umsetzungen von L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE durchgeführt.

5.6.3 Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit der Esterase PLE in KPP

Da in den Kapiteln 5.6.1 und 5.6.2 das Aussehen und die Lage der Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate bereits ausführlich beschrieben wurden, werden bei den anschließenden Umsetzungen mit der Esterase PLE die Reaktionsverläufe nur über die FI-Anstiege der jeweiligen Produkte dargestellt. Folgende Einzelreaktionen werden betrachtet:

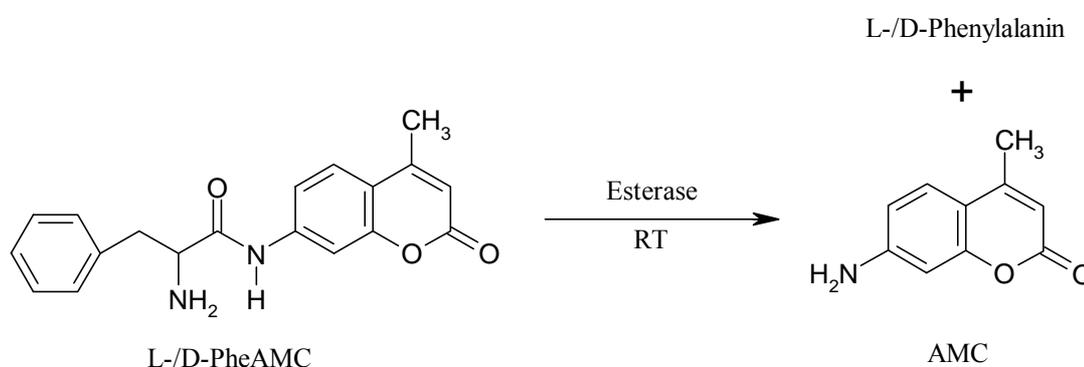


Abb. 5.15: Enzymatische Umsetzungen von L-/D-PheAMC mit der Esterase PLE

Zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAMC-Lösung werden 1000 U der Esterase nativ zugegeben und der Reaktionsverlauf on-line fluoreszenzspektroskopisch in KPP verfolgt. Abbildung 5.16 zeigt die Zunahme der FI von AMC, detektiert bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm. Die Esterase fluoresziert im Proteinbereich bei $\lambda_{EX} = 290$ nm und $\lambda_{EM} = 330$ nm mit einer FI von 120. Der Reaktionsverlauf zeigt, daß nach ca. 55 Minuten das eingesetzte Substrat nahezu vollständig zum Produkt AMC umgesetzt worden ist. Somit setzt die Esterase PLE das

Substrat L-PheAMC langsamer um als die Protease α -Chymotrypsin, bei welcher bereits nach 25 Minuten das Substrat vollständig zum Produkt hydrolysiert wurde.

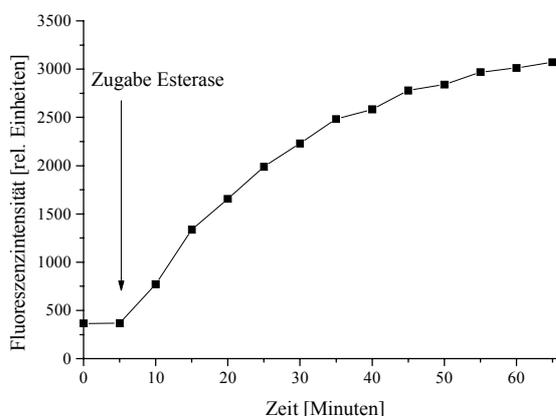


Abb. 5.16: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAMC mit der Esterase PLE, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$

Im nächsten Versuchsabschnitt wird die Hydrolyse von D-PheAMC mit der Esterase PLE in KPP betrachtet. Wiederum werden 1000 U des Enzyms nativ eingesetzt, die Konzentration des Substrates beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Abbildung 5.17 zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität vom Produkt AMC ($\lambda_{EX} = 345 \text{ nm}$ $\lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$).

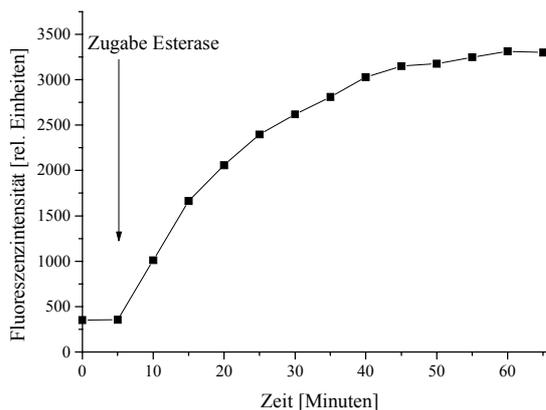


Abb. 5.17: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAMC mit der Esterase PLE, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$

Der Reaktionsverlauf in Abbildung 5.17 zeigt, daß nach 40 Minuten das eingesetzte Substrat D-PheAMC vollständig zu AMC hydrolysiert wird. Aus den Reaktionsverläufen wird

sichtbar, daß das Coumarinsubstrat D-PheAMC von PLE schneller umgesetzt wird als das Substrat L-PheAMC. Für weitere Vergleiche zwischen den Substraten sind jedoch weiterführende kinetische Untersuchungen nötig. Diese werden in Kapitel 5.7.2 beschrieben.

5.6.4 Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE in KPP

Zum Abschluß der qualitativen Umsetzungen werden folgende Hydrolysen durchgeführt:

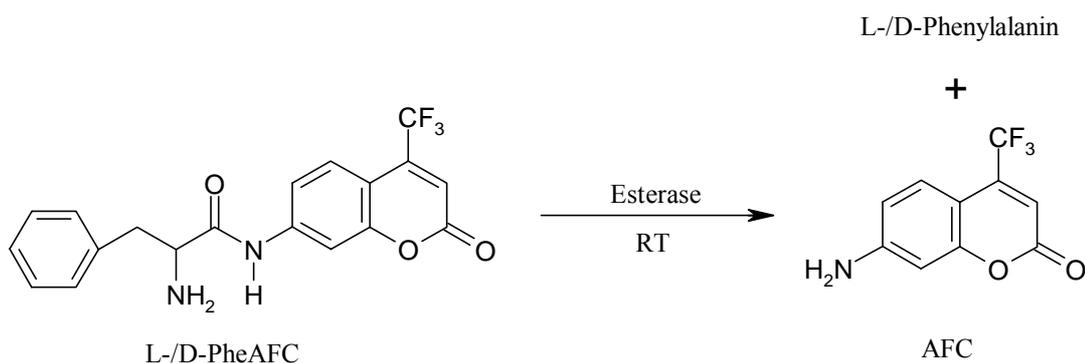


Abb. 5.18: Enzymatische Umsetzungen von L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE

Zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAFC Lösung werden 1000 U der Esterase PLE nativ zugegeben. Abbildung 5.19 zeigt den Verlauf der Hydrolyse in KPP, dabei wird das Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm und $\lambda_{\text{EM}} = 490$ nm detektiert.

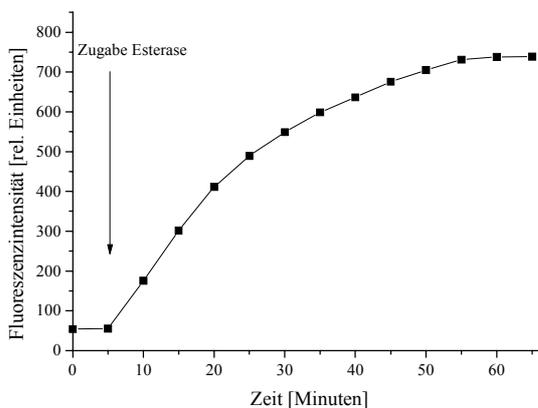


Abb. 5.19: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAFC mit der Esterase PLE, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm / $\lambda_{\text{EM}} = 490$ nm

Aus der Abbildung 5.19 wird ersichtlich, daß das eingesetzte Substrat L-PheAFC nach ca. 55 Minuten vollständig zu AFC hydrolysiert wird. Danach ist kein weiterer Anstieg in der Fluoreszenzintensität von AFC bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$ zu beobachten.

Im letzten Versuch wird das Coumarinsubstrat D-PheAFC von der Esterase PLE hydrolysiert, es werden 1000 U des Enzyms nativ eingesetzt, die Konzentration des Substrates beträgt $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Abbildung 5.20 zeigt den Hydrolyseverlauf.

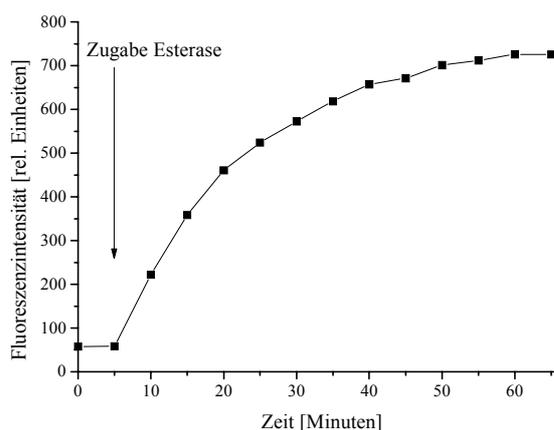


Abb. 5.20: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAFC mit der Esterase PLE, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm}$ / $\lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$

Abbildung 5.20 zeigt, daß nach ca. 50 Minuten die Umsetzung von D-PheAFC zu AFC abgeschlossen ist. Auch in dieser Reaktion wird offensichtlich das D-Substrat schneller hydrolysiert als das L-Substrat.

Die Umsetzungen der Substrate mit den Enzymen α -Chymotrypsin und der Esterase PLE können on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden. Während die Protease α -Chymotrypsin L-spezifisch ist und kein D-Substrat hydrolysiert, findet mit der Esterase bei allen Substraten eine Umsetzung statt.

5.7 Bestimmung kinetischer Daten

Die theoretischen Grundlagen zur Kinetik enzymatischer Reaktionen sind in Kapitel 3.2 geschildert worden. Da es sich bei den untersuchten Hydrolysereaktionen um Umsetzungen in KPP mit Wasser als Überschußkomponente handelt, können für die Reaktionen der Substrate Kinetiken nach Michaelis-Menten angenommen werden. Mit jedem Coumarinsubstrat werden Versuchsserien durchgeführt, bei denen die Konzentration der Fluorophore bei konstanter Enzymkonzentration variiert wird. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit werden die enzymatischen Umsetzungen der Substrate in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Für eine genaue Bestimmung wird ein bestimmtes Ex./Em.-Wellenlängenpaar betrachtet. Ein solcher „Time-scan“-Verlauf kann softwarebedingt jedoch nur eine Stunde lang aufgezeichnet werden.

5.7.1 Bestimmung der kinetischen Daten von α -Chymotrypsin

Die Time-scan-Verläufe sind für die langsamen Reaktionen der D-Substrate nicht zur Bestimmung der kinetischen Parameter geeignet. Um die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, wird jede zehnte Minute der Teil des Spektrums, in dem der Produktpeak entsteht, über 19 Stunden fluoreszenzspektroskopisch erfaßt. Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse der kinetischen Messungen mit α -Chymotrypsin.

Tab. 5.3: Kinetische Daten aus den Substratumsetzungen mit α -Chymotrypsin

	L-PheAMC	L-PheAFC	D-PheAMC	D-PheAFC
v_{\max} [mol/l·sec]	$1,53 \cdot 10^{-6}$	$1,34 \cdot 10^{-6}$	$4,25 \cdot 10^{-12}$	$4,19 \cdot 10^{-12}$
K_M [mol/l]	$2,62 \cdot 10^{-5}$	$2,41 \cdot 10^{-5}$	$6,11 \cdot 10^{-6}$	$4,98 \cdot 10^{-6}$

Die ermittelten Daten verdeutlichen, daß das Enzym sehr spezifisch auf die eingesetzten Substrate reagiert. Die niedrigen Michaelis-Menten-Konstanten zeigen, daß die Protease eine hohe Affinität zu den Coumarinsubstraten besitzt. Eine schnelle Umsetzung wird nur bei den L-Substraten gefunden. Die D-Coumarinderivate werden vom Enzym nicht hydrolysiert. Die Geschwindigkeitskonstante der D-Substrate ergibt sich aus deren langsameren Autoprotolysen im wäßrigen Medium. Beide L-Substrate werden mit nahezu identischer Geschwindigkeit umgesetzt, auch die K_M -Konstanten unterscheiden sich nur geringfügig. Die

Affinität der D-Substrate zum Enzym ist jedoch höher als die der L-Substrate, ausgedrückt durch ihre kleineren Michaelis-Menten-Konstanten.

5.7.2 Hemmung von α -Chymotrypsin

D-PheAMC und D-PheAFC werden aufgrund ihrer Konfiguration von α -Chymotrypsin nicht umgesetzt, beide Substrate weisen jedoch eine hohe Affinität zum Biokatalysator auf. Durch diese Eigenschaften der D-Substrate ist es möglich, daß die Enzymaktivität von α -Chymotrypsin gehemmt wird. Die unterschiedlichen Mechanismen der Enzymhemmung wurden in Kapitel 3.2.3 bereits ausführlich beschrieben.

In den folgenden Versuchsreihen wird deshalb die Hydrolyse von L-PheAMC und L-PheAFC mit variierenden Konzentrationen an D-PheAFC / D-PheAMC untersucht. Abbildung 5.21 zeigt die Lineweaver-Burk Auftragungen der Umsetzungen.

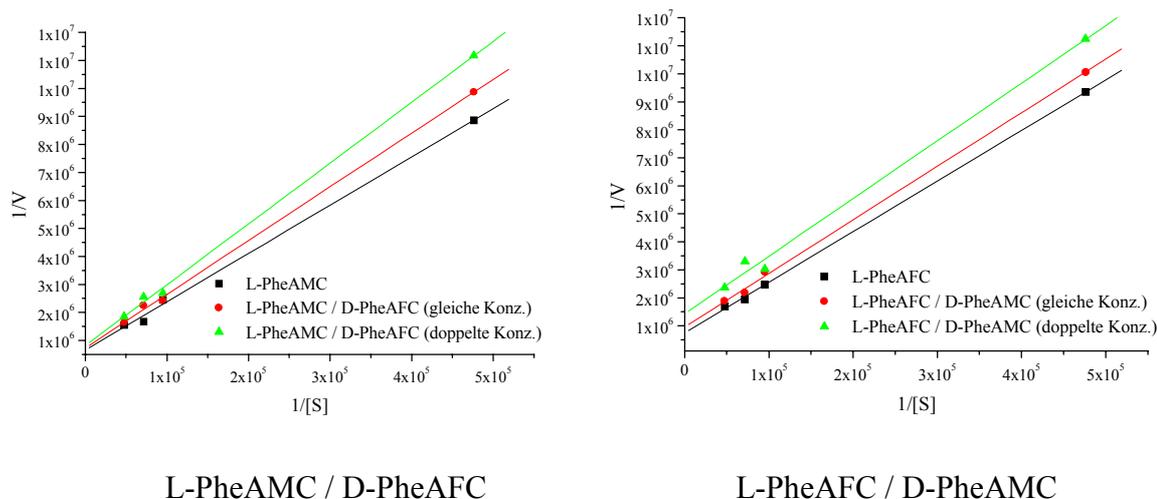


Abb. 5.21: Kompetitive Hemmung von L-PheAMC / L-PheAFC durch die eingesetzten D-Substrate

Aus den Lineweaver-Burk Auftragungen ist zu erkennen, daß mit steigender D-Substrat-Konzentration die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit beider L-Substrate erniedrigt wird. Die Maximalgeschwindigkeit bleibt jedoch konstant und die Michaelis-Menten-Konstante wird größer. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine kompetitive Hemmung für α -Chymotrypsin durch die eingesetzten Substrate D-PheAFC und D-PheAMC.

5.7.3 Bestimmung der kinetischen Daten der Esterase PLE

Für die Esterase PLE werden ebenfalls aus den einzelnen Umsetzungen der Coumarinsubstrate die kinetischen Parameter bestimmt. Tabelle 5.4 zeigt die Ergebnisse aus den einzelnen Hydrolysen.

Tab. 5.4: Kinetische Daten aus den Substratumsetzungen mit der Esterase PLE

	L-PheAMC	L-PheAFC	D-PheAMC	D-PheAFC
v_{\max} [mol/l·sec]	$1,43 \cdot 10^{-6}$	$2,27 \cdot 10^{-5}$	$1,34 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-5}$
K_M [mol/l]	$3,49 \cdot 10^{-5}$	$7,08 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-5}$	$5,51 \cdot 10^{-6}$

Die Esterase PLE ist im Gegensatz zur Protease α -Chymotrypsin in Bezug auf die Konfiguration der eingesetzten Substrate unspezifisch. Alle Coumarinderivate werden von ihr vollständig hydrolysiert. Die einzelnen Umsetzungen zeigen jedoch unterschiedliche Maximalgeschwindigkeiten und Michaelis-Menten Konstanten. Die Substrate mit dem Trifluoromethylsubstituenten AFC werden schneller hydrolysiert als die Substrate mit dem Methylsubstituenten AMC. Dieser Unterschied zeigt sich auch in den K_M -Konstanten, L- und D-PheAFC zeigen eine höhere Affinität zum eingesetzten Enzym, ausgedrückt durch die niedrigeren Michaelis-Menten Konstanten. Ueji *et al.* [1999] untersuchten die lipasekatalysierte Veresterung von Phenoxypropionsäure, welche entweder $-\text{CH}_3$ - oder $-\text{CF}_3$ -Substituenten hatten. Dort zeigte die methylsubstituierte Säure die niedrigeren K_M -Konstanten, welches im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen steht. Als Ursache für die höhere Affinität wird der Elektronendonatoreffekt der Methylgruppe beschrieben, welche die π -Elektronendichte im Phenylring des Substrates erhöht.

Ein Vergleich mit den kinetischen Parametern von α -Chymotrypsin zeigt, daß das Substrat L-PheAMC nahezu mit gleicher Maximalgeschwindigkeit von PLE umgesetzt wird. L-PheAFC wird von der Esterase schneller hydrolysiert. Die AMC-substituierten Coumarine zeigen gegenüber den AFC-Substraten bei α -Chymotrypsin niedrigere K_M -Konstanten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ueji *et al.* [1999].

5.8 Gleichzeitige enzymatische Umsetzung der Coumarinsubstrate im wäßrigen Medium

In den folgenden Untersuchungen werden die Fluorophorpaare L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC jeweils zusammen in gleicher Konzentration eingesetzt und im wäßrigen Medium enzymatisch gespalten. Die on-line erhaltenen Daten werden zusätzlich mit off-line genommenen Proben anhand der Enantiomerenüberschüsse, der Enantioselektivitäten und der Umsätze verglichen.

5.8.1 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in KPP

Für den Versuch werden 12 ml eines L-PheAMC / D-PheAFC-Gemisches (die Konzentration der Fluorophore beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in den 15 ml Reaktor gegeben. Danach werden 1000 U α -Chymotrypsin dem Reaktionsgemisch nativ zugefügt. Nach jedem aufgenommenen Spektrum wird eine Probe aus dem Reaktor entnommen und die Enantioselektivitäten, die Enantiomerenüberschüsse und der Umsatz bestimmt (Kapitel 8.10). Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.22 dargestellt.

Aus dem 2D-Spektrum 5.22 a ist zu erkennen, daß bei einem Einsatz beider Coumarinsubstrate in gleichen Konzentrationen nahezu keine Überlagerung der Fluoreszenzmaxima stattfindet. Es zeigt sich ein Maximum, welches mit dem Fluoreszenzmaximum von L-PheAMC alleine (Abbildung 5.10 a) vergleichbar ist. Es ist lediglich eine leichte Verschiebung in Richtung des D-Substrates zu höherer Wellenlängen bemerkbar. Diese Verschiebung wird durch die höhere FI des L-Substrates gegenüber dem D-Substrat hervorgerufen. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei $\lambda_{EX} = 325$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm mit einer relativen FI von 975. Durch die Enzymzugabe wird nur L-PheAMC umgesetzt, im Differenzspektrum 5.22 e wird deutlich, daß nur das Fluoreszenzmaximum von L-PheAMC nach der Zugabe von α -Chymotrypsin abnimmt, eine Verringerung des D-PheAFC-Peaks ist nicht erkennbar. Der im Differenzspektrum 5.22 e neu gebildete Peak bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm ist freigesetztem AMC zuzuordnen. Im weiteren Reaktionsverlauf zeigt sich, daß 60 Minuten nach Enzymzugabe nur das eingesetzte L-Substrat vollständig zu AMC hydrolysiert ist. Aufgrund der kompetitiven Hemmung der Protease durch D-PheAFC verzögert sich die Hydrolysegeschwindigkeit gegenüber der Einzelumsetzung. Ein Vergleich zwischen der Einzelumsetzung von L-PheAMC (Kapitel 5.6.1) und der Hydrolyse von

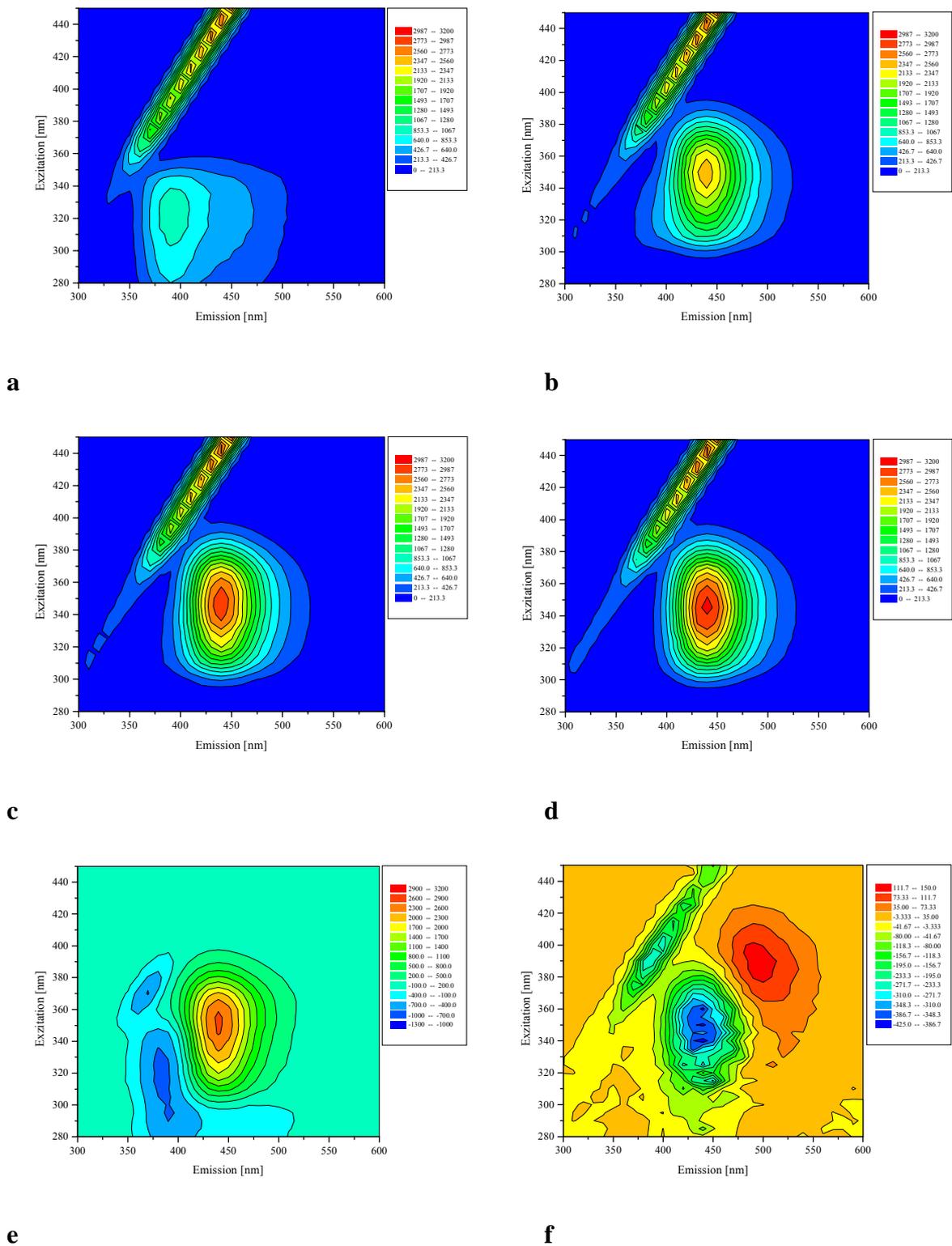


Abb. 5.22: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAMC und D-PheAFC mit α -Chymotrypsin
a: L-PheAMC/D-PheAFC in KPP
b: 15 Minuten nach Enzymzugabe
c: 30 Minuten nach Enzymzugabe
d: 60 Minuten nach Enzymzugabe
e: Differenzspektrum **d – a**
f: Differenzspektrum nach 24 Std.

L-PheAMC mit D-PheAFC, ausgedrückt über den FI-Anstieg von AMC, ist in Abbildung 5.23 dargestellt.

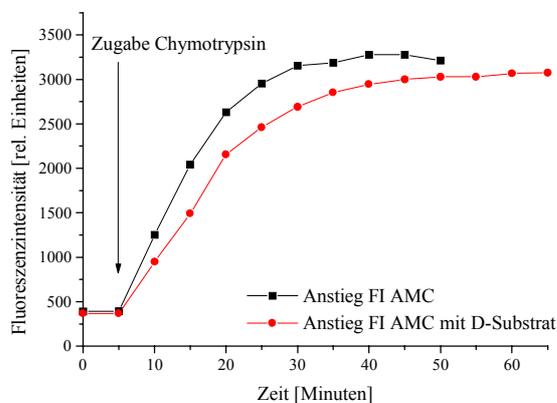


Abb. 5.23: Vergleich zwischen der AMC-Fluoreszenz bei der Einzelumsetzung von L-PheAMC (Kapitel 5.6.1) und bei gleichzeitigem Einsatz von L-PheAMC / D-PheAFC, detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{EM} = 440 \text{ nm}$

Während bei der Einzelumsetzung bereits nach 30 Minuten die Hydrolyse des L-Substrates abgeschlossen ist, ist bei der Reaktion von L-PheAMC mit D-PheAFC erst nach 40 Minuten kein Anstieg in der FI von AMC mehr zu erkennen. Durch die kompetitive Hemmung des D-Substrates am Enzym wird es dem L-Substrat erschwert freie Stellen im aktiven Zentrum der Protease zu finden. Dies drückt sich in einer verminderten Hydrolysegeschwindigkeit aus. Das Differenzspektrum 5.22 f zeigt, daß sich 24 Stunden nach der Enzymzugabe durch Autoprotolyse auch teilweise das D-Substrat umgesetzt hat, erkennbar durch den gebildeten AFC-Peak bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{EM} = 490 \text{ nm}$. Auch die Abnahme des D-PheAFC-Peaks bei $\lambda_{EX} = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_{EM} = 430 \text{ nm}$ ist deutlich sichtbar.

5.8.2 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAFC / D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP

Die Konzentration der Substrate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, die Reaktion wird mit der nativen Zugabe von 1000 U α -Chymotrypsin gestartet. Abbildung 5.24 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzung. Das Fluoreszenzmaximum der Fluorophore befindet sich bei $\lambda_{EX} = 325 \text{ nm}$ und $\lambda_{EM} = 390 \text{ nm}$ mit einer FI von 970. Fünf Minuten nach der Enzymzugabe zeigt sich, daß D-PheAMC nicht umgesetzt wird, nur der ansteigende AFC-Peak des hydrolysierten L-Substrates ist im 2D-Spektrum erkennbar.

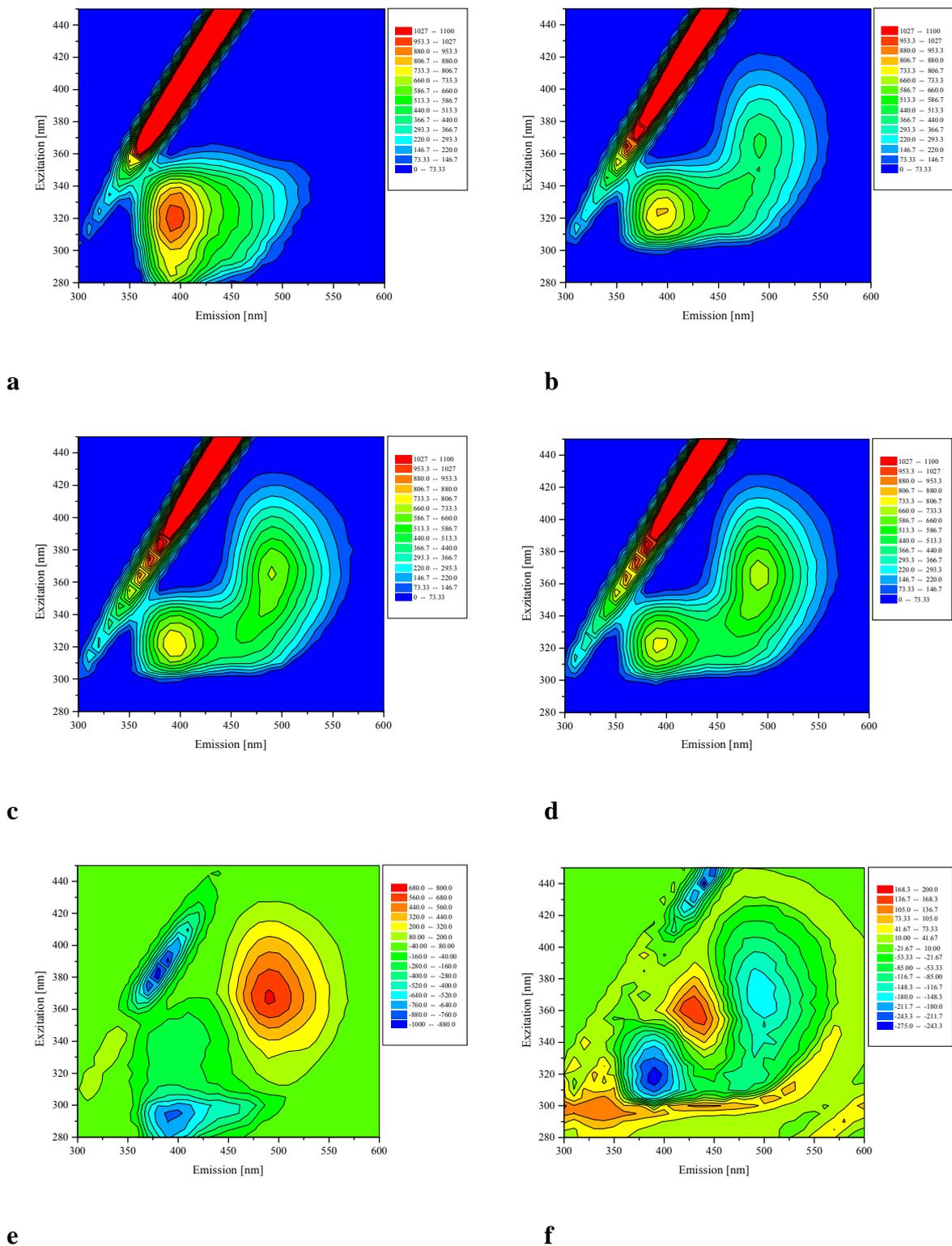


Abb. 5.24: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAFC und D-PheAMC mit α -Chymotrypsin
a: L-PheAFC/D-PheAMC in KPP
b: 5 Minuten nach Enzymzugabe
c: 15 Minuten nach Enzymzugabe
d: 40 Minuten nach Enzymzugabe
e: Differenzspektrum **d** – **a**
f: Differenzspektrum nach 24 Std.

Die Fluoreszenzmaxima von AFC und von D-PheAMC sind während des Reaktionsverlaufes in Abbildung 5.24 b – d getrennt voneinander sichtbar. Die L-Spezifität von α -Chymotrypsin wird im Differenzspektrum 5.24 e erneut bestätigt, nach 40 Minuten ist nur der angewachsene AFC-Peak bei $\lambda_{EX} = 365$ nm und $\lambda_{EM} = 490$ nm mit einer FI von 710 erkennbar. Durch das anwesende D-Substrat wird auch in diesem Fall die Hydrolysegeschwindigkeit aufgrund der kompetitiven Hemmung des Enzyms verringert. Abbildung 5.25 zeigt den Vergleich zwischen den anwachsenden Fluoreszenzmaxima von AFC in An- und Abwesenheit von D-PheAMC.

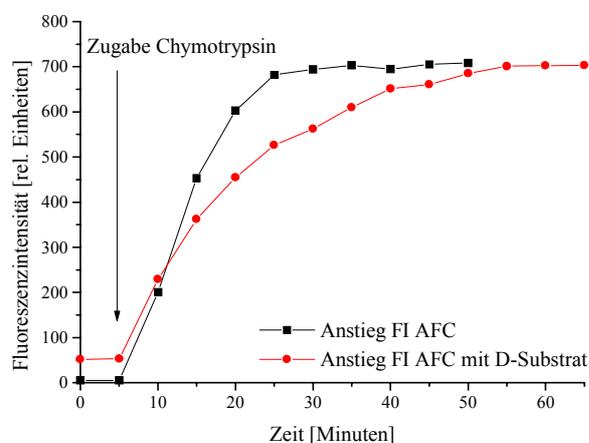


Abb. 5.25: Vergleich zwischen der AFC-Fluoreszenz bei der Einzelumsetzung von L-PheAFC (Kapitel 5.6.2) und bei gleichzeitigem Einsatz von L-PheAFC / D-PheAMC, detektiert bei $\lambda_{EX} = 365$ nm / $\lambda_{EM} = 490$ nm

In Abwesenheit von D-PheAMC wird das Coumarinsubstrat L-PheAFC nach ca. 30 Minuten vollständig zu AFC hydrolysiert. Durch die kompetitive Hemmung von α -Chymotrypsin durch das D-Substrat wird die Hydrolysegeschwindigkeit deutlich verringert. Erst nach ca. 45 Minuten ist kein Anstieg in der FI von AFC mehr erkennbar. In Differenzspektrum 5.24 f ist nach 24 Stunden der durch die Autoprotolyse begründete Anstieg des AMC-Peaks bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm gut sichtbar.

Durch die aus dem Reaktionsgemisch genommenen Proben werden im Anschluß die Enantiomerenüberschüsse der Produkte und Substrate, die Enantioselektivitäten und die Umsätze berechnet und verglichen.

5.8.3 Vergleich von eeS, eeP, E und U der Hydrolysen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in KPP

Abbildung 5.26 zeigt die Reaktionsverläufe der gleichzeitig eingesetzten Coumarinderivate mit α -Chymotrypsin.

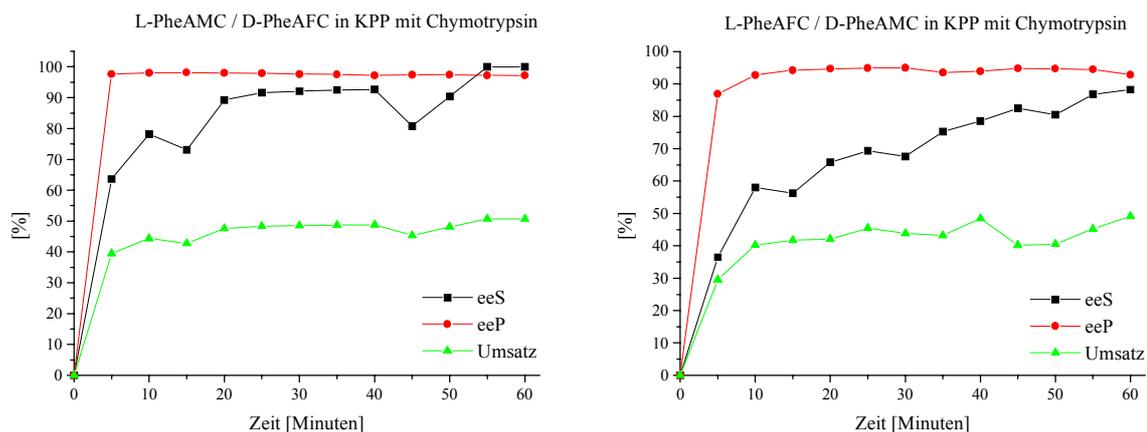


Abb. 5.26: Reaktionsverläufe der enzymatisch katalysierten Umsetzungen von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC in KPP

Die Ergebnisse zeigen, daß es sich in beiden Fällen um eine schnelle, sehr enantioselektive enzymatische Reaktion handelt. Bereits nach fünf Minuten liegen die Enantiomerenüberschüsse des Produktes bei über 94 %. Nur das L-Substrat wird jeweils umgesetzt, was mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie bereits on-line bestätigt werden konnte. Während der gesamten Reaktion liegen die eeP-Werte beständig über 94 %. Das Coumarinsubstrat L-PheAMC besitzt eine kleinere K_M -Konstante als das Substrat L-PheAFC. Durch die höhere Affinität zum Enzym steigen die eeS-Werte für L-PheAMC schneller an als für L-PheAFC. Die Umsätze liegen in beiden Fällen bei ca. 50 %, somit wird nur ein pseudo-Substratenantiomer komplett in das Produktenantiomer umgesetzt. Für die Enantioselektivität E ergibt sich nach 60 Minuten bei der Umsetzung von L-PheAFC / D-PheAMC ein Wert von 211, für die enzymatische Hydrolyse von L-PheAMC / D-PheAFC ein Wert von 188.

Abbildung 5.27 zeigt einen Vergleich zwischen der on-line gemessenen Zunahme der FI von AFC und AMC und den off-line bestimmten Umsätzen der beiden Reaktionen. Auch hier zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den on-line und off-line gemessenen Daten. Die Kurvenverläufe zeigen eine gute Übereinstimmung, da der Umsatz nur durch die Hydrolyse der L-Substrate bestimmt wird.

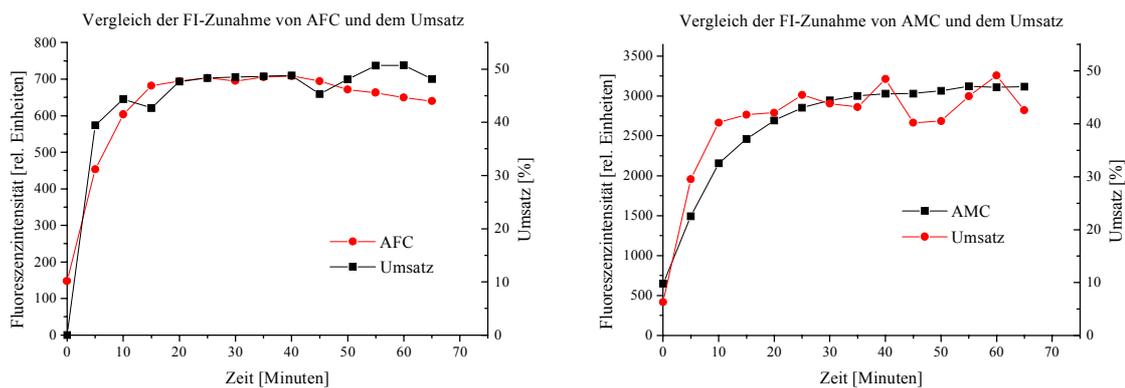


Abb. 5.27: Vergleich zwischen den on-line/off-line gewonnenen Daten der Hydrolysen von L-PheAFC/D-PheAMC und L-PheAMC/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in KPP

Die Ergebnisse aus der gleichzeitigen Umsetzung der Coumarinsubstrate ergeben, daß die Reaktionen mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie on-line verfolgt werden können. Die on-line gewonnenen Daten stimmen sehr gut mit den off-line Daten überein, in beiden Fällen kann die L-Spezifität der Protease α -Chymotrypsin bestätigt werden.

In den folgenden Untersuchungen wird der gleichzeitige Einsatz der Coumarinderivate mit der Esterase aus *Porcine liver* on-line-analytisch verfolgt.

5.8.4 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit der Esterase PLE

Die Konzentration der Coumarine L-PheAMC / D-PheAFC beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. 12 ml des Substratgemisches werden in den 15 ml Reaktor vorgelegt und die Reaktion durch die native Zugabe von 1000 U der Esterase gestartet. Abbildung 5.28 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzungen von L-PheAMC und D-PheAFC in KPP. 25 Minuten nach der Enzymzugabe ist ein Peak mit einer FI von 1833 entstanden, welcher dem Produkt AMC zugeordnet werden kann (Abbildung 5.28 b). Das Differenzspektrum 5.28 c zeigt jedoch eine starke Ausdehnung in Richtung höherer Wellenlängen, zum Produkt AFC. Eine Stunde nach der Zugabe von PLE ist nur der Produktpeak von AMC erkennbar, im Differenzspektrum 5.28 e ist ebenfalls nur das Fluoreszenzmaximum von AMC detektierbar. Die kinetischen Untersuchungen mit der Esterase zeigen, daß das D-Substrat schneller umgesetzt wird als das L-Substrat. Die Verschiebungen in Richtung höherer Wellenlängen können durch bereits

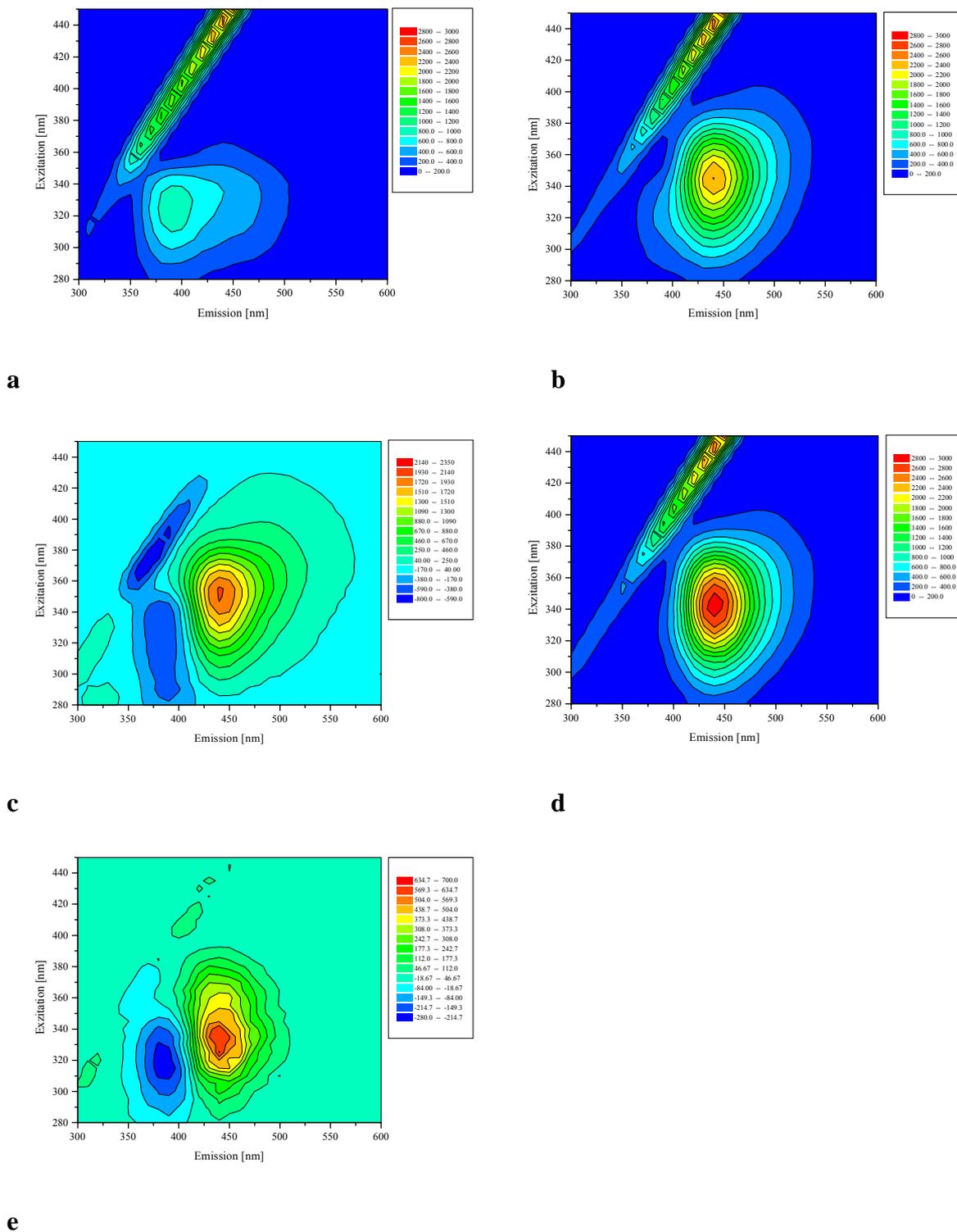


Abb. 5.28: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAMC und D-PheAFC mit PLE

a: L-PheAMC/D-PheAFC in KPP

b: 25 Minuten nach Enzymzugabe

c: Differenzspektrum **b** – **a**

d: 1 Stunde nach Enzymzugabe

e: Differenzspektrum **d** – **b**

entstandenes AFC hervorgerufen werden, da offensichtlich D-PheAFC schneller hydrolysiert wird als L-PheAMC. Im späteren Differenzspektrum 5.28 e ist eine solche Verschiebung nicht erkennbar. Das Problem ist die dreifach höhere FI von AMC, die das Fluoreszenzmaximum von AFC im 2D-Spektrum überdeckt. Eine eindeutige Zuordnung welches Substrat von dem unspezifischen Enzym zuerst umgesetzt wird ist somit schwierig. Auch die kinetischen Parameter unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. In Abbildung 5.29 sind deshalb die während der Hydrolyse anwachsenden Peakflächen von AMC und AFC aus den HPLC-Untersuchungen gegeneinander aufgetragen.

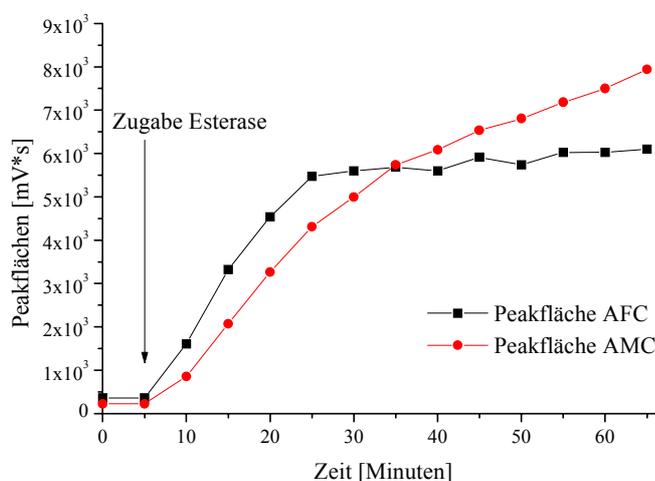


Abb. 5.29: Vergleich der Zunahme der Peakflächen von AMC und AFC

Der Vergleich zeigt, daß die Peakfläche des Produktes AFC schneller ansteigt als die vom Produkt AMC. Nach 25 Minuten ist kein weiterer Anstieg von AFC mehr erkennbar, das Substrat D-PheAFC wurde somit vollständig hydrolysiert. Nach 25 Minuten ist die Hydrolyse des L-Substrates jedoch noch nicht abgeschlossen, die AMC-Peakfläche nimmt weiterhin zu. Die Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse aus den kinetischen Untersuchungen und aus der on-line Analytik. Das Substrat D-PheAFC wird gegenüber L-PheAMC von der Esterase PLE schneller umgesetzt.

5.8.5 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAFC / D-PheAMC mit der Esterase PLE

12 ml des Coumaringemisches ($c = 2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) werden in den Reaktor gegeben und die Reaktion durch die native Zugabe von 1000 U PLE gestartet. Abbildung 5.30 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Hydrolyse.

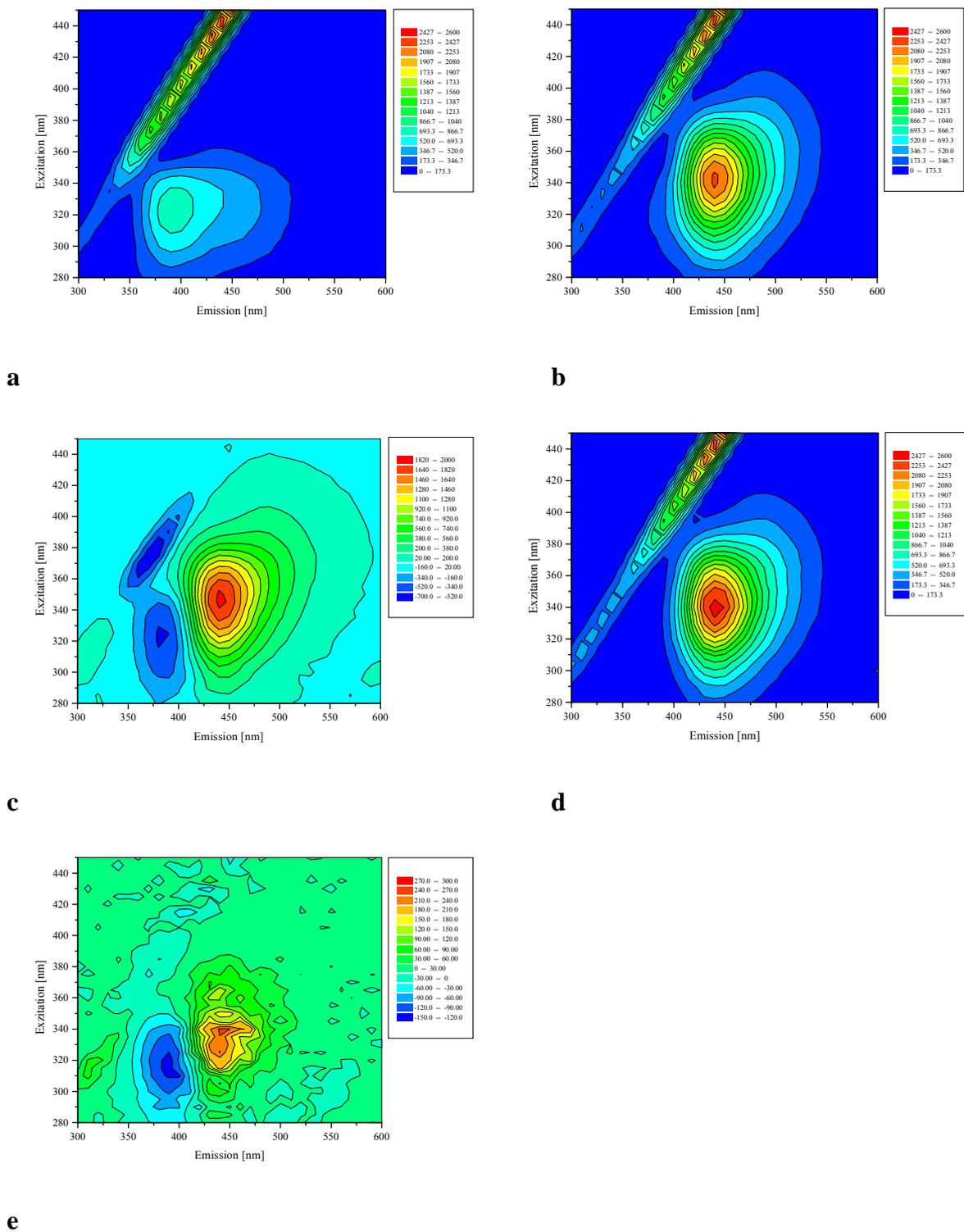


Abb. 5.30: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAFC und D-PheAMC mit PLE

a: L-PheAFC/D-PheAMC in KPP

b: 35 Minuten nach Enzymzugabe

c: Differenzspektrum **b** – **a**

d: 1 Stunde nach Enzymzugabe

e: Differenzspektrum **d** – **b**

Aus den 2D-Spektren ergibt sich ein ähnlicher Reaktionsverlauf wie aus der vorherigen Umsetzung. In Abbildung 5.30 b zeigt sich 35 Minuten nach der Enzymzugabe ein ausgeprägtes Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 440$ nm, welches dem Produkt AMC zugeordnet werden kann. Jedoch zeigt sich auch hier bereits eine starke Ausdehnung in Richtung höherer Wellenlängen. Diese Ausdehnung zum Spaltprodukt AFC ist auch im Differenzspektrum 5.30 c gut zu erkennen. Eine Stunde nach der Enzymzugabe zeigt sich im Differenzspektrum 5.30 e nur noch ein geringer Anstieg des AMC-Produkts, eine Verschiebung in Richtung AFC ist nicht zu erkennen. Wahrscheinlich wird zuerst das Substrat L-PheAFC von der Esterase umgesetzt. Dieses Ergebnis würde von den kinetischen Untersuchungen bestätigt werden, denn hier besitzt L-PheAFC eine höhere Maximalgeschwindigkeit und eine geringere K_M -Konstante gegenüber D-PheAMC (Tabelle 5.4). Abbildung 5.31 zeigt die Auftragung der Peakflächen der Produkte AFC und AMC aus den HPLC-Untersuchungen.

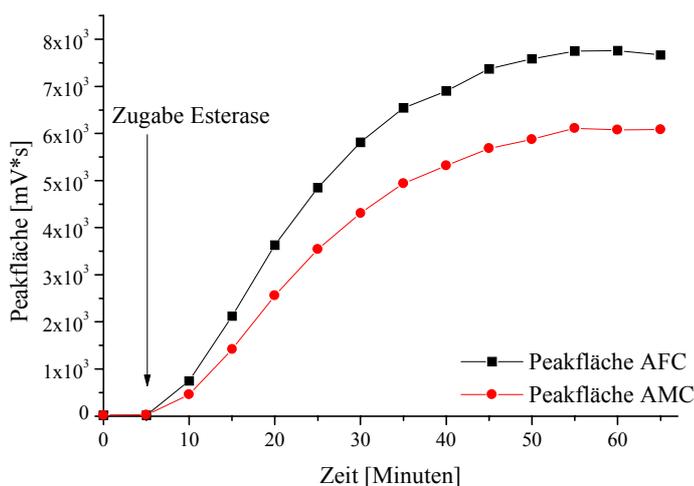


Abb. 5.31: Vergleich der Zunahme der Peakflächen von AMC und AFC

Aus den Zunahmen der Peakflächen läßt sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, welches Substrat von der Esterase eher umgesetzt wird. Die Peakfläche von AFC steigt geringfügig schneller an, jedoch ist bei beiden Kurven nach ca. 45 Minuten kein großer Anstieg mehr erkennbar. Die Reaktion läßt sich on-line analytisch verfolgen, jedoch liegen die kinetischen Parameter der Substrate und die Fluoreszenzmaxima der Produkte im 2D-Spektrum zu nahe beieinander, um der Esterase PLE eine eindeutige Spezifität zuzuordnen.

5.8.6 Vergleich von eeS, eeP, E und U der Hydrolysen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC mit der Esterase PLE in KPP

Abbildung 5.32 zeigt die Reaktionsverläufe der gleichzeitig eingesetzten Coumarinderivate mit der Esterase PLE.

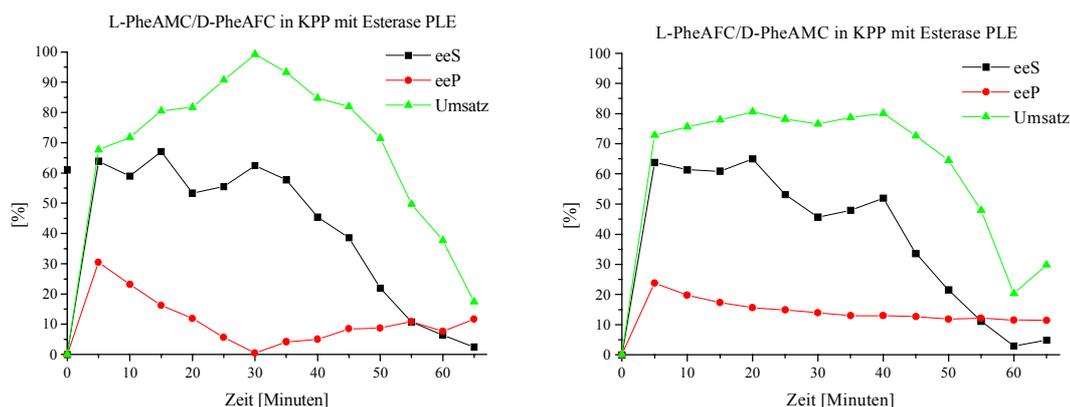


Abb. 5.32: Reaktionsverläufe der enzymatisch katalysierten Umsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC in KPP

In beiden Fällen steigt der Umsatz zunächst an (25. Minute, 35. Minute), danach fällt er ab. Zuerst wird bevorzugt das pseudo-Enantiomer (in beiden Fällen das Coumarinderivat mit dem AFC-Substituenten) hydrolysiert, danach wird das weniger bevorzugte Coumarinsubstrat schneller umgesetzt, da das Reaktionsgemisch am AFC-substituierten pseudo-Enantiomer immer weiter verarmt. Somit sinkt der Umsatz wieder, da der Substratenantiomerenüberschuß schneller abnimmt. Die Berechnung des Umsatzes über die Enantiomerüberschüsse wird in Kapitel 8.10 genauer erklärt. Die zuerst ansteigenden, danach abfallenden Umsatzverläufe zeigen, daß die Bestimmung des Umsatzes bei nichtselektiven Reaktionen problematisch ist. Die Enantiomerenüberschüsse der Produkte liegen in beiden Fällen nach einer Stunde bei 10 %, die eeS-Werte steigen nach fünf Minuten jeweils auf ca. 65 % an, fallen danach jedoch kontinuierlich ab. Dies kann so interpretiert werden, daß das Enzym am Anfang der Reaktion noch eine gewisse Unterscheidung zwischen den Substraten trifft, diese jedoch im Laufe der Umsetzung abnimmt. Die Enantioselektivitäten E liegen bei der Umsetzung von L-PheAMC / D-PheAFC bei 1,3 und bei der Hydrolyse von L-PheAFC / D-PheAMC bei 1,32. Diese Ergebnisse bestätigen die unselektiven Umsetzungen der Coumarinderivate mit der Esterase PLE, die bereits aus den on-line Untersuchungen ersichtlich wurden. Eine on-line Verfolgung

der Coumarinsubstrate mit der Esterase PLE im wäßrigen System ist somit möglich, jedoch kann keine eindeutige Aussage über die Selektivität des Enzyms getroffen werden.

5.9 Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse der Coumarin-substrate in organischen Lösemitteln

Die Ergebnisse aus den Umsetzungen im wäßrigen Medium zeigen, daß die Hydrolyse der Coumarinderivate on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden kann. Die Reaktion wird im Anschluß auf organische Lösemittel übertragen. Durch die Änderung des Reaktionsmediums kann die Enantioselektivität der eingesetzten Enzyme beeinflusst werden [Kise und Nagashima; 1993]. Der Einsatz von Enzymen in organischen Lösemitteln mit geringem Wassergehalt kann die Konformation des Katalysators verändern, was zu möglichen Veränderungen in der Substratspezifität des Enzyms führen kann [Nagashima *et al.*; 1992]. Mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz wäre es möglich, eine solche Änderung in der Enantioselektivität des Biokatalysators on-line zu erfassen.

Da die eingesetzte Protease α -Chymotrypsin sehr selektiv auf das L-Coumarinsubstrat reagiert, ist es eher unwahrscheinlich, die Spezifität des Enzyms durch die Änderung des Mediums beeinflussen zu können. Unmöglich ist eine solche Verschiebung in der Selektivität jedoch nicht, so konnten Mansson *et al.* [1992] die vorher unmögliche Synthese von N-acetyl-D-tryptophaneethylester durch Veränderungen in der Konformation von α -Chymotrypsin durchführen.

Es ist wahrscheinlicher, die unselektive Esterase PLE durch die Medienumstellung in ihrer Selektivität beeinflussen zu können, so konnte durch Veränderungen im Wassergehalt bei Umesterungen mit der Esterase PLE in Toluol die Enantioselektivität und Aktivität des Biokatalysators verändert werden [Ruppert und Gais; 1997]. Ke und Klibanov [1999] beeinflussten die Enantioselektivität von Enzymen in organischen Lösemitteln durch Veränderungen in der Substratstruktur. Durch den Einsatz von sterisch anspruchsvollen Gegenionen bei dem weniger reaktiven Enantiomer konnte die Enantioselektivität des Biokatalysators erhöht werden. Diese Methode wird auch in dieser Arbeit angewandt. Durch die Synthese von Coumarinsubstraten mit unterschiedlich großen Gegenionen (Prof. H. H. Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover) wird eine Veränderung in der Selektivität der Esterase verursacht, die on-line detektiert werden kann. Während im wäßrigen Medium die eingesetzten Substratsalze sofort dissoziieren, bleiben die Coumarinsubstrate mit

ihren Gegenionen im organischen Lösemittel zusammen und üben so durch ihre unterschiedlichen Größen einen Einfluß auf die Enantioselektivität des Biokatalysators aus.

5.9.1 Auswahl der Lösemittel

Die theoretischen Grundlagen über die Auswahlmöglichkeiten und die Einflüsse des Lösemittels bei enzymatischen Umsetzungen sind in Kapitel 3.5 behandelt worden. Als Kriterium zur Auswahl des Lösemittels wird das von Laane [1987] aufgestellte log-P Konzept auf die Modellreaktionen angewandt. Gleichzeitig werden Lösemittelsysteme benutzt, für die bereits enzymatische Umsetzungen mit α -Chymotrypsin und PLE in der Literatur beschrieben wurden [Laszlo und Simon; 1998]; [Mansson *et al.*; 1992]; [Mozhaev; 1998]; [Castro; 1999]; [Partridge *et al.*; 1999] und [Ruppert und Gais; 1997]. Außerdem müssen die Coumarinsubstrate eine gute Löslichkeit in den Lösemittelsystemen aufweisen.

In Abbildung 5.33 läßt sich der Einfluß des Lösemittels auf die enzymatische Umsetzung von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin ablesen, es ist dort die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse gegen den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im Oktanol/Wasser System ($\log P$) aufgetragen. Des weiteren sind zur weiteren Verdeutlichung des Lösemittelinflusses die Auftragungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen die Dielektrizitätskonstante (Abb. 5.34) und gegen das Dipolmoment (Abb. 5.35) dargestellt [Castro; 1999].

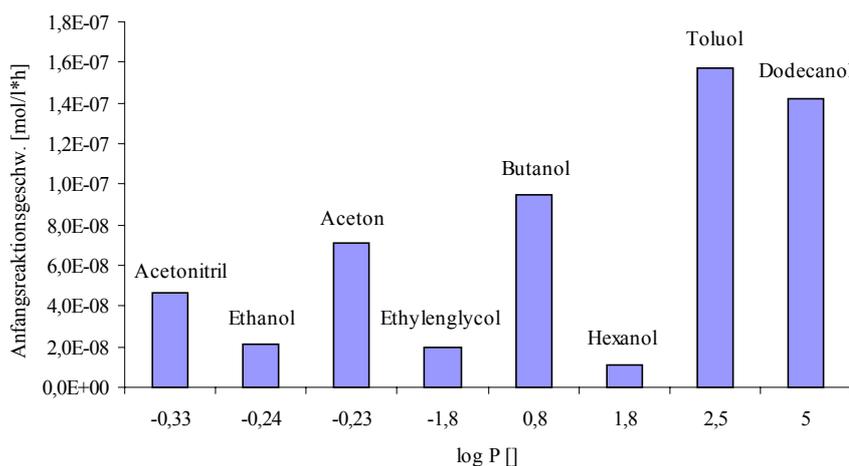


Abb. 5.33: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin vom $\log P$ des Lösemittels; Werte für $\log P$ aus [Laane; 1987]

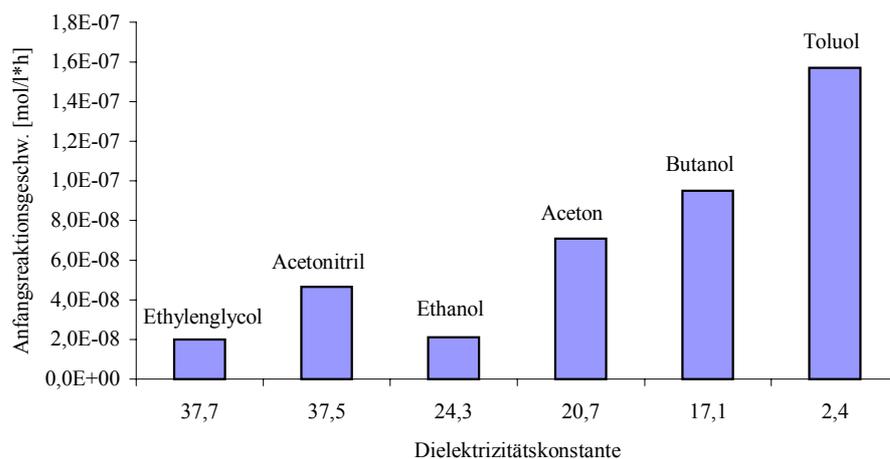


Abb. 5.34: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin von der Dielektrizitätskonstante ϵ des Lösemittels; Werte für ϵ aus [Reichardt; 1973]

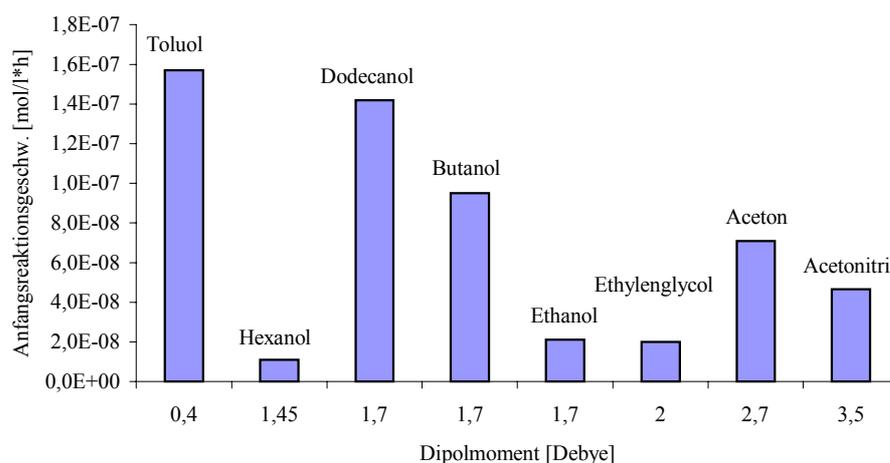


Abb. 5.35: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin vom Dipolmoment des Lösemittels; Werte für das Dipolmoment aus [Reichardt; 1973] und [Daubert und Danner; 1989]

Die Konzentration von L-PheAMC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, den verschiedenen Lösemitteln werden jeweils 0,5 % KPP (0,5 M, pH 7,6) zugemischt, um die Hydrolyse des Substrates zu gewährleisten. Die Temperatur während der Hydrolyse beträgt 30°C , höhere Temperaturen würden Aktivitätsverluste verursachen [Partridge *et al.*; 1999]. Aufgrund des geringen Wassergehalts in den Systemen wird keine Autoprotolyse der Coumarinsubstrate beobachtet.

Das log P Konzept kann durch die Ergebnisse weitgehend bestätigt werden, da in Lösemitteln mit einem hohem log P-Wert die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei der Hydrolyse des L-Substrates zu verzeichnen sind. Die gefundene Korrelation steht im Einklang mit Literaturdaten [Okazaki *et al.*; 1997]; [Levitsky *et al.*; 2000]. Physikochemische Eigenschaften der Lösemittel wie die Dielektrizitätskonstante und das Dipolmoment werden häufig zur Vorhersage der Enzymaktivität und -löslichkeit in nichtwässrigen Medien genutzt [Laane *et al.*; 1987]; [Laroute und Willemot; 1992]; [Castro; 1999]. Eine Korrelation mit der Dielektrizitätskonstante und dem Dipolmoment läßt sich teilweise finden, Toluol verzeichnet mit der niedrigsten Dielektrizitätskonstante und dem niedrigsten Dipolmoment die höchste Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Für Dodecanol und Hexanol sind keine Literaturwerte für die Dielektrizitätskonstante und das Dipolmoment vorhanden. Alle Interaktionen in Proteinen sind elektrostatischen Ursprungs, so daß die Dielektrizitätskonstante ϵ des eingesetzten Lösemittels einen Einfluß auf das Enzym ausübt. Enzyme sind in Lösemitteln mit hohem ϵ flexibler als in Lösemitteln mit niedrigem ϵ [Narayan und Klibanov; 1993]. Diese Flexibilität kann sich auf die Aktivität des Katalysators unterschiedlich auswirken. Zum einen können z.B. die Interaktionen zwischen dem Enzym und dem Substrat erleichtert werden, zum anderen kann der Biokatalysator in dem Lösemittel schneller denaturieren. Die Ergebnisse in der Literatur zeigen, daß Vorhersagen über die Aktivität des Enzyms in einem nichtwässrigen Medium durch die physikochemischen Parameter nur bedingt möglich sind. Jedoch konnten Narayan und Klibanov [1993] ihre experimentellen Befunde besser mit dem Dipolmoment und der Dielektrizitätskonstante erklären, verglichen mit dem log P-Kriterium. Der Einfluß des Lösemittels auf die essentielle Wasserschicht in der Umgebung des Enzyms sowie die Wasseraktivität lassen sich ebenfalls nur schwer abschätzen.

Da in dieser Versuchsserie mit α -Chymotrypsin die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Toluol erzielt werden, werden alle weiteren Experimente in diesem Lösemittel durchgeführt. Für die Esterase PLE finden sich in der Literatur nur wenige Lösemittelsysteme, u.a. beschreiben Jungen und Gais [1999] die Veresterung von Glycerolketalen in Toluol mit PLE, welches mit Methoxypolyethylenglycol (MPEG) colyophilisiert wurde. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung von L-PheAMC mit PLE in Toluol bei 30° C beträgt $4,99 \cdot 10^{-8}$ mol/l·h.

Bei allen Lösemitteln, außer bei Aceton und Toluol, zeigt sich nur eine geringfügige Verschiebung der Fluoreszenzmaxima der Substrate, Produkte und des Enzyms im 2D-Spektrum. Dies läßt auf keine oder nur wenige Konformationsveränderungen bei dem Biokatalysators schließen [Castro; 2000]. Bei der Verwendung von Aceton und Toluol als

Lösemittel liegt der Substratpeak im Fluoreszenzspektrum in beiden Fällen so stark an der Rayleighbande, das ein Maximum nicht detektiert werden kann. Auch die Fluoreszenzmaxima des eingesetzten Enzyms verschieben sich geringfügig, so daß hier Änderungen in der Konformation des Katalysators nicht auszuschließen sind.

5.9.2 Stabilität von α -Chymotrypsin und PLE in KPP und Toluol

Für die eingesetzten Biokatalysatoren α -Chymotrypsin und Esterase PLE wird im Anschluß der mögliche Aktivitätsverlust durch Konformationsänderungen im Enzym untersucht. Dazu werden jeweils 400 U des Enzyms in KPP (25° C) und Toluol (30° C) wie folgt behandelt:

- Nativ eingesetzt in KPP als Referenz
- In 1 ml 0,5 M KPP (pH 7,6) gelöst
- In Toluol 140 Minuten geschüttelt
- In 1 ml 0,5 M KPP (pH 7,6) 25 Stunden geschüttelt
- In Toluol 25 Stunden geschüttelt
- In 1 ml 0,5 M KPP (pH 7,6) 5 Tage geschüttelt
- In Toluol 5 Tage geschüttelt

Die Bestimmung der Aktivität erfolgt mit der pH-Stat Methode (Kap. 8.9), Abbildung 5.36 und 5.37 stellen die Ergebnisse der in Doppelbestimmungen ermittelten Aktivitäten dar.

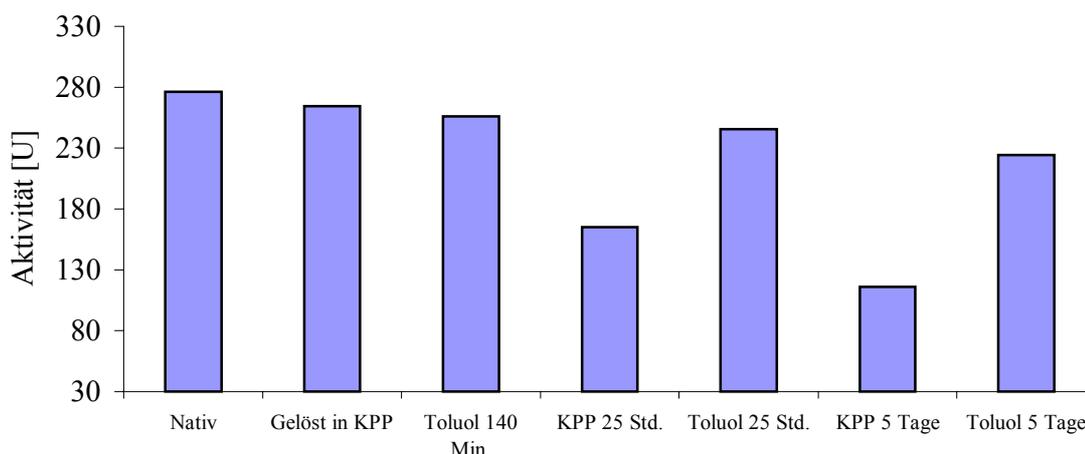


Abb. 5.36: Aktivität von α -Chymotrypsin in Abhängigkeit vom Lösemittel

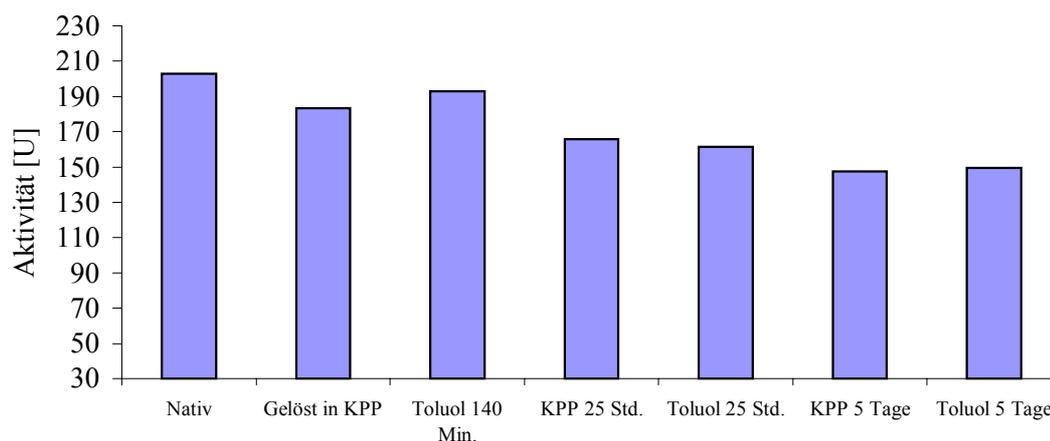


Abb. 5.37: Aktivität der Esterase PLE in Abhängigkeit vom Lösemittel

Ein Einsatz von α -Chymotrypsin in Toluol bei 30° C für fünf Tage führt zu einem Aktivitätsverlust von rund 19 %. Im Gegensatz dazu zeigt das Enzym in KPP nach fünf Tagen einen Aktivitätsverlust von rund 58 %. Ein solcher Aktivitätsverlust vom Biokatalysator bei einer längeren Lagerung in KPP wurde auch schon von Hartmann [1999] beobachtet. In Systemen mit einem geringem Wassergehalt wird die Stabilität des Enzyms durch kinetische Faktoren beschrieben [Zaks und Klibanov; 1988]. Aufgrund der Abwesenheit von hydrophoben Effekten ist die native Form instabil gegenüber der Denaturation. Durch den geringen Wassergehalt im System kann die Struktur jedoch auch starr werden, so daß die Auffaltung der Enzymstruktur stark verlangsamt wird. Partridge *et al.* [1999] beschreiben einen solchen Fall für α -Chymotrypsin in 70 % Acetonitril. Wurde der Volumenanteil an organischem Lösemittel auf 30 – 50 % gesenkt, beschleunigte sich die Denaturation des Biokatalysators beträchtlich. Der Aktivitätsverlust der Esterase in Toluol liegt nach fünf Tagen bei rund 26 %, ein erheblicher Unterschied in den Aktivitäten in Toluol und KPP nach fünf Tagen wird hier nicht beobachtet. Die Aktivität der Esterase liegt in allen Fällen unter der Aktivität von α -Chymotrypsin. Prinzipiell zeigen beide Enzyme Einbußen in ihren Aktivitäten bei einem Einsatz in Toluol, diese führen aber nicht so weit, daß keine Katalyse mehr stattfindet.

Die Versuche zeigen, daß α -Chymotrypsin in Toluol eine gute Reaktionsgeschwindigkeit aufweist und auch nach fünf Reaktionstagen nur geringe Aktivitätsverluste im organischen Medium mit einem geringen Wassergehalt zu beobachten sind. Für die Esterase PLE ist der Aktivitätsverlust in Toluol höher und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse geringer, deshalb werden im Anschluß weitere Untersuchungen zur Aktivitäts- und

Stabilitätserhöhung der Esterase in Toluol durchgeführt. Ruppert und Gais [1997] beschreiben die Colyophilisation von PLE mit Methoxypolyethylenglycol (MPEG), der Katalysator PLE/MPEG zeigte dabei eine erhöhte Aktivität und Stabilität bei Umesterungen in Toluol. Des weiteren wird PLE auf Eupergit C immobilisiert [Laumen *et al.*; 1985] und in Toluol eingesetzt. Abbildung 5.38 zeigt den Vergleich zwischen den Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolysen von L-PheAMC ($2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in Toluol bei 30° C mit den verschiedenen Enzymvorlagen, dabei werden jeweils 1000 U Katalysator und 1 % KPP verwendet.

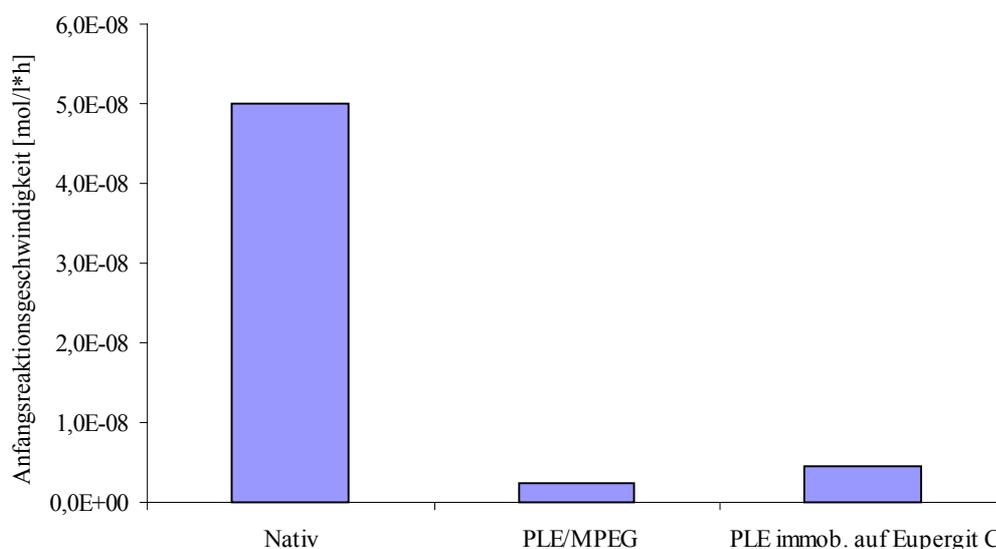


Abb. 5.38: Abhängigkeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von L-PheAMC in Toluol von PLE, PLE/MPEG und PLE immobilisiert auf Eupergit C

Die Ergebnisse zeigen, daß die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse des Coumarinsubstrates L-PheAMC bei einem nativen Einsatz der Esterase PLE erheblich höher liegt als bei dem immobilisierten Enzym und bei PLE/MPEG. Da das Ziel dieser Arbeit auf die on-line Analytik der Umsetzungen der Coumarinsubstrate ausgerichtet ist, sind lange Hydrolysezeiten unvorteilhaft. Somit wird in den weiteren Untersuchungen die Esterase PLE nativ eingesetzt.

5.9.3 Einfluß des Wassergehaltes im Gesamtsystem auf die Hydrolysegeschwindigkeit

Auf den Einfluß des Wassergehalts auf die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen wurde bereits in Kapitel 3.5.2 eingegangen. Durch die Variation der Wassermenge bei gleichbleibender Enzym- und Substratkonzentration sollen im Anschluß die Maxima der Hydrolysegeschwindigkeiten für α -Chymotrypsin und die Esterase PLE detektiert werden. Die Substratkonzentration von L-PheAMC beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, es werden jeweils 1000 U Enzym eingesetzt und die Wassermenge (KPP, 0,5 M, pH 7,6) von 0,2 – 3 % variiert. Abbildung 5.39 zeigt die Ergebnisse der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolysen von L-PheAMC als Funktion des Wassergehalts.

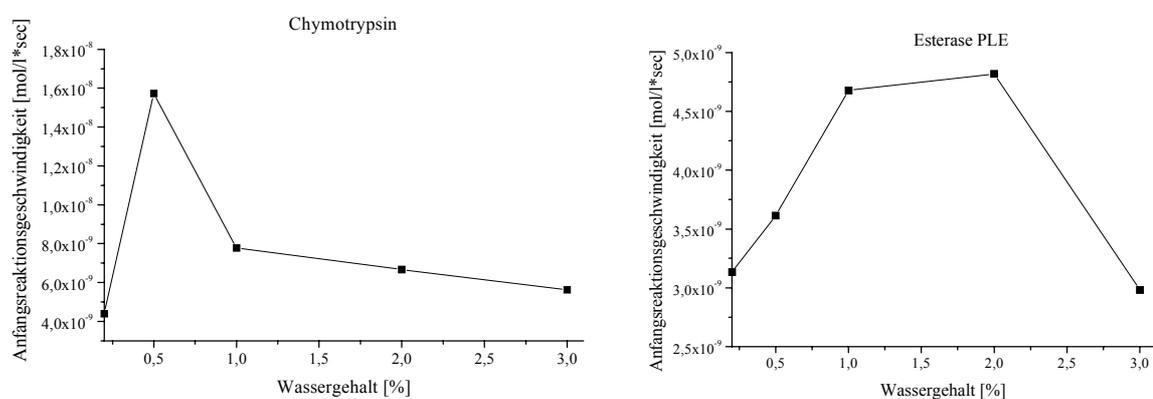


Abb. 5.39: Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Hydrolysen von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin und Esterase PLE als Funktion des Wassergehalts

Für die Protease α -Chymotrypsin ergibt sich das Maximum der Hydrolysegeschwindigkeit bei einem Wassergehalt von 0,5 %. Das Maximum der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung mit der Esterase findet sich bei einem Wassergehalt von 2 %. In beiden Versuchen wird bei einem Wassergehalt von höher als 1 % das Ausbilden einer zweiten flüssigen Phase an der Oberfläche des Reaktors beobachtet, welche neben Wasser auch eine unbestimmte Menge an Enzym beinhaltet. Deshalb wird für alle weitere Umsetzungen mit der Esterase PLE ein Wassergehalt von 1 % verwendet. Ruppert und Gais [1997] beschreiben ebenfalls eine Abnahme in der Reaktionsgeschwindigkeit bei Veresterungen von verschiedenen Alkoholen mit Vinylpropionat, mit PLE/MPEG in Toluol mit steigendem Wassergehalt im Gesamtsystem, verursacht durch den Aktivitätsverlust des Biokatalysators.

Während der Reaktion stieg die Aktivität des Enzyms wieder an, da durch die enzymatische Hydrolyse des Acyldonors der Wassergehalt im System erniedrigt wurde. Auch die Enantioselektivität der Esetrase wurde durch die Wassermenge im Gesamtsystem beeinflusst, mit steigendem Wassergehalt stieg auch die Spezifität des Enzyms an. Die Autoren erklärten dies durch eine höhere Flexibilität des Enzyms aufgrund erhöhter Hydratation des Biokatalysators.

5.10 Messung der Wasseraktivität bei der Umsetzung von L-PheAMC mit PLE

In Kapitel 3.5.2 wurde bereits dargestellt, daß der Wassergehalt in einem System wenig über die Verteilung des Wassers zwischen dem Enzym, dem Lösemittel und den Reaktanten aussagt. Die Wasseraktivität a_w kann hier als aussagekräftiger Parameter zu Nutze gezogen werden. Für Messungen der Wasseraktivität bieten sich Feuchtesensoren an, mit ihnen kann die relative Feuchte in Gasphase über einem Reaktionsgemisch gemessen werden, welche aufgrund der beschriebenen theoretischen Zusammenhänge direkt der Wasseraktivität entspricht. Wird durch eine Reaktion Wasser gebildet oder verbraucht ändert sich die relative Feuchte im System, diese Veränderungen können durch die eingesetzten Feuchtesensoren gemessen werden.

Im nächsten Versuch wird das Substrat L-PheAMC ($2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) durch α -Chymotrypsin (1000 U) in Toluol (30° C, 0,5 % KPP) hydrolysiert und die Reaktion fluoreszenzspektroskopisch über den FI-Anstieg von AMC verfolgt. Die Detektion von AMC erfolgt bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm. Durch die gleichzeitige on-line Erfassung der Wasseraktivität soll der Reaktionsverlauf der Hydrolyse der Coumarinderivate ebenfalls verfolgt werden. Als Meßgerät dient ein Feuchtesensor mit integriertem Temperaturfühler der Firma Rotronic. Laut Herstellerangaben ist der Sensor geeicht. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 5.40 dargestellt, Abbildung 5.41 ist die Wasseraktivität und die ansteigende FI von AMC als Funktion der Zeit aufgetragen.

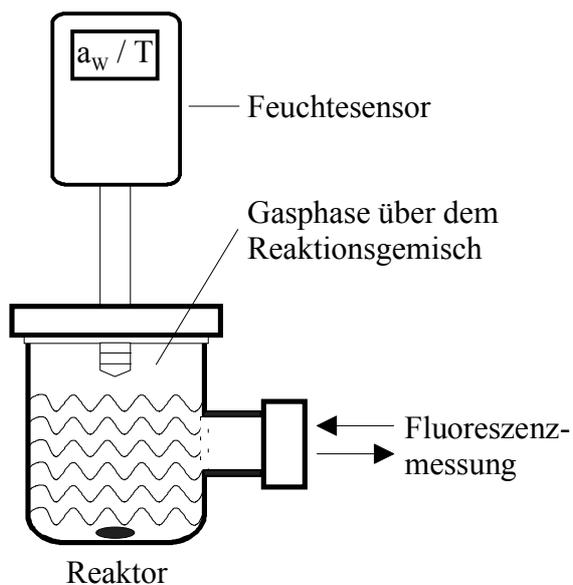


Abb. 5.40: Versuchsaufbau zur Messung der Wasseraktivität

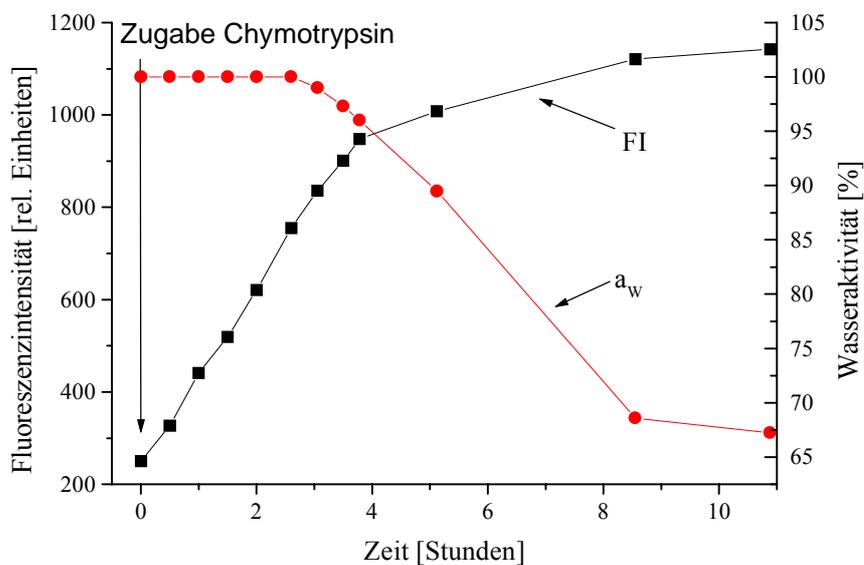


Abb. 5.41: Zeitlicher Verlauf der Wasseraktivität und FI-Zunahme von AMC bei der Hydrolyse von L-PheAMC durch α -Chymotrypsin bei Zusatz von 0,5 % KPP

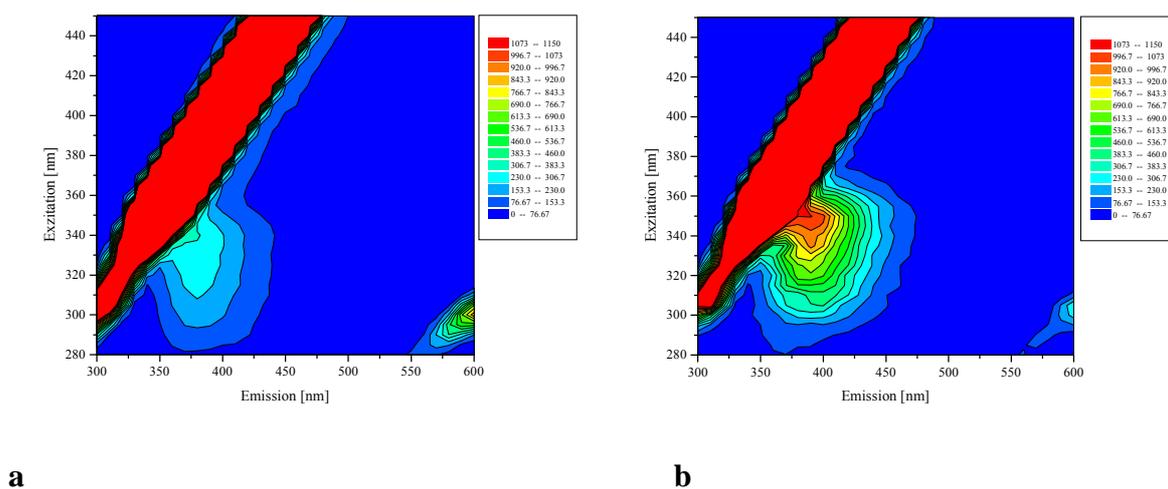
Aus Abbildung 5.41 ist zu entnehmen, daß die Wasseraktivität in den ersten zwei Stunden bei 1 liegt, während der FI-Zunahme von AMC ist eine Abnahme der Wasseraktivität in den ersten Stunden durch eine Equilibrierung der unterschiedlichen Wassergehalte von Enzym, Lösemittel und Reaktanten ist nicht zu erkennen [Bornscheuer; 1993]. Erst nach drei Stunden

fällt die Wasseraktivität langsam und liegt nach 8.5 Stunden bei einem Wert von 0,68. Der Verlauf der Hydrolyse von L-PheAMC, detektiert durch die FI-Zunahme von AMC, und der damit verbundene Wasserverbrauch spiegelt sich in der Abnahme der Wasseraktivität erst zeitversetzt wieder. Möglicherweise wird dies durch eine sehr langsame Verteilung des Wassers im Gesamtsystem hervorgerufen, so daß eine Detektion der Wasseraktivität in der Gasphase über dem Reaktionsgemisch erst spät erkannt werden kann. Während die FI von AMC nach 8,5 bis 11 Stunden nahezu konstant bleibt, werden auch für die Wasseraktivität konstante Werte erhalten.

Eine Verfolgung der enzymatischen Umsetzung des Coumarinsubstrats L-PheAMC durch die Wasseraktivität ist somit nur bedingt möglich, da der Verlauf der Hydrolyse erst zu sehr zeitversetzt detektiert werden kann.

5.11 Lage der Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate /-produkte im 2D-Fluoreszenzspektrum in Toluol

In Abbildung 5.42 sind die einzelnen 2D-Fluoreszenzspektren der verwendeten Substrate L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC und der Produkte AMC und AFC in Toluol dargestellt, die Konzentration der Fluorophore beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l.



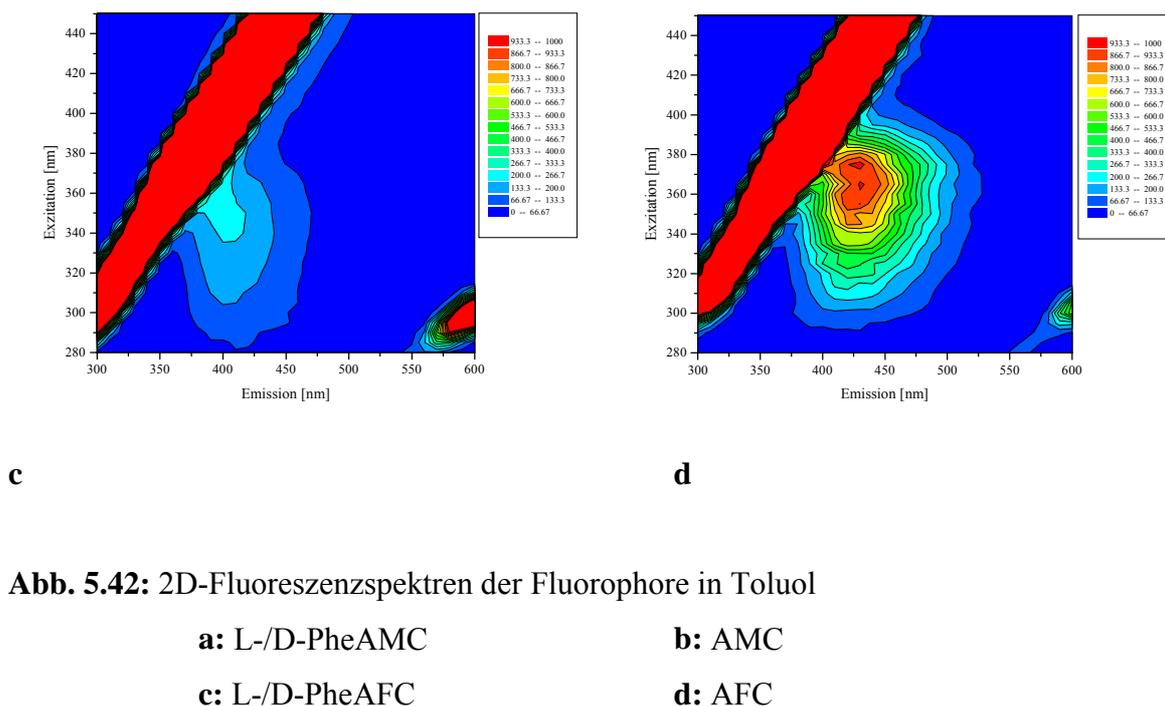


Abb. 5.42: 2D-Fluoreszenzspektren der Fluorophore in Toluol

a: L-/D-PheAMC

b: AMC

c: L-/D-PheAFC

d: AFC

Aus Abbildung 5.42 a ist zu erkennen, daß die Fluoreszenzmaxima der Substrate L-/D-PheAMC nicht im 2D-Spektrum sichtbar sind. Der Ausläufer des Fluoreszenzpeaks, welcher sehr nah an der Streulichtbande liegt, gehört vielmehr zum Produkt AMC, welches bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 390 \text{ nm}$ fluoresziert. Die Substrate L-/D-PheAFC fluoreszieren bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 400 \text{ nm}$, das Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$. Im Vergleich zum wäßrigen Medium sind die Fluorophore in Toluol in Richtung niedrigerer Emissionswellenlängen hin verschoben, eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Substraten und Produkten in Toluol ist somit erschwert.

5.12 Fluoreszenzspektroskopische on-line Analytik der enzymatischen Umsetzung von L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC in Toluol

Die enzymatischen Spaltungen der Coumarinderivate wird nun erneut on-line-analytisch verfolgt, dazu werden wiederum zuerst die Einzelreaktionen getrennt in Toluol untersucht und die kinetischen Parameter in dem organischen Medium bestimmt. Bei einem gleichzeitigen Einsatz beider Coumarinsubstrate werden zusätzlich die Enantioselektivitäten und die Enantiomerenüberschüsse ermittelt. Von dem verwendeten Biokatalysatoren werden jeweils 1000 U nativ eingesetzt. Die Konzentrationen der Coumarinsubstrate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, die Hydrolysen werden bei 30° C durchgeführt.

5.12.1 Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin

Die Reihenfolge der Einzelumsetzungen erfolgt wie im wäßrigen Medium (Abb. 5.9), zuerst werden zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAMC-Lösung (0,5 % KPP) in Toluol 1000 U α -Chymotrypsin nativ zugegeben. Der Reaktionsverlauf in Toluol ist in Abbildung 5.43 dargestellt.

Abbildung 5.43 a zeigt, daß ein eindeutiges Fluoreszenzmaximum vom Coumarinsubstrat L-PheAMC im 2D-Spektrum in Toluol nicht mehr zu erkennen ist. Bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm befindet sich ein Ausläufer vom Maximum, welches eine FI von 250 aufweist und sehr nah an der Rayleigh-Bande liegt. Aus diesem Fluoreszenzpeak an der Streulichtbande entsteht drei Stunden nach der Zugabe der Protease α -Chymotrypsin das Fluoreszenzmaximum von AMC mit einer FI von 840 (Abb. 5.43 b). Ca. neun Stunden nach der Enzymzugabe ist das Fluorophor L-PheAMC vollständig zu AMC hydrolysiert worden, das Produkt AMC weist eine FI von 1120 auf (Abb. 5.43 c). Im Differenzspektrum 5.43 d ist das Anwachsen des Produktpeaks AMC bei $\lambda_{EX} = 345$ nm / $\lambda_{EM} = 390$ nm deutlich zu erkennen, außerdem ist eine Abnahme der FI bei $\lambda_{EX} = 325$ nm und $\lambda_{EM} = 350$ nm um ca. 1000 Fluoreszenzeinheiten sichtbar, welche innerhalb der Streulichtbande liegt. Wahrscheinlich liegt bei diesem Wellenlängenpaar das Fluoreszenzmaximum von L-PheAMC in Toluol, welches jedoch nur aufgrund der Fluoreszenzabnahme im Differenzspektrum detektiert werden kann. Der ansteigende Verlauf der FI von AMC (Abb. 5.43 e) zeigt, daß ca. sieben Stunden nach der Zugabe von α -Chymotrypsin das Substrat vollständig zum Produkt hydrolysiert wurde.

Insgesamt kann die enzymatische Umsetzung von L-PheAMC in Toluol mit α -Chymotrypsin mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden, im Vergleich zum wäßrigen Medium sind die Fluoreszenzmaxima der Substrate und Produkte jedoch stark in Richtung niedriger Wellenlängen hin verschoben. Auch die FI des Produktes AMC ist in KPP höher (3200, Kap. 5.6.1) als in Toluol (1120).

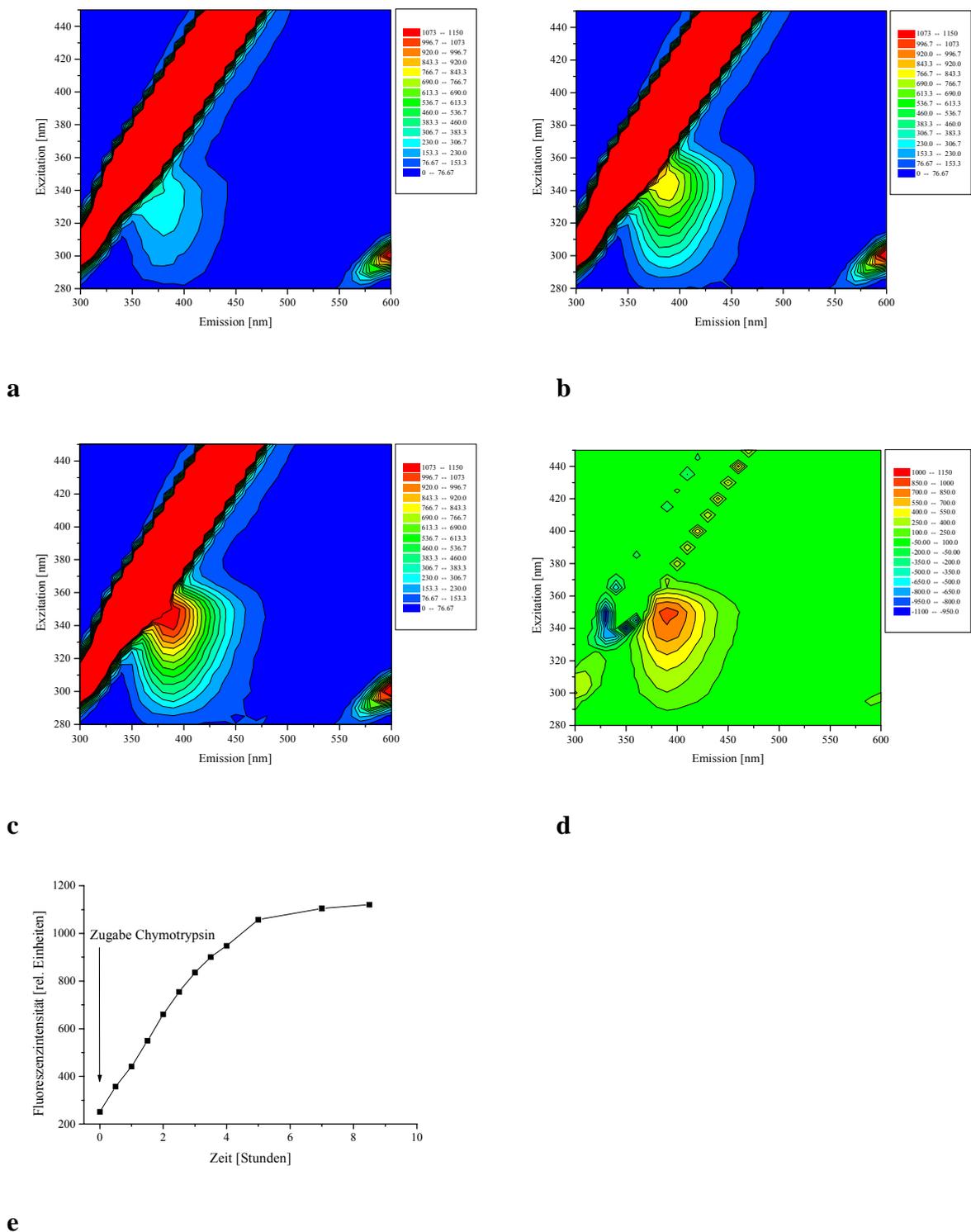


Abb. 5.43: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin in Toluol

a: L-PheAMC in Toluol **b:** 3 Stunden nach Enzymzugabe

c: 8,5 Stunden nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum a – c

e: Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{EX} = 345 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 390 \text{ nm}$

In der anschließenden Versuchsreihe wird die enzymatische Umsetzung von D-PheAMC mit der Protease α -Chymotrypsin in Toluol durchgeführt. Die Reaktion wird 24 Stunden fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, jedoch ist eine Hydrolyse des D-Coumarinsubstrates durch α -Chymotrypsin in den 2D-Spektren nicht erkennbar. Das Fluoreszenzmaximum von D-PheAMC befindet sich ebenfalls bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm, mit einer FI von 240. 24 Stunden nach der Enzymzugabe ist keine Umsetzung zu AMC detektierbar. Während im wäßrigen Medium eine Hydrolyse des D-Substrates aufgrund der Autoprotolyse erfolgte, passiert dieses aufgrund des niedrigen Wassergehalts von 0,5 % im Gesamtsystem im organischen Lösemittel nicht.

5.12.2 Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin

Im Anschluß wird die Umsetzung von L-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol betrachtet, dazu werden zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAFC-Lösung (0,5 % KPP) 1000 U α -Chymotrypsin nativ zugegeben. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.44 dargestellt.

Das Fluoreszenzmaximum des AFC-Coumarinsubstrates ist im 2D-Spektrum bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 400$ nm sichtbar, die relative FI beträgt 238 (Abb. 5.44 a). Auch hier ist gegenüber dem wäßrigen Medium das Fluoreszenzmaximum des Substrates in Richtung niedriger Wellenlängen hin verschoben. Drei Stunden nach der Enzymzugabe bildet sich das Fluoreszenzmaximum vom Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{EX} = 365$ nm und $\lambda_{EM} = 430$ nm (Abb. 5.44 b). Neun Stunden nach der Zugabe von α -Chymotrypsin besitzt der Fluoreszenzpeak vom Produkt AFC eine FI von 1110 (Abb. 5.44 c), welche somit bei gleichen Konzentrationen in Toluol nahezu der FI vom Produkt AMC entspricht. Während sich die FI der Substrate und Produkte im wäßrigen Medium stark unterscheiden sind diese in Toluol nahezu gleichwertig. Im Differenzspektrum 5.44 d ist die Zunahme des Produktpeaks von AFC bei $\lambda_{EX} = 365$ nm / $\lambda_{EM} = 430$ nm gut zu erkennen, eine Abnahme des Substratpeaks wie bei Abbildung 5.43 c ist jedoch nicht sichtbar. Aus dem Anstieg der FI von AFC ist zu erkennen, daß das Substrat L-PheAFC nach ca. sieben Stunden nahezu vollständig zum Produkt AFC enzymatisch hydrolysiert wurde.

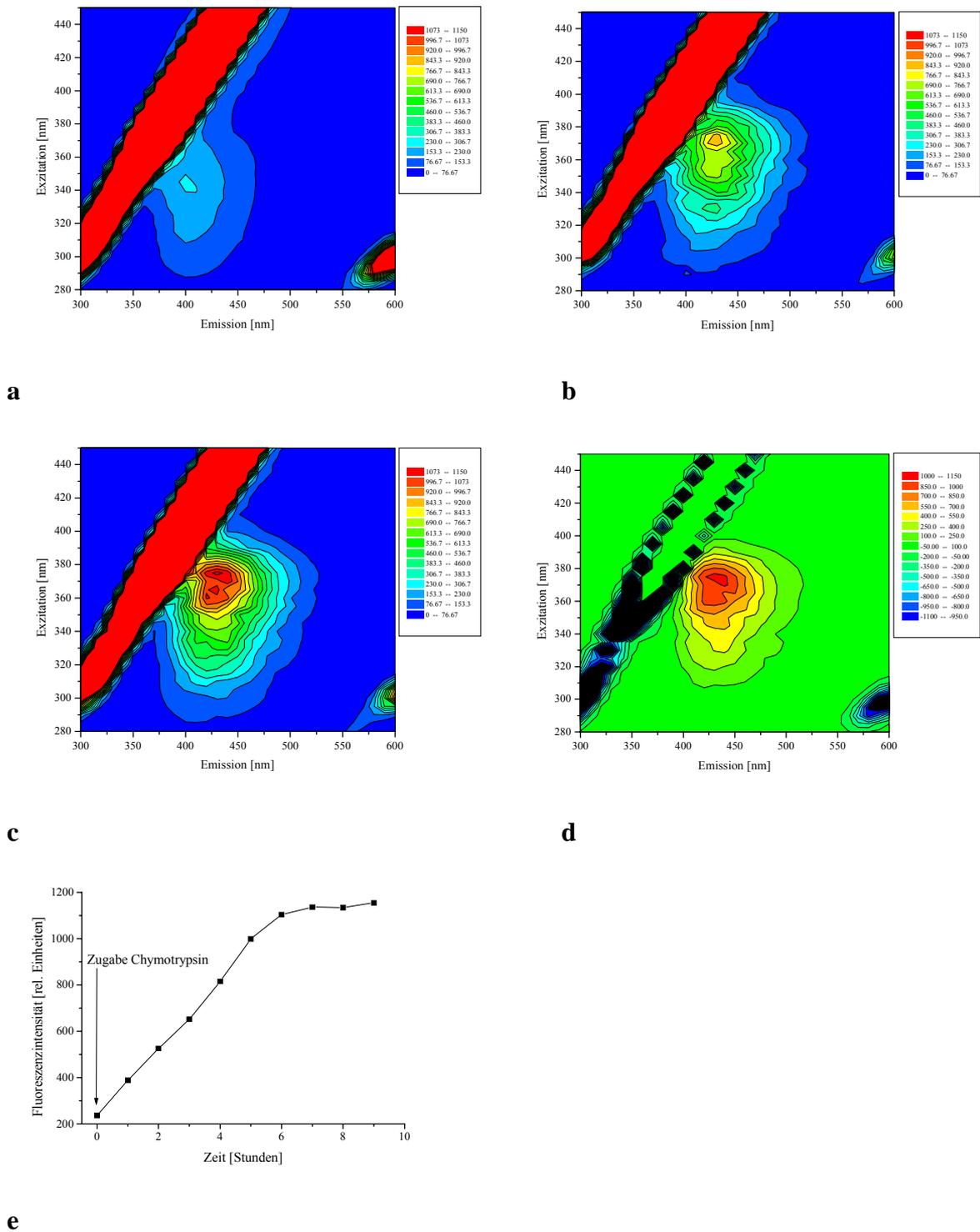


Abb. 5.44: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol
a: L-PheAFC in Toluol **b:** 3 Stunden nach Enzymzugabe
c: 9 Stunden nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum a – c
e: Zunahme der FI von AFC detektiert bei $\lambda_{EX} = 365 \text{ nm} / \lambda_{EM} = 430 \text{ nm}$

Somit läßt sich die Hydrolyse vom Coumarinsubstrat L-PheAFC in Toluol mit α -Chymotrypsin ebenfalls mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgen, jedoch sind auch hier Verschiebungen der Fluoreszenzmaxima zu erkennen. Eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Fluorophoren ist möglich, insbesondere da die FI in Toluol einander angeglichen sind.

Im Anschluß wird die enzymatische Umsetzung von D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol durchgeführt und die Reaktion 24 Stunden fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Auch hier ist eine Hydrolyse des D-Coumarinsubstrates durch α -Chymotrypsin in den 2D-Spektren nicht erkennbar, eine Autoprotolyse des Fluorophors wird nicht beobachtet.

Auch bei den Reaktionen in Toluol kann die L-Spezifität der Protease α -Chymotrypsin mit Hilfe der on-line Analytik bestätigt werden, in den nächsten Versuchsreihen werden die Hydrolysen der Coumarinsubstrate mit der Esterase PLE in Toluol durchgeführt.

5.12.3 Hydrolysen von L-/D-PheAMC mit der Esterase PLE

Zu 12 ml einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAMC-Lösung in Toluol (1 % KPP) werden 1000 U der Esterase nativ zugegeben und der Reaktionsverlauf on-line fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Abbildung 5.45 zeigt die Zunahme der FI von AMC, detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 345$ nm und $\lambda_{\text{EM}} = 390$ nm.

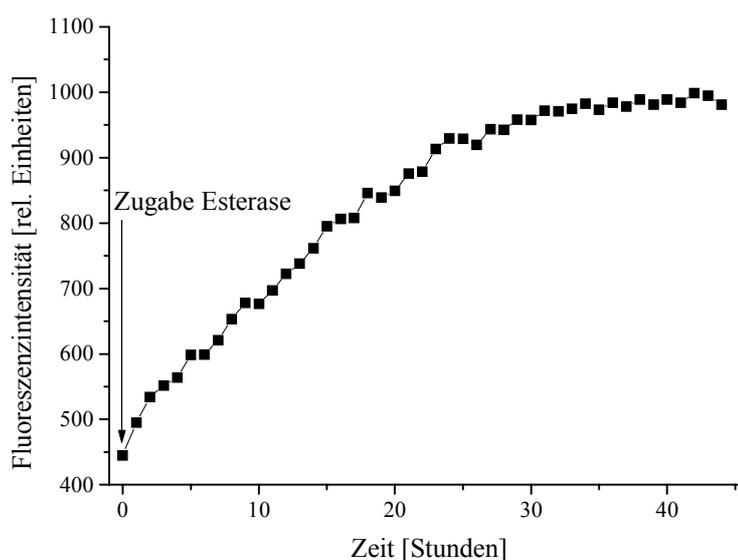


Abb. 5.45: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAMC mit der Esterase PLE in Toluol, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 345$ nm / $\lambda_{\text{EM}} = 390$ nm

Der Reaktionsverlauf zeigt, daß nach ca. 30 Stunden das eingesetzte Substrat in Toluol nahezu vollständig zum Produkt AMC umgesetzt worden ist. Somit setzt die Esterase PLE das Substrat L-PheAMC in Toluol erheblich langsamer um als die Protease α -Chymotrypsin, bei welcher bereits nach 7 Stunden das Substrat vollständig zum Produkt hydrolysiert wurde.

Im nächsten Versuchsabschnitt wird die Hydrolyse von D-PheAMC mit der Esterase PLE in Toluol betrachtet. Wiederum werden 1000 U des Enzyms nativ eingesetzt, die Konzentration des Substrates beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l (1 % KPP). Abbildung 5.46 zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität vom Produkt AMC ($\lambda_{\text{EX}} = 345$ nm / $\lambda_{\text{EM}} = 390$ nm).

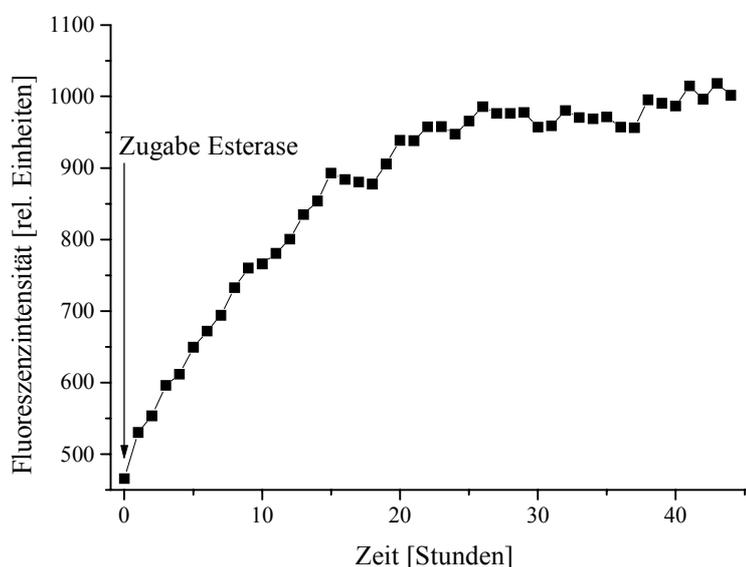


Abb. 5.46: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAMC mit der Esterase PLE in Toluol, Zunahme der FI von AMC detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 345$ nm / $\lambda_{\text{EM}} = 390$ nm

Der Verlauf in Abbildung 5.46 zeigt, daß nach 26 Stunden das eingesetzte Substrat D-PheAMC in Toluol vollständig zu AMC hydrolysiert wurde. Aus den Reaktionsverläufen wird sichtbar, daß das Coumarinsubstrat D-PheAMC in Toluol schneller umgesetzt wird als das Substrat L-PheAMC, vergleichbar mit den Ergebnissen aus den wäßrigen Umsetzen.

5.12.4 Hydrolysen von L-/D-PheAFC mit der Esterase PLE

Zum Abschluß der Einzelumsetzungen mit der Esterase PLE in Toluol werden die Hydrolysen der Substrate L-/D-PheAFC betrachtet.

Zu einer $2,1 \cdot 10^{-5}$ M L-PheAFC Lösung in Toluol (1 % KPP) werden 1000 U der Esterase PLE nativ zugegeben. Abbildung 5.47 zeigt den Verlauf der Hydrolyse, dabei wurde das Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm und $\lambda_{\text{EM}} = 430$ nm detektiert.

Auch hier zeigt der Verlauf in Abbildung 5.47, daß das L-Substrat nach ca. 28 Stunden vollständig zum Produkt AFC hydrolysiert wird, danach ist kein weiterer Anstieg in der FI des Coumarinproduktes erkennbar.

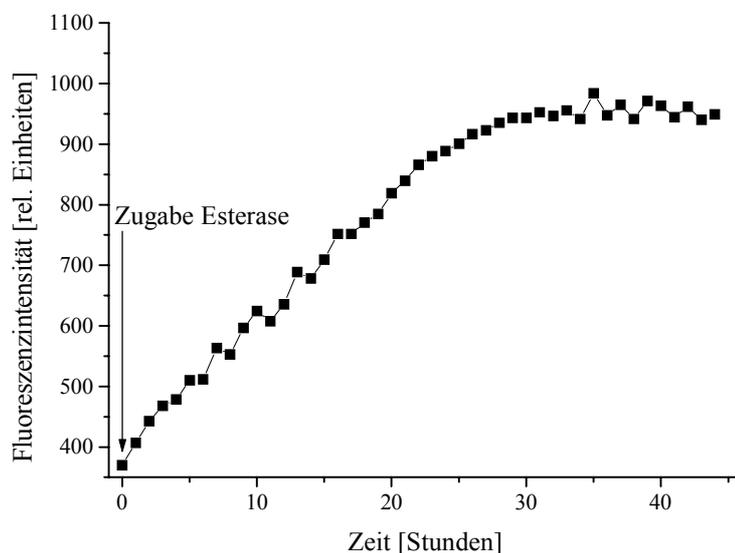


Abb. 5.47: Reaktionsverlauf der Umsetzung von L-PheAFC mit der Esterase PLE in Toluol, Zunahme der FI von AFC detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm / $\lambda_{\text{EM}} = 430$ nm

Im letzten Versuch wird das Coumarinsubstrat D-PheAFC von der Esterase PLE hydrolysiert in Toluol, es werden 1000 U des Enzyms nativ eingesetzt, die Konzentration des Substrates beträgt $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l (1 % KPP). Abbildung 5.48 zeigt den Hydrolyseverlauf.

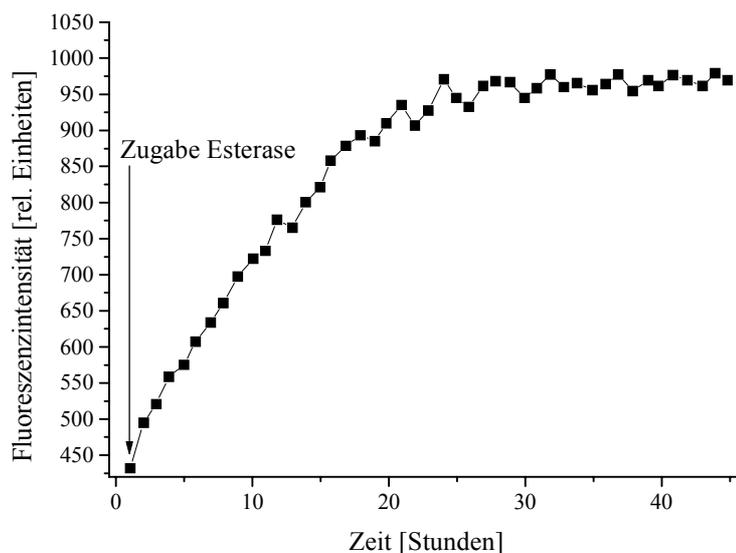


Abb. 5.48: Reaktionsverlauf der Umsetzung von D-PheAFC mit der Esterase PLE in Toluol, Zunahme der FI von AFC detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$

Abbildung 5.48 zeigt, daß nach ca. 24 Stunden kein Anstieg im Verlauf der FI vom Substrat AFC mehr zu erkennen ist, somit wird auch das Substrat D-PheAFC von der Esterase schneller umgesetzt als das entsprechende L-Substrat L-PheAFC.

Die Ergebnisse der enzymatischen Einzelumsetzungen in Toluol zeigen, daß die Umsetzungen der Substrate mit den Enzymen α -Chymotrypsin und der Esterase PLE on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden können. Auch im organischen Medium kann die L-Spezifität von α -Chymotrypsin mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie bestätigt werden, die Esterase aus *Porcine liver* ist, wie auch im wäßrigen Medium, in Toluol unspezifisch. Für weitergehende Untersuchungen ist jedoch auch hier eine genaue Betrachtung der Reaktionskinetik nötig.

5.13 Bestimmung kinetischer Daten in Toluol

Die theoretischen Grundlagen zur Kinetik enzymatischer Mehrsubstratreaktionen sind in Kapitel 3.3.2 beschrieben worden. Die Hydrolyse der Coumarinsubstrate mit Wasser in Toluol ist nun eine Zwei-Substratreaktion. Die Michaelis-Menten Beziehung erweist sich auch für diese Erweiterung als prinzipiell gültig, erfordert jedoch die Variation aller beteiligter Substrate [Bisswanger; 2000].

Aus den Messungen der FI-Anstiege der jeweiligen Substrate wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei einem bestimmten Wassergehalt (0,5 - 2 %) berechnet und die reziproke (Anfangs-)Reaktionsgeschwindigkeit [l·h/mol] gegen die reziproke Substratkonzentration [1/mol] aufgetragen.

5.13.1 Bestimmung der kinetischen Daten von α -Chymotrypsin

Die Umsetzung von L-PheAMC mit Wasser in Toluol dient als Modellreaktion. Es werden drei Versuchsserien durchgeführt, bei denen die Konzentration des Coumarinsubstrats bei einem festem Wassergehalt variiert wird. Aus der Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ in Abbildung 5.49 läßt sich folgende Schlußfolgerung ableiten:

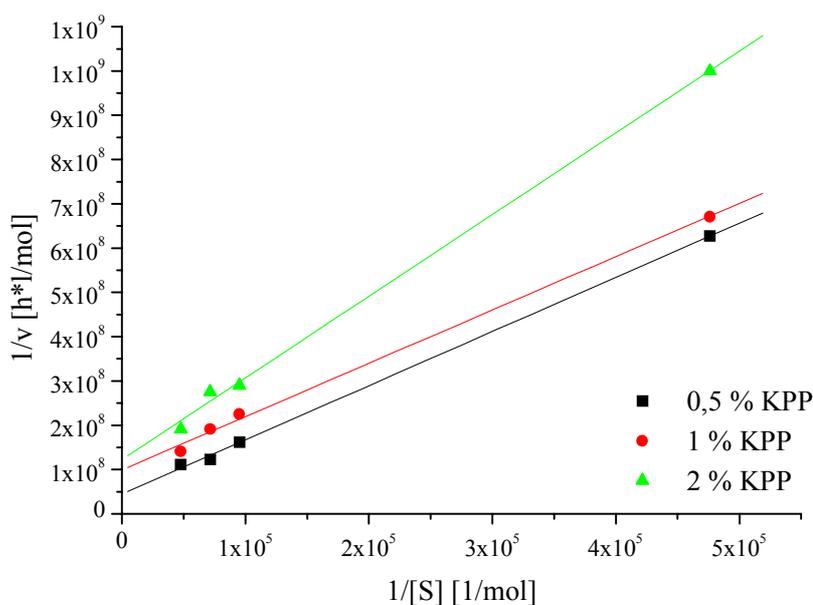


Abb. 5.49: Auftragung von $1/v$ gegen $1/[S]$ für die Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin in Toluol bei verschiedenen festen Wassergehalten

Eine Erhöhung des Wassergehalts von 0,5 % auf 1 % zeigt eine parallele Verschiebung der Kurve in Abbildung 5.49. Wird der Wassergehalt auf 2 % erhöht, erfolgt eine Erhöhung der Kurvensteigung. Bei einem Wassergehalt von 0,5 % bis 1 % könnte es sich nach Bisswanger [2000] um einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus handeln, bei diesem Mechanismus ergeben sich ebenfalls parallel verschobene Kurven im Lineweaver-Burk Diagramm. Eine Erhöhung der Wassermenge im System führt zur einer Verschiebung der Mechanismen, der Kurvenverlauf mit einer Erhöhung der Kurvensteigung kann für einen zufälligen oder einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus stehen [Bisswanger; 2000]; [Bornscheuer; 1992]. Aus Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit kann nicht entschieden werden, ob ein zufälliger oder ein geordneter Bi-Bi-Mechanismus vorliegt. Somit kommt es wahrscheinlich ab einer bestimmten Wassermenge im System zu einer Überlagerung der angegebenen Effekte. Versuche mit weiteren festen Wassergehalten würden eine genauere Aufschlüsselung der Mechanismen ergeben. Leider sind in der Literatur keine vergleichbaren Daten zu den Mechanismen der enzymatischen Hydrolyse mit α -Chymotrypsin zu finden.

Mit den zur Verfügung stehenden Daten werden die v_{\max} und K_M -Werte ohne Berücksichtigung der Inhibitorkonstanten nach Gleichung 3.5 berechnet. Tabelle 5.5 gibt die Werte für die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) und Michaelis-Konstanten (K_M) für die einzelnen Coumarinsubstrate in einem System mit einem Wassergehalt von 0,5 % an.

Tab. 5.5: Kinetische Daten aus den Substratumsetzungen mit α -Chymotrypsin in Toluol

	L-PheAMC	L-PheAFC	D-PheAMC	D-PheAFC
v_{\max} [mol/l·h]	$1,26 \cdot 10^{-8}$	$1,06 \cdot 10^{-8}$	-	-
K_M [mol/l]	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$1,79 \cdot 10^{-5}$	-	-

Für die D-Substrate werden keine kinetischen Parameter bestimmt, da keine Hydrolyse mit der Protease stattfindet. Die Ergebnisse zeigen, daß beide L-Substrate mit nahezu gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert werden, auch die Michaelis-Konstanten sind nahezu gleich. Während die Reaktionsgeschwindigkeiten erheblich geringer sind als im wässrigen System, liegen die Michaelis-Konstanten in der Größenordnung der bestimmten K_M -Werte in KPP.

5.13.2 Bestimmung der kinetischen Daten der Esterase PLE

Die Umsetzung von L-PheAFC mit Wasser in Toluol dient als Modellreaktion. Es werden drei Versuchsserien durchgeführt, bei denen die Konzentration des Coumarinsubstrats bei einem festem Wassergehalt variiert wird. Die Auftragungen in einem Lineweaver-Burk Diagramm zeigen dabei bei zunehmendem Wassergehalt von 1 - 3 % jeweils ein Ansteigen der Kurvensteigungen. Dies könnte für einen zufälligen oder geordneten Bi-Bi-Mechanismus stehen. Leider lassen sich hier ebenfalls keine vergleichbaren Literaturangaben finden.

Eine Unterscheidung zwischen beiden Mechanismen wäre über eine Analyse der Produkthemmung möglich [Bisswanger; 2000]. Dabei würde ein Produkt die Reaktion in Abhängigkeit desjenigen Substrats, aus dem es entstanden ist, kompetitiv hemmen. Gegenüber dem Cosubstrat würde es nicht-kompetitiv wirken, da es dieses zwar nicht verdrängen, jedoch dessen Umsatz verhindern kann.

Auch hier werden mit den zur Verfügung stehenden Daten die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Michaelis-Konstanten ohne Berücksichtigung der Inhibitor-konstanten nach Gleichung 3.5 berechnet. Tabelle 5.6 gibt eine Übersicht über die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (v_{\max}) und Michaelis-Konstanten (K_M) für die einzelnen Coumarinsubstrate in einem System mit einem Wassergehalt von 1 %.

Tab. 5.6: Kinetische Daten aus den Substratumsetzungen mit PLE in Toluol

	L-PheAMC	L-PheAFC	D-PheAMC	D-PheAFC
v_{\max} [mol/l·h]	$1,85 \cdot 10^{-10}$	$1,67 \cdot 10^{-10}$	$3,79 \cdot 10^{-10}$	$3,15 \cdot 10^{-10}$
K_M [mol/l]	$5,97 \cdot 10^{-6}$	$2,28 \cdot 10^{-6}$	$6,21 \cdot 10^{-6}$	$1,78 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 5.6 zeigt, daß alle Reaktionsgeschwindigkeiten für die Substrate in der gleichen Größenordnung liegen, dabei werden die D-Substrate geringfügig schneller hydrolysiert als die L-Substrate. Auch die Michaelis-Konstanten unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen kinetischen Parametern, wie im wässrigen Medium, ist hier nicht mehr erkennbar.

5.14 Gleichzeitige enzymatische Umsetzung der Coumarinsubstrate in Toluol

In den folgenden Untersuchungen werden die Fluorophorpaare L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC / D-PheAMC jeweils zusammen in gleicher Konzentration eingesetzt und in Toluol enzymatisch gespalten. Die on-line erhaltenen Daten werden zusätzlich mit off-line genommenen Proben über die Enantiomerenüberschüsse, die Enantioselektivitäten und die Umsätze verglichen.

5.14.1 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol

Für den Versuch werden 12 ml eines Gemisches von L-PheAMC/D-PheAFC (die Konzentration der Substrate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) in den 15 ml Reaktor gegeben. Der Wassergehalt im System beträgt 0,5 %, die Temperatur wird auf 30° C eingestellt. Danach werden 1000 U α -Chymotrypsin nativ dem Reaktionsgemisch zugefügt. Nach jedem aufgenommenen Spektrum wird eine Probe aus dem Reaktor entnommen und die Enantioselektivitäten, die Enantiomerenüberschüsse und der Umsatz bestimmt (Kap. 8.10). Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.50 dargestellt.

In Abbildung 5.50 a ist nur sehr schwach das Maximum beider Coumarinsubstrate erkennbar, die überlappenden Fluoreszenzmaxima liegen nah an der Streulichtbande. Sichtbar ist dabei nur der auslaufende Teil des Fluoreszenzmaximums beider Substrate, da das Maximum von L-PheAMC unterhalb der Rayleigh-Streuung liegt. Vier Stunden nach der Enzymzugabe ist das Anwachsen des Fluoreszenzmaximums vom Spaltprodukt AMC bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm mit einer FI von 844 erkennbar (Abbildung 5.50 b). Nach 12 Stunden beträgt die FI vom AMC-Maximum 1162 (Abbildung 5.50 c), nach 95 Stunden 1800 (Abbildung 5.50 d). Im Differenzspektrum 5.50 e ist bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm nur das Anwachsen des AMC-Peaks sichtbar, eine Zunahme von AFC wird nicht detektiert. Auch hier ist eine Abnahme um ca. 1000 FI-Einheiten innerhalb der Streulichtbande erkennbar, welche dem L-Substrat zuzuordnen ist. Bei einem gleichzeitigem Einsatz beider Coumarinsubstrate kann somit wiederum on-line die L-Spezifität der Protease α -Chymotrypsin bestätigt werden. Ein Vergleich zwischen der Einzelumsetzung von L-PheAMC (Kap. 5.12.2) und der Hydrolyse von L-PheAMC mit D-PheAFC, ausgedrückt über den FI-Anstieg von AMC, ist in Abbildung 5.51 dargestellt.

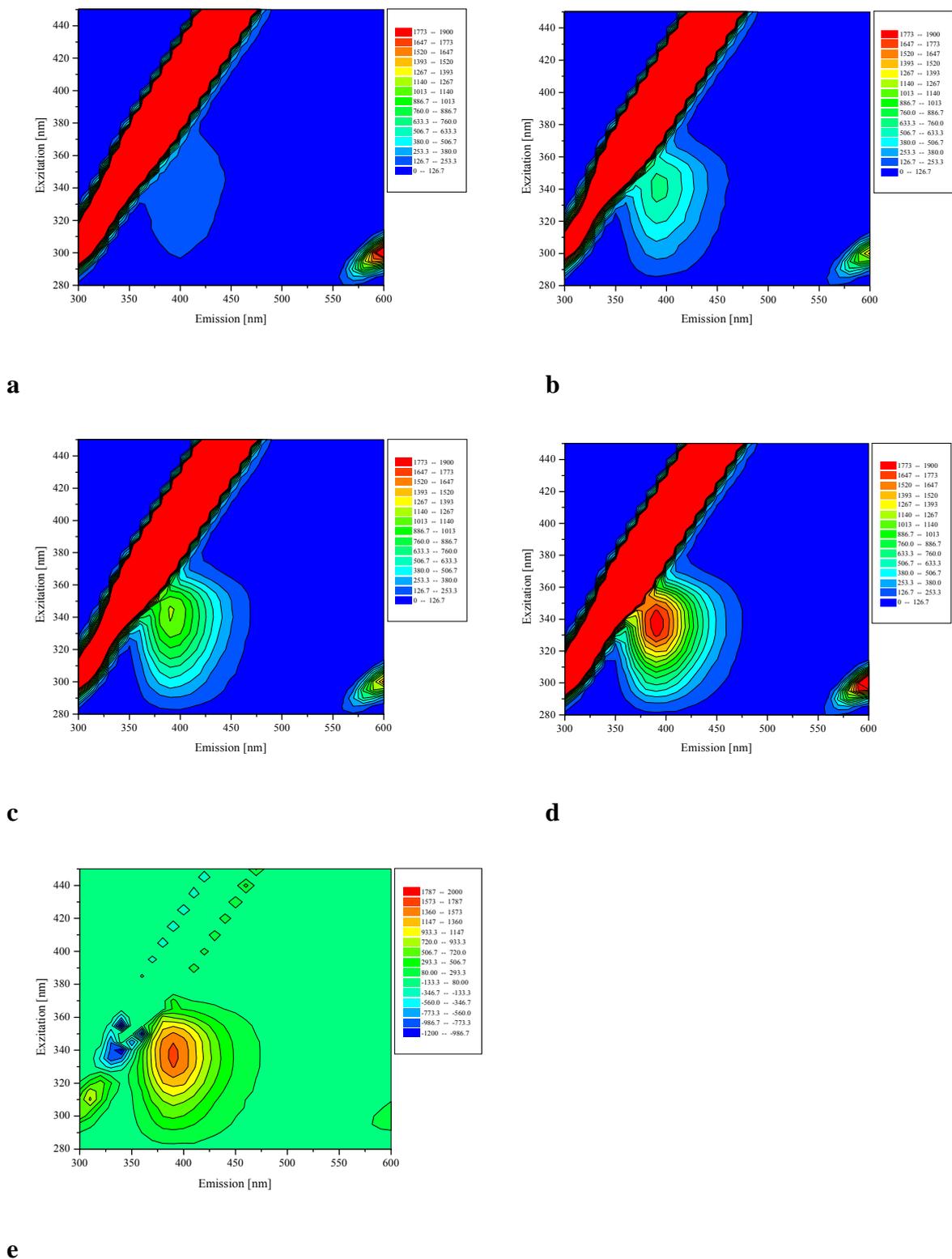


Abb. 5.50: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAMC/D-PheAFC mit α -Chymotrypsin in Toluol
a: L-PheAMC/D-PheAFC in Toluol
b: 4 Stunden nach Enzymzugabe
c: 12 Stunden nach Enzymzugabe
d: 95 Stunden nach Enzymzugabe
e: Differenzspektrum e – a

Bei der Einzelumsetzung von L-PheAMC ist das Substrat nach ca. sieben Stunden vollständig hydrolysiert, in Gegenwart vom D-Substrat wird die Hydrolyse deutlich verzögert, erst nach ca. 55 Stunden ist kein Anstieg in der FI von AMC detektierbar.

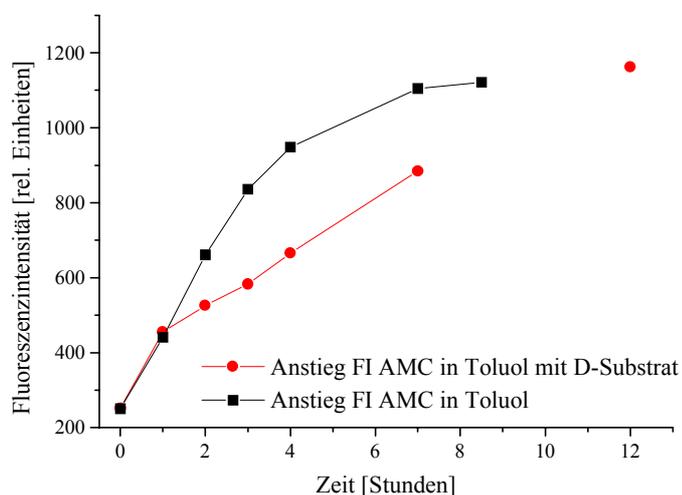


Abb. 5.51: Vergleich zwischen dem Anstieg von AMC bei der Einzelumsetzung von L-PheAMC (Kap. 5.12.2) und bei gleichzeitigem Einsatz von L-PheAMC/D-PheAFC in Toluol, detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{EM}} = 390 \text{ nm}$

Somit kann auch in Toluol von einer kompetitiven Hemmung der Protease α -Chymotrypsin durch das D-Substrat, welche bereits im wässrigen Medium festgestellt wurde, ausgegangen werden.

Im Anschluß wird die Hydrolyse der Coumarinsubstrate L-PheAFC und D-PheAMC mit α -Chymotrypsin untersucht. 12 ml der Substratlösung werden in den 15 ml Reaktor eingesetzt, die Konzentration beider Coumarinderivate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Die Umsetzung wird mit der nativen Zugabe von 1000 U der Protease gestartet. Der Gesamtwassergehalt im System beträgt 0,5 %, die Temperatur 30° C . Abbildung 5.52 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzung.

Abbildung 5.52 a zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum beider Coumarinsubstrate, dabei ist teilweise ein Maximum bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 400 \text{ nm}$ mit einer FI von 250 zu erkennen, welches wiederum nah an der Streulichtbande liegt. Vier Stunden nach der Zugabe von α -Chymotrypsin ist ein Anwachsen eines Fluoreszenzpeaks bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ mit einer FI von 210 erkennbar (Abbildung 5.52 b), welches dem Spaltprodukt AFC zugeordnet werden kann. 12 Stunden nach der Enzymzugabe beträgt die FI vom AFC-

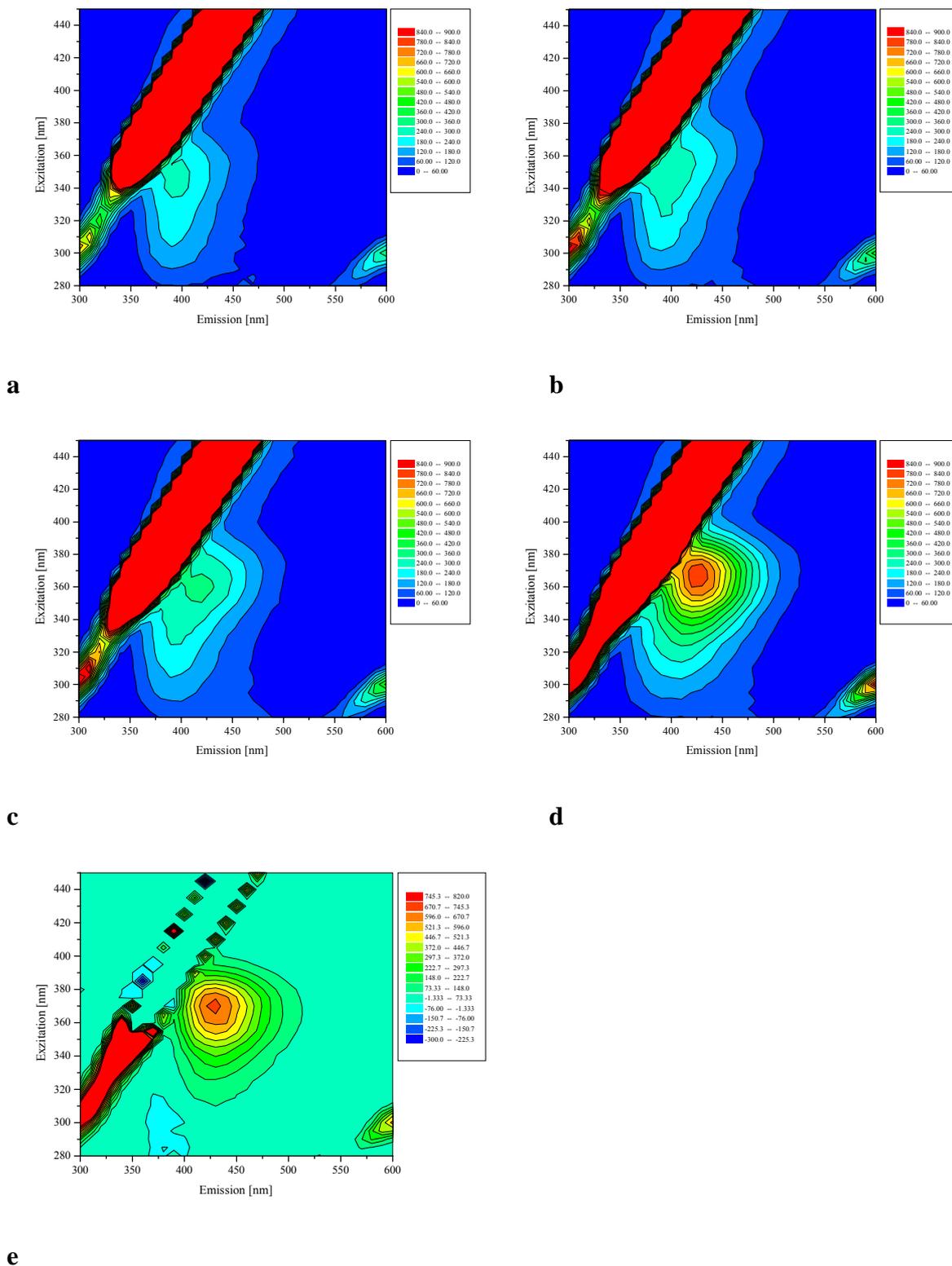


Abb. 5.52: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAFC/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in Toluol
a: L-PheAFC/D-PheAMC in Toluol
b: 4 Stunden nach Enzymzugabe
c: 12 Stunden nach Enzymzugabe
d: 109 Std. nach Enzymzugabe
e: Differenzspektrum e – a

Maximum 296 (Abbildung 5.52 c), 109 Stunden nach der Zugabe der Protease ist in Abbildung 5.52 d der AFC-Peak bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ mit einer FI von 820 deutlich zu erkennen. Im Differenzspektrum 4.52 e ist nur der Fluoreszenzanstieg des Spaltprodukts AFC deutlich bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ erkennbar, eine Abnahme des L-Substrats ist nicht sichtbar, da die Maxima des L-Substrats und des Produkts im 2D-Fluoreszenzspektrum dicht beieinander liegen und der Anstieg von AFC die Abnahme von L-PheAFC überdeckt. Eine Hydrolyse des D-Substrats geschieht nicht, somit lässt sich erneut die L-Spezifität von α -Chymotrypsin on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie bestätigen.

Abbildung 5.53 zeigt den Vergleich zwischen den anwachsenden Fluoreszenzmaxima von AFC ohne und in Gegenwart von D-PheAMC in Toluol.

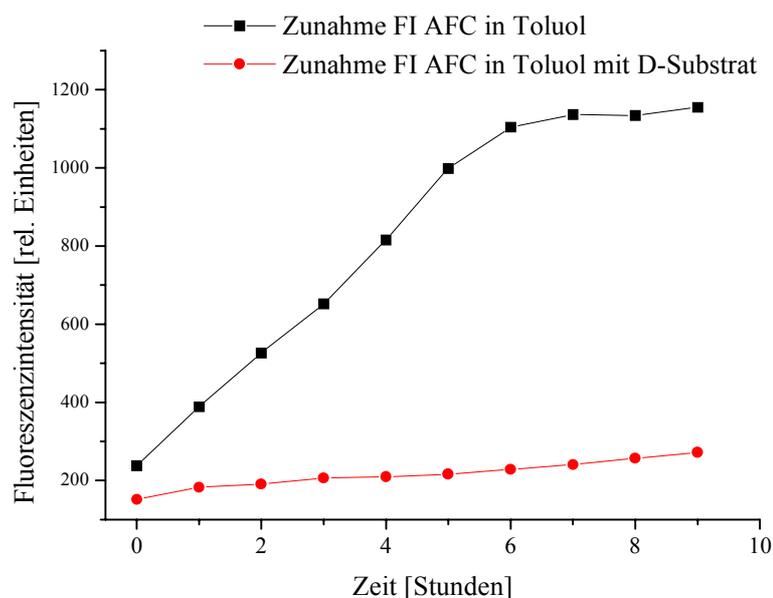


Abb. 5.53: Vergleich zwischen dem Anstieg von AFC bei der Einzelumsetzung von L-PheAFC (Kap. 5.12.2) und bei gleichzeitigem Einsatz von L-PheAFC/D-PheAMC in Toluol, detektiert bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm} / \lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$

Auch hier zeigt sich eine erhebliche Verringerung der Hydrolysegeschwindigkeit des L-Substrats in Gegenwart von D-PheAMC. Während bei der Einzelumsetzung von L-PheAFC das Substrat bereits nach ca. sieben Stunden vollständig zu AFC hydrolysiert ist, ist bei einem gleichzeitigem Einsatz nach 120 Stunden noch keine vollständige Umsetzung sichtbar. Wiederum ist eine kompetitive Hemmung des Enzyms durch das D-Substrat

wahrscheinlich. Im Anschluß werden von den Umsetzungen mit α -Chymotrypsin die Enantiomerenüberschüsse der Produkte und Substrate, die Enantioselektivitäten und die Umsätze berechnet und miteinander verglichen.

5.14.2 Vergleich von eeS, eeP, E und U der Umsätze von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin in Toluol

Abbildung 5.54 zeigt die Reaktionsverläufe der Gleichzeitig eingesetzten Coumarinderivate mit α -Chymotrypsin in Toluol.

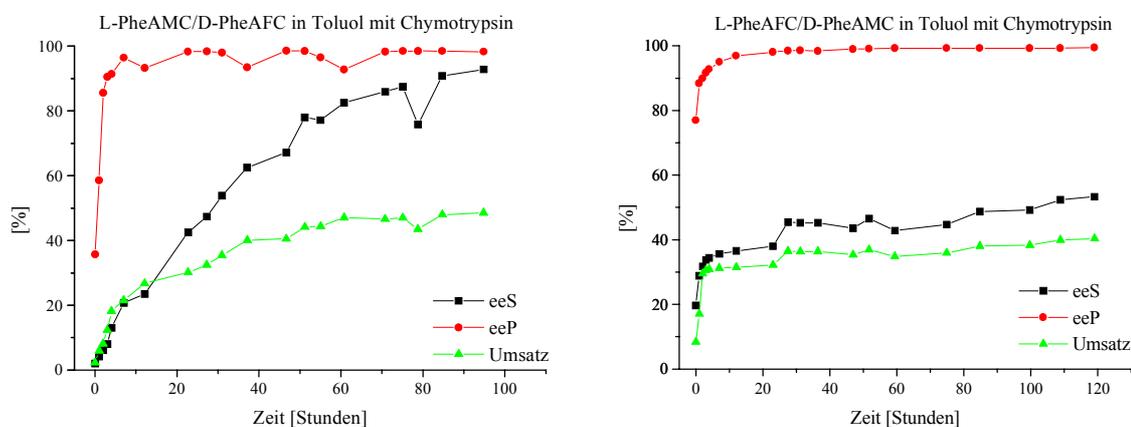


Abb. 5.54: Reaktionsverläufe der enzymatisch katalysierten Umsetzungen von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC in Toluol

Die Kurvenverläufe zeigen, daß es sich in beiden Fällen um Reaktionen mit hoher Enantioselektivität handelt, nach jeweils 22 Stunden liegen die Enantiomerenüberschüsse des Produkts jeweils über 98 %. Somit wird bei einem Einsatz von α -Chymotrypsin nur das L-Substrat umgesetzt, was bereits on-line fluoreszenzspektroskopisch bestätigt werden konnte. In beiden Fällen wird ein Umsatz von 50 % in der Reaktionszeit nicht erreicht, bei einem Einsatz von L-PheAMC/D-PheAFC liegt dieser nach 95 Stunden bei 48 %, bei L-PheAFC/D-PheAMC nach 120 Stunden erst bei 40 %. Die ansteigenden Enantiomerenüberschüsse des Substrats stehen für die alleinige Hydrolyse des L-Pseudoenantiomers. Die Umsetzung von L-PheAFC/D-PheAMC verläuft erheblich langsamer als die Hydrolyse von L-PheAMC/D-PheAFC, obwohl sich die kinetischen Parameter nur geringfügig unterscheiden. Möglicherweise ist der Einfluß des D-Substrats auf den Biokatalysator durch die kompetitive Hemmung in Toluol größer als im wäßrigen

System, wodurch die kinetischen Parameter aus den Einzelumsetzungen in Toluol an Aussagekraft verlieren. Nach 95 Stunden ergibt sich für die Enantioselektivität E bei der Umsetzung von L-PheAMC/D-PheAFC ein Wert von 399, für die Umsetzung von L-PheAFC/D-PheAMC ein Wert von 414.

In den folgenden Untersuchungen wird der gleichzeitige Einsatz der Coumarinderivate mit der Esterase aus *Porcine liver* on-line-analytisch in Toluol verfolgt.

5.14.3 Gleichzeitiger Umsatz von L-PheAMC / D-PheAFC mit der Esterase PLE

Beide Substrate werden in gleicher Konzentration (jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) vorgelegt und 1000 U der Esterase nativ dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Temperatur beträgt 30°C , der Wassergehalt ist auf 1 % eingestellt. Abbildung 5.55 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzungen von L-PheAMC und D-PheAFC in Toluol.

Abbildung 5.55 a zeigt das gemeinsame Fluoreszenzmaximum der Coumarinsubstrate. Eine Stunde nach der Enzymzugabe zeigt sich im Differenzspektrum 5.55 b eine Zunahme des AFC-Peaks bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ um eine FI von ca. 35. Ein Anstieg des AMC-Maximums ist vorerst nicht erkennbar. Abbildung 5.55 c zeigt ein 2D-Fluoreszenzspektrum vier Stunden nach der PLE-Zugabe. Hier ist ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ mit einer FI von 241 erkennbar, welches dem Produkt AFC zugeordnet werden kann. Jedoch ist der Peak in Richtung tieferer Wellenlängen verschoben, der gebildete AFC-Peak überdeckt wahrscheinlich noch das Fluoreszenzmaximum vom langsam entstehenden Spaltprodukt AMC. Das Differenzspektrum 5.55 d zeigt nach vier Stunden nur ein langsam angestiegenes Fluoreszenzmaximum von AMC. 120 Stunden nach der Zugabe der Esterase ist in Abbildung 5.55 e das AMC-Maximum erkennbar, jedoch ist auch dieses in Richtung höherer Wellenlängen verschoben. Die Ergebnisse aus den on-line Untersuchungen in Toluol zeigen, daß die Hydrolyse der Coumarinsubstrate mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden kann, dabei wird das D-Substrat eher von der Esterase umgesetzt als das L-Substrat. Dieses Ergebnis stimmt mit den kinetischen Untersuchungen in Kapitel 5.13.2 überein, dort zeigte das Substrat D-PheAFC eine geringfügig höhere Geschwindigkeitskonstante gegenüber dem Substrat L-PheAMC.

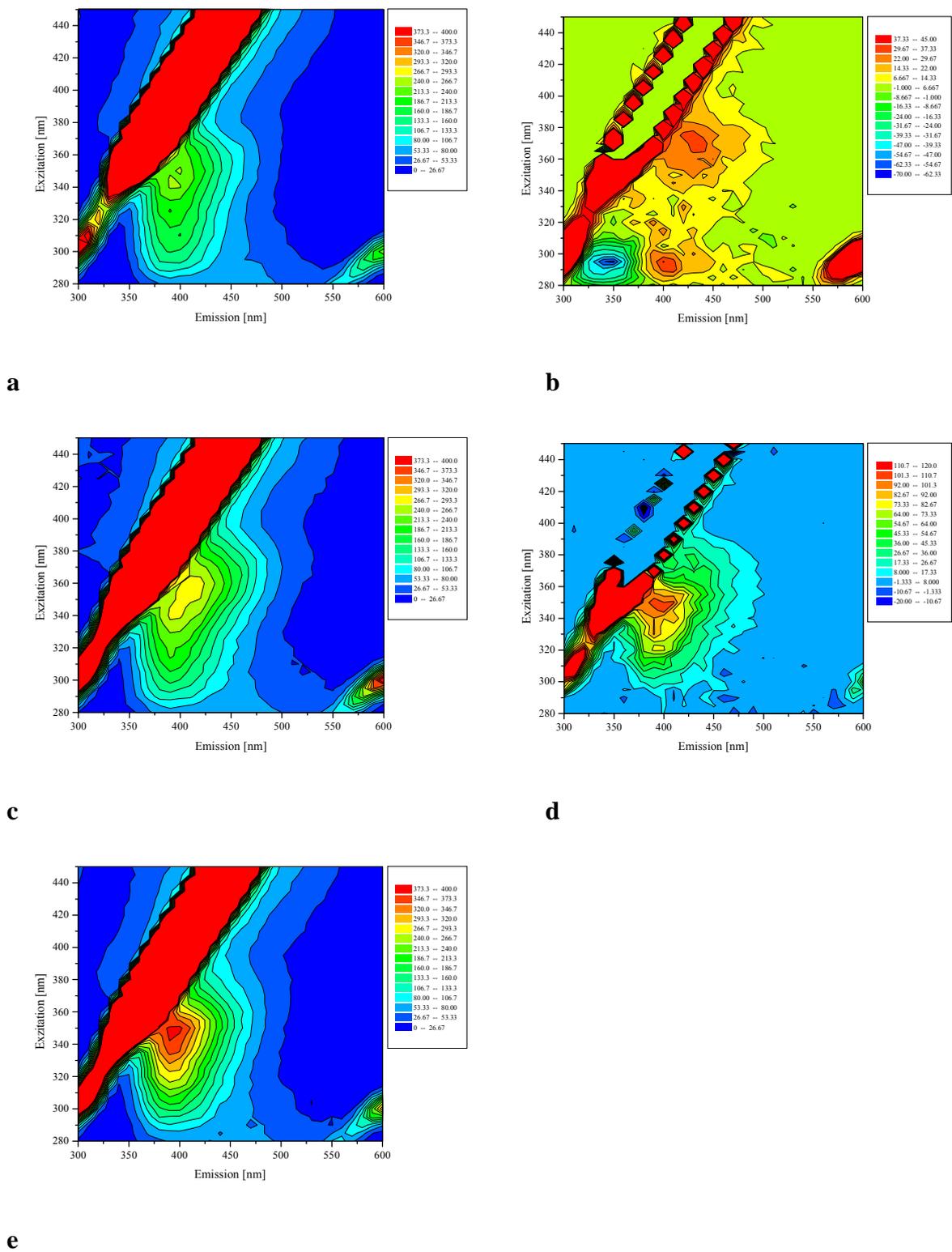


Abb. 5.55: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAMC und D-PheAFC mit PLE in Toluol
a: L-PheAMC/D-PheAFC in Toluol **b:** Differenzspektrum nach 1 Std.
c: 4 Stunden nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum c - a
e: 120 Stunden nach Enzymzugabe

Im Anschluß wird die gleichzeitige Hydrolyse der Coumarinsubstrate L-PheAFC und D-PheAMC mit der Esterase PLE untersucht. 12 ml der Substratlösung werden in den 15 ml Reaktor eingesetzt, die Konzentration beider Coumarinderivate beträgt jeweils $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Die Umsetzung wird mit der nativen Zugabe von 1000 U PLE gestartet. Der Gesamtwassergehalt im System beträgt 1 %, die Temperatur 30° C. Abbildung 5.56 zeigt den Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzung.

Abbildung 5.56 a zeigt die sich überlagernden Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate L-PheAFC und D-PheAMC, welche nah an der Streulichtbande liegen. Eine Stunde nach der Enzymzugabe zeigt das Differenzspektrum 5.56 b ein ansteigendes Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{EX} = 345$ nm und $\lambda_{EM} = 390$ nm mit einer FI von ca. 60, welches dem Spaltprodukt AMC zugeordnet werden kann. Ein Anstieg von AFC ist nach einer Stunde im Spektrum nicht zu erkennen. Vier Stunden nach der Zugabe der Esterase ist das Fluoreszenzmaximum von AMC mit einer FI von 281 gut zu erkennen (Abbildung 5.56 c). Das Differenzspektrum 5.56 d zeigt jedoch nun ebenfalls einen geringen Anstieg im Bereich $\lambda_{EX} = 365$ nm und $\lambda_{EM} = 430$ nm, dies bedeutet, daß nun auch das L-Substrat teilweise von dem Enzym hydrolysiert wird. 103 Stunden nach der PLE-Zugabe ist im 2D-Spektrum ein Fluoreszenzmaximum zu erkennen, welches nun deutlich zum AFC-Produkt in Richtung höherer Wellenlängen verschoben ist. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei $\lambda_{EX} = 365$ nm und $\lambda_{EM} = 430$ nm mit einer FI von 318. Somit zeigen die Ergebnisse aus den Untersuchungen in Toluol, daß die Esterase PLE zuerst das Substrat D-PheAMC hydrolysiert, danach wird das Coumarinderivat L-PheAFC von dem Enzym umgesetzt. Auch hier stimmen wiederum die Ergebnisse aus den on-line Untersuchungen mit den ermittelten kinetischen Parametern aus Kapitel 5.13.2 überein. Dort zeigte ebenfalls D-PheAMC eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit als L-PheAFC. Hier zeigt sich ein Unterschied zu den Umsetzungen der Coumarinderivate im wäßrigen Medium, dort wird zuerst L-PheAFC hydrolysiert, danach erst D-PheAMC.

Gegenüber den Umsetzungen im wäßrigen Medium liegen die Fluoreszenzmaxima der Substrate und der Produkte im organischen Medium zwar näher beieinander, jedoch lassen sich durch die niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit bessere Aussagen über die umgesetzten und gebildeten Edukte und Produkte im 2D-Fluoreszenzspektrum treffen. Im Anschluß werden von den Umsetzungen mit der Esterase PLE die Enantiomerenüberschüsse der Produkte und Substrate, die Enantioselektivitäten und die Umsätze berechnet und miteinander verglichen.

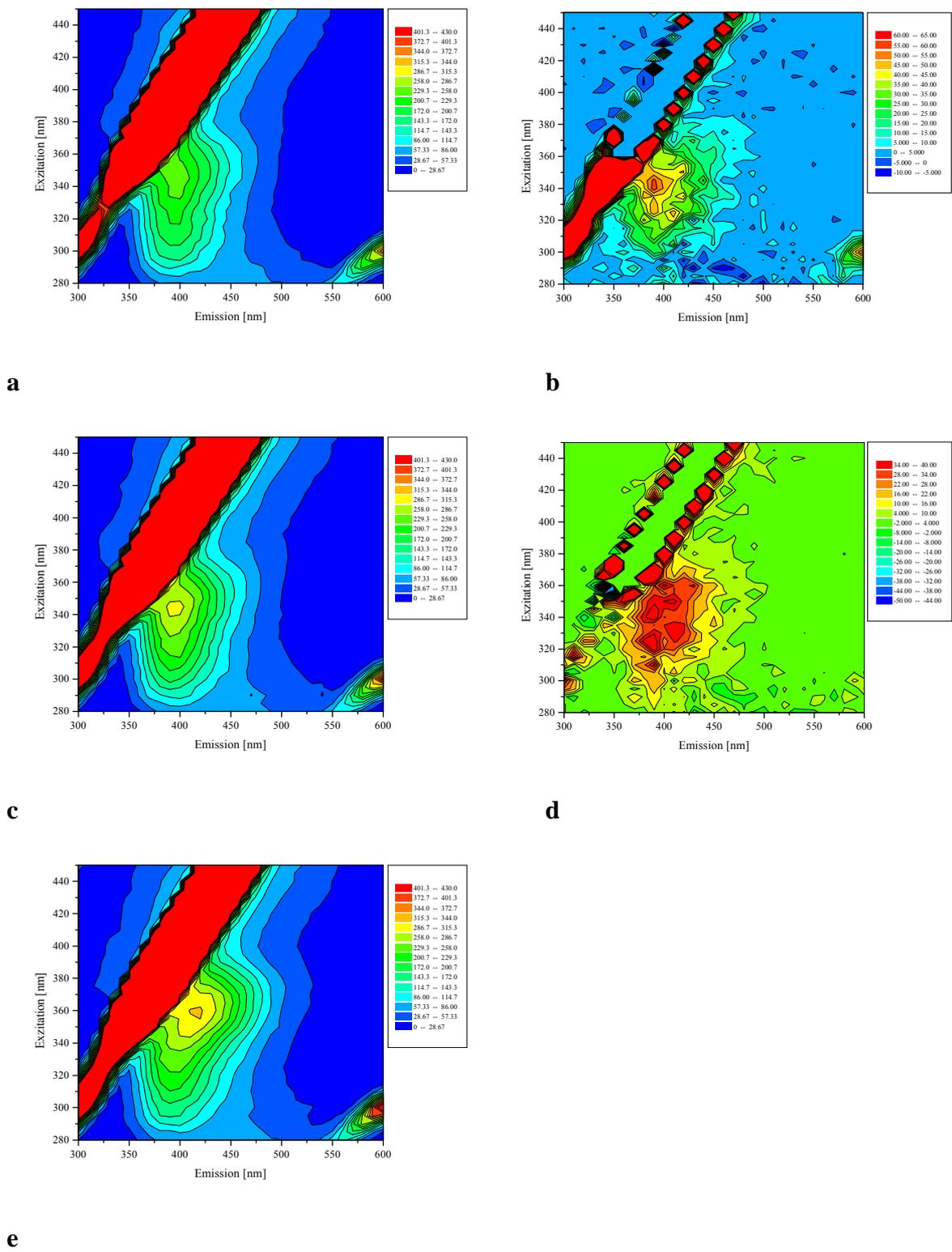


Abb. 5.56: Gleichzeitiger Einsatz von L-PheAFC und D-PheAMC mit PLE in Toluol
a: L-PheAFC/D-PheAMC in Toluol **b:** Differenzspektrum nach 1 Std.
c: 4 Stunden nach Enzymzugabe **d:** Differenzspektrum c - a
e: 103 Stunden nach Enzymzugabe

5.14.4 Vergleich von eeS, eeP, E und U der Umsätze von L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC mit der Esterase PLE in Toluol

Abbildung 5.57 zeigt die Reaktionsverläufe der Gleichzeitig eingesetzten Coumarinderivate mit der Esterase PLE in Toluol.

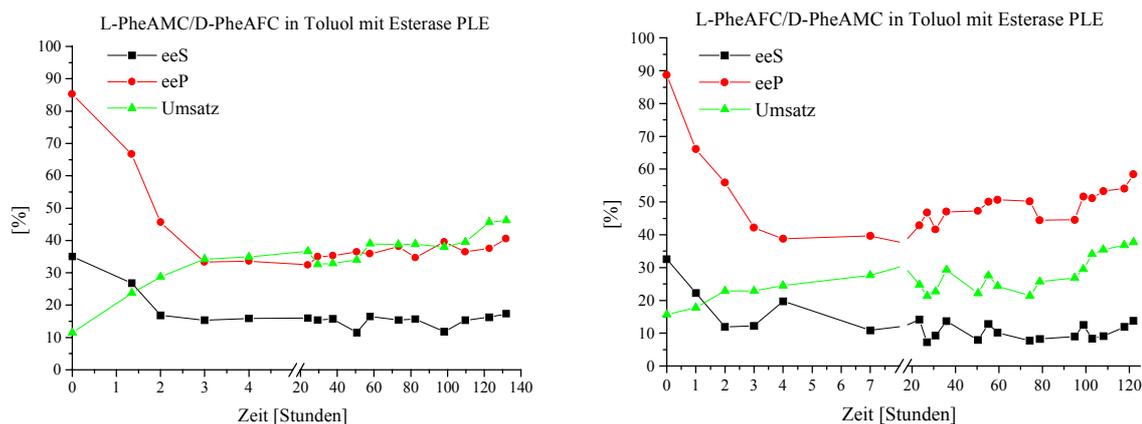


Abb. 5.57: Reaktionsverläufe der enzymatisch katalysierten Umsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC in Toluol

Die Reaktionsverläufe in Abbildung 5.57 zeigen in beiden Fällen zu Beginn der Umsetzung hohe Enantiomerenüberschüsse des Produktes. Das Enzym setzt somit am Anfang der Reaktion nur jeweils ein pseudo-Enantiomer um. Die eeS-Werte fallen jedoch rasch ab, nach vier Stunden liegen sie bei 16 % (L-PheAMC/D-PheAFC) und 20 % (L-PheAFC/D-PheAMC). Nun setzt die Esterase auch das weniger bevorzugte pseudo-Enantiomer um, gleichzeitig fallen auch die Werte für die Enantiomerenüberschüsse der Substrate ab. Der Umsatz steigt in beiden Fällen nur langsam an und erreicht jeweils nicht die 50 % Marke. Die kinetischen Daten zeigen, daß die Reaktion mit der Esterase in Toluol nur sehr langsam stattfindet, gleichzeitig können jedoch auch Veränderungen in der Enzymstruktur, hervorgerufen durch den anhaltenden Einsatz im organischen Medium, für die geringen Umsätze verantwortlich sein. Nach 100 Stunden ergibt sich für die Enantioselektivität E bei der Umsetzung von L-PheAMC/D-PheAFC ein Wert von 2,58, für die Umsetzung von L-PheAFC/D-PheAMC ein Wert von 3,54.

5.15 Erhöhung der enzymatischen Enantioselektivität in organischem Medium durch Variation der Substratsalzgrößen

Wird ein racemisches Enantiomergemisch enzymatisch umgesetzt, erfährt dabei das weniger reaktive Substratenantiomer eine größere sterische Hemmung im enzymatisch gebundenen Übergangszustand als das reaktivere Substratenantiomer. Wird das weniger reaktive Substrat weiterhin durch Salzbildung mit einem sperrigen Gegenion vergrößert, sollte dies zu einer Vergrößerung der Hemmung führen, was eine Erhöhung der Enantioselektivität zur Folge hat. Die Umsetzung der Salze kann jedoch nur in organischen Medien mit geringem Wassergehalt erfolgen, im wäßrigen Medium dissoziieren die Salze sofort und ergeben die freien Substrate. Ke und Klibanov [1998] setzten Substrate mit unterschiedlich großen Gegenionen in verschiedenen organischen Medien enzymatisch um, dabei konnte die Enantioselektivität teilweise um das fünffache gegenüber den Umsetzungen ohne Variation der Gegenionen erhöht werden. Dabei setzten die Autoren Enzyme ein, die bei den Umsetzungen Enantioselektivitäten von ca. 3 –6 aufwiesen. Die E-Werte sollten bei den Reaktionen nicht zu hoch liegen, da ansonsten die sterische Beeinflussung durch das Gegenion zu gering ausfällt.

Die Umsetzungen der Coumarinsubstrate mit der Esterase PLE in Toluol zeigen, daß die Reaktionen on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden können. Dabei ergeben sich Enantioselektivitäten von ca. 2,6 – 3,5. In den anschließenden Versuchen soll nun die Enantioselektivität der Esterase durch Variation der Substratsalzgröße erhöht werden, etwaige Änderungen in den Reaktionsabläufen werden dabei on-line verfolgt und sind somit sofort erkennbar. Bei einem gleichzeitigen Einsatz von L-PheAMC und D-PheAFC wird zuerst das D-Substrat von PLE hydrolysiert, im Anschluß das L-Substrat. Das Fluoreszenzmaximum von AFC wird jedoch sehr schnell durch das Maximum von AMC überdeckt (Abbildung 5.55). Im folgenden Versuch wird deshalb das Coumarinsubstrat L-PheAMC mit dem voluminösen Gegenion 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (TMZS) als Salz versehen [Ke und Klibanov; 1998], das Substrat D-PheAFC verbleibt als Salz mit dem bereits verwendeten kleineren Gegenion Trifluoressigsäure. Der Wassergehalt beträgt 1 %, die Temperatur wird auf 30° C eingestellt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1000 U PLE gestartet, Abbildung 5.58 zeigt den Reaktionsverlauf im direkten Vergleich mit der Umsetzung von L-PheAMC/D-PheAFC in Kapitel 5.14.3.

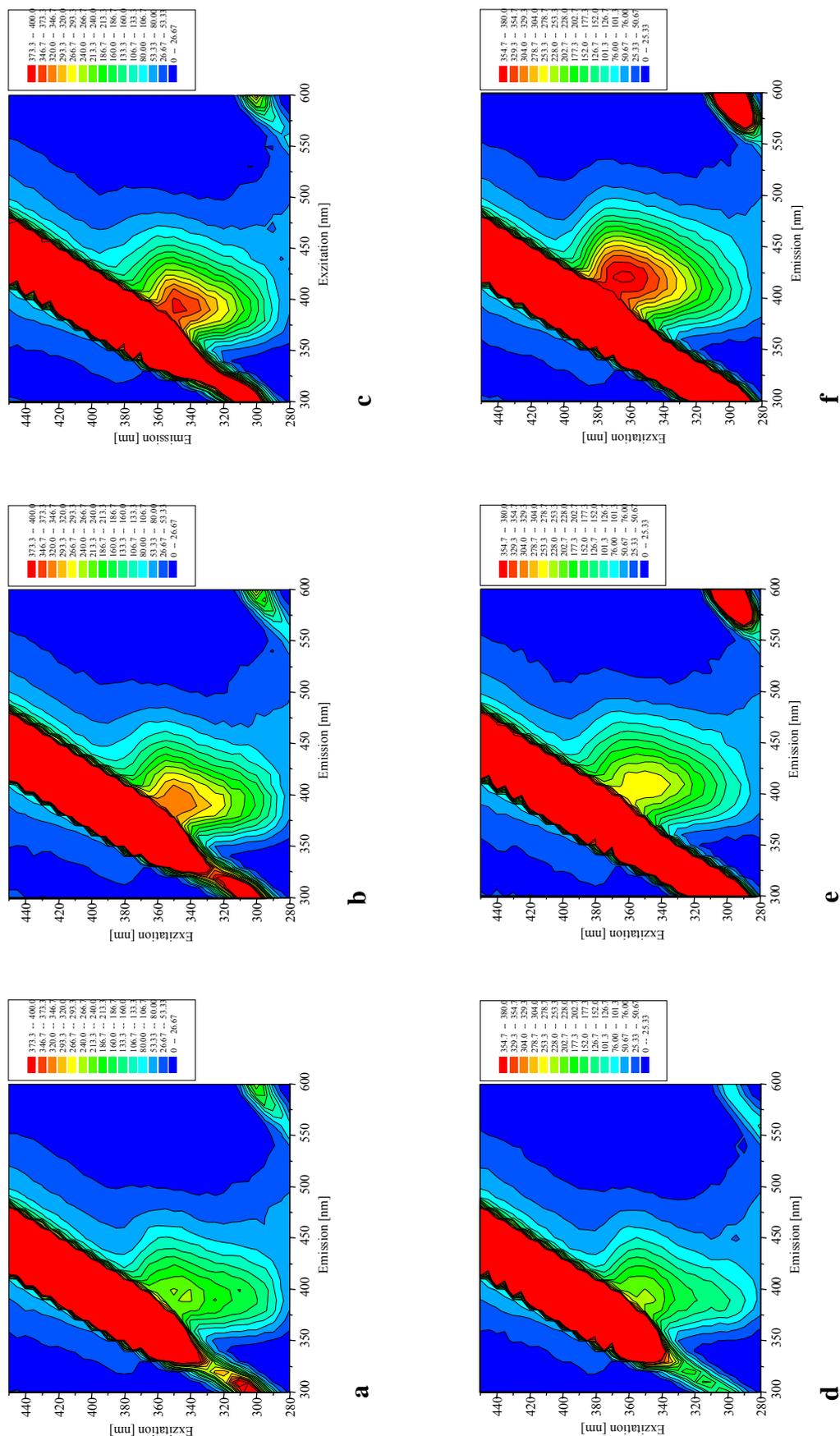


Abb. 5.58: Vergleich zwischen den enzymatischen Umsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC (**a – c**; Kap. 5.14.3) und L-PheAMC·TMZS / D-PheAFC (**d – f**) in Toluol mit PLE
a: L-PheAMC / D-PheAFC in Toluol **b:** 4 Std. nach Enzymzugabe **c:** 120 Std. nach Enzymzugabe
d: L-PheAMC·TMZS / D-PheAFC in Toluol **e:** 4 Std. nach Enzymzugabe **f:** 120 Std. nach Enzymzugabe

Abbildung 5.58 a und d zeigen die überlappenden Fluoreszenzmaxima der Coumarinsubstrate nahe der Streulichtbande. Vier Stunden nach der Enzymzugabe zeigt sich bei Abbildung 5.58 b das bereits bekannte Spektrum vom anwachsenden AMC-Peak bei $\lambda_{\text{EX}} = 345 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 390 \text{ nm}$ mit einer FI von 285. In Abbildung 5.58 e dagegen zeigt sich dagegen nach vier Stunden bei der Hydrolyse von L-PheAMC·TMZS/D-PheAFC das anwachsende Fluoreszenzmaximum vom Spaltprodukt AFC bei $\lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{EM}} = 430 \text{ nm}$ mit einer FI von 278. 120 Stunden nach der Zugabe der Esterase PLE zeigt sich in Abbildung 5.58 c nur der Fluoreszenzpeak von AMC mit einer FI von 379. Bei der Umsetzung des L-Substrats mit dem variierten Gegenion ist dagegen nach 120 Stunden nur der AFC-Peak zu erkennen (Abbildung 5.58 f). Eine Verschiebung in Richtung niedriger Wellenlängen ist jedoch vorhanden, so daß auch von einer späteren Hydrolyse des L-Substrats ausgegangen werden kann. Diese fällt jedoch im geringeren Maßstab aus, da eine Überdeckung des AFC-Peaks durch das Fluoreszenzmaximum von AMC nicht stattfindet. Weiterhin muß eine mögliche Abnahme der Enzymaktivität im organischen Medium bedacht werden.

Durch die Variation ist somit die Enantioselektivität der Esterase erfolgreich beeinflusst worden, das L-Substrat mit dem sterisch anspruchsvollen Gegenion wird im Vergleich zur Umsetzung mit gleichen Gegenionen nun im Laufe der Hydrolyse erst sehr viel später umgesetzt, die Änderung im Reaktionsverlauf kann on-line fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden. Für die Reaktion ergibt sich eine Vergrößerung der Enantioselektivität von 2,58 auf 6,31, der E-Wert wird somit um das 2,5fache erhöht. Die Werte liegen in der Größenordnung der von Ke und Klivanov [1998] gemessenen Daten, die Autoren erhöhten die Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse von 2-Benzylsuccinsäure-1-monomethylester mit der Protease Subtilisin Carlsberg durch Variation der Substrate mit verschiedenen Gegenionen von 1,5 auf 8,1.

5.16 Verwendung eines chemometrischen Modells zur Reaktionsvorhersage der enzymatischen Hydrolyse der Coumarinderivate

Die Ergebnisse aus den vorangehenden Abschnitten zeigen, daß die enzymatischen Hydrolysen der Coumarinsubstrate in die Spaltprodukte mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie on-line verfolgt werden können. Dabei kann die L-Spezifität der Protease α -Chymotrypsin im wäßrigen Medium und in Toluol bestätigt werden. Für die Esterase aus *Porcine liver* läßt sich jedoch keine eindeutige Aussage hinsichtlich ihrer Spezifität treffen. Im organischen Medium Toluol verläuft die Umsetzung der Substrate langsam, hier kann mit Hilfe von Differenzspektren eine Zuordnung vollzogen werden, welches Substrat zuerst hydrolytisch gespalten wird. Im wäßrigen Medium geschieht die Umsetzung der Coumarinderivate mit PLE jedoch sehr schnell, so daß dort allein mit der Fluoreszenzspektroskopie keine eindeutigen Aussagen über die Spezifität getroffen werden können. Die Bestimmung der kinetischen Parameter ist hier hilfreich. Im Anschluß wird deshalb ein chemometrisches Modell verwendet, um die Ergebnisse aus den wäßrigen on-line Untersuchungen und die dort bestimmten kinetischen Parameter zu verifizieren.

Dazu werden die im wäßrigen Medium aufgenommenen 2D-Spektren, zu denen bekannte Konzentrationen vorlagen, zur Kalibration als Datensätze verwendet und in ein chemometrisches Modell eingefügt [Solle; 2002], aus welcher im Anschluß eine Reaktionsvorhersage hervorgeht. Für die Modellerstellung der Produkte werden Spektren aus erstellten Kalibrationsreihen verwendet, bei denen die Fluoreszenz der einzelnen Produkte in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen wird. In die Modellerstellung zur Vorhersage der Substrate gehen Spektren aus der Kalibrierung der einzelnen Coumarinsubstrate und des dazugehörenden Produktes ein.

5.16.1 Die Sensitivitätsanalyse

Mögliche Ergebnisse aus der Modellerstellung sind die Sensitivitätsspektren, in denen relevante Spektrenbereiche zur Vorhersage der Prozessgrößen den Emissions- und Exzitationswellenlängen zugeordnet werden können. Dabei werden die Meßpunkte im 2D-Fluoreszenzspektrum ermittelt, die für eine spätere Konzentrationsvorhersage relevant sind. In Abbildung 5.59 sind die Sensitivitätsspektren der Modelle für die ausgesuchten Substrate L-PheAMC und D-PheAFC und für die Produkte AMC und AFC dargestellt.

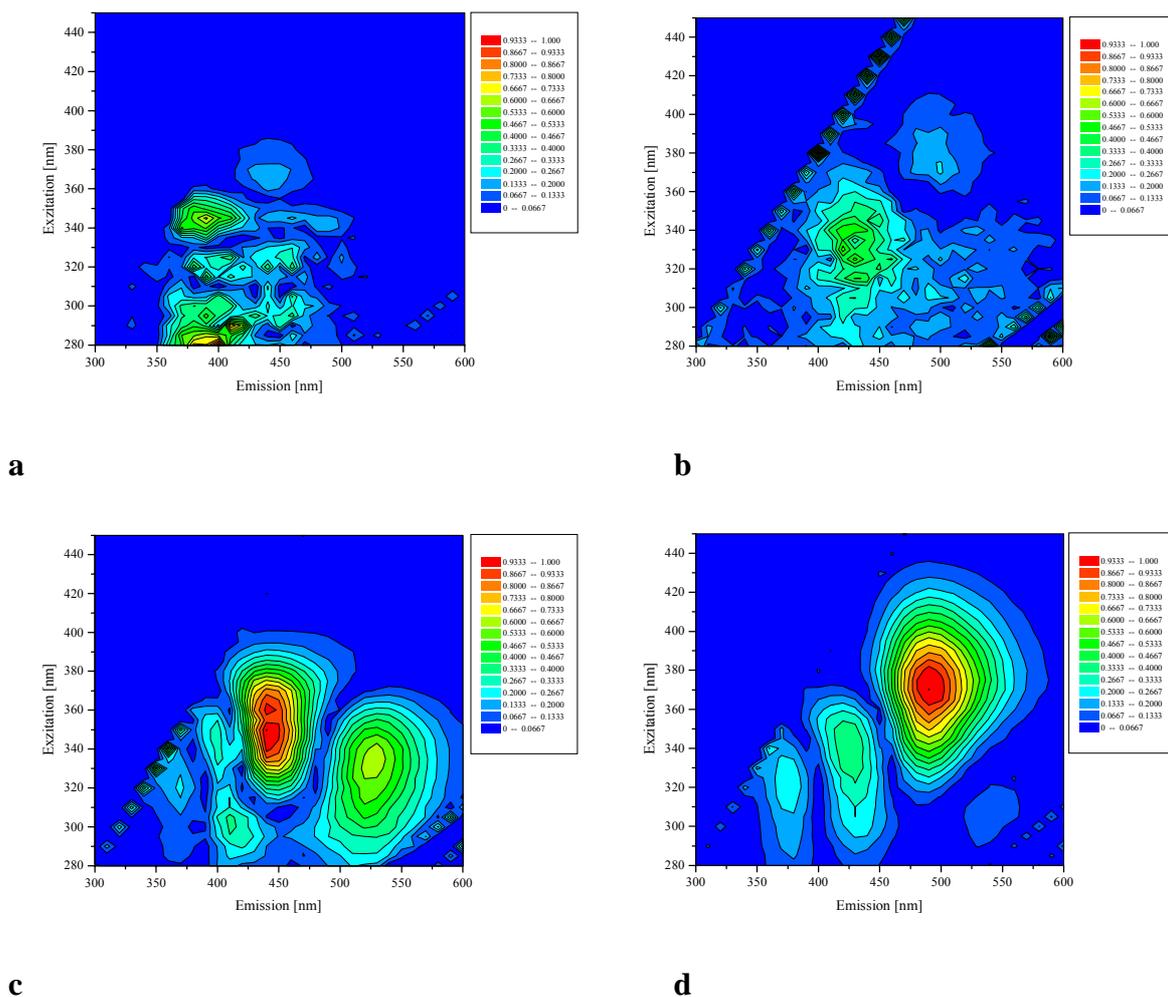


Abb. 5.59: Sensitivitätsspektren der Substrate und Produkte in KPP

a: L-PheAMC

b: D-PheAFC

c: AMC

d: AFC

Die Maxima der Produkte AMC und AFC aus den chemometrischen Analysen stimmen gut mit den Fluoreszenzmaxima aus den Untersuchungen im wässrigen Medium überein. Für die Substrate erfolgt jedoch keine gute Ermittlung der relevanten Exzitations-/Emissionswellenlängen. Für die Substratanalyse werden Kalibrationspektren von reinem L-PheAMC oder L-PheAFC und Kalibrationspektren aus dem Gemisch von Substrat und dem entsprechendem Produkt verwendet. Dadurch kann es bei den Substratvorhersagen zu möglichen Beeinflussungen durch die entsprechenden Produkte kommen.

5.16.2 Die chemometrischen Vorhersagen aus den Einzelumsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin und PLE

Zuerst werden die chemometrischen Modelle zur Vorhersage der Einzelumsetzungen der Substrate L-PheAMC und D-PheAFC durch α -Chymotrypsin und PLE verwendet.

Abbildung 5.60 zeigt die Vorhersage für die Hydrolyse von L-PheAMC mit der Protease α -Chymotrypsin in KPP.

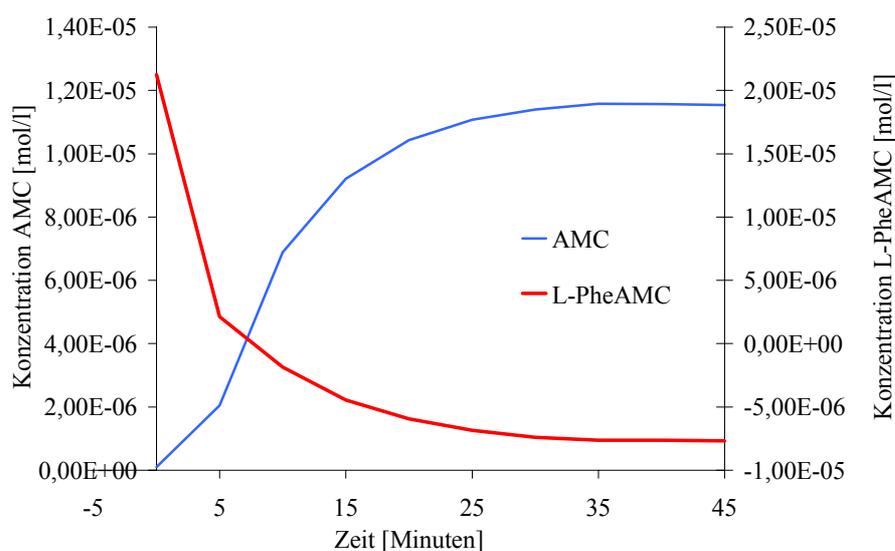


Abb. 5.60: Vorhersage der Hydrolyse von L-PheAMC in KPP durch α -Chymotrypsin

Die Vorhersage in Abbildung 5.60 zeigt die Abnahme des Substrats L-PheAMC und die Zunahme des Produkts AMC. Der Reaktionsverlauf wird gut wiedergegeben, jedoch werden die absoluten Konzentrationen für das Produkt und das Substrat nicht gut vorhergesagt. Die Konzentration von L-PheAMC sinkt schon für die dritte Vorhersage unter null, außerdem erreicht das Produkt AMC nicht die zu erwartende Konzentration von $2,1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Eine Ursache hierfür könnte in den Kalibrationsdatensätzen liegen, für niedrige Substratkonzentrationen und hohe Produktkonzentrationen zeigt sich kein linearer Verlauf mehr in der FI, so daß diese Konzentrationen nicht zur Modellerstellung benutzt werden konnten. Abbildung 5.61 zeigt den Vergleich zwischen der chemometrischen Reaktionsvorhersage für AMC und dem Anstieg in der FI für AMC aus der enzymatischen Umsetzung in KPP (Kapitel 5.6.1).

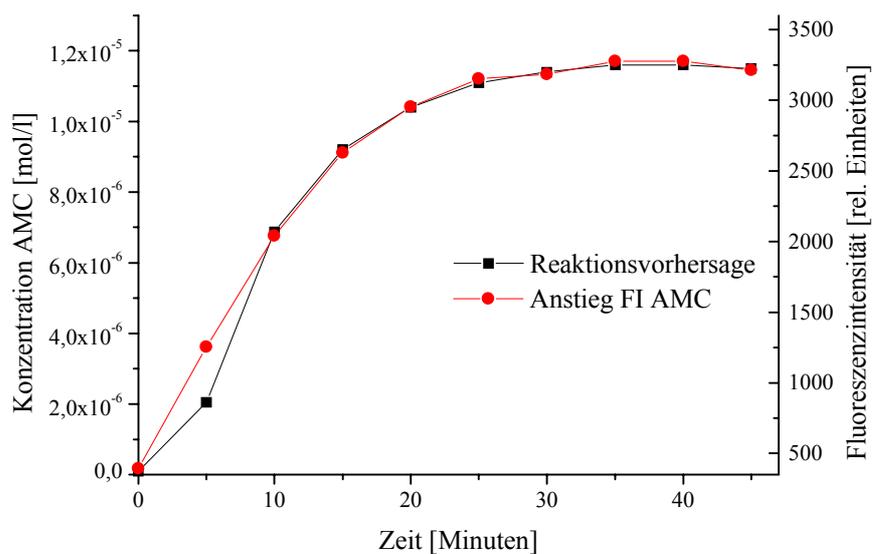


Abb. 5.61: Vergleich der chemometrischen Reaktionsvorhersage / Anstieg FI für AMC für die Umsetzung von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin

Hierbei zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Berechnungen aus den off-line Daten der chemometrischen Reaktionsvorhersage und den on-line Daten aus dem gemessenen Anstieg der FI von AMC in KPP. Da für die enzymatische Umsetzung von D-PheAFC mit α -Chymotrypsin nur geringfügige Änderungen in den Substrat- Produktkonzentrationen auftreten, wird auf eine Darstellung der Reaktionsvorhersage verzichtet.

Im Anschluß wird die Hydrolyse von L-PheAMC mit der Esterase PLE mit Hilfe des chemometrischen Modells vorhergesagt werden. Abbildung 5.62 zeigt die Modellvorhersage.

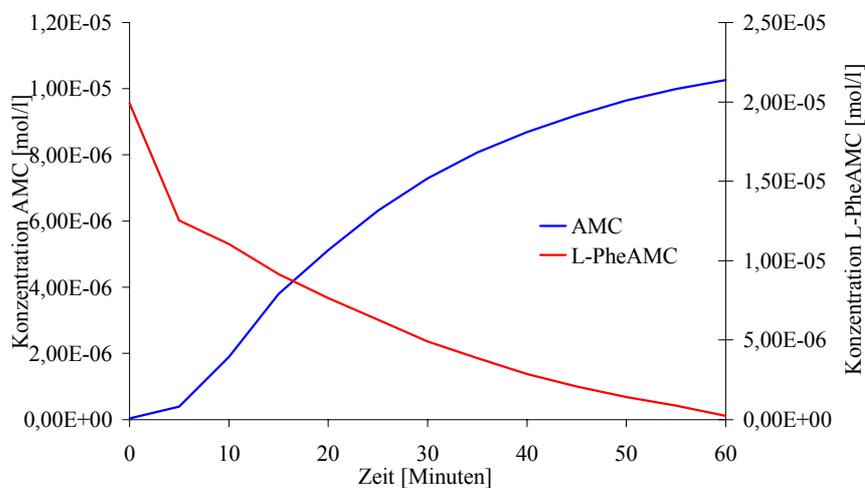


Abb.5.62: Vorhersage der Hydrolyse von L-PheAMC in KPP durch PLE

Auch hier zeigt die Reaktionsvorhersage die Abnahme der Substratkonzentration und die Zunahme der Produktkonzentration. Die zu erwartende Konzentration vom Spaltprodukt AMC wird hier ebenfalls nicht erreicht, da wiederum bei der Modellerstellung die höheren Produktkonzentrationen nicht verwendet wurden. Das starke Abknicken in den Kurvenverläufen des Substrats und des Produkts erfolgt wahrscheinlich durch plötzlich auftretende Konzentrationsänderungen, verursacht durch die Enzymzugabe.

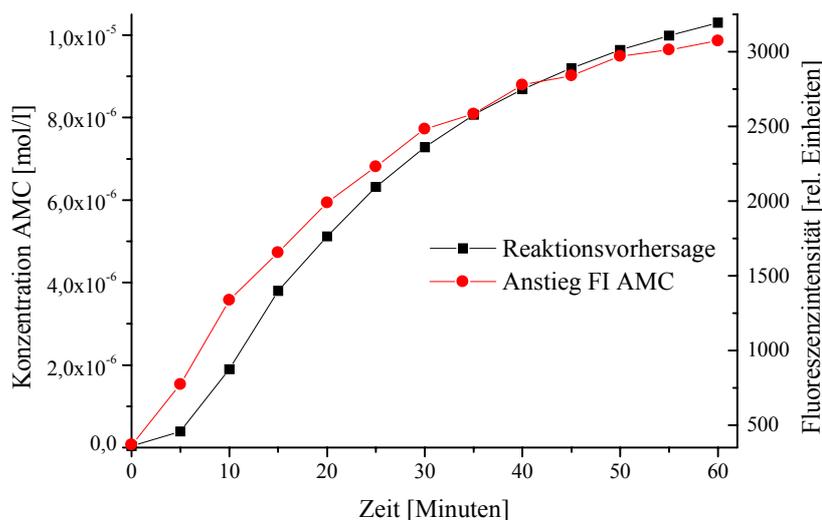


Abb. 5.63: Vergleich der chemometrischen Reaktionsvorhersage / Anstieg FI für AMC für die Umsetzung von L-PheAMC mit PLE

Ein Vergleich zwischen der Reaktionsvorhersage und den on-line Daten aus der Hydrolyse des Coumarinsubstrats in KPP zeigt auch hier eine gute Übereinstimmung.

Die letzte Modellvorhersage wird für die Umsetzung von D-PheAFC mit PLE durchgeführt. Abbildung 5.64 zeigt die Ergebnisse aus der chemometrischen Vorhersage.

Der Verlauf der Vorhersage ist gut gelungen. Die reale Produktkonzentration wird nahezu erreicht, obwohl für die Kalibration die hohen Produktkonzentrationen wiederum nicht verwendet wurden.

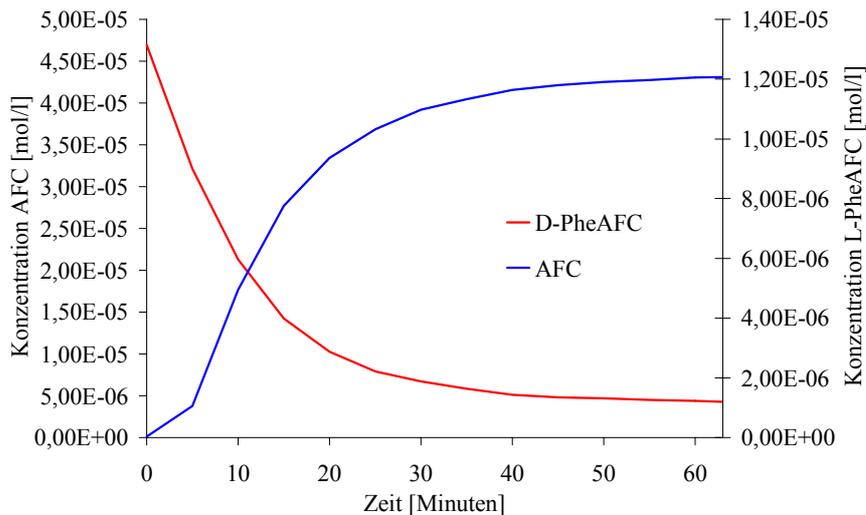


Abb.5.64: Vorhersage der Hydrolyse von D-PheAFC in KPP durch PLE

Abbildung 5.65 zeigt den Vergleich der Datensätze aus der chemometrischen Reaktionsvorhersage und der Umsetzung des Substrats in KPP, ausgedrückt durch den Anstieg der FI von AFC.

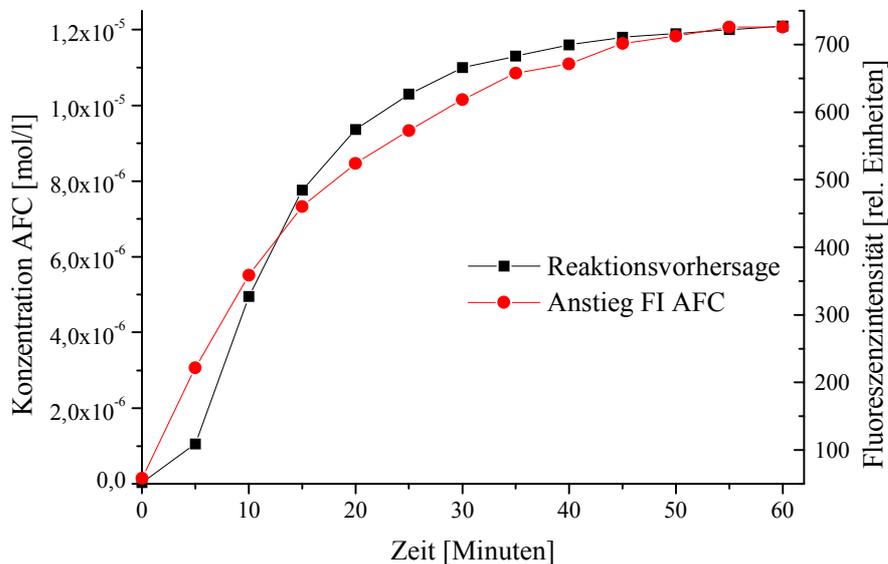


Abb. 5.65: Vergleich der chemometrischen Reaktionsvorhersage / Anstieg FI für AFC für die Umsetzung von D-PheAFC mit PLE

Auch hier zeigt sich ein guter Vergleich zwischen der Vorhersage und den on-line gewonnenen Daten.

5.16.3 Die chemometrischen Vorhersagen aus den gleichzeitigen Umsetzungen von L-PheAMC / D-PheAFC mit α -Chymotrypsin und PLE

Die Ergebnisse aus den Einzelumsetzungen zeigen, daß mit Hilfe eines chemometrischen Modells eine Reaktionsvorhersage für die Hydrolysen der Coumarinsubstrate in KPP getroffen werden kann. Im Anschluß werden nun die Daten aus den gleichzeitigen Hydrolysen der Coumarinderivate in KPP zur Modellvorhersage verwendet.

Zuerst werden die Vorhersagen für die enzymatischen Umsetzungen mit α -Chymotrypsin getroffen (Abbildung 5.66).

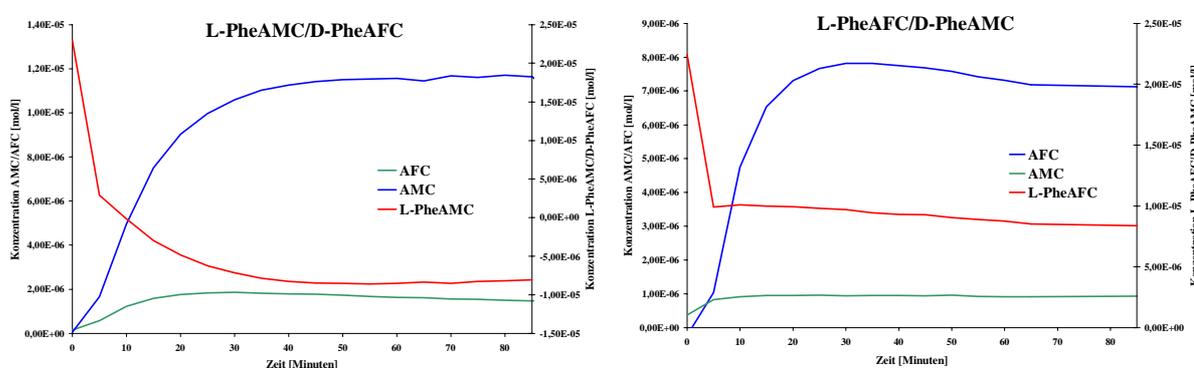


Abb. 5.66: Reaktionsvorhersagen für die gleichzeitigen Hydrolysen der Coumarinsubstrate mit α -Chymotrypsin in KPP

Für beide Vorhersagen konnte kein Modell für die Konzentrationsverläufe aus den Datensätzen der D-Substrate erstellt werden. Die Vorhersagen zeigen die jeweilige Abnahme der L-Substrate und die Zunahme der entsprechenden Spaltprodukte. Auch hier werden die realen Konzentrationen für die Produkte nicht vorhergesagt, die Konzentration von L-PheAMC fällt erneut unter null. Weiterhin ist ein geringer Anstieg in dem jeweiligen Spaltprodukt des D-Substrats zu erkennen, der in diesem Zeitrahmen noch nicht durch die Autoprotolyse der D-Substrate verursacht werden kann. Bei der Modellerstellung liegen die Produktpeaks nahe beieinander, so daß es bei der Vorhersage zu Beeinflussungen zwischen den Produktpeaks kommt. Der Verlauf des L-Substrats bei der Umsetzung von L-PheAFC/D-PheAMC zeigt einen ausgeprägten Knick, danach ist keine starke Abnahme der Substratkonzentration mehr erkennbar. Dies zeigt, daß für diese Hydrolyse das gewählte Zeitintervall von fünf Minuten zwischen der Aufnahme der 2D-Spektren zu groß ist. Die L-Spezifität von α -Chymotrypsin kann jedoch mit der Modellvorhersage verifiziert werden.

Im Anschluß werden die Modellvorhersagen für die Umsetzungen mit der Esterase PLE erstellt.

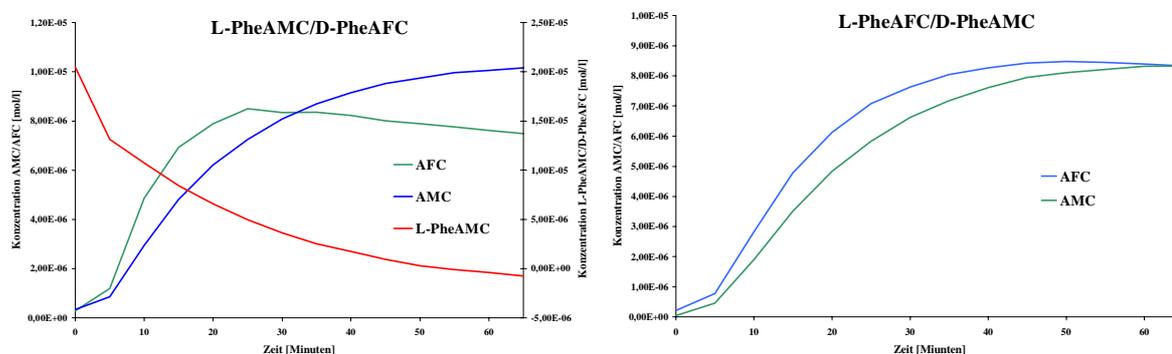


Abb. 5.67: Reaktionsvorhersagen für die gleichzeitigen Hydrolysen der Coumarinsubstrate mit der Esterase PLE in KPP

Für die Umsetzung von L-PheAMC/D-PheAFC mit PLE kann für das D-Substrat keine Modellvorhersage getroffen werden, für die Hydrolyse von L-PheAFC/D-PheAMC mit PLE ist es nicht möglich, aus den verwendeten Datensätzen ein Modell für die Substrate zu erstellen. Die Vorhersagen der Produkte verifizieren jedoch die Ergebnisse aus den on-line Umsetzungen in KPP (Kapitel 5.8.3). Bei der Umsetzung von L-PheAMC/D-PheAFC mit PLE wird als Ergebnis aus der Modellvorhersage das D-Substrat schneller umgesetzt, ausgehend von der schnelleren Zunahme der AFC-Konzentration gegenüber der AMC-Konzentration. Für die Hydrolyse von L-PheAFC/D-PheAMC ergibt die Modellvorhersage eine geringfügig schnellere Hydrolyse des L-Substrats, ausgehend von der geringfügig schneller anwachsenden AFC-Konzentration gegenüber der AMC-Konzentration. Somit bestätigen die chemometrischen Modellvorhersagen die Ergebnisse aus den on-line Untersuchungen in Kapitel 5.8.3.

Da für die Modellerstellung nur Spektren verwendet wurden, die die einzelnen Substrate und Produkte allein enthalten, sind die Vorhersagen der chemometrischen Modelle nur bedingt aussagekräftig. Die Modelle für die Produkte zeigen jedoch, daß trotz der dicht beieinanderliegenden Fluoreszenzmaxima eine chemometrische Differenzierung möglich ist. Für aussagekräftigere Modelle müßten durch „experimental design“ Spektren mit verschiedenen Mischungen der Produkte und Substrate mit entsprechender Kenntnis der Konzentrationen der Fluorophore erstellt werden. Hierdurch sollte es möglich sein, die komplexen Zusammenhänge zwischen den sich gegenseitig beeinflussenden Prozessvariablen (Fluoreszenz / Konzentration) modellieren zu können.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden vier fluoreszenzspektroskopisch detektierbare Coumarinderivate synthetisiert, L-/D-PheAMC und L-/D-PheAFC, bei denen die Fluoreszenzanregungen im UV/VIS-Bereich liegen. Durch die Verknüpfung der Coumarine mit L-/D-Phenylalaninmolekülen über Peptidbindungen verfügen die Substrate über eine absolute Konfiguration, so daß eine enantioselektive Reaktion simuliert werden konnte. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substituenten R-CH₃ und R-CF₃ besitzen die Coumarinsubstrate und deren Spaltprodukte unterschiedliche Fluoreszenzpunkte im 2D-Fluoreszenzspektrum. Die methylsubstituierten Coumarinsubstrate / -produkte zeigen dabei eine höhere FI als die trifluoromethylsubstituierten Coumarinsubstrate / -produkte. Die fluoreszenzspektroskopisch untere Nachweisgrenze lag für L-/D-PheAMC bei $3,4 \cdot 10^{-8}$ mol/l, bei L-/D-PheAFC bei $2,1 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

Stabilitätsuntersuchungen im wäßrigen Medium zeigten bei allen Substraten eine Autoprotolyse der Fluorophore nach 24 Stunden an, welche die kinetischen Parameter für die Hydrolyse der D-Substrate mit α -Chymotrypsin in KPP in späteren Untersuchungen beeinflussten. Experimente zur Temperaturstabilität der Coumarinsubstrate in KPP zeigten eine steigende Zersetzung der Derivate mit ansteigender Reaktionstemperatur, welche daraufhin auf 25° C festgelegt wurde.

Bei einem Enzymscreening erwiesen sich die Protease α -Chymotrypsin und die Esterase aus *Porcine liver* als geeignete Biokatalysatoren für die Hydrolyse der Fluorophore. Die Einzelumsetzungen der Substrate mit der Protease und der Esterase konnten on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden, schon hier konnte die L-Spezifität von α -Chymotrypsin on-line bestätigt werden. Die Esterase erwies sich als unselektiv. Aus den Einzelumsetzungen wurden die kinetischen Parameter v_{\max} und K_M bestimmt. Es zeigte sich, daß die Autoprotolyse der D-Coumarinsubstrate eine scheinbare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für α -Chymotrypsin verursacht. Alle Substrate zeigten eine hohe Affinität zu den eingesetzten Enzymen, ausgedrückt durch niedrige Ergebnisse für die Michaelis-Konstanten. Weiterhin ergaben die kinetischen Untersuchungen eine kompetitive Hemmung von α -Chymotrypsin durch die D-Substrate.

Ein gleichzeitiger Umsatz beider Coumarinderivate L-PheAMC/D-PheAFC und L-PheAFC/D-PheAMC mit α -Chymotrypsin und PLE konnte on-line verfolgt werden, auch hier wurde sofort die L-Spezifität der Protease detektiert. Bei den Hydrolysen mit der

unselektiven Esterase ergaben sich keine eindeutigen Aussagen zur Spezifität des Enzyms, erst durch die Bildung von Differenzspektren konnte eine Zuordnung der Ergebnisse aus den ansteigenden Fluoreszenzmaxima erfolgen. Bei einem Einsatz von L-PheAMC/D-PheAFC setzte die Esterase zuerst das D-Substrat um, wurden L-PheAFC/D-PheAMC vorgelegt, wurde zuerst das L-Substrat hydrolysiert.

Für die Coumarinsubstrate und Spaltprodukte wurde eine zuverlässige HPLC-Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse entwickelt. Im wäßrigen Medium ergaben sich Enantiomerenüberschüsse von ca. 95 % ee für die Umsetzungen mit α -Chymotrypsin und ca. 10 % ee für die Hydrolysen mit der Esterase aus *Porcine liver*. Die ee-Werte für die Reaktionen mit der Protease wurden durch die Autoprotolyse der Substrate in KPP erniedrigt. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung der on-line Daten mit den off-line gewonnenen Daten.

Die hohe Stereoselektivität bei den Umsetzungen mit α -Chymotrypsin und die niedrige bei den Reaktionen mit PLE konnten anhand von Modellen der aktiven Zentren der Biokatalysatoren erklärt werden.

Die Umsetzungen der Coumarinsubstrate wurden im Anschluß auf organische Lösemittel übertragen. Lösemittel mit hohem log P (Toluol, Dodecanol) ergaben tendenziell eine höhere Aktivität, eine Korrelation mit dem Dipolmoment und der Dielektrizitätskonstante wurde gefunden. Stabilitäts- und Aktivitätsuntersuchungen der Enzyme in Toluol ergaben eine ausreichende Stabilität und eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von L-PheAMC mit nativ eingesetztem α -Chymotrypsin. Die nativ eingesetzte Esterase zeigte eine erheblich geringere Hydrolysegeschwindigkeit in Toluol, dabei wurden auch Untersuchungen der Esterase, immobilisiert auf verschiedenen Trägermaterialien, durchgeführt.

Für die enzymatischen Hydrolysen der Coumarinderivate wurden die Wassergehalte für das Gesamtsystem ermittelt, bei denen sich die höchsten Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ergaben. Für die Umsetzungen mit α -Chymotrypsin lag dieser bei 0,5 % KPP, für die Hydrolysen mit der Esterase PLE bei 1 % KPP.

Eine on-line-Verfolgung der Hydrolyse von L-PheAMC mit α -Chymotrypsin durch die Messung der Wasseraktivität war nur bedingt möglich.

Die Fluoreszenzpeaks der Substrate und Produkte im 2D-Spektrum verschoben sich bei einem Einsatz in Toluol in Richtung niedrigerer Wellenlängen, außerdem näherten sich die Maxima einander an. Dies erschwerte bei der on-line-Verfolgung der enzymatischen Umsetzungen in Toluol eine eindeutige Zuordnung der Peakmaxima.

Die enzymatischen Einzelumsetzungen der Coumarinsubstrate in Toluol konnten on-line verfolgt werden, aufgrund des niedrigen Wassergehalts im Gesamtsystem zeigte sich keine Autoprotolyse der Coumarinderivate im organischem Lösemittel.

Die kinetischen Untersuchungen der Zwei-Substrat-Reaktionen ergaben für α -Chymotrypsin bei einem niedrigen Wassergehalt einen möglichen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus, dieser ging bei einer Erhöhung des Wassergehalts wahrscheinlich in einen zufälligen/geordneten Bi-Bi-Mechanismus über. Die Umsetzungen in Toluol mit PLE gehorchen wahrscheinlich einem zufälligen/geordneten Bi-Bi-Mechanismus. Die kinetischen Parameter v_{\max} und K_M für die eingesetzten Biokatalysatoren in Toluol wurden bestimmt.

Bei den on-line Untersuchungen der gleichzeitigen Umsätze der Coumarinsubstrate in Toluol konnte die L-Spezifität von α -Chymotrypsin erneut sofort bestätigt werden, dabei wirkten auch in Toluol die D-Substrate als kompetitive Inhibitoren für die Protease. Im Gegensatz zu den Reaktionen in KPP konnte durch die langsame Umsetzung der Coumarinsubstrate mit PLE in Toluol die Spezifität des Enzyms on-line erfaßt werden. Bei einem gleichzeitigem Einsatz von L-PheAMC/D-PheAFC setzte die Esterase bevorzugt das D-Substrat um, bei einem Einsatz von L-PheAFC/D-PheAMC wurde ebenfalls das D-Substrat bevorzugt hydrolysiert. Im wäßrigen System spaltete das Enzym noch zuerst L-PheAFC, somit konnte die Stereospezifität von PLE durch eine Änderung des Lösemittels (KPP, Toluol) umgekehrt werden. In Toluol ergaben sich Enantiomerenüberschüsse von $> 98\%$ ee für die Umsetzungen mit α -Chymotrypsin und von ca. 16 - 20 % ee für die Hydrolysen mit der Esterase aus *Porcine liver*.

Weiterhin wurde die Salzgröße eines der eingesetzten Coumarinsubstrate variiert, dadurch konnte die Enantioselektivität der Esterase aus *Porcine liver* erfolgreich beeinflusst werden. Dabei war es möglich, die Änderungen im Reaktionsablauf on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zu erfassen.

Abbildung 6.1 faßt schematisch die Erhöhung der Enantioselektivität der Umsetzungen der Coumarinderivate mit α -Chymotrypsin und der Esterase aus *Porcine liver* in KPP/Toluol zusammen.

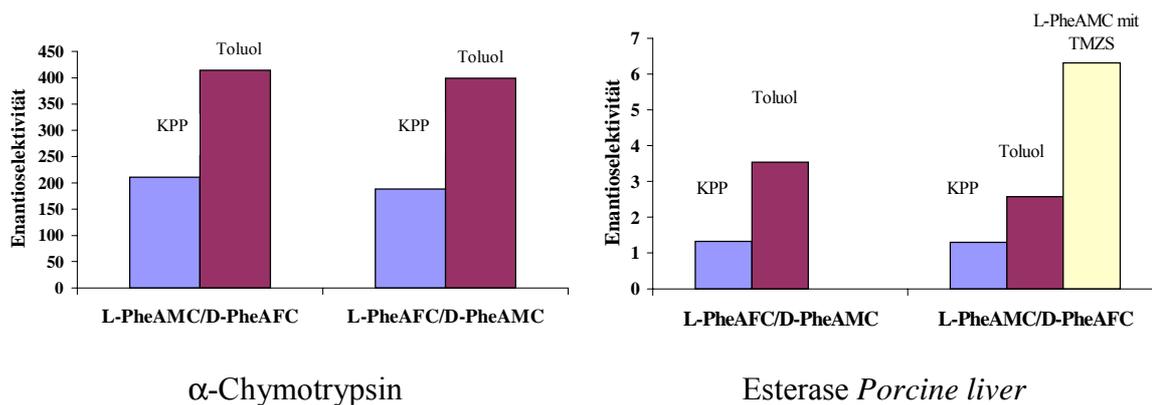


Abb. 6.1: Änderung der Enantioselektivität in unterschiedlichen Reaktionsmedien

Durch die Übertragung der Daten aus den einzelnen Umsetzungen im wässrigen System auf ein chemometrisches Modell konnten Sensitivitätsspektren erstellt werden, welche die essentiellen Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren während der enzymatischen Hydrolyse darstellten. Weiterhin wurde durch das Modell eine Reaktionsvorhersage durchgeführt, mit der die kinetischen Parameter aus den Umsetzungen der Coumarinsubstrate mit der Esterase PLE in KPP verifiziert werden konnten.

7. Diskussion und Ausblick

Die Protease α -Chymotrypsin und die Esterase aus *Porcine liver* erwiesen sich in den durchgeführten Hydrolysen als die reaktivsten Enzyme. Bei den verwendeten Coumarinsubstraten wurden große Unterschiede in der Enantioselektivität gefunden. Die Protease α -Chymotrypsin setzte nur die L-Coumarinderivate um, die D-Substrate stellten sich als kompetitive Inhibitoren für das Enzym heraus. Bei den Hydrolysen wurden hohe Enantioselektivitäten festgestellt. Die Esterase PLE dagegen spaltete völlig unspezifisch alle L- und D-Coumarinsubstrate, die Enantioselektivitäten für diese Umsetzungen fielen dementsprechend niedrig aus.

Zur Erklärung dieser experimentellen Befunde wird für die Protease PLE das von Kim [1993] vorgeschlagene Modell des aktiven Zentrums von α -Chymotrypsin auf die L- und D-Substrate angewandt (Kapitel 3.4). Für die Esterase aus *Porcine liver* wird das von Toone *et al.* [1990] erstellte und weiterentwickelte „active-site“ Modell für die Coumarinsubstrate verwendet (Kapitel 3.4) [Toone und Jones; 1991]. In beiden Fällen ist jedoch zu berücksichtigen, daß beide zweidimensionale Modelle nur bedingt aussagekräftig sind und etwaige konformative Änderungen in der Enzymstruktur, hervorgerufen z. B. durch Lösemiteleinflüsse, nicht berücksichtigt werden können. Abbildung 7.1 zeigt das L-Coumarinsubstrat im aktiven Zentrum der Protease α -Chymotrypsin.

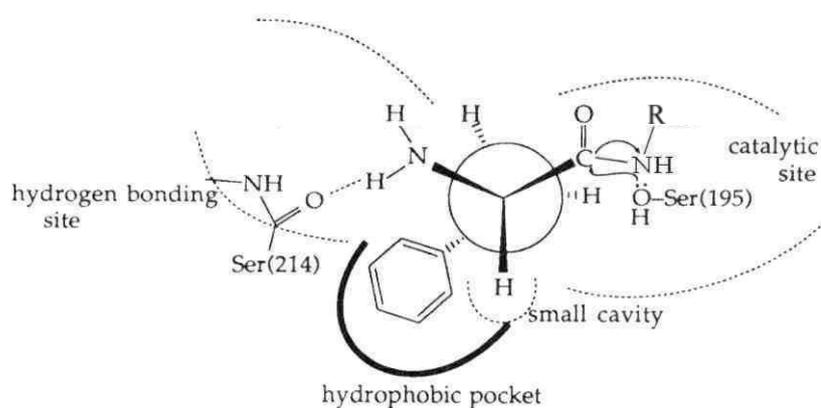


Abb. 7.1: Einpassung des L-Substrats in das Modell des aktiven Zentrums von α -Chymotrypsin

Das L-Substrat wird teilweise in der Newman Projektion dargestellt. Dabei ist zu erkennen, daß die große hydrophobe Tasche des Enzyms den Phenylrest des Substrats aufnimmt. Weiterhin hält eine Wasserstoffbrücke, ausgebildet von dem Carbonylatom von Ser-214 und dem Amidwasserstoff des Substrats, das Coumarinderivat in einer reaktiven Position. Die Hydroxylgruppe von Ser-195 kann nun die Carbonylfunktion der Peptidbindung des Substrats angreifen, es resultiert daraus ein Acylenzymintermediat, aus welchem das Spaltprodukt und die Phenyllessigsäure hervorgehen. Abbildung 7.2 zeigt die Bindung des D-Substrats in das aktive Zentrum von α -Chymotrypsin.

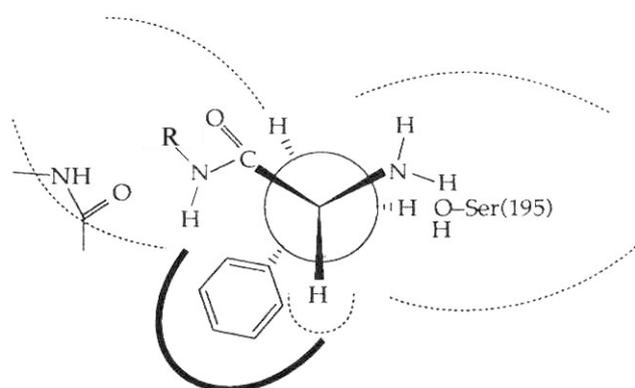


Abb. 7.2: Einpassung des D-Substrats in das Modell des aktiven Zentrums von α -Chymotrypsin

Für das D-Substrat in Abbildung 7.2 ergibt sich keine produktive Bindungsmöglichkeit in das aktive Zentrum von α -Chymotrypsin. An Stelle der Peptidbindung liegt nun die Amidfunktion des Substrats auf der katalytischen Seite des Enzyms, eine Umsetzung des D-Substrats kann so nicht erfolgen. Das Modell von Kim [1993] erklärt somit gut die hohe Stereoselektivität bei der Verwendung der L- und D-Coumarinsubstrate.

In Abbildung 7.3 ist nun die Einpassung der Coumarinderivate in das aktive Zentrum der Esterase aus *Porcine liver* dargestellt. Die geringe Stereoselektivität bei einem Einsatz beider Substrate läßt sich ansatzweise erklären.

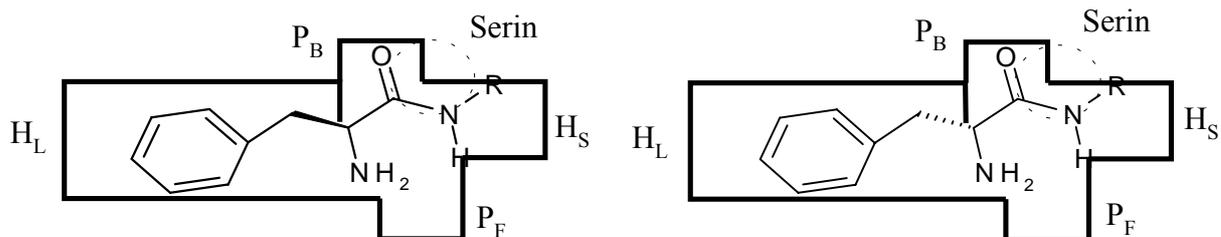


Abb. 7.3: Einpassung der L- und D-Substrate in das aktive Zentrum der Esterase PLE

Beide pseudo-Enantiomere passen scheinbar ähnlich gut in das aktive Zentrum der Esterase, es liegen vermutlich nur geringe energetische Unterschiede zwischen den eingepaßten Coumarinsubstraten vor. Bei beiden Coumarinderivaten liegt die Peptidbindung in der Nähe des katalytischen Serinrestes, welcher für die Spaltung der Substrate verantwortlich ist. Somit läßt sich auch mit dem Modell von Toone und Jones [1991] die geringe Stereoselektivität bei einem Einsatz der L- und D-Substrate erklären.

Im wäßrigen System konnten die gleichzeitig eingesetzten L- und D-Coumarinsubstrate und die daraus resultierenden Spaltprodukte relativ gut voneinander im 2D-Fluoreszenzspektrum unterschieden werden. Die Maxima der Produkte AMC und AFC lagen weit genug voneinander im Spektrum entfernt, bei den eingesetzten Substraten gestaltete sich jedoch eine Detektion zwischen den nah aneinander liegenden Peakmaxima im Spektrum schwieriger. Die geringere FI der Substrate könnte durch eine Reduktion der Planarität des Coumarinmoleküls durch den Phenylalaninsubstituenten in der 7-Position hervorgerufen werden, da sich Veränderungen in der Molekülplanarität direkt auf die Konjugation der Elektronen im Fluorophor und somit auf die FI auswirken [Christie und Lui; 2000]. Für eine bessere on-line Detektion müßten die Fluoreszenzmaxima aller beteiligten Substrate und Produkte weiter voneinander entfernt vorliegen. Die Übertragung der Reaktion auf organische Lösemittel zeigte, das hierbei die Fluoreszenzmaxima sich einander annäherten, was eine eindeutige Zuordnung der Maxima erschwerte. Eine Variation der Substituenten in der 4-Position des Coumarinmoleküls würde möglicherweise die Fluoreszenzmaxima der Substrate und Produkte im Spektrum weiter voneinander entfernen. Schade *et al.* [1999] beschreiben durch die Einführung einer Hydroxyfunktion in die 4-Position von 7-Methoxycoumarin eine Verschiebung in Richtung niedrigerer Wellenlängen gegenüber 7-Methoxy-4-methylcoumarin. Weitere Beispiele für die Einflüsse von Substituenten auf die Lage der Fluoreszenzmaxima von Coumarinderivaten werden von Christie und Lui [2000] aufgelistet. Durch die Änderung eines der Substituenten der Coumarinderivate würde möglicherweise

somit dessen Lage in Richtung niedriger Wellenlängen im 2D-Spektrum verschoben werden, gleichzeitig würde jedoch auch der Charakter der Enantioselektivität bei den Coumarinsubstraten verloren gehen. Die Substrate sind pseudo-Enantiomere, die Methyl- und die Trifluoromethylsubstituenten wurden aufgrund ihrer geringen Größenunterschiede ausgewählt (Tabelle 7.1), neben ihrer unterschiedlichen Peaklage im 2D-Spektrum (Kapitel 5.2.1).

Tab. 7.1: Van der Waals-Radien der Substituenten

Substituent	Van der Waals-Radius [\AA]
-CH ₃	1,79
-CF ₃	2,22
-CCl ₃	2,88
-CBr ₃	3,19

Eine Vorhersage der Fluoreszenzcharakteristiken (FI, maximale Exzitations- und Emissionswellenlängen) von Molekülen, ausgehend von ihrer Struktur und ihren Substituenten, ist schwierig. Uchiyama *et al.* [1998] benutzen die Hammett-Substituentenkonstanten (σ_p) [Hansch *et al.*; 1991], um mit ihrer Hilfe die elektronischen Effekte von Substituenten in der 4- und 7-Position von Benzofuran, und somit dessen Fluoreszenzeigenschaften, zu beschreiben und vorherzusagen.

Die Untersuchungen in organischen Lösemitteln zeigten, daß durch „substrate engineering“ die Enantioselektivität eines Enzyms teilweise beeinflusst werden kann. Weitere Experimente mit variierender Größe des Gegenions wären vorteilhaft. Während Ke und Klivanov [1999] beide Enantiomere im racemischen Gemisch nur mit dem gleichen Gegenion ausstatten konnten, können die Coumarinsubstrate hier getrennt voneinander verändert werden. Dadurch ist eine noch größere Varianz zwischen den Substraten, und somit größere Veränderungen in der Enantioselektivität des Enzyms, welche on-line detektiert werden können, denkbar.

Auch sollte die Reaktion in weiteren unterschiedlichen Lösemitteln untersucht werden, überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium wäre hier ebenfalls denkbar. Bereits durchgeführte Untersuchungen in SCCO₂ zeigen, das auch dort die enzymatische Hydrolyse der Substrate on-line verfolgt werden kann [Knüttel; 1999]. Die Enantioselektivität des Enzyms könnte in diesem Medium über mögliche Temperatur- und Druckveränderungen

beeinflusst werden. Jedoch zeigt das trifluoromethylsubstituierte Coumarinderivat in SCCO_2 eine fünfmal bessere Löslichkeit als das methylsubstituierte. Dadurch müßte eine Anlage mit zwei Reaktoren entwickelt werden, in dem einen erfolgt die Lösung beider Coumarinsubstrate in SCCO_2 , die Reaktion könnte dann durch die Zugabe des Enzyms, welches in dem zweiten Reaktor gelöst im überkritischen Kohlendioxid vorliegt, erfolgen. Ähnliche Anlagen wurden bereits von Hartmann [1999] und Tservistas *et al.* [2001] beschrieben.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse der Coumarinderivate wäre ein weiteres Enzymscreening, da die hier untersuchten Enzyme nur einen kleinen Teil der kommerziell erhältlichen Biokatalysatoren darstellen. Neben natürlichen Quellen bietet es sich mit Hilfe der Gentechnologie an, sowohl vorhandene Enzyme zu verbessern („Protein engineering“) als auch neue zu kreieren. Bornscheuer [1999] dokumentierte die Darstellung einer Esterase durch gerichtete Evolution, die einen Hydroxyester für die Epothilonsynthese umsetzte. Dieser Ester wurde von keinem weiteren herkömmlichen Enzym akzeptiert.

Während in dieser Arbeit nur hydrolytisch spaltende Enzyme eingesetzt wurden, wäre auch eine umgekehrte Reaktion denkbar. Möglicherweise läßt sich eine Verknüpfung der freien Coumarine AMC und AFC mit der L-/D-Aminosäure zu fluoreszierenden Produkten on-line mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie verfolgen. Somit könnte das Spektrum der verwendbaren Enzyme erheblich erweitert werden.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen und Zeichenerklärungen

[]	Konzentration eines Stoffes
λ_{EM}	Emissionswellenlänge
λ_{EX}	Exzitationswellenlänge
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AFC	7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CAS	Chemical Abstracts Service
d	Dalton
E	Enantioselektivität
EC-Nr.	Enzyme Commission number
ee	Enantiomerenüberschuß
eeS	Substratantiomerenüberschuß
eeP	Produktenantiomerenüberschuß
Em.	Emission
EP	Enzym-Produkt-Komplex
EtOH	Ethanol
ES	Enzym-Substrat-Komplex
Ex.	Exzitation
F	Peakfläche im Gaschromatogramm
Fa.	Firma
FI	Fluoreszenzintensität
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigchromatographie
Kap.	Kapitel
K_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante

KPP	Kaliumphosphatpuffer
L-/D-PheAFC	L-/D-Phenylalanin-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
L-/D-PheAMC	L-/D-Phenylalanin-7-amino-4-methylcoumarin
M	molar
ml	Milliliter
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
P	Produkt
PLE	<i>Porcine liver</i> Esterase
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Substrat
Slit	Bandbreite
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
U	Umsatz
v_r	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
vgl.	vergleiche
x	Molenbruch
z.B.	zum Beispiel

8.2 Verwendete Chemikalien

D-/L-Phenylalaninmethylester	Fluka
Dodecanol	Riedel de Haen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Ethanol	Riedel de Haen
Ethylenglycol	Sigma
Glycerin	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck

Methanol	Sigma
Natronlauge	Sigma
n-Hexan	Fluka
Octan	Merck
Octanol	Merck
Tert-butyl-methylether	Fluka
Toluol	Riedel de Haen

8.3 Fluorophore

7-Amino-4-methylcoumarin	Sigma
7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin	Sigma
L-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin	Sigma
L-/D-Phenylalanin-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin	Institut für Organische Chemie der Universität Hannover
D-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin	Institut für Organische Chemie der Universität Hannover

8.4 Verwendete Enzyme

Acylase I	Sigma
Bromelain	Fluka
Carboxypeptidase A	Fluka
Catalase	Sigma
α -Chymotrypsin	Sigma
Corrolase PP	Röhm
Corrolase S 550	Röhm
Esterase (Chirazyme) aus <i>Porcine liver</i>	Fluka / Sigma / Roche Molecular Biochemicals
Esterase immobilisiert auf Eupergit C	Fluka
Papain	Fluka
Pepsin	Fluka
Pronase E	Sigma
Subtilisin (Protease)	Sigma
Trypsin	Fluka

8.5 Vergleich der eingesetzten Enzyme

Tabelle 8.1 gibt einen Vergleich zwischen den eingesetzten Enzymen α -Chymotrypsin und der Esterase PLE:

Tab. 8.1: Charakteristische Eigenschaften der eingesetzten Enzyme; a = [Kim *et al.*; 1997]; b = [Tsukada *et al.*; 1985]; c = [Junge; 1979]; d = [Schaer *et al.*; 1988]; e = [McGhee; 1987]; f = [Ryan *et al.*; 1965]

	Esterase	α -Chymotrypsin
Name	Carboxylesterase	-
E.C. Nummer	3.1.1.1	3.4.21.1
CAS Nummer	9016-18-6	9004-07-3
Reaktionstyp	Hydrolyse von Carboxylestern	Hydrolyse von Carbonsäureamiden
pH-Optimum	8 ^c	8,5 ^f
T-Optimum [°C]	35 ^d	-
Molekulargewicht [d]	23865 ^a	25193 ^b
Stabilität	-15 °C mehrere Jahre ^e	0 °C mehrere Monate ^f

Abbildung 8.1 gibt die Kristallstruktur von α -Chymotrypsin wieder:

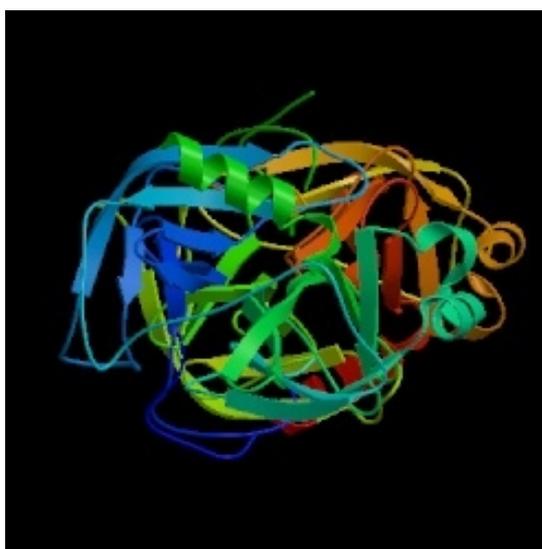


Abb. 8.1: Kristallstruktur von α -Chymotrypsin [Tsukada *et al.*; 1985]

In Abbildung 8.2 ist die Kristallstruktur der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* dargestellt:



Abb. 8.2: Kristallstruktur der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* [Kim *et al.*; 1997]

8.6 Colyophilisation

In Kapitel 5.9.2 wurde die Esterase PLE mit Methoxypolyethylenglycol (MPEG) wie folgt colyophilisiert:

1000 U PLE werden zusammen mit 134 mg MPEG mit 13,33 ml Wasser versetzt und zwei Stunden bei RT gerührt. Im Anschluß wird die Lösung eingefrohren und 48 Stunden bei 0,09 mbar lyophilisiert.

8.7 Probenaufarbeitung aus den enzymatischen Umsetzungen der Coumarinsubstrate

Nachdem eine Probenahme (300 μ l) aus dem Reaktor erfolgt, muß vor der HPLC-Analyse die Probe aufgearbeitet werden, um das eingesetzte Enzym abzutrennen, da verbleibende Proteinreste die HPLC-Säule verunreinigen würden.

Wäßriges Medium

1. 300 µl werden aus dem Reaktor entnommen.
2. 300 µl KPP (0,5 M; pH 7,6) werden dem Reaktionsgemisch zugeführt.
3. Das in der Probe enthaltene Protein wird mit 1 ml Methanol in der Kälte gefällt.
4. Das ausgefallene Enzym wird abzentrifugiert, der Überstand kann nun untersucht werden.

Toluol

1. 300 µl werden aus dem Reaktor entnommen.
2. 300 µl Toluol und die entsprechende prozentual entnommene Menge KPP werden dem Reaktionsgemisch zugeführt werden dem Reaktionsgemisch zugeführt.
3. Das in der Probe enthaltene Protein wird mit 1 ml Methanol in der Kälte gefällt.
4. Das ausgefallene Enzym wird abzentrifugiert, der Überstand kann nun untersucht werden.

8.8 Darstellung der Coumarinderivate

Die Coumarinderivate wurden vollständig von Prof. H. Meyer (Institut für organische Chemie, Universität Hannover) dargestellt. Die Synthese erfolgt exemplarisch für das Coumarinderivat D-PheAFC·TFA:

Zur Darstellung des Aminosäurechlorids wird das FMOC-geschützte D-Phenylalanin (1,5 mmol) in 10 ml CH₂Cl₂ vorgelegt und 1,1 ml SOCl₂ und eine katalytische Menge DMF zugefügt. Im Anschluß wird die Reaktionslösung 1 h bei 40 °C gerührt bis sich eine gelbe Lösung bildete. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockne evaporiert, danach wird das 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (1,5 mmol) in 2,5 ml THF bei 0 °C gelöst und 180 mg Pyridin zugegeben, das in 5 ml CH₂Cl₂ gelöste Aminosäurechlorid wird innerhalb von zwei Minuten zugegeben. Nach 1 h werden einige Tropfen Wasser, verdünnt mit 30 ml CH₂Cl₂, hinzugefügt, 5 Minuten gerührt und mit KHSO₄-Lösung und NaHCO₃-Lsg extrahiert. Die Lösung wird mit Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne evaporiert.

Zur Abspaltung der Schutzgruppe werden 1,25 mmol des Rohprodukts in 4 ml THF mit 650 mg Piperidin 1 h bei 0 °C und 3 h bei RT gerührt. Nach 4 h werden die Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 30 ml CH₂Cl₂ gelöst, mit Zitronensäure und Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne evaporiert.

Zur Darstellung des Trifluoroessigsäuresalzes wird das Produkt (0,32 mmol) in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst, mit 0,4 ml Trifluoressigsäure versetzt und die Lösemittel im Vakuum abgetrennt. Der Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und zur Trockne evaporiert.

8.9 Aktivitätsbestimmungen der Enzyme mit der pH-Stat Methode

Die Aktivitätsbestimmung für die eingesetzten Enzyme erfolgt mit der pH-Stat Methode. In ein auf 25° C thermostatisiertes Rührgefäß werden 25 ml D,L-Phenylalaninmethylester (Stammlösung: 20 g/l) mit 1 N NaOH auf pH 7 eingestellt und 10 mg Enzym dem Reaktionsgemisch zugeführt. Die bei der enzymatischen Hydrolyse von D,L-Phenylalaninmethylester freigesetzte Essigsäure wird kontinuierlich mit Natronlauge bekannter Konzentration (0,1 N) neutralisiert.

Die spezifische Aktivität (U/mg oder U/ μl) bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit ist der pro Zeiteinheit Δt verbrauchten Menge n an Natronlauge direkt proportional:

$$\text{Spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{n_{\text{NaOH}} [\mu\text{mol}]}{\Delta t [\text{min}] \cdot m_{\text{Enzym}} [\text{mg}]} \quad (8.1)$$

8.10 Enantioselektivität

Der Enantiomerenüberschuß (enantiomeric excess, ee) stellt ein Maß für die Enantiomerenreinheit einer Substanz dar. Ausgedrückt über die Molenbrüche x_r und x_s des R-Enantiomers und des S-Enantiomers ergeben sich für die Substrate und Produkte folgende Formeln [Schurig (1985)]:

$$eeS = \frac{|(x_R^S - x_S^S)|}{(x_R^S + x_S^S)} \cdot 100 \% \quad (8.2) \quad eeP = \frac{|(x_R^P - x_S^P)|}{(x_R^P + x_S^P)} \cdot 100 \% \quad (8.3)$$

Aus diesen Angaben läßt sich der Umsatz einer Reaktion folgendermaßen berechnen [Capewell (1994)]:

$$U = \frac{eeS}{(eeS + eeP)} \cdot 100 \% \quad (8.4)$$

Die Enantioselektivität E wird durch die unterschiedliche Geschwindigkeit, mit der die Enantiomere umgesetzt werden, definiert. Sie läßt sich für irreversible Reaktionen aus den Enantiomerenüberschüssen (8.2) und (8.3) berechnen [Chen, Sih (1989)]:

$$E = \frac{\ln[(1-U)(1-eeS)]}{\ln[(1-U)(1+eeS)]} \quad (8.5) \quad E = \frac{\ln[1-U(1+eeP)]}{\ln[1-U(1-eeP)]} \quad (8.6)$$

Die Enantioselektivität gibt die Trennleistung oder Unterscheidungsfähigkeit eines Enzyms wieder. Sie ist im Idealfall über den gesamten Reaktionsverlauf konstant und stellt eine charakteristische Größe für die Reaktion dar. Bei Reaktionen mit geringer Enantioselektivität sinkt der Produktenantiomerenüberschuß im Reaktionsverlauf ab, da bei abnehmender Konzentration des bevorzugt umgesetzten Enantiomers zunehmend das weniger bevorzugte umgesetzt wird.

Die Auswertung der Versuche erfolgt mit Hilfe der HPLC. Die Peakflächen im Chromatogramm sind dem Molenbruch der R- und S-Enantiomere direkt proportional, dadurch können die Verhältnisse der Peakflächen F zur Berechnung der Enantiomerenüberschüsse herangezogen werden:

$$eeS = \left| \frac{(F_R - F_S)}{(F_R + F_S)} \right| \cdot 100 \% \quad (8.7) \quad eeP = \left| \frac{(F_R - F_S)}{(F_R + F_S)} \right| \cdot 100 \% \quad (8.8)$$

Anhand der Gleichungen (8.2) – (8.8) ist es möglich, alle notwendigen charakteristischen Größen der enantioselektiven Katalyse über die Peakflächen der Substrat- und Produktenantiomere zu ermitteln.

8.11 Betriebsparameter für die HPLC-Untersuchungen

Abbildung 8.3 zeigt ein Beispielchromatogramm der Coumarinsubstrate und –produkte, dabei liegen die Produkte AMC und AFC zeitlich vor den Substratpeaks. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden durch die Injektion der entsprechenden Reinsubstanzen verifiziert.

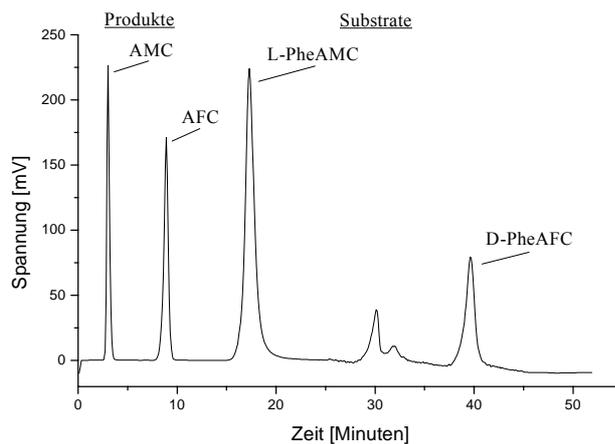


Abb. 8.3: Beispielchromatogramm für L-PheAMC / D-PheAFC und deren Produkte

Folgende Bedingungen, Eluenten und Gradienten wurden verwendet:

Säule: Waters Resolve C18, 5 μ m, 4 · 150 mm

Flow: 1 ml/min

Temperatur: 30° C

Eluent A: 96 % Puffer (0,05 M Na-Acetat, 0,05 M NaH₂PO₄, pH 7,0)
2 % Tetrahydrofuran

2 % Methanol

Eluent B: 54 % Methanol

46 % Wasser (bidestilliert)

Zeitprogramm Detektor:	Ex. [nm]	Em. [nm]
Beginn	345	410
Ab 6.0 min	365	490
Ab 11.0 min	325	390
Ab 25.0 min	335	430

Gradient:	Zeit [min]	% A	% B
	0 - 25	20	80
	25 - 28	Änderung auf	0 100
	28 - 45	0	100
	45 - 46	Änderung auf	20 80
	46 - 52	20	80

Gesamtdauer: 52 Minuten

8.12 Geräteverzeichnis

HPLC

Autosampler	Spark Triathlon
Datenaufnahme	Andromeda, DataApex Ltd.
Degasser	Vakuum Degasser Techlab TS 505
Detektor	Shimadzu RF – 10 AXL
Pumpe	Gradientenpumpe Techlab LCP 4100
Säule	Waters Resolve C18, 5 µm, 4 · 150 mm

Titrationanlage für pH-Stat-Messungen

Dosimat 665	Metrohm
Impulsomat 614	Metrohm
pH-Meter 605	Metrohm
Rührer E 649	Metrohm
thermostatisierbares Reaktionsgefäß	Metrohm
Schreiber SE 120	BBC
Thermostat M 3	MGW Lauda

Aufarbeitung

Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexer	Heidolph

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektrophotometer Modell F-4500	Hitachi, Frankfurt
Reaktor	Werkstatt des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover

Reaktoreinsatz

Werkstatt des Instituts für
Technische Chemie der Universität

Hannover

Lichtleiter

Lumatec, Denzlingen

Quarzglas

Spindler & Hoyer

Feuchtemessungen

Rotronic Hygroskop GT

Rotronic AG

9. Literaturverzeichnis

- Adlercreutz, P.; 1992
On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media.
Support effects at controlled water activity
Biocatalysis in Non-Conventional Media; **8**, 55-61
Ed. J. Tramper; Elsevier, Amsterdam
- Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; 1987
Aspects of Biocatalyst Stability in Organic Solvents
Biocatalysis; **1**, 99-108
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.; 1995
Molekularbiologie der Zelle
Dritte Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Barros, R. J.; Wehtje, E.; Adlercreutz P.; 1999
Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence
of insoluble protonated nucleophile
Enzyme and Microbial Technology; **24**, 480-488
- Bhat, A. N.; Jain, B. D.; 1960
Separation and determination of uranium and thorium with 3-acetyl-4-hydroxy-
coumarin
Talanta; **4**, 13-16
- Bisswanger, H.; 2000
Enzymkinetik
Dritte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- Blow, D. M.; 1976
Structure and Mechanism of Chymotrypsin
Acc. Chem. Res.; **9**, 145-152
- Bornscheuer, U.; 1998
Gerichtete Evolution von Enzymen
Angew. Chem.; **110**, 22, 3285-3288
- Bornscheuer, U.; 1993
Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Racematspaltung
verschiedener 3-Hydroxyester in unkonventionellen Lösungsmittelsystemen
Fortschrittsberichte VDI; Reihe 17: Biotechnik, Nr. 87
- Bornscheuer, U.; Capewell, A.; Wendel, V.; Scheper, T.; 1996
On-line determination of the conversion in a lipase-catalyzed kinetic resolution in
supercritical carbon dioxide
Journal of Biotechnology; **46**, 139-143
- Bourinbaïar, A. S.; Tan, X.; Nagorny, R.; 1993
Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: A role for plant derived metabolites
with synergistic anti-oxidant activity
Acta Virol.; **37**, 241-50
- Boyer, P. D.; 1971
The Enzymes Vol. II / Vol. V
Third edition, Academic Press; New York and London
- Breznik, M.; Kikelj, D.; 1997
Pig liver esterase catalyzed hydrolysis of dimethyl and diethyl 2-methyl-2-
(*o*-nitrophenoxy)malonates
Tetrahedron: Asymmetrie, Vol. 8; **3**, 425-434

- Buchholz, K.; Kasche, V.; 1997
Biokatalysatoren und Enzymtechnologie
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Capewell, A.; 1994
Untersuchungen zu enantioselektiven enzymatischen Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid
Fortschrittberichte VDI; VDI-Verlag GmbH; Düsseldorf
- Castro, G. R.; 1999
Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents
Enzyme and Microbial Technology; **25**, 689-694
- Castro, G. R.; 2000
Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water
Enzyme and Microbial Technology; **27**, 143-150
- Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; 1982
Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers
J. Am. Chem. Soc.; **104**, 7294-7299
- Christie, R. M.; Lui, C. H.; 2000
Studies of fluorescent dyes: part 2. An investigation of the synthesis and electronic spectral properties of substituted 3-(2'-benzimidazolyl)coumarins
Dyes and Pigments; **47**, 79-89
- Danzer, K.; Hobert, H. Fischbacher, C.; Jagemann, K. U.; 2001
„Chemometrik“ Grundlagen und Anwendungen
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Daubert, T. E.; Danner, R. P.; 1989
Physical and Thermodynamic Properties of pure chemicals
Data compilation, Part 3, 4
Hemisphere Publishing Corporation, New York, Washington, Philadelphia, London
- Dement, J.; 1995
Fluorescent indicators
CRC Handbook of Chemistry and Physics
76th Edn., DR Lide (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, 19-20
- Diego, T.; Lozano, P.; Niguez, M. J.; Iborra, J. L.; 1998
Effect of sorbitol on immobilized chymotrypsin thermostability in low-water system
Stability and stabilizations of biocatalysts; 411-416
- Faber, K.; 1997
Biotransformations of non-natural compounds: state of the art and future developments
Pure Appl. Chem.; **69**, 1613-1632
- Fitzpatrick, P. A.; Klivanov, A. M.; 1991
How can the solvent affect enzyme enantioselectivity?
J. Am. Chem. Soc.; **113**, 3166-3171
- Freeman, K. S.; Lee, S. S.; Kiserow, D. J., McGown, L. B.; 1998
Increased Chymotrypsin activity in AOT/Bile Salt reversed micelles
J. of colloid and interface Science; **207**, 344-348
- Fojan, P.; Jonson, P. H.; Petersen, M. T. N.; Petersen, S. B.; 2000
What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach
Biochemie; **82**, 1033-1041
- Forster, Y.; Hass, E.; 1993
Preparation and characterisation of three fluorescent labels for proteins, suitable for structural studies
Anal. Biochem.; **209**, 9-14

- Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.; 1996
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford
- Gossrau, R.; 1983
Fluorescence histochemical detection of hydrolase in tissue sections and culture cells
Histochemie; **79**, (1), 87-94
- Hahn, K. W.; Klis, W. A.; Stewart, J. M.; 1990
Design and synthesis of a peptide having chymotrypsin esterase activity
Science; **248**, 1544-1547
- Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W.; 1991
A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters
Chem. Rev.; **91**, 165-195
- Harris, J. L.; Backes, B. J.; Leonetti, F.; Mahrus, S.; Ellman, J.; Craik, C. S.; 2000
Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries
Biochemistry; **97**, 14, 7754-7759
- Hartmann, T.; 1999
Überkritisches Kohlendioxid als Reaktionsmedium für die Naturstoffsynthese –
Die enantioselektive Hydrolyse von 3-Hydroxysäureester
Dissertation, TCI, Universität Hannover
- Hartmann, T.; Schwabe, E.; Combes, D.; Scheper, T.; 1999
Enzymatic Reactions in Supercritical Carbon Dioxide
(In: Patel, R.: Stereoselective Biocatalysis)
Marcel Dekker, New York
- Hartmeier, W.; 1986
Immobilisierte Biokatalysatoren
Springer Verlag, Berlin
- Hilmer, J. M.; 1995
In-situ-Bioprozeßkontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-
Fluoreszenzspektroskopie
Dissertation, TCI, Universität Hannover
- Hitzmann, B.; Marose, S.; Lindemann, C.; Scheper, T.; 1998
New sensor application in european industries for detailed bioprocess monitoring
Computer Applications in Biotechnology –CAB 7- 7th international conference - Osaka
- Hitzmann, B.; Pekeler, T.; Lindemann, C.; Marose, S.; Scheper, T.; 1998
Chemometric Models for the on-line estimation of bioprocess variables from 2-D-
fluorescence
Computer Applications in Biotechnology –CAB 7- 7th international conference - Osaka
- Jain, B. D.; Singh, H. B.; 1963
Gravimetric determination and separation of titanium (IV) from iron (III) using
4-phenyl-7,8-dihydroxycoumarin
Ind. J. Chem.; **1**, 317-18
- Jungen, M.; Gais, H-J.; 1999
Application of pig liver esterase catalyzed transesterification in organic media to the
kinetic resolution of glycerol derivates
Tetrahedron: Asymmetry; **10**, 3747-3758
- Ke T.; Klibanov, A. M.; 1999
Markedly enhancing enzymatic enantioselectivity in organic solvents by forming
substrate salts
J. Am. Chem. Soc.; **121**, 3334-3340

- Khalfan, H.; Abuknesha, R.; Rard-Weaver, M.; Price, R. G.; Robinson, D.; 1986
Aminomethyl coumarin acetic acid: a new fluorescent labelling agent for proteins
Histochem. J.; **38**, 18, 3624-3637
- Khan, S. A.; Halling, P. J.; Bell, G.; 1990
Measurement and control of water activity with an aluminum oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymatic catalysis
Enzyme and Microbial Technology; **12**, 453-458
- Kielbasinski, P.; Goralczyk, P.; Mikolajczyk, M.; Wieczorek, W.; Majzner, W. R.; 1998
Enzyme-promoted kinetic resolution of racemic, P-chiral phosphonyl and phosphorylacetates
Tetrahedron: Asymmetry; **9**, 2641-2650
- Kim, D. H.; 1993
A Proposal for a Three-Dimensional Representation of the S₁ Subsite of α -Chymotrypsin
Organic & Medicinal Chemistry Letters; Vol. 3; **6**, 1313-1318
- Kim, D. H.; 1999
Design of Protease Inhibitors on the Basis of Substrate Stereospecificity
Biopolymers (Peptide Science), **51**, 3-8
- Kise, H.; Nagashima, T.; 1993
Enantiospecificity of chymotrypsin at S'₁ site for peptide synthesis in aqueous-organic media
Bull. Chem. Soc. Jpn.; **66**, 3693-3698
- Knüttel, T.; 1999
Grundlegende Untersuchungen zur online 2D-Fluoreszenzanalyse von enzymatisch katalysierten Reaktionen in überkritischem Kohlendioxid
Diplomarbeit, TCI, Universität Hannover
- Kollecker, M.; 1999
Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren zur Vorhersage von Prozeßgrößen
Diplomarbeit; TCI, Universität Hannover
- Koolman, J.; Röhm, K. H.; 1994
Taschenatlas der Biochemie
Georg Thieme Verlag
- Kuchner, O.; Arnold, F. H.; 1997
Trends Biotechnol.; **15**, 523-530
- Kuromizu, K.; Shimokawa, Y.; Abe, O.; Izumiya, N.; 1985
New fluorogenic substrate for esterase activity of α -chymotrypsin and related enzymes
Analytical Biochemistry; **151**, 534-539
- Laane, C.; 1987
Medium-engineering for bioorganic synthesis
Biocatalysis; **1**, 17-22
- Laane, C; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; 1987
Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic solvents
Biotechnol. Bioeng.; **30**, 81-87
- Laroute V.; Willemot, R. M.; 1992
Effect of organic solvents on stability of two glycosidases and gluco-amylase catalysed oligosaccharides synthesis
Enzyme and Microbial Technology; **14**, 528-534
- Laszlo K.; Simon, L. M.; 1998
Chymotrypsin-catalyzed synthesis of N-acetyl-L-tyrosine esters in organic media
Stability and Stabilizations of Biocatalysts; 713-718

- Laumen, K.; Reimerdes, E. H.; Schneider, M.; 1985
Immobilized porcine liver esterase: a convenient reagent for the preparation of chiral building blocks
Tetrahedron Letters; **26**, 4, 407-410
- Levitsky, V.; Lozano, P.; Gladilin, A.; Iborra, J. L.; 1998
Stability of immobilized enzyme-polyelectrolyte complex against irreversible inactivation by organic solvents
Stability and Stabilization of Biocatalysts
- Levitsky, V.; Lozano, P.; Iborra, J. L.; 2000
Designing enzymatic kyotorphin synthesis in organic media with low water content
Enzyme and Microbial Technology; **26**, 608-613
- Liese, A.; Seelbach K.; Wandrey, C.; 2000
Industrial Biotransformations
Wiley-VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Lindemann, C.; 1998
Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung
Fortschrittsberichte VDI, Düsseldorf, VDI Verlag; **17**, 171
- Mansson, M. O.; Stahl, M.; Mosbach, K.; 1992
Induced stereo and substrate selectivity of bio-imprinted chymotrypsin in anhydrous organic media
Biocatalysis in non-conventional media; 321-327
- Marose, S.; 1995
Untersuchungen zur Anwendung eines Prozeßspektralfluorometers für die On-line-Bioprozeßbeobachtung
Diplomarbeit, Universität Münster
- Meyer, V. R.; 1992
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie
Salle und Sauerländer, Frankfurt (Main)
- Michal, G.; Mölering, H.; Siedel, J.; 1983
Methods of Enzymatic Analysis; Vol. 1; 197
Bergmeyer, H. U., Ed.
Verlag Chemie, Weinheim
- Moravcova, J.; Vanclova, Z.; Capkova, J.; Kefurt, K.; Stanek, J.; 1997
Enzymic hydrolysis of Methyl 2,3-Di-O-Acetyl-5-Deoxy- α and β -Xylofuranosides – an active-site model of pig liver esterase
J. Carbohydrate Chemistry; **16**, 7, 1011-1028
- Moris-Varas, F.; Shah, A.; Aikens, J.; Nadkarni, N. P.; Rozzell, J. D.; Demirjian, D. C.; 1999
Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity
Bioorganic & Medicinal Chemistry; **7**, 2183-2188
- Mozhaev, V. V.; 1998
Engineering stability of enzymes in systems with organic solvents
Stability and Stabilization of Biocatalysts; 355-363
- Nagashima, T.; Watanabe, A.; Kise, H.; 1992
Peptide synthesis by proteases in organic solvents: medium effect on substrate specificity
Enzyme and Microbial Technology; **14**, 1118-1123
- Nakaya, H.; Miyawaki, O.; Nakamura, K.; 2001
Determination of $\log P$ for pressurized carbon dioxide and its characterization as a medium for enzyme reaction
Enzyme and Microbial Technology; **28**, 176-182

- Narayan, V. S.; Klibanov, A. M.; 1993
Are Water-Immiscibility and Apolarity of the Solvent Relevant to Enzyme Efficiency
Biotechnology and Bioengineering; **41**, 390-393
- Okazaki, S.; Kaiya, N.; Goto, M.; 1997
Application of novel preparation method for surfactant-protease complexes
catalytically active in organic media
Biotechnol. Prog.; **13**, 551-556
- O'Kennedy, R.; Thornes, R. D.; 1997
Coumarins: Biology, Application and Mode of Action
John Wiley & Sons Ltd
- Park, S. J.; Lee, E. J.; Lee, D. H.; Lee, S. H.; Kim, S. J.; 1995
Spectrofluorometric Assay for Rapid Detection of Total and Fecal Coliforms from
Surface Water
Appl Environmental Microbiology; **61**, 5, 2027-2029
- Partridge, J.; Moore, B. D.; Halling, P. J.; 1999
 α -Chymotrypsin stability in aqueous-acetonitrile mixtures: is the native enzyme
thermodynamically or kinetically stable under low water conditions ?
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; **6**, 11-20
- Pau, C. P.; Warner, I. M.; Rossi, T. M.; 1988
Two-dimensional fluorescence spectroscopy for bacterial identification
Trends in Anal. Chem.; **7**, 2, 68-73
- Pietzsch, M.; Vielhauer, O.; Pamperin, D.; Ohse, B.; Hopf, H.; 1999
On the kinetics of the enzyme-catalyzed hydrolysis of axial chiral alkyl
allenicarboxylates: preparation of optically active R(-)-2-ethyl-4-phenyl-2,3-
hexadiene-carboxylic acid and its optically pure S-(+)-methyl ester
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; **6**, 51-57
- Reichardt, C.; 1973
Lösungsmittel-Effekte in der organischen Chemie
Verlag Chemie
- Ross, A. C.; Bell, G.; Halling, P. J.; 2000
Organic solvent functional group effect on enzyme inactivation by the interfacial
mechanism
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; **8**, 183-192
- Ruppert, S.; Gais, H. J.; 1997
Activity enhancement of pig liver esterase in organic solvents by colyophilization with
methoxypolyethylene glycol: kinetic resolution of alcohols
Tetrahedron: Asymmetry; **8**, 21, 3657-3664
- Schade, B.; Hagen, V.; Schmidt, R.; Herbrich, R.; Krause, E.; Eckardt, T.; Bendig, J.; 1999
Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl
derivatives. 1. Photocleavage of (7-methoxycoumarin-4-yl)methyl-caged acids with
fluorescence enhancement
J. Org. Chem.; **64**, 9109-9117
- Scheper, T.; Schügerl, K.; 1986
Bioreactor characterization by means of *in situ* fluorimetry
Chem. Ing. Tech.; **58**, 5, 433
- Scheper, T.; Schügerl, K.; Weiss, M.; 1986
Two new fluorogenic substrates for the detection of Penicillin-G-Acylase activity
Analytica Chimica Acta; **182**, 203-206
- Scheper, T.; Schügerl, K.; Weiss, M.; 1988
Patent, PS 3614647

- Schöfer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U.; 2001
Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity
Chem. Commun.; 425-426
- Segel, I. H.; 1975
Biochemical Calculations
2nd Edition, Wiley & Sons, New York
- Sjursnes, B.; Kvittingen, L.; Anthonsen, T.; Halling, P.; 1992
Control of water activity by using salt hydrates in enzyme catalysed esterifications in organic media (In: Biocatalysis in Non-Conventional Media; Ed.: J. Tramper)
Elsevier, Amsterdam; **8**, 451-457
- Smith, R. E.; Bissel, E. R.; Mitchell, A. R.; Pearson, K. W.; 1980
Direct photometric or fluorimetric assay of proteinases using substrates containing 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
Thromb. Res.; **17**, 393-402
- Solle, D.; 2002
Laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover
- Sousa, H. A.; Rodrigues, C.; Klein, E.; Afonso, C. A. M.; Crespo, J. G.; 2001
Immobilisation of pig liver esterase in hollow fibre membranes
Enzyme and Microbial Technology, **29**, 625-634
- Stryer, L.; 1991
Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Tchoupe, I. R.; Moreau, T.; Gauthier, F.; Bieth, J. G.; 1991
Photometric or fluorimetric assay of cathepsin B, L and H and papain using substrates with an aminotrifluoromethylcoumarin leaving group
Biochem. Biophys. Acta; **1076**, 149-51
- Thaisrivongs, S.; Tomich, P. K.; Watenpaugh, K. D.; 1994
Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxy-coumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors
J. Med. Chem.; **37**, 3200-4
- Toone, E. J.; Jones, J. B.; 1991
Enzymes in Organic Synthesis 50.¹ Probing the Dimensions of the Large Hydrophobic Binding Region of the Active Site of Pig Liver Esterase using Substituted Aryl Malonate Substrates
Tetrahedron: Asymmetry Vol. 2; **10**, 1041-1052
- Toone, E. J.; Werth, M. J.; Jones, J. B.; 1990
Active-Site Model for Interpreting and Predicting the Specificity of Pig Liver Esterase
J. Am. Chem. Soc.; **112**, 4946-4952
- Tservistas, M.; Könecke, R.; Comte, A.; Scheper, T.; 2001
Oxygen monitoring in supercritical carbon dioxide using a fibre optic sensor
Enzyme and Microbial Technology; **28**, 637-641
- Tsukada, H.; Blow, D. M.; 1985
Structure of alpha-chymotrypsin refined at 1.68 Å resolution
J. Mol. Biol., **184**, 703ff
- Turner, N. A.; Vulfson, E. N.; 2000
At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity ?
Enzyme and Microbial Technology; **27**, 108-113

- Uchiyama, S.; Santa, T.; Fukushima, T.; Homma, H.; Imai, K.; 1998
Effects of the substituent groups at the 4- and 7-positions on the fluorescence characteristics of benzofurazan compounds
J. Chem. Soc., Perkin Trans.; **2**, 2165-2173
- Ueji, S.; Watanabe, K.; Koshiba, T.; Nakamura, M.; Oh-ishi, K.; Yasufuku, Y.; Miyazawa, T.; 1999
Lipase-catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy)propionic acids in organic solvents: substituent effect controlling enantioselectivity toward racemic acids
Biotechnology Letters; **21**, 865-868
- van Unen, D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N.; 1998
Effects of crown ethers on the activity of enzymes in peptide formation in organic media
Stability and Stabilization of Biocatalysts
- Wasserscheid, P.; Keim, W.; 2000
Ionische Flüssigkeiten – neue „Lösungen“ für die Übergangsmetallkatalyse
Angew. Chem.; **112**, 3926-3945
- Wedler, G.; 1987
Lehrbuch der Physikalischen Chemie
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Wolfbeis, O. S.; Leitner, M.; 1983
Mapping of total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterisation
Anal. Chim. Acta.; **167**, 203-215
- Zaks, A.; Klibanov, J.; 1988
J. Biol. Chem.; **263**, 3194-3201
- Zimmermann, M.; Ashe, B.; Yurewicz, E. C.; Patel, G.; 1977
Sensitive assays for trypsin, elastase and chymotrypsin using new fluorogenic substrates
Anal. Biochem.; **78**, 47-51
- Zimmermann, M.; Yurewicz, E. C.; Patel, G.; 1976
A new fluorogenic substrate for chymotrypsin
Anal. Biochem.; **70**, (1), 258-262

Lebenslauf

Name Torsten Knüttel
Geburtstag 27.04.1973 in Hannover, Deutschland

Schulbildung

1979 – 1983 Grundschule Scherenbostel
1983 – 1985 Orientierungsstufe Bissendorf
1985 – 1989 Realschule Mellendorf
1989 – 1992 Gymnasium, Helene-Lange Schule Hannover
1992 Allgemeine Hochschulreife

1992 – 1993 Allgemeiner Wehrdienst in Luttmersen

Hochschulausbildung

1993 – 1999 Studium der Chemie an der Universität Hannover
1995 Vordiplom
1999 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper
1999 Im April Abschluß als Diplom-Chemiker
1999 Juni 1999 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper