

Biokatalytische enantioselektive Sulfoxidation

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Frank Heckel
aus Geiselwind

Würzburg 2004

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„Je planmäßiger Menschen vorgehen,
desto wirksamer trifft sie der Zufall!“
Friedrich Dürrenmatt, 1921-1990

Meinen Eltern
und Sabine

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Januar 2001 bis Dezember 2004 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Organische Chemie II der Universität Würzburg, Herrn Prof. Dr. Waldemar Adam.

Herrn Prof. Schreier danke ich für die Überlassung des Themas und das stets offene und vertrauensvolle Verhältnis sowohl in allen Fragen zu meiner Arbeit als auch in den verschiedensten Angelegenheiten rund um den reibungslosen Betrieb des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie. Ich habe hier Arbeitsbedingungen vorgefunden, die meinem wissenschaftlichen Fortschritt stets dienlich waren und Eindrücke erfahren dürfen, die mich unbestritten auch persönlich geprägt haben. Vielen Dank!

Herrn Prof. Adam und seiner „rechten Hand“, Herrn Dr. Chantu Saha-Möller, gilt mein Dank für die kritischen, ab und an ernüchternden, aber immer zielorientierten Diskussionen in den Minigroups und bei der Vorbereitung meiner Manuskripte. Nicht zuletzt erfüllt es mich mit Stolz, dass ich als „last member of AKA“ eine erfolgreiche Würzburger Ära beende. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch beim Freistaat Bayern, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 347) und dem Fond der chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Für ihre bereitwillige und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich den Herren Marcus Taupp, Michael Bretz, Bastian Knaup und Wolfgang Hümmer sowie meiner Lieblingspraktikantin Frau Hedwig Reder.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Ursula Rdest vom Institut für Mikrobiologie für Ihre wertvollen Tips sowie die Möglichkeit, die Bakterienisolate dauerhaft zu lagern.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jean-Marie Meyer vom Laboratoire de Microbiologie et Génétique, Université Louis Pasteur in Strassburg für die Durchführung des Siderophore-Typings.

Allen Kollegen, Doktorandinnen und Doktoranden sowie den Laborantinnen danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Besonders möchte ich hier den Kollegen Marcus Taupp von „unserer“ mikrobiologischen Forschungsabteilung nennen und ihm für alle fachlichen und sonstigen Diskussionen sowie für unsere Freundschaft danken. Gleiches gilt für Herrn Michael Kraus, der mir besonders in Fragen rund um den Computer beistand. Schließlich soll nicht unerwähnt bleiben, dass meine Zweckgemeinschaft mit den Herren Völker, Vollmuth und Walter von der Werkstatt immer einen hohen Stellenwert genoss.

Mein unübertroffener Dank gilt allerdings meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglichten und mich jederzeit nach aller Kraft unterstützen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Mein abschließendes Dankeswort richte ich an meine Sabine, die dafür sorgte, dass mein grundsätzlich frohes Gemüt in den letzten Jahren nur noch strahlte.

Publikationen

1. Veröffentlichungen

Adam, Waldemar; Heckel, Frank; Saha-Möller, Chantu R.; Taupp Marcus; Meyer, Jean-Marie; Schreier, Peter. Opposite enantioselection in the bacterial whole-cell sulfoxidation by two phenotypically and genotypically similar strains of *Pseudomonas frederiksbergensis*. *Appl. Environ. Microb.* in press

Adam, Waldemar; Heckel, Frank; Saha-Möller, Chantu R.; Taupp, Marcus; Schreier, Peter. A highly enantioselective biocatalytic sulfoxidation by the topsoil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 983-985.

Adam, Waldemar; Heckel, Frank; Saha-Möller, Chantu R.; Schreier, Peter. Biocatalytic synthesis of optically active oxyfunctionalized building blocks with enzymes, chemoenzymes and microorganisms. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 661, 17-29.

Kahle, Kathrin.; Preston, Christina; Richling, Elke; Heckel, Frank, Schreier, Peter. On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products. *Food Chem.* in press

Fink, Kathrin; Richling, Elke; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of (*E*)-methyl cinnamate from different sources using isotope ratio mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3065-3068.

Preston, Christina; Richling, Elke; Elss, Sandra; Appel, Markus; Heckel, Frank; Hartlieb, Ariane; Schreier, Peter. On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8027-8031.

Schmitt, Thomas; Strohm, Erhard; Herzner, Gudrun; Bicchi, Carlo; Krammer, Gerhard; Heckel, Frank; Schreier, Peter. (*S*)-2,3-dihydrofarnesoic acid, a new component in cephalic glands of male European beewolves *Philanthus triangulum*. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29, 2469-2479.

Richling, Elke; Hoehn, Corinna; Weckerle, Bernhard; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (EA-C/P-IRMS). *Europ. Food Res. Technol.* **2003**, 216, 544-548.

Richling, Elke; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Flavor authenticity studies. Progress in multi-element HRGC-IRMS techniques. *Chimia* **2003**, 57, 39-41.

Aguilar-Cisneros, Blanca O.; Lopez, Mercedes G.; Richling, Elke; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7520-7523.

Weil, Kerstin; Gruber, Patrick; Heckel, Frank; Harmsen, Dag; Schreier, Peter. Selective (R)-3-hydroxylation of FA by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lipids.* **2002**, 37, 317-323.

2. Posterbeiträge

Heckel, Frank; Adam, Waldemar; Saha-Möller, Chantu R.; Taupp, Marcus; Schreier, Peter. Enantioselective sulfoxidation in bacterial 'whole-cell' conversions. 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg, 19.-21. September **2005**.

Preston, Christina; Richling, Elke; Appel, Markus; Kahle, Kathrin; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Ester synthesis: Authenticity assessment by stable isotope analysis. 7th Wartburg Symposium on Flavour Chemistry & Biology, Eisenach, 21.-23. April **2004**.

Elss, Sandra; Richling, Elke; Preston, Christina; Appel, Markus; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Ananas Aromastoffe: Aromaprofil und Stabilisotopen-Analytik. GDCH Jahrestagung Chemie, 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 08.-11. Oktober **2003**.

Weil, Kerstin; Gruber, Patrik; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Selective hydroxylation of fatty acids: Sonderforschungsbereich 347: IV. Symposium „Selective reactions of metal-activated molecules“, Würzburg, 20.-22. September **2000**.

Weil, Kerstin; Gruber, Patrik; Heckel, Frank; Schwab, Wilfried; Schreier, Peter. Selective hydroxylation of fatty acids by *Stenotrophomonas maltophilia*. International Symposium on non mammalian eicosanoids and bioactive lipids. Berlin, 29.-31. Mai **2000**.

3. Vortrag

Heckel, Frank; Adam, Waldemar; Saha-Möller, Chantu R.; Schreier, Peter. *Pseudomonas frederiksbergensis* – Enantiodifferenzierung in der bakteriellen `whole-cell` Sulfoxidation. Jahrestagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCH, Erlangen, 07. März 2005.

Erläuterungen

- Alle in dieser Arbeit für bakterielle und enzymatische Umsetzungen verwendeten Sulfide sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen durchnummeriert; die entsprechenden Sulfoxide sind zusätzlich mit einem Stern gekennzeichnet. Die im Anhang zu findende Strukturmatrix fasst die Substrate als Überblick zusammen.
- Auf die Nummerierung einmalig genannter Verbindungen (z. B. Reagenzien in Synthesen) wurde verzichtet.
- Literaturhinweise sind unter Aufführung von maximal den beiden erstgenannten Autoren und des Erscheinungsjahres in Klammern angegeben und im Literaturverzeichnis vollständig hinterlegt.
- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ versehen.

Abkürzungen

Abb	Abbildung
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cfu	colony forming units
CHMO	Cyclohexanonmonooxygenase
CPO	Chlorperoxidase
d	Duplett
d _f	Filmdicke von Trennphasen
δ	chemische Verschiebung delta
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM(Z)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (und Zellkulturen)
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess)
EI	Elektronenstoßionisation
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	und andere (et alii)
F ₂₅₄	Fluoreszenzfarbstoff zur UV-Detektion bei 254 nm
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
HRGC	high resolution gas chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
I.D.	Innendurchmesser
IEF	isoelektrische Fokussierung
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
M	molar, mol/l
m	Multipllett
MCSS	moving column switching system
MDGC	multidimensionale Gaschromatographie
mol	Mol
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NDO	Naphthalindioxygenase
NMR	magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
POM	<i>Pseudomonas oliveorans</i> Monooxygenase
ppm	parts per million oder chemische Verschiebung in Hertz
q	Quartett

REM	Rasterelektronenmikroskopie
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
sog.	sogenannte(r,s)
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TDO	Toluoldioxygenase
tert.	tertiär
TIC	Totalionenchromatogramm
U	Unit
u	Masseneinheit
u.a.	unter anderem
upm / rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	3
2.1 EINSATZ VON BIODKATALYSATOREN	3
2.2 CHEMISCHE SULFOXIDATION	5
2.3 HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER ENANTIOSELEKTIVEN SULFOXIDATION.....	8
2.3.1 Die enzymatische Sulfoxidation	15
2.3.2 Die mikrobielle Sulfoxidation	20
2.4 BINDUNGSTHEORIEN UND ENZYMMODELLE FÜR DIE ASYMMETRISCHE SULFOXIDATION.....	22
2.5 SIDEROPHORE-TYPING VON NICHTFLUORESZIERENDEN PSEUDOMONADEN	30
2.6 OPTISCH AKTIVE SULFOXIDE ALS PHARMAZEUTISCHE WIRKSTOFFE.....	34
2.7 PHYSIOLOGIE UND MORPHOLOGIE DER CHARAKTERISIERTEN STÄMME.....	35
2.8 PROBLEMSTELLUNG.....	37
3 ERGEBNISSE	40
3.1 ISOLIERUNG GEEIGNETER MIKROORGANISMEN ZUR SULFOXIDATION	40
3.2 CHARAKTERISIERUNG AUSGEWÄHLTER BAKTERIENSTÄMME	41
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung	42
3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie	46
3.2.3 Genotypische Charakterisierung	47
3.2.4 Siderophore-Typing	51
3.3 DIVERSE SULFIDE ALS SUBSTRATE IN MIKROBIELLEN UND ENZYMATISCHEN UMSETZUNGEN	53
3.3.1 Substratscreening mit einfach strukturierten Sulfiden.....	53
3.3.2 N-Heterozyklische Sulfide	58
3.3.3 Furfuryle und Thiophene	59

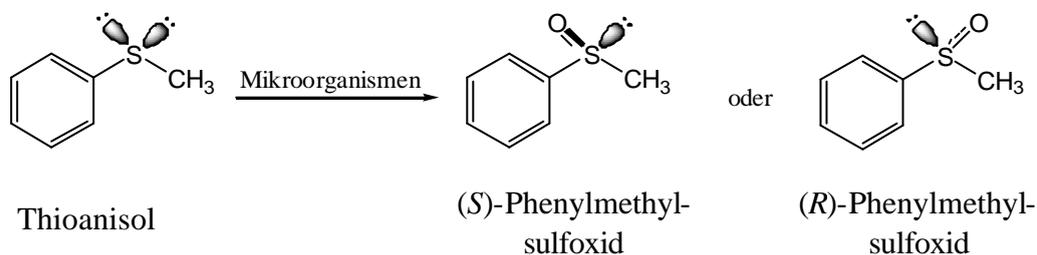
3.3.4 Schwefelhaltige Pestizide	60
3.3.5 Omeprazol [®] und Modafinil [®]	62
3.4 EINSATZ DES FERMENTERS.....	63
3.5 TOXIZITÄTSTESTS NACH DEM BLÄTTCHENVERFAHREN	68
4 DISKUSSION	71
4.1 EINFLUSS DER SULFIDSTRUKTUR AUF DIE SULFOXIDATIONSFÄHIGKEIT DER BAKTERIEN	71
4.2 BEDEUTUNG DER ARYLSTRUKTUR IN SULFIDEN ALS SUBSTRATE FÜR DIE BAKTERIELLE SULFOXIDATION.....	74
4.3 FURFURYLE UND THIOPHENE ALS SUBSTRATE FÜR DIE BAKTERIELLE SULFOXIDATION.....	75
4.4 SCHWEFELHALTIGE PESTIZIDE ALS SUBSTRATE FÜR DIE BAKTERIELLE SULFOXIDATION.....	76
4.5 OMEPRAZOL [®] UND MODAFINIL [®]	78
4.6 EINSATZ DES BIOREAKTORS	78
4.7 TOXIZITÄTBEWERTUNG NACH DEM BLÄTTCHENTEST	80
4.8 DIE NEUE SUBSPEZIES <i>PSEUDOMONAS FREDERIKSBERGENSIS</i> ISOLAT 33	81
5 EXPERIMENTALTEIL.....	83
5.1 MATERIAL.....	83
5.1.1 Chemikalien	83
5.1.2 Enzyme	83
5.1.3 Mikroorganismen	84
5.1.4 API 20 NE Testkit	84
5.1.5 Dünnschichtchromatographie	84
5.2 GERÄTE.....	85
5.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC).....	85
5.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	85
5.2.3 Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC).....	87
5.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	88
5.2.5 Rasterelektronenmikroskopie	88
5.2.6 Geräte für mikrobiologische Umsetzungen	89

5.2.7 Sonstige Geräte	90
5.3 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	91
5.3.1 Herstellung von Agarplatten	91
5.3.2 Isolierung von Mikroorganismen aus einer Bodenprobe	92
5.3.3 Herstellung der Wachstumsmedien	92
5.3.4 Phänotypische Charakterisierung mittels APIZYM 20 NE Test	94
5.3.5 Genotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen.....	95
5.3.6 Allgemeine Vorschrift zur bakteriellen Biotransformation von Sulfiden zu Sulfoxiden	98
5.3.7 Einsatz des Fermenters	100
5.3.8 Allgemeine Vorschrift für enzymatische Reaktionen mit Chlorperoxidase...	102
5.3.9 Siderophore-Typing	103
5.3.10 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	104
5.3.11 Durchführung der Zellzahlstudie	105
5.3.12 Toxizitätstests mit Hilfe des Blättchenverfahrens.....	106
5.4 SYNTHESSEN	107
5.4.1 Synthese von 2-Methylthio-4-hydroxyanisol	107
5.4.2 Synthese von 3-Methylthiopyridin	108
5.4.3 Synthese von Methylthio-sym-Triazin.....	109
5.4.4 Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Sulfoxide als Referenzen aus den entsprechenden Sulfiden	111
STRUKTURMATRIX.....	113
LITERATURVERZEICHNIS.....	115

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Anwendung intakter Mikroorganismen auf organische Sulfide zur asymmetrischen Synthese von optisch aktiven Sulfoxiden. Die im Vergleich zu den aufwendigen und teureren Reaktionen mit isolierten Enzymen besonders effizienten Rahmenbedingungen bei sogenannten 'whole-cell'-Umsetzungen stellten den Grund für die Bemühungen in dem stetig an Bedeutung gewinnenden Arbeitsfeld der Bioorganischen Chemie dar. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Studien sind im Folgenden zusammengefasst:

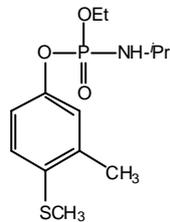
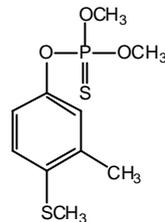
1. Die Mikroorganismen wurden isoliert, singularisiert und kultiviert. Eine Bodenprobe diente als Quelle für eine Vielzahl an Bakterien, Hefen und Pilzen, die mit dem Standardsubstrat Thioanisol auf ihre Fähigkeit zur enantioselektiven Sulfoxidation überprüft wurden.



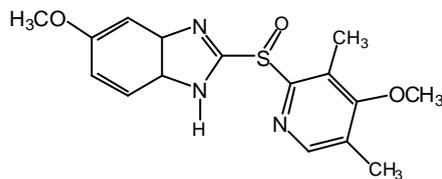
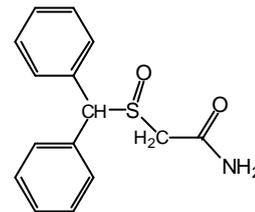
2. Insgesamt sind sechs Keime nach standardisierten Methoden genotypisch charakterisiert und den entsprechenden Spezies zugeordnet worden. Die beiden Bakterienstämme mit den bei der Sulfoxidation höchsten Enantiomerenüberschüssen (*ee*-Werten), nämlich *Arthrobacter aurescens* (bildete das *S*-Enantiomer) und *Pseudomonas frederiksbergensis* (lieferte das *R*-Enantiomer), wurden für nachfolgende Biosynthesen verwendet. *Pseudomonas frederiksbergensis* war der einzige Stamm, der das *R*-Enantiomer im Überschuss produzierte.

3. Durch direkte Vergleiche der Biosyntheseleistung der isolierten Bakterien mit kommerziell erhältlichen Referenzstämmen wurde im Fall von *Pseudomonas frederiksbergensis* gezeigt, dass sich Bodenisolat und zugeordneter Referenzstamm gegensätzlich enantioselektiv verhalten. Weitere Charakterisierungsdaten (Farb- und Assimilationsreaktionen, Oberflächenfettsäureverteilung, „Siderophore-Typing“ und direkter rRNA Vergleich) sicherten die Zugehörigkeit beider Bakterienstämme als *Pseudomonas frederiksbergensis*-Spezies; keinerlei Unterschiede wurden zwischen den beiden Stämmen festgestellt. Zum ersten Mal werden somit zwei natürliche, nicht genetisch manipulierte Stämme von *Pseudomonas frederiksbergensis* beschrieben, deren Enzymaktivität eine entgegengesetzte Enantioselektivität in der mikrobiellen `whole-cell` asymmetrischen Sulfoxidation aufweist.
4. In einem umfangreichen Substratscreening sind strukturvariierte organische Sulfide als Substrate zur bakteriellen Sulfoxidation eingesetzt worden. Anhand der *ee*-Werte wurde der Einfluss der Sulfidstruktur auf den Reaktionsverlauf bestimmt. Generell erwiesen sich Arylalkylsulfide als optimale Substrate für die bakterielle Sulfoxidation mit den isolierten und kommerziell erworbenen Stämmen von *Arthrobacter aurescens* und *Pseudomonas frederiksbergensis*; aliphatische Sulfide wurden zur biokatalytischen Umsetzung nicht akzeptiert.
 - 4a. Elektronenreiche *para*-Substituenten am Arylsystem ergaben teilweise enantiomerenreine Sulfoxide.
 - 4b. Eine zunehmende Anzahl an Stickstoffatomen im Arylring (N-heterozyklische Grundstruktur) führte zu einer dramatischen Verringerung des *ee*-Wertes.
 - 4c. Schwefelhaltige Furfuryle und Thiophene wurden nicht als Substrate für die enantioselektive Sulfoxidation akzeptiert.

4d. Der Einsatz schwefelhaltiger Pestizide in der Biokatalyse verlief erfolglos, allerdings wurden die Organophosphorpestizide Fenamiphos[®] und Fenthion[®] mit dem aus Sulfoxidationsreaktionen lange bekannten Enzym Chlorperoxidase (CPO) enantiomerenangereicht umgesetzt.

Fenamiphos[®]Fenthion[®]

4e. Die biotechnologisch wichtige Anwendung der asymmetrischen Sulfoxidation in der Arzneistoffsynthese - hier versucht mit den Wirkstoffen Omeprazol[®] und Modafinil[®] - schlug fehl.

Omeprazol[®]Modafinil[®]

5. Der Einsatz eines Bioreaktors (Fermenter) schuf die Grundlage für künftige asymmetrische Sulfoxidationen in präparativem Maßstab. Eine Zellzahlstudie mit *Pseudomonas frederiksbergensis* wurde durchgeführt; ferner erfolgten Bestimmungen der optimalen Fermentationsparameter am Beispiel einfach strukturierter, organischer Sulfide inklusive Blindwerts- und Hemmversuchen. Die toxischen Einflüsse auf die bakteriellen `whole-cell`-Systeme, die vom eingesetzten Sulfid sowohl als auch vom produzierten Sulfoxid verursacht werden, bedürfen besonderer Beachtung bei einer weiteren Bearbeitung dieses Themas.

Das vorgestellte, neue Phänomen der asymmetrischen Sulfoxidation mit entgegengesetzter Enantioselektivität durch zwei geno- und phänotypisch identische Spezies von *Pseudomonas frederiksbergensis* rechtfertigt eine weitere, intensive Suche nach derartigen, natürlichen Mikroorganismen.

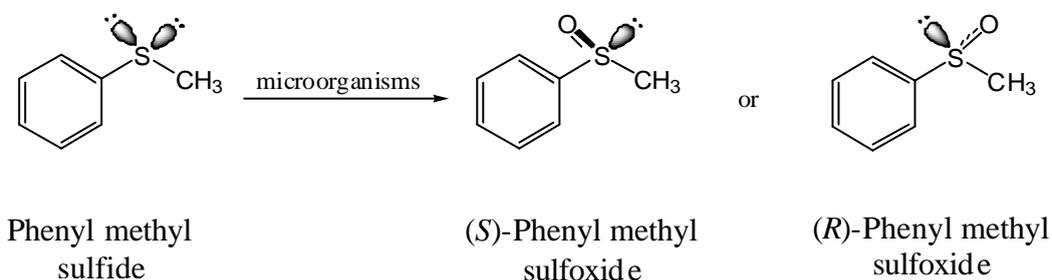
Fazit:

Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten, zukunftssträchtigen Studien zum Einsatz von Mikroorganismen zur enantioselektiven Sulfoxidation demonstrieren das Potential dieser Methode für die Organische Chemie. Durch weitere, interdisziplinäre Zusammenarbeit von Chemikern und Biologen zur Isolierung, Charakterisierung und Überexpression der gewünschten enzymatischen Aktivitäten werden vielversprechende, neue Perspektiven zur Darstellung bisher schwer zugänglicher, enantiomerenreiner Sulfoxide für die verschiedensten Anwendungsbereiche der Synthesechemie eröffnet.

Summary

The goal of this study was to employ intact microorganisms for the asymmetric synthesis of optically active sulfoxides from organic sulfides. Especially the efficient and convenient conditions of the so-called 'whole-cell' transformations, compared to the elaborate and costly reactions with isolated enzymes, provided the incentives and impetus for the present efforts in the steadily growing and future-oriented field of bioorganic chemistry. The highlights of these studies are enumerated briefly below:

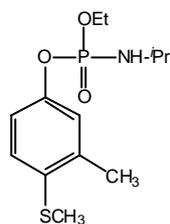
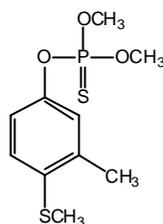
1. The microorganisms were isolated, singularized and cultivated. A soil sample served as source for the manifold bacteria, yeasts and fungi, which were tested for their efficacy of enantioselectively sulfoxidizing phenyl methyl sulfide as the standard model substrate.



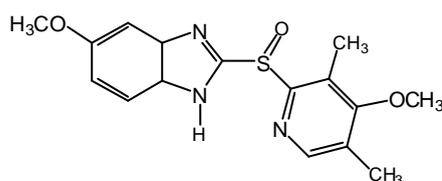
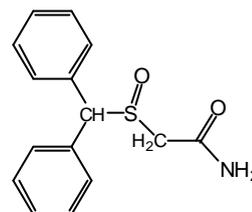
2. A total of six microorganisms were genotypically characterized by standard methods and assigned to the corresponding species. The two bacterial strains with the highest enantiomeric excess (*ee* value) in the sulfoxidation, namely *Arthrobacter aurescens* (which forms the *S* enantiomer) and *Pseudomonas frederiksbergensis* (which forms the *R* enantiomer), were used for the prospective biosynthetic experiments. *Pseudomonas frederiksbergensis* was the only strain which produced preferentially the *R* enantiomer.
3. Direct comparison of the biosynthetic performance of the isolated bacteria with commercially available reference strains revealed that *Pseudomonas frederiksbergensis* (the isolated soil strain) displayed an opposing sense in the

enantioselectivity than the reference strain. Further characterization tests (color and assimilation reactions, surface fatty acid spectra, siderophore typing and direct rRNA comparison) secured that both bacterial strains belong to the *Pseudomonas frederiksbergensis* species, since no differences whatsoever were found between both strains. Thus, for the first time two natural, genetically not manipulated strains of *Pseudomonas frederiksbergensis* are reported, which possess an opposing sense in the enantioselectivity for the microbial 'whole-cell' asymmetric sulfoxidation.

4. In an extensive substrate screening, a variety of organic sulfide structures was submitted to the bacterial asymmetric sulfoxidation. On the basis of the *ee* values, the influence of the sulfide structure on the course of the reaction was assessed. Generally speaking, the aryl alkyl sulfides proved to be optimal substrates for the bacterial sulfoxidation by the isolated and commercially available strains of *Arthrobacter aurescens* and *Pseudomonas frederiksbergensis*; aliphatic sulfides were not accepted in biocatalytic enantioselective conversions. Specifically, the following trends obtain:
 - 4a. Electron-rich *para* substituents on the aryl system afforded enantiomerically pure sulfoxides.
 - 4b. An increasing number of nitrogen atoms in the aryl ring (N-heterocyclic structure) led to a dramatic decrease of the *ee* values.
 - 4c. Sulfur-containing furfurals and thiophenes were not accepted in the present enantioselective sulfoxidation.
 - 4d. The use of sulfur-containing pesticides as substrates in the biocatalysis failed, but the phosphor-containing organic pesticides Fenamiphos[®] and Fenthion[®] were converted to the respective enantiomerically enriched sulfoxides by chloroperoxidase (CPO), an enzyme known to catalyze asymmetric sulfoxidation.

Fenamiphos[®]Fenthion[®]

- 4e. The application of the biotechnologically important asymmetric sulfoxidation in drug synthesis -in particular the pharmaceutical agents Omeprazol[®] and Modafinil[®] - failed.

Omeprazol[®]Modafinil[®]

5. The use of a fermenter established the basis for future asymmetric sulfoxidations on a preparative scale. A cell-count study with *Pseudomonas frederiksbergensis* was conducted and the fermentation parameters were optimized with simple organic sulfides by employing blanks and inhibition tests. The toxicity of the sulfide substrate and the sulfoxide product on the bacterial 'whole-cell' systems demands particular attention in future work.

The new phenomenon of asymmetric sulfoxidation by the two genotypically and phenotypically identical species of *Pseudomonas frederiksbergensis* displays an opposing sense in the enantioselectivity, which encourages to search intensively for other such natural microorganisms.

Conclusion:

The seminal studies conducted in this dissertation on the use of microorganisms for the enantioselective sulfoxidation demonstrate the potential of this method in asymmetric synthesis. Through the interdisciplinary cooperation of chemists and biologists in the isolation, characterization and overexpression of the desired enzymes, it is anticipated that promising, new perspectives will be developed for the production of until now difficult to come by enantiomerically pure sulfoxides, especially since the latter constitute attractive building blocks in synthetic chemistry.

1 Einleitung

Enzymatische und mikrobielle Biotransformationen haben in der organischen Synthese zunehmend an Bedeutung gewonnen. Galt die Verwendung von Biokatalysatoren vor zwanzig Jahren noch als exotisches Randgebiet der Organischen Chemie, das sich mit wenigen, meist biotechnologischen Fragestellungen beschäftigte, bestimmt genau diese innovative Methodik heute große Bereiche der asymmetrischen Synthese. Aufgrund ihrer Fähigkeiten zur regio-, diastereo- und enantioselektiven Katalyse bieten Enzyme und Mikroorganismen unübertroffene Vorteile zur gezielten Synthese vor allem von Naturstoffen und Synthesebausteinen. Für die chemische Industrie stellen Biokatalysatoren eine attraktive Alternative zu etablierten Katalysatoren dar. Effizientere, selektivere und kostengünstigere biokatalytische Verfahren ersetzen hier zahlreiche aufwendige Reaktionen (Schreier 1997, Faber 2000, Loughlin 2000, Liese 2002).

Besonders die ausführlich untersuchten Lipasen (Theil 2000, Yadav et al. 2000, Berglund 2001) und Hydrolasen (Ader et al. 1992, Kazlauskas und Weber 1998) haben in den letzten Jahren ihren Weg zur Anwendung in der industriellen Synthese gefunden. Die Entwicklung dieser umweltfreundlichen Biokatalysatoren beschleunigte sich in neuerer Zeit aufgrund des weltweit stark ansteigenden Bedarfs an enantiomerenreinen Produkten, der sehr deutlich in der pharmazeutischen Industrie zu spüren ist. Auch die Lebensmittelindustrie profitiert von den Fortschritten im Bereich der enzymatischen Biokatalyse, beispielsweise bei der Aromastoffproduktion (Marasco und Schmidt-Dannert 2003).

Mikroorganismen enthalten eine Vielzahl selektiver Enzyme für die verschiedensten Anwendungen. Sie stellen erneuerbare Katalysatoren dar, die jederzeit in der erforderlichen Menge kultiviert werden können. Hierbei erübrigt sich die aufwendige Aufreinigung von Enzymen sowie der Zusatz teurerer Cofaktoren und weiterer Reagentien. Bakterien, Hefen und Pilze bieten daher einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung umweltfreundlicher Verfahren zur Gewinnung enantiomerenreiner Verbindungen.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Synthesewegen zeigen Biokatalysatoren wesentlich bessere Umweltverträglichkeit und ermöglichen zudem Transformationen, die mit chemischen Katalysatoren oftmals nur schwierig zu realisieren sind (Faber 2000). An diesem Wandel im Bereich der enantioselektiven Synthese waren in den letzten Jahren unter anderem die Würzburger Arbeitsgruppen um die Professoren Adam und Schreier maßgeblich beteiligt. Deren grundlegende Ergebnisse aus Untersuchungen mit Peroxidasen (Adam et al. 1999-1, 1999-2, Adam et al. 2002) und bakteriellen Systemen (Adam et al. 2000-1, 2000-2, 2000-3, Adam et al. 2001 und Adam et al. 2002) eröffneten neue Wege im vielversprechenden Synthesefeld der Oxyfunktionalisierung.

Neben den zahlreichen Entwicklungen auf dem Gebiet der enzymatischen enantioselektiven Sulfoxidation (Colonna et al. 1990, 1992-2, 1996 und 2002) als effektiver Ersatz für die chemisch-synthetische Variante (Walker 1992, Oae 1977) sind seit einigen Jahren auch bakterielle `whole-cell`-Systeme untersucht worden. Die Biotransformation mit lebenden Zellen ist im Bereich der asymmetrischen Sulfoxidation allerdings an nur wenigen Beispielen beschrieben worden (Kelly et al. 1996). Optisch aktive Sulfoxide stellen nach wie vor wichtige Bausteine in der asymmetrischen Synthese dar und sind gefragte Substrate sowohl in der bioorganischen Chemie als auch in der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikroorganismen nach einem speziell entwickelten Screeningverfahren aus Bodenproben isoliert, umfassend charakterisiert und zur enantioselektiven Sulfoxidation eingesetzt. Mit ihnen wurden bakterielle `whole-cell`-Umsetzungen unterschiedlich strukturierter organischer Sulfide (Adam et al. 2004-1 und 2004-2) und schwefelhaltiger Pestizide durchgeführt. Weitere Substrate sind im Hinblick auf Sulfoxidationsprodukte mit pharmakologischer Wirksamkeit untersucht worden.

2 Kenntnisstand

2.1 Einsatz von Biokatalysatoren

In der asymmetrischen Synthese gehören Biokatalysatoren heute mehr denn je zu den gefragtesten Substanzen. Die Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten sowie die ausgeprägte Selektivität begründen die Tatsache, dass Enzyme (Faber 2000, De Santis und Jones 1999, Jäger und Reetz 2000) und Mikroorganismen (Galli et al. 2002, Patel 2002) den chemischen Katalysatoren und Metallkomplexen in ihrer Anwendung häufig überlegen sind.

Um Enantiomere darzustellen, bedarf es einer asymmetrischen Reaktionsführung, die 1971 von Izumi als „eine Reaktion, bei der die Enantiomere eines chiralen Moleküls in ungleichen Anteilen entstehen“, definiert wurde (Izumi 1971). Grundsätzlich stehen drei Wege zur Darstellung optisch aktiver Verbindungen zur Verfügung: Bei der **produktselektiven Reaktionsführung** ist das Edukt eine prochirale Verbindung, aus der durch asymmetrische Induktion mit Hilfe eines Katalysators ein bestimmtes Stereoisomer gewonnen wird; die **eduktselektive Reaktionsführung** geht von Verbindungen aus, die schon enantiomerenrein vorliegen, wobei die Zielverbindung dann ohne stereochemische Alternative aufgebaut wird; schließlich lässt sich, ausgehend von einem racemischen Gemisch, eine **präparative Auftrennung** in die beiden Enantiomere bewerkstelligen.

Die für die produktselektive Reaktionsführung notwendige asymmetrische Induktion wird von den Biokatalysatoren in besonderer Perfektion übernommen. Isolierte Enzyme sowie die verschiedensten Enzymsysteme in Mikroorganismen sind effektive Katalysatoren und beschleunigen eine im Vergleich zur nicht-enzymatischen Reaktion um den Faktor 10^8 bis 10^{12} . Im Allgemeinen werden sie in einer Menge von 10^{-3} bis 10^{-4} mol% eingesetzt und übertreffen damit ihre chemischen Analoga (0.1 bis 1 mol%) deutlich an Effizienz. Weiterhin verlaufen viele von Enzymen katalysierte Reaktionen

regio-, diastereo- und enantioselektiv. Der Aufbau von Enzymen aus chiralen Aminosäuren gewährleistet die zwingend vorausgesetzte Asymmetrie der Katalysatoren und ermöglicht damit asymmetrische Synthesen. Diese sind zudem noch unter milden Bedingungen möglich, denn die Enzymkatalyse verläuft in der Regel bei pH-Werten im Bereich von 5-8, bei Raumtemperatur und Normaldruck. Unerwünschte Nebenreaktionen können so häufig vermieden werden. Vorhandene Nachteile wie eingeschränkte Substratspezifität, auftretende Enzyminhibierung, Instabilität und begrenzte Optimierungsmöglichkeit lassen sich ausgleichen. Diese negativen Effekte haben trotzdem lange Zeit den Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese stark behindert. Durch verschiedene chemische und biologische Fortschritte, wie neue Techniken zur Stabilisierung und Immobilisierung von Enzymen, wurde deren Handhabbarkeit deutlich erleichtert (Hartmeier 1990, Tischler und Wedekind 1999), und sie entwickelten sich immer mehr zu vielseitig einsetzbaren Biokatalysatoren nicht nur in der asymmetrischen Synthese. Weiterhin ermöglichen apparative und technische Neuerungen eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabes bis hin zu den großtechnischen Verfahren (Nüesch 1969, Stanbury und Whitaker 1984, Dingermann 1999, Zhang et al. 2004).

Stetige Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie (Austausch von Aminosäuren im katalytisch aktiven Zentrum eines Enzyms) sowie der theoretischen Chemie (Berechnung und Erstellung von 'active-site' Modellen) ermöglichen eine gezielte Optimierung von Enzymen sowie den Ausbau des grundsätzlichen Verständnisses von enzymkatalysierten Reaktionen. Die Konstruktion von Genen für die Expression von Proteinen mit erwünschten Eigenschaften, die für bestimmte Zielsetzungen geeignet sind, ist möglich. Durch Modifikationen werden Aktivität, Selektivität und Stabilität beeinflusst (De Santis und Jones 1999, Jäger und Reetz 2000). Die Technologie rekombinanter DNA erlaubt zudem die kostengünstige Produktion von Enzymen (Dingermann 1999). Auch semisynthetische Enzyme hat man der asymmetrischen organischen Synthese zugänglich gemacht (Häring et al. 1999).

Da die genannten Eigenschaften von isolierten Enzymen auf Mikroorganismen übertragbar sind, erklärt sich der zunehmende Einsatz von „whole-cell“-Systemen als

Katalysatoren im industriellen Bereich sowie in der organischen Synthese. Weitere Vorteile, wie die ständige Möglichkeit zur Erneuerung des Katalysators durch Replikation sowie die fehlende Notwendigkeit von Cofaktoren und Hilfsenzymen, verstärken diese Entwicklung. Da die mikrobiellen (und somit enzymatischen) Reaktionen im Gegensatz zu chemischen Verfahren stereoselektiv ablaufen, wurde hier seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld der industriellen Mikrobiologie eröffnet (Nüesch 1969). Die Verwendung von Mikroorganismen als Biokatalysatoren wurde in den letzten Jahren durch neue Kultivierungs- und Fermentationstechniken sowie Fortschritte im Bereich der Immobilisierung ständig verbessert. Vor allem die bereits erwähnten Entwicklungen in der Gentechnik ermöglichen die gezielte Herstellung von sogenannten Hochleistungsstämmen mit maßgeschneiderten Eigenschaften (Dingermann 1999, Krämer 2004). Heute werden Mikroorganismen in vielen Bereichen erfolgreich eingesetzt, z. B. zur Produktion von organischen Säuren (Karklins et al. 2001), Aminosäuren (Faurie und Thommel 2003) und Antibiotika (Gutierrez et al. 2004).

2.2 Chemische Sulfoxidation

Sulfide werden chemisch durch partielle Oxidation zum Sulfoxid umgesetzt, durch einen weiteren Oxidationsschritt ist die Bildung eines Sulfons möglich, welches die Endstufe im Oxidationsprozess darstellt. Das Interesse an den Sulfoxiden ist seit langem hoch, da ihr einzelnes freies Elektronenpaar am Schwefelatom eine besondere Reaktionsfreudigkeit begründet und zudem für die optische Aktivität der Verbindungen verantwortlich ist. Diese Eigenschaften bieten der Substanzklasse der Sulfoxide in synthetisch bedeutenden Reaktionen ein breites Einsatzfeld.

Seit der ersten chemischen Synthese eines Sulfoxids, ausgehend von einem Sulfid, durch Märcker im Jahre 1865 wurden verschiedene Methoden für die Transformation von Sulfiden zu Sulfoxiden entwickelt. Die Standardmethode für die Herstellung eines Sulfoxids stellt die Oxidation von Sulfiden durch verschiedenste Oxidationsmittel dar. Diese Oxidation kann nicht nur durch die gängigen Reagenzien wie Persäuren,

Salpetersäure und Periodat (vgl. Abb. 2-1), sondern auch durch halogenhaltige Vertreter

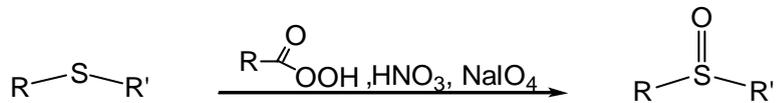


Abb. 2-1: Synthese von Sulfoxiden mit Persäuren, Salpetersäure oder Periodat

wie *t*-Butylhypochlorit und N-Bromsuccinimid erreicht werden. Andere Methoden zur Synthese von Sulfoxiden schließen beispielsweise die Reaktion eines Sulfoxid-Carbanions mit einer ungesättigten Gruppe (vgl. Abb. 2-2), die reduktive Addition von

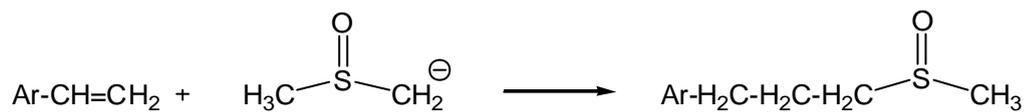


Abb. 2-2: Reaktion eines Sulfoxid-Carbanions mit einer ungesättigten Verbindung

aromatischem Sulfonylchlorid mit Alkylaluminium und die Umlagerung von Allyl- und Benzylarylsulfonaten ein. Industriell wird Dimethylsulfoxid in direkter Luftoxidation mit Stickstoffdioxid als Oxidans hergestellt (vgl. Abb. 2-3). Hierbei sind sowohl

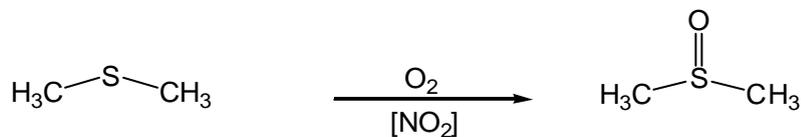


Abb. 2-3: Industrielle Herstellung von Dimethylsulfoxid (DMSO), Luftoxidation mit Stickstoffdioxid

Dampf- als auch Flüssigphasenoxidation beschrieben. Die gleiche Vorgehensweise kann auch bei der Oxidation von Dialkylsulfiden zu den entsprechenden Sulfoxiden angewendet werden.

Im Labor werden Sulfide vorzugsweise mit Peroxiden, Persäuren und Ozon oxidiert. Dialkyl-, Diaryl- und Arylalkylsulfide werden mit H_2O_2 oder Perbenzoesäure zu Sulfoxiden umgesetzt (vgl. Abb. 2-4). Teilweise ist es aber schwierig, die Oxidation auf

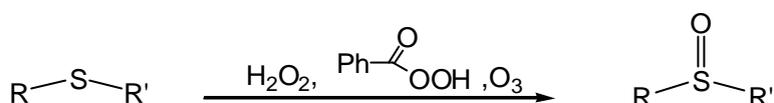


Abb. 2-4: Bevorzugte Herstellung von Dialkyl- und Diarylsulfiden im Labormaßstab mit Peroxiden, Persäuren und Ozon

der Stufe des Sulfoxids zu halten, was besonders bei Diarylsulfiden der Fall ist. Dagegen kann man die Oxidation von Dialkylsulfiden leichter auf die Stufe des Sulfoxids begrenzen, da die freien Elektronenpaare am Schwefelatom nur bei Diarylsulfiden im Wesentlichen über die Benzylringe delokalisiert sind. Infolgedessen benötigt man für die erste Oxidation zum Sulfoxid relativ starke Oxidantien, die deutlich stärker als im Falle der Dialkylsulfide ausfallen und somit bei den Diarylsulfiden auch für die Oxidation zum Sulfon ausreichen.

Es wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Nebenreaktion der Sulfonbildung zu vermeiden. Salpetersäure wurde beispielsweise erfolgreich zur Oxidation von Thioanisol (**1**) zum Phenylmethylsulfoxid (**1***) ohne Sulfonbildung eingesetzt. Auf ähnlichem Weg wurden auch viele Diarylsulfide ausschließlich zum entsprechenden Sulfoxid oxidiert, wobei manchmal aber eine unerwünschte Nitrierung der Substrate stattfand. Dagegen wurde gefunden, dass N_2O_4 zur Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden ohne die Bildung von Sulfonen oder anderen Nebenprodukten geeignet ist. Eine erste gründliche Studie ließ die Bedeutung von sterischen und elektronischen Effekten bei derartigen Oxidationsreaktionen erkennen. Weiterhin wurde Chromsäure

als effektives Reagenz zur Sulfoxidation eingesetzt, wobei erneut das unerwünschte Sulfon als Nebenprodukt auftrat; jedoch wurde durch die Wahl von Pyridin als Lösungsmittel diese Nebenreaktion weitgehend reduziert. Die Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden durch Halogene in wässriger Lösung wurde ebenfalls beschrieben (vgl. Abb. 2-5), bei der oft Nebenreaktionen wie die Spaltung der C-S Bindung oder die

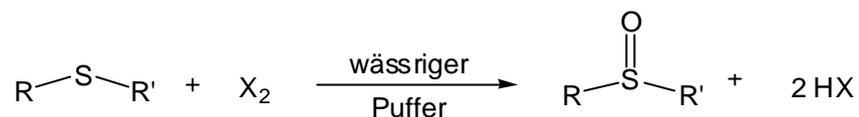


Abb. 2-5: Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden durch Halogene in wässriger Lösung

Bildung von Kohlenstoff-Halogen Bindungen überwiegen. Bei Arylsulfiden wurde häufig die Halogenierung des Arylrings festgestellt (Oae 1977).

Bei der chemischen Oxidation von Sulfiden besteht immer die Tendenz, dass Substrate über das Sulfoxid hinaus zum Sulfon oder sogar zur Sulfonsäure weiteroxidiert werden. Die Größenordnung dieser unerwünschten Nebenreaktion ist von der Struktur der organischen Sulfide, der Art des Oxidationsreagenz sowie den Reaktionsbedingungen wie Konzentration und Temperatur abhängig (Reid 1960). Weiterhin ist die chemische Synthese von optisch aktiven Sulfoxiden nur mit großem Aufwand durchzuführen und auf wenige Substrate beschränkt.

2.3 Historische Entwicklung der enantioselektiven Sulfoxidation

Enthält die Sulfoxid-Funktionalität zwei unterschiedliche Substituenten, so liegt ein chirales Molekül vor. Dies verdeutlicht, warum chiralen Sulfoxiden in der asymmetrischen Synthese ein stets wachsendes Interesse als 'stereodirigierende' Funktion zukommt. Außerdem gibt es sowohl natürliche als auch synthetische Sulfoxide, die abhängig von ihrer Stereoselektivität am Schwefelatom bestimmte biologische Aktivitäten begründen. Als Beispiel sollen hier die beiden Enantiomere von Thalidomid (besser bekannt unter dem Handelsnamen Contergan[®]) erwähnt werden; das Glutarsäureimidderivat galt als ungefährliches Schlafmittel, bei dem auch bei

Überdosierung keine Nebenwirkungen auftraten. Diese Wirkung wurde aber im Nachhinein nur dem *S*-Enantiomer zugeordnet, wohingegen sich das *R*-Enantiomer als teratogen erwies (Mutschler 1986). Es ist daher von Interesse, verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung unterschiedlicher chiraler Sulfoxide zu beherrschen. Die präparative Trennung von racemischen Gemischen hat man lange Zeit verwendet, um enantiomerenangereicherte Sulfoxide zu erhalten. Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass für jedes Sulfoxid ein spezieller Trennschritt ausgearbeitet werden muss und durch die mangelnde Übertragbarkeit auf andere Derivate diese Methode nur eingeschränkt eingesetzt werden kann. Die asymmetrische Synthese verspricht dagegen einen deutlich bequemeren und effizienteren Zugang zu chiralen Sulfoxiden (Kagan und Diter 1998). Abbildung 2-6 zeigt schematisch eine Reihe von Herstellungsmöglichkeiten, die in ihrer historischen Abfolge im Folgenden kurz erläutert werden.

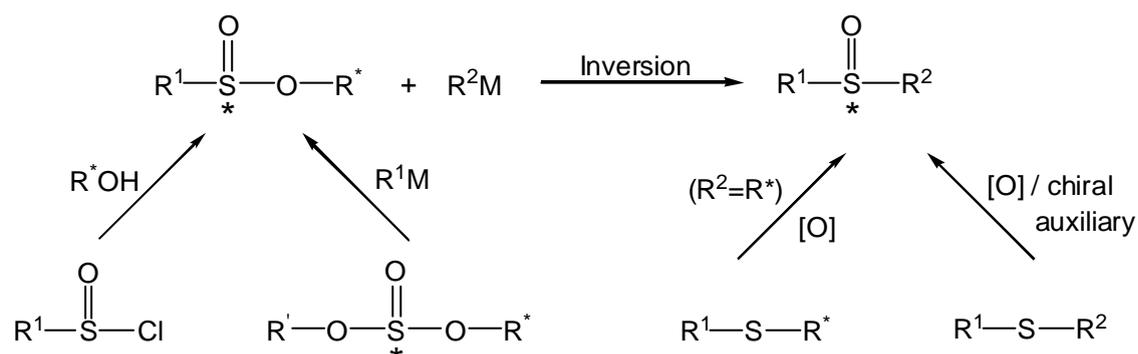


Abb. 2-6: Ausgewählte Methoden zur Herstellung chiraler Sulfoxide in der asymmetrischen Synthese (Kagan und Diter 1998)

Mitte der 20er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden erste Versuche unternommen, optisch aktive Sulfoxide durch die Trennung racemischer Gemische zu erhalten (Harrison et al. 1926). Als besonders nachteilig stellte sich heraus, dass die Sulfoxide strukturell eine saure oder basische Gruppe tragen mussten, um später ein Salz mit einer optisch aktiven Säure oder Base bilden zu können. Die resultierenden Diastereomere ließen sich trennen und daraus optisch aktive Sulfoxide gewinnen. Wegen der schon oben erwähnten, stark begrenzten Übertragbarkeit dieser Methode war eine Weiterentwicklung wenig sinnvoll.

In den 60er Jahren hat man versucht, enantiomerenangereicherte Sulfoxide durch asymmetrische Oxidation von Sulfiden mit optisch aktiven Persäuren zu generieren (Balenovic et al. 1960, Maccioni et al. 1961, Montanari 1965). Die dabei erzielten Enantiomerenüberschüsse waren allerdings durchwegs sehr niedrig.

1962 war Andersen erfolgreich, indem er eine neue Methode zur Synthese von optisch aktiven Sulfoxiden in hoher Reinheit durch die Reaktion von optisch aktiven Sulfonsäureestern mit Organomagnesiumhalogenid-Verbindungen in Anlehnung an die Grignard-Reaktion entwickelte (siehe Abb. 2-7, Andersen 1962).

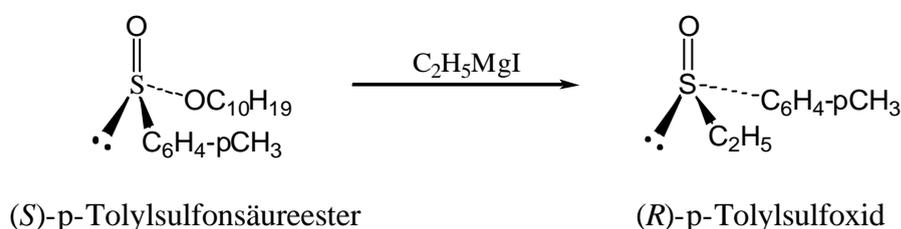


Abb. 2-7: Herstellung von optisch aktivem Sulfoxid mittels Grignard-Reaktion aus optisch aktivem Ester (Andersen 1962)

Bei dieser Reaktion unterliegt der *p*-Tolylsulfonsäureester einer nukleophilen Substitution, die eine Umkehrung der Absolutkonfiguration am Schwefelatom zur Folge hat. Das eingesetzte Ethylmagnesiumiodid dient als nukleophiles Reagenz, und die Konfiguration des entstandenen *p*-Tolylsulfoxids ist entgegengesetzt zu der im als Substrat dienenden Sulfonsäureester.

Seit den 80er Jahren wurde eine Vielzahl weiterer Synthesewege für optisch aktive Sulfoxide erschlossen. Dabei gewann der Einsatz von Metallkomplexen als Katalysatoren immer mehr an Bedeutung, später wurden für Einzelanwendungen auch sehr spezielle Katalysatoren als asymmetrische Induktoren verwendet.

Bedeutende Arbeiten führte in diesem Zusammenhang die Gruppe um Kagan durch, welche die Reaktionsbedingungen der bekannten Sharpless-Epoxidierung zugunsten einer enantioselektiven Sulfoxidation modifizierte (Pitchen und Kagan 1984). Der bekannte chirale Titankomplex, bestehend aus Ti(OPr^{*i*})₄ und Diethyltartrat (DET) im

entsprechenden Sulfoxid umsetzen (Colombo et al. 1986). Leider lagen die *ee*-Werte < 20%, und es entstanden zusätzlich geringe Mengen Sulfon. Als Grund hierfür wird angegeben, dass das Sulfid vor dem Angriff durch H₂O₂ mit dem Titankomplex eine koordinative Bindung eingeht und somit keine Peroxotitan-Spezies gebildet werden kann. Ähnliche Erfahrungen beschreiben Colonna und Mitarbeiter, die chirale Titankomplexe von *N*-Salicyliden-*L*-aminosäuren verwendeten (Colonna et al. 1987). Mit diesem Katalysator wurden bei der Umsetzung von *p*-Tolylmethylsulfid (**2**) und anderen Sulfiden mit *t*-BuOOH als Oxidationsmittel in Benzol bei Raumtemperatur *ee*-Werte < 25% gemessen.

Die Verwendung von Schiff'schen Basen als Liganden wurde auch auf das Metall Vanadium ausgedehnt. Blom und Bienewald entdeckten einige Komplexe mit chiralen Vanadium(IV)-Schiff'sche Basen als effiziente Katalysatoren für die Sulfoxidation. Der chirale Katalysator wurde in einer in-situ Reaktion von VO(acac)₂ mit der Schiff'schen Base von β-Aminoalkohol hergestellt. Die Umsetzung von Thioanisol (**1**) wurde bei Raumtemperatur unter langsamer Zugabe von 30%igem H₂O₂ durchgeführt und bei einer Ausbeute von 94% Phenylmethylsulfoxid (**1***) erhielt man einen *ee*-Wert von 70% (Blom und Bienewald 1998).

In der Folge wurden noch viele strukturelle Analoga dieser Art von Katalysatoren zur enantioselektiven Sulfoxidation eingesetzt (Vetter und Berkessel 1998). Als weiteres Katalysatorsystem fanden Komplexe von chiralen Schiff'schen Basen als Liganden und Mangan als Zentralatom Verwendung. Jacobsen und Mitarbeiter setzten den chiralen (Salen)Mn(III)Cl Komplex zur asymmetrischen Oxidation von Arylmethylsulfiden mit 30%igem H₂O₂ in Acetonitril ein und erzielten moderate *ee*-Werte zwischen 50 und 70% (Palucki et al. 1992). Katsuki und Mitarbeiter beschrieben, dass kationische chirale (Salen)Mn(III) Komplexe als perfekte Katalysatoren für die Oxidation von Sulfiden mit Iodosylbenzol fungieren; das beste Ergebnisse wurde im Fall von *ortho*-Nitrophenylmethylsulfoxid mit 94% Ausbeute und 94% Enantiomerenüberschuss erzielt (Kokubo und Katsuki 1996).

Oxometallporphyrine wurden verwendet, um in Modellsystemen einige Zwischenstufen des katalytischen Zyklus von Cytochrom P-450-Enzymen und Peroxidasen zu erklären. Dabei wurde ein problemloser Sauerstofftransfer von iodosylaromatischen Verbindungen auf Sulfide mit den Metallporphyrinen Fe(III) oder Mn(III) als Katalysatoren festgestellt. Das erste Beispiel für eine enantioselektive Sulfoxidation (73% *ee*) wurde in diesem Zusammenhang von Naruta und Mitarbeitern veröffentlicht, die ein chirales zweikerniges Eisenporphyrin als Katalysator verwendeten (Naruta et al. 1990). Die räumliche Anordnung von Eisenporphyrinen bei der asymmetrischen Sulfoxidation ist im Abschnitt 2.4 (Abb. 2-13) dargelegt. Groves und Mitarbeiter beschrieben ähnliche Ergebnisse mit einem Binaphthyl-Fe(III)-Tetraphenylporphyrin als Katalysator, wobei *ee*-Werte bis 48% erreicht wurden (Groves und Viski 1990).

Davis und Mitarbeiter entwickelten eine sehr nützliche Klasse chiraler Oxidantien auf der Basis von *N*-Sulfonyloxaziridinen (abgeleitet von Kampfer). Diese Katalysatoren sind kommerziell erhältlich, und man erreicht beispielsweise für *p*-Tolylmethylsulfid einen Enantiomerenüberschuss von 95% (Davis et al. 1992-1). Der Mechanismus für den elektrophilen Angriff am Schwefel wird an einem 'active-site' Modell im Abschnitt 2.4 (Abb. 2-14) erläutert.

Seit 1976 wurden neben den „klassischen“ Metallkomplexen noch einige weitere, durchaus als unkonventionell zu bezeichnende heterogene Katalysatoren zur enantioselektiven Sulfoxidation entworfen. Die Elektrooxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden an mit optisch aktiven Substanzen chemisch modifizierten Elektroden war dabei eine attraktive Vorgehensweise, auch wenn die ersten Versuche mit *ee*-Werten < 2% nicht ermutigend waren (Firth und Miller 1976). Hohe Enantioselektivitäten wurden von Komori und Nonaka erreicht, als sie verschiedene Typen von Platin- und Graphitelektroden herstellten, die mit Polyaminosäuren beschichtet waren. Die besten Ergebnisse wurden für Sulfide mit sperrigen Alkylgruppen erzielt. Die zweckmäßigste Elektrode war mit einem Polypyrrol- und anschließend mit einem Poly-*L*-Valin-Film überzogen (Komori und Nonaka 1983 und 1984). Den genauen Reaktionsmechanismus und den Ursprung der asymmetrischen Induktion hat man nicht aufgeklärt. Dieser vielversprechende Lösungsansatz wird allerdings durch das aufwendige Herstellungs-

verfahren und die geringe Robustheit der ansonsten aber ohne Verlust der Enantioselectivität wiederverwertbaren Elektroden begrenzt.

Die biologische Oxidation von Sulfiden beinhaltet Cytochrom P-450 Enzyme oder flavinabhängige Oxygenasen. Shinkai und Mitarbeiter setzten Flavinophan als Modell eines chiralen Flavins zur Katalyse der Oxidation von Arylmethylsulfiden ein. Damit wurden mit 35%igem H_2O_2 bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Dunklen *ee*-Werte von bis zu 65% erzielt (Shinkai et al. 1988).

Imine und Iminiumsalze werden durch Persäuren zu den Oxaziridinen und Oxaziridiniumionen oxidiert, die, wie oben bereits beschrieben, gute Katalysatoren für die enantioselective Sulfoxidation darstellen. Sie können aber prinzipiell vor der Oxidation durch die Persäuren auch selbst als Katalysatoren der enantioselectiven Sulfoxidation dienen (Bohe et al. 1993). Page und Mitarbeiter entwickelten ein System, in dem H_2O_2 unter basischen Bedingungen als Oxidationsmittel in Gegenwart eines chiralen Imins (abgeleitet von Kampfer) reagiert (Page et al. 1995). Diese Methode ergänzt die in der Literatur bekannten Systeme; sie erwies sich als besonders effektiv bei der asymmetrischen Oxidation von nicht-aryllischen Sulfiden. So wurde beispielsweise bei der Oxidation von 2-Phenyl-1,3-dithian ein *ee*-Wert von 98% gemessen.

Als weiteres Beispiel soll auch die Sulfoxidation in Gegenwart von Cyclodextrinen angeführt werden. Es ist bekannt, dass Cyclodextrine eine hydrophobe Tasche (u. a. als Bindungsstelle für Aromaten) und eine hydrophile äußere Oberfläche besitzen. Deswegen wurde eine asymmetrische Sulfoxidation von verschiedenen Arylalkylsulfiden mit *m*-Chlorperbenzoesäure und β -Cyclodextrin in Wasser durchgeführt (Czarnik 1984). Insgesamt hat man allerdings nur moderate Enantioselectivitäten von bis zu 33% gefunden, die bei Reduzierung des Cyclodextrinanteils im Reaktionsansatz (unter ein Moläquivalent) noch niedriger ausfielen (Drabowicz und Mikolajczyk 1984).

Sugimoto und Mitarbeiter fanden heraus, dass Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA), ein Transportprotein in biologischen Systemen, einen Speicherort für

aromatische Sulfide darstellt. Auf dieser Grundlage wurden Sulfoxidationsreaktionen mit NaIO_4 in Gegenwart von BSA durchgeführt (Sugimoto et al. 1979 und 1981), wobei eine markante Abhängigkeit zwischen der Enantioselektivität und der Struktur der aromatischen Einheit festgestellt wurde; so erhöhten z. B. sperrige Seitenketten den *ee*-Wert. Weiterhin waren die *ee*-Werte stark pH-abhängig, was mit einer Konformationsänderung der Proteinstruktur bei pH-Werten < 5 zu erklären ist. Außerdem wurde eine kinetische Racematspaltung in Gegenwart von BSA beschrieben (Kagan und Fiaud 1988). Am Beispiel von Phenyl-*i*-propylsulfid wurde der *ee*-Werte durch gleichzeitige Kombination von asymmetrischer Oxidation und kinetischer Racematspaltung gesteigert, ein Effekt der schon von Umsetzungen mit Titan-Katalysatoren bekannt war (Adam et al. 1998). Daraus konnte abgeleitet werden, dass in einem Zweiphasen-Prozess einerseits an der Bindungsdomäne des BSA das *R*-Sulfoxid gebildet und andererseits zunehmend das *S*-Sulfoxid durch die kinetische Racematspaltung abgebaut wird. Unerklärlicher Weise ließ sich diese Beobachtung nicht auf *p*-Tolylsulfide übertragen. Colonna und Mitarbeiter untersuchten später noch eine große Anzahl strukturvariiertes Sulfide, um die durch BSA katalysierte Periodatoxidation mechanistisch zu verstehen (Colonna et al. 1986).

2.3.1 Die enzymatische Sulfoxidation

Obwohl isolierte Enzyme gerade auf dem Gebiet der Biotransformation im präparativen Maßstab oftmals nicht mit den mikrobiellen Systemen mithalten können, gibt es trotzdem ein gesteigertes Interesse an deren Funktionsweise und Einsatzmöglichkeit in der asymmetrischen Sulfoxidation. Dem generellen Aufklärungsbedarf auf diesem Gebiet folgte die sehr frühe Erkenntnis, dass oxidative Enzyme unabdingbar mit der metabolischen Bildung von Sulfoxidderivaten aus z. B. schwefelhaltigen Pharmazeutika und Pestiziden verbunden sein müssen. Erste Beispiele dafür waren die Oxidation von Chlorpromazin durch Peroxidasen und Katalasen (Cavanaugh 1957) sowie Lebermikrosomen (Gillette und Kamm 1960). Weiterhin hat man den Metabolismus von Phenothiazin und Promazin untersucht (Walkenstein und Seifert 1959, Smith et al. 1983). Das Sulfoxidationsprodukt des Insektizids Systox war schon 1955 bekannt

(March et al. 1955). Die Grundstrukturen dieser Substanzen sind in Abbildung 2-9 zusammengefasst.

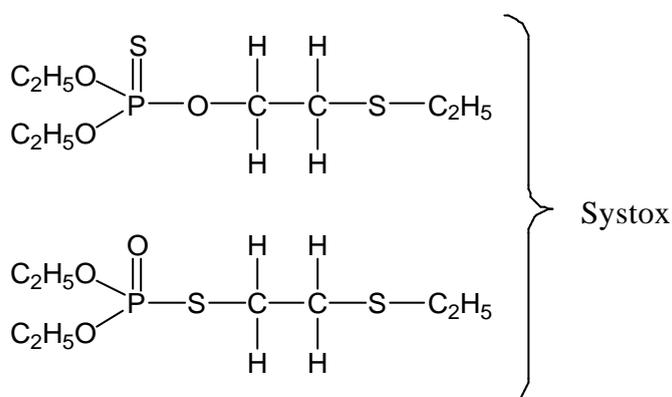
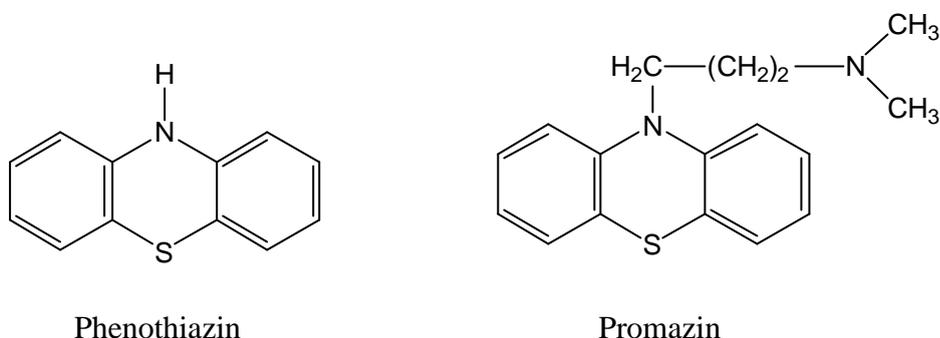


Abb. 2-9: Strukturformeln von Phenothiazin, Promazin und Systox

Die enzymatische Sulfoxidation von schwefelhaltigen Aminosäuren (z.B. Cysteinderivate, Ebbon und Callaghan 1968) hatte die partielle Aufreinigung von Enzymen aus Rattenleber zur Folge, denen man die effiziente Sulfoxidation einer Reihe von α -Thiocarbonsäuren zugeschrieben hat (Lee et al. 1970). Weiterhin wurde die menschliche Leber als ein Reservoir an oxidativen Enzymen entdeckt, die in der Lage sind, Thioether zu sulfoxidieren (Estabrook et al. 1963). Enzympräparate aus Lebermikrosomen sind allerdings nicht als homogen einzustufen, da sie Enzymaktivitäten verschiedener Stereoselektivitäten und Substratspezifitäten aufweisen. Die dahingehenden Probleme wurden noch größer, als man bei enzymatischen Reaktionen mit Rattenleberhomogenat nicht nur die Bildung von *R*- und *S*-Sulfoxiden, sondern auch die von Sulfonen nachgewiesen hat. Zusätzlich wurde dabei eine Enzymaktivität

festgestellt, die für eine selektive Reduktion von *S*-Sulfoxiden zu den entsprechenden Sulfiden verantwortlich war.

Durch Arbeiten mit aufgereinigten Präparaten von Hasenleber wurden sowohl mechanistische als auch präparative Aspekte der Sulfoxidation durch ein Enzym genauer untersucht, das man als cytochromabhängige P-450-Oxygenase klassifiziert hat (Fukushima et al. 1978). Erwähnenswert ist die Tatsache, dass das Enzym Cytochrom P-450 eine grundlegende Monooxygenase in menschlichen Geweben darstellt. Der katalytische Zyklus von Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen wird im Abschnitt 2.4 (Abb. 2-16) genauer beschrieben. Am Beispiel der Hasenleber wurden einfache prochirale Moleküle mit *ee*-Werten bis zu 54% sulfoxidiert; die Oxidation von *p*-Tolylethylsulfid mit zwei Cytochrom P-450-Isoenzymen ergab sogar einen *ee*-Wert von 80% zugunsten des *S*-Enantiomers (Takata et al. 1980, Cashman et al. 1990).

Es folgten ausführliche Untersuchungen bezüglich der stereochemischen Präferenz in Biotransformationen von strukturvariieren Sulfiden mit mikrosomalem Cytochrom P-450-Enzym aus Hasenleber (Takata et al. 1983). Aufgereinigte Cytochrom-P-450-abhängige Enzyme aus Rattenleber wurden von Walsh und Mitarbeitern mit *p*-Tolylethylsulfid als Substrat untersucht. Zwei verschiedene Isoenzyme lieferten das *S*-Sulfoxid mit *ee*-Werten von 58 und 68%; als Nebenprodukt wurden geringe Mengen des Benzylalkohols detektiert. Zusammen mit der Tatsache, dass racemisches *p*-Tolylethylsulfoxid durch die Rattenleberenzyme nicht zum Sulfon oxidiert wurde, schrieb man die fehlende Stereoselektivität in Oxidationsreaktionen mit Thioanisol (**1**) einer insgesamt wenig ausgeprägten Stereoselektivität des Enzyms selbst zu (Waxman 1982).

Im Gegensatz zur vorwiegenden Produktion von *S*-Sulfoxiden durch Cytochrom-P-450-abhängige Enzyme aus Rattenleber wurden in den Umsetzungen mit flavinabhängigen Monooxygenasen aus Schweineleber die entsprechenden *R*-Sulfoxide mit hoher optischer Reinheit von 90% isoliert. Der katalytische Zyklus der flavinabhängigen Monooxygenasen ist im Abschnitt 2.4 (Abb. 2-17) dargestellt. Es waren wiederum Walsh und Mitarbeiter (Oae et al. 1985), die von der hohen optischen Reinheit der Sulfoxide aus Reaktionen mit einem Rohextrakt von Lebermikrosomen ein

Zusammenwirken der von Flavin- und Cytochrom-P-450-abhängigen Enzyme in der Leber ableiteten. Eine Methode wurde entwickelt, die aufgrund des Anteils an S- und C-Oxidation an Phenylacetylphenylsulfid (jeweils determiniert durch P-450- oder Flavinaktivität) eine Unterscheidung zwischen den beiden Enzymaktivitäten erlaubte.

Ein anderes Beispiel für die enzymatische Sulfoxidation stellt die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) dar. Diese kupferhaltige Monooxygenase katalysiert die benzyliche Oxidation von Dopamin zu Norepinephrin. Der Austausch eines benzylichen Kohlenstoffatoms durch ein Schwefelatom wurde in einem Modellsystem untersucht, wobei die Oxidation durch Sauerstoff in Gegenwart von DBH ein S-Aminosulfoxid mit hohem *ee*-Wert und gleicher Konfiguration wie bei der Dopaminoxidation lieferte (May und Phillips 1980). Die Oxidation von *p*-Tolylmethylsulfid durch eine Flavinadeninindinukleotid (FAD) enthaltende Monooxygenase resultierte in einem *ee*-Wert von 95% zugunsten des *R*-Enantiomers (Waxman 1982). Die *Pseudomonas oliveorans* Monooxygenase (POM), eine ω -Hydroxylase, hydroxyliert normalerweise endständige Methylgruppen von Alkanen und epoxidiert endständige Olefine. In Modellumsetzungen führte dieses System aber auch zur Oxidation einer großen Anzahl von Alkylmethylsulfiden (in Gegenwart von NADH und Sauerstoff); *ee*-Werte bis zu 80% wurden erzielt (Katopodis et al. 1988).

Systematische Studien der Sulfoxidation durch Cyclohexanonmonooxygenasen (CHMO) aus *Acinetobacter sp.* sind von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt worden. Ein 'active site model' ist beschrieben und in Abbildung 2-15 aufgeführt. Viele Arylalkylsulfide, Dialkylsulfide und Dialkyldisulfide wurden als Substrate in Gegenwart von NADP und eines NADPH-regenerierenden Systems (Glucose-6-Phosphat) eingesetzt und in guten Ausbeuten sulfoxidiert; die *ee*-Werte schwankten in Abhängigkeit der Struktur der Substrate von 0 bis 98% (Carrea et al. 1992, Secunde et al. 1993). Außerdem erfolgte eine genauere Betrachtung unter Berücksichtigung des Einflusses der elektronischen Gegebenheiten der *para*-Substituenten bei Benzylmethylsulfiden. Auch wurden nichtsubstituierte 1,3-Dithioacetale zu entsprechenden Monosulfoxiden in guten Ausbeuten und *ee*-Werten über 98% umgesetzt (Colonna et al. 1996).

Die Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von verschiedenen Arylalkylsulfiden mit Hilfe von H_2O_2 mit dem Ergebnis moderater *ee*-Werte von 0 bis 68% (Colonna 1992-2). Erst gentechnische Methoden erlaubten es, die Enantioselektivitäten für die Sulfoxidation mit HRP beträchtlich zu steigern. So wurde eine Phe-41- \rightarrow Leu Mutante (F41L HRP) kreiert, die bessere Ausbeuten und *ee*-Werte bis 94% lieferte. Der Effekt eines Austausches von Phe-41 durch Threonin wurde ebenfalls geprüft.

Insgesamt stellen molekulare Arbeitstechniken an HRP einen vielversprechenden Zugang zur Variation der Selektivität von Enzymen für die Sulfoxidation dar (Ozaki und Ortiz de Montellano 1995).

Eine aus *Caldariomyces fumago* isolierte Chlorperoxidase (CPO) ist von Colonna und Mitarbeitern als effektiver Katalysator für die Oxidation von Sulfiden mit den Oxidationsmitteln H_2O_2 , Iodbezol und verschiedenen Hydroperoxiden (1.6×10^{-5} Moläquivalente CPO wurden in einem wässrigen Puffer bei pH 5 eingesetzt) beschrieben worden. Dieses System stellt auch das Referenzsystem dar (siehe Abb. 2-10), mit dem Vergleichsumsetzungen zur Bestimmung der Absolutkonfiguration der

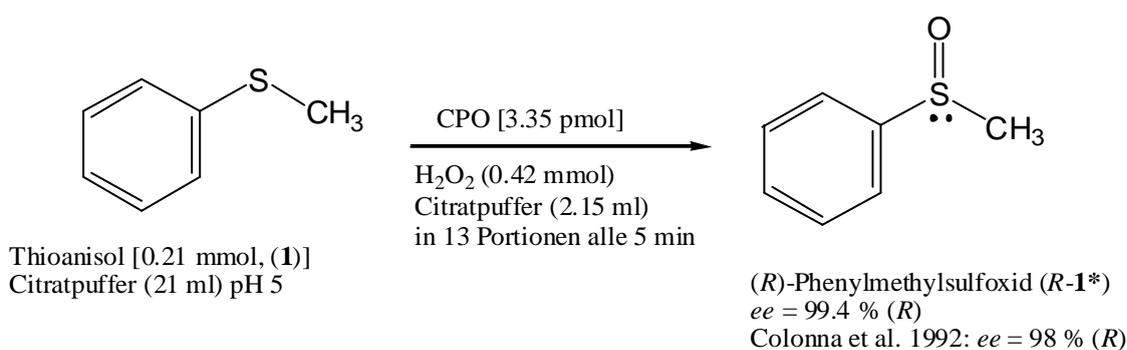
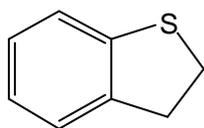


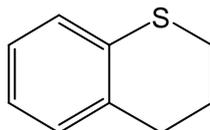
Abb. 2-10: Enzymatische Sulfoxidation mit Chlorperoxidase (CPO) aus *Caldariomyces fumago* am Beispiel des Standardsubstrats Thioanisol (**1**)

in dieser Arbeit aufgeführten Sulfoxide durchgeführt wurden. Ferner hat man beispielsweise (*R*)-*p*-Tolylmethylsulfoxid und (*R*)-Benzylmethylsulfoxid mit

Enantiomerenüberschüssen von > 90% synthetisiert (Colonna et al. 1990, Colonna et al. 1992-1). Die Chlorperoxidase wurde auch von Fu und Mitarbeitern (Fu et al. 1992) verwendet, wobei man mit H_2O_2 als Oxidationsmittel unter optimierten Reaktionsbedingungen exzellente Ausbeuten (66-92%) und *ee*-Werte (97-100%) erreichte. Eine weitere Forschergruppe setzte eine Auswahl an starren und aromatischen Sulfiden mit genau definierter Geometrie und H_2O_2 als Oxidationsmittel ein. Das nahezu planare Molekül 1-Thiaindan stellte sich als perfektes Substrat heraus (> 95% *R*-Sulfoxid, 100% Ausbeute); 1-Thiatetrahydronaphthalin war weniger reaktiv, bildete aber dennoch ein Sulfoxid mit einem *ee*-Wert von 96% (Allenmark und Andersson 1996, Strukturformeln in Abb. 2-11). Die beiden denkbaren Enzymmechanismen bei der enantioselektiven Sulfoxidation mit Chlorperoxidase sind im Abschnitt 2.4 (Abb. 2-18) dargestellt.



1-Thiaindan



1-Thiatetrahydronaphthalin

Abb. 2-11: Strukturformeln von 1-Thiaindan und 1-Thiatetrahydronaphthalin

2.3.2 Die mikrobielle Sulfoxidation

Der Einsatz von intakten Zellen gehörte zu den ersten Versuchen auf dem Gebiet der enantioselektiven Biokatalyse. Als Pionier dieser Arbeitstechnik untersuchte Henbest die Sulfoxidation durch *Aspergillus niger* (Auret et al. 1968). (*R*)-Alkyl-*p*-tolylsulfoxide wurden mit teilweise hohen Enantiomerenüberschüssen hergestellt; so ergaben beispielsweise Umsetzungen mit *t*-Butyl-, *i*-Propyl- und Methylsubstraten *ee*-Werte von 98, 70 und 32%. Die Experimente wurden in kleinem Maßstab mit geringen Ausbeuten durchgeführt (Auret et al. 1974). Sih und Mitarbeiter fanden in einem systematischen Screeningverfahren nach Mikroorganismen zur enantioselektiven Sulfoxidation mit *p*-Tolylmethylsulfid heraus, dass *Mortierella isabellina* (NRRL 1757) und *Helminthosporium* sp. (NRRL4671) in guten Ausbeuten enantiomerenreine *R*- und *S*-

Sulfoxide lieferten. Im Anschluss wurde noch der Einfluss von verschiedenen *para*-Substituenten bei der Sulfoxidation von Phenylmethylsulfiden durch *Mortierella isabellina* nachvollzogen, weiterhin hat man die Sulfoxidation verschiedener Aryl- und Benzylalkylsulfiden durch *Helminthosporium* sp. überprüft (Abushanab et al. 1978, Holland et al. 1985 und 1994). Auf der weiteren Suche nach Mikroorganismen, die zur enantioselektiven Sulfoxidation befähigt sind, lenkten Ohta und Mitarbeiter das Interesse auf *Corynebacterium equi*. Die Eigenschaften dieses Bakteriums wurden als extrem enantioselektiv bei der Sulfoxidation von Arylalkylsulfiden beschrieben, mit Stereopräferenz zugunsten des *R*-Enantiomers. Die Produktion von geringen Mengen Sulfon in nahezu allen Reaktionsansätzen machte das Vorhandensein einer Enzymaktivität für den notwendigen zweiten Oxidationsschritt wahrscheinlich. Außerdem könnte die stereoselektive Anreicherung des *R*-Sulfoxids in der bevorzugten *S*-Sulfoxid-Reduktion nach den Regeln einer kinetischen Racematspaltung begründet liegen (Ohta et al. 1984 und 1985).

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält Enzyme, die in der Lage sind, annähernd symmetrische Sulfide wie z.B. Methylthiostearat zu oxidieren. Sulfide wie z.B. Bn-S-(CH₂)₇-CO₂Me wurden mit einem *ee*-Wert von 70% zum *S*-Sulfoxid umgesetzt. Der stereochemische Reaktionsverlauf bei der Oxidation von Sulfiden wie Methyl-9-thiostearat wurde als hoch enantioselektiv (> 95% *ee*) bestimmt (Buist et al. 1990, Buist und Marecak 1991).

Die Produktion von *R*- und *S*-Sulfoxiden durch ein und denselben Bakterienstamm wurde erstmals von Boyd und Mitarbeitern beschrieben. Das Bodenbakterium *Pseudomonas putida* metabolisierte eine Serie von Arylalkylsulfiden, wobei ein Stamm (NCIMB 8859) eine Naphthalindioxygenase (NDO) enthielt und selektiv *S*-Sulfoxide synthetisierte; im zweiten Exemplar von *Pseudomonas putida* (UV4) sorgte eine Toluoldioxygenase (TDO) für die enantioselektive Sulfoxidation zugunsten von *R*-Sulfoxiden, die abhängig von der Sulfidstruktur *ee*-Werte von > 99% erreichten. Die beim zuletzt genannten Bakterium für die Enantioselektivität verantwortliche Enzymaktivität der TDO stammte allerdings ursprünglich aus einer weiteren *Pseudomonas* sp. und wurde dem Stamm UV4 mittels gentechnischer Verfahren

induziert. Diese Untersuchungen mit einem nativen und einem rekombinanten Stamm derselben Spezies stellen das erste Beispiel einer `whole-cell`-Sulfoxidation mit dem Ergebnis entgegengesetzt enantioselektiver Sulfoxide dar. In keinem Fall war die Bildung von Sulfonen feststellbar. Ähnliche Ergebnisse hat man mit einem Klon von *Escherichia coli* (pKST 11) erhalten (Allen et al. 1995, Boyd et al. 1998).

Die Darlegung von effektiven `whole-cell`-Systemen für die Biokatalyse ist nach wie vor ein anspruchsvolles und vielversprechendes Forschungsgebiet und unterliegt einer rasanten Entwicklung. Im Bereich der enantioselektiven Sulfoxidation sind einige, zum Teil hoch selektive Mikroorganismen beschrieben. So sulfoxidiert eine *Acinetobacter*-Spezies (NCIMB 9871) Arylalkylsulfide nur mit minimal geringerer Enantioselektivität als die aus derselben Spezies isolierte Cyclohexanonmonooxygenase (CHMO). *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872 oxidiert dieselben Substrate in sehr hohem, meist umgekehrtem Enantiomerenüberschuss von 73 bis 100%. Eine CHMO-Aktivität wurde auch in der sogenannten Black Yeast NV-2 und in *Xanthobacter autotrophicus* DSM 431 (NCIMB 10811) festgestellt, aber entgegen früheren Veröffentlichungen konnte diese Aktivität nicht in freien Zellextrakten von *Xanthobacter autotrophicus* nachgewiesen werden. Beide Spezies oxidierten Thioanisol (**1**) ausschließlich zum entsprechenden (*R*)-Phenylmethylsulfoxid (*R*-**1***) mit 100% *ee* (Kelly et al. 1996, Alphand et al. 1996). Die auf diesem Kenntnisstand aufbauenden eigenen Erfahrungen und Ergebnisse mit bakteriellen `whole-cell`-Systemen werden ausführlich im Ergebnisteil (Abschnitt 3.3) erläutert.

2.4 Bindungstheorien und Enzymmodelle für die asymmetrische Sulfoxidation

Um das Zustandekommen der im Abschnitt 2.3 differenzierten optischen Aktivitäten zu verstehen, sollen im Folgenden die wichtigsten bekannten Bindungstheorien katalytischer Übergangszustände sowie enzymatische Modelle der verschiedenen Systeme zur enantioselektiven Sulfoxidation vorgestellt werden. Da in den später verwendeten bakteriellen `whole-cell`-Systemen letztlich auch Enzyme für die asymmetrische Induktion verantwortlich sind, gelten die grundlegenden Enzymmechanismen gleichermaßen für die mikrobiellen Biotransformationen.

Der bei der Sulfoxidation mittels Kagan-Reagenz maßgebliche Mechanismus wurde noch nicht vollends aufgeklärt. Allgemein ist aber aus der asymmetrischen Synthese bekannt, dass die Größe der das Schwefelatom flankierenden Seitengruppen und vorhandene π -Elektronensysteme einen maßgeblichen Einfluss auf die Enantioselektivität besitzen. Weiterhin wurde aus der Molmasse der Hauptkomponente in der Umsetzungslösung ein dimerer Tartratkomplex als reaktive Spezies abgeleitet. Infrarotspektroskopische Untersuchungen zeigten sowohl einen freien Ester als auch einen Chelatester. Die Rolle des Wassers wurde der Bildung der TiOTi-Bindung zugeordnet. Vorläufig hat man ein Modell für die asymmetrische Induktion -wie in Abbildung 2-12 gezeigt- entwickelt (Kagan et al. 1985, Zhao et al. 1987).

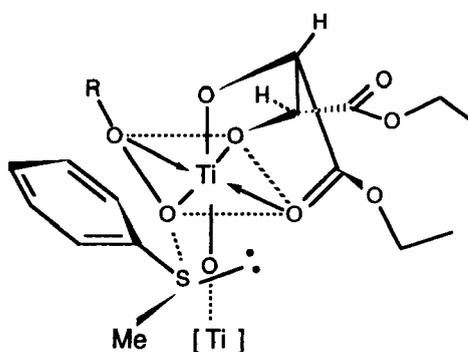


Abb. 2-12: Modell der asymmetrischen Sulfoxidation mittels Kagan-Reagenz
(Kagan et. al 1985)

Es beinhaltet die Hypothese, dass sich Diethyltartrat als ein Trihaptoligand bezüglich des Titans verhält, wie es auch im Sharpless-System der Fall ist. Bei diesem Modell -einer katalytischen Reaktion in Bezug auf Titan als Zentralatom- kommt der freien Esterfunktionalität eine besondere Wirkung zu. Tatsächlich wurde festgestellt, dass mit Dimethyltartrat im Vergleich zu Diethyltartrat ein geringerer ee -Wert bei der Umsetzung von p -Tolylmethylsulfid mit t -BuOOH erzielt wurde.

Erst seit 1990 wurden Beispiele für die Verwendung von Metallporphyrinen für die asymmetrische Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden mit signifikanten ee -Werten veröffentlicht. Naruta und Mitarbeiter (Naruta et al. 1991) entdeckten, dass beidseitig mit chiralen Binaphthylresten flankierte Eisenporphyrine die Oxidation von Sulfiden

mit guter Enantioselektivität katalysieren. Dieser C_2 -symmetrische Komplex wurde als chiraler Ligand mit Iodosobenzol als Oxidationsmittel in Gegenwart von 1-Methylimidazol als Katalysator eingesetzt. Die Autoren schlugen auch ein mechanistisches Modell zur Erklärung der asymmetrischen Induktion vor, das auf einer sterischen Reaktionskontrolle basierte. Die beiden Binaphthylreste, die sich über dem Makrozyklus zugewandt sind, bilden auf beiden Seiten chirale Taschen, die den Zugang von Substrat und Oxidationsmittel zum aktiven Metallzentrum vorgeben. Die räumliche Anordnung des Eisenporphyrins in der asymmetrischen Sulfoxidation zeigt Abbildung 2-13.

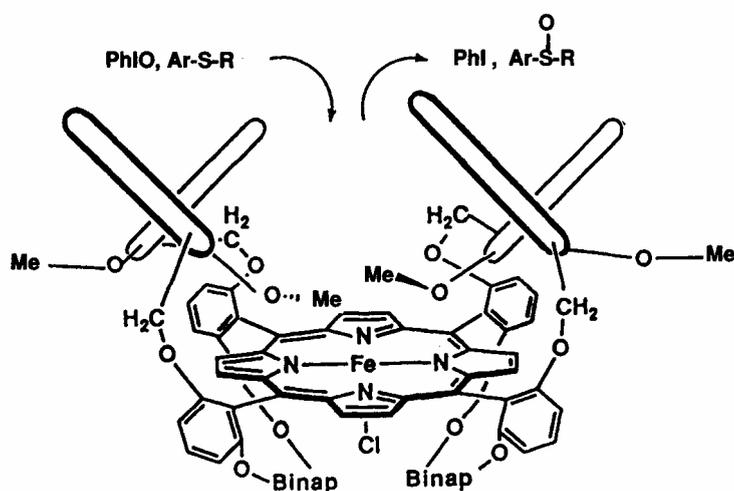


Abb. 2-13: Strukturelle Anordnung von Eisen-Porphyrinen in der asymmetrischen Sulfoxidation (Naruta et al. 1991)

Davis und Mitarbeiter (Davis et al. 1992-2) entwickelten eine nützliche Klasse chiraler Oxidantien auf der Basis von Kampfer abgeleiteten *N*-Sulfonyloxaziridinen. Abbildung 2-14 beschreibt die bevorzugten Übergangszustände I und II für die Oxidation von Sulfiden durch Oxaziridine in einem Mechanismus, der sich auf einem elektrophilen Angriff an das Schwefelatom stützt. R_L bezeichnet große (large) und R_S kleine (small) Gruppen. Deren sterischer Einfluss scheint größte Bedeutung zu haben, weil der durch ein Chloratom und die Phenylsulfonylgruppe vorgegebene molekulare Spalt nur kleine Gruppen (R_S) einlagern kann. Dadurch wird die große Gruppe R_L vorzugsweise in Richtung des freien Quadranten (unten links) abgedrängt (vgl. Abb. 2-14).

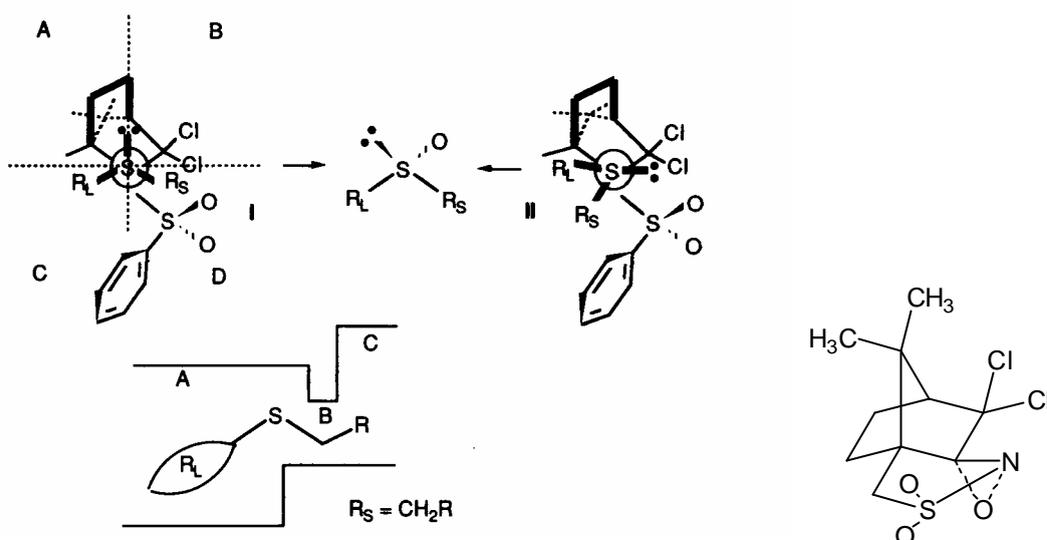


Abb. 2-14: Bevorzugte Übergangszustände und ein 'active-site' Modell für die Oxidation von Sulfiden durch Oxaziridine [rechts unten ist die Strukturformel des eingesetzten Oxaziridins, abgeleitet von Kampfer, angegeben (Davis 1992-2)]

Auch die im Abschnitt 2.3.1 schon aufgezählte und ausführlich untersuchte Cyclohexanonmonooxygenase (CHMO) darf hier unter dem Aspekt des Sulfoxidationsmechanismus nicht fehlen. Da es noch keine genauen strukturellen Daten zur CHMO gibt, beschreibt ein sogenanntes 'active-site'-Modell die stereoselektive Sulfoxidation und dient zur Vorhersage der optischen Aktivität der CHMO aus *Acinetobacter* sp. NCIB 9871. Das auf würfelförmigen Deskriptoren basierende Modell wurde aus den Ergebnissen abgeleitet, die aus Umsetzungen mit über 30 strukturvariierten Sulfiden stammen. Dieses Modell (siehe Abb. 2-15) stimmt mit früheren Untersuchungen zum Prozess der asymmetrischen Sulfoxidation durch CHMO überein und baut die grundlegenden Theorien noch weiter aus. Durch Überlagerung der Sulfoxidstrukturen wurde die Dimension der Bindungstaschen festgelegt. Um die Moleküle übereinander legen zu können, wurden die Produkte in zwei Gruppen, abhängig von der vorherrschenden Konfiguration, aufgeteilt. Die Sulfoxide jeder Gruppe wurden entlang ihrer S=O-Achse ausgerichtet und am Schwefelatom zentriert; die verbleibenden zwei Fragmente wurden dann so übereinandergelegt, dass abhängig von ihrer Größe gemein-

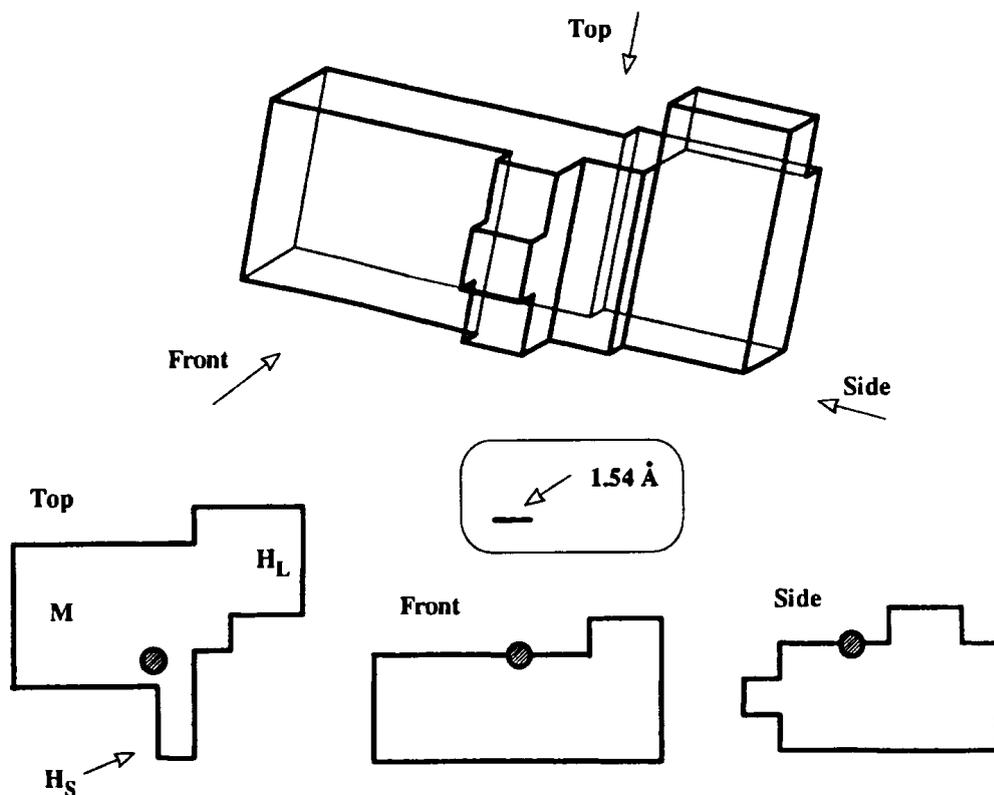


Abb. 2-15: Das 'active-site' Modell der Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO):

Die katalytisch unabdingbare Region (Sauerstoffbindungsstelle) ist kreisförmig dargestellt, weiterhin sind Auf-, Front- und Seitenansicht gekennzeichnet. Die Haupt- (M), hydrophobe große (H_L) und hydrophobe kleine (H_S) Tasche sind beschriftet (Ottolina 1995)

same Volumina optimal belegt wurden. Im zweiten Schritt hat man diese beiden Molekülcluster wiederum an ihrer S=O Achse ausgerichtet und am Schwefelatom zentriert. Das entstandene dreidimensionale Bild wurde danach in einen Käfig aus verschiedenen Würfeln mit einer Kantenlänge von 1.54 \AA eingelassen. Daraus lassen sich in dem in Abbildung 2-15 dargestellten Modell drei Bindungsstellen als Katalysestelle (gekennzeichnet durch Punkte) für den Angriff des Sauerstoffs erkennen, der

von oben in das System eingeführt wird. Eine ausführliche Beschreibung des Modells mit zahlreichen Beispielen ist in der Arbeit von Ottolina und Mitarbeiter zu finden (Ottolina et al. 1995).

Im Folgenden sollen die katalytischen Zyklen zweier im Zusammenhang mit der asymmetrischen Sulfoxidation stehender wichtiger Enzymsysteme aufgeführt werden. Cytochrom-abhängige P-450 Enzyme hat man seit Jahren ausführlich untersucht. Deren katalytischer Zyklus, der im Wesentlichen von Studien mit einer Kampferhydroxylase aus *Pseudomonas putida* (Cyt-P-450_{CAM}) abgeleitet wurde, ist in Abbildung 2-16 abge-

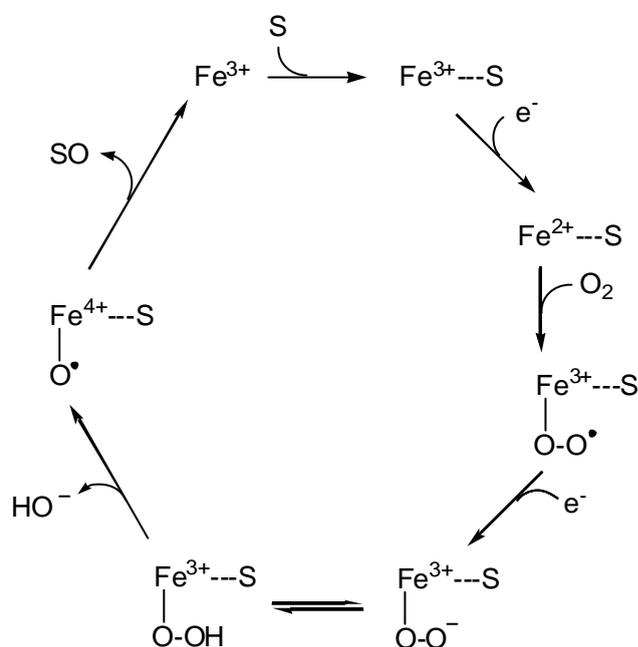


Abb. 2-16: Katalytischer Zyklus von Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen (Holland 1988)

bildet. Die derzeit verfügbaren Informationen zielen darauf ab, dass alle Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen diesem Mechanismus in sehr ähnlicher Form gehorchen. Der einleitende Schritt der Substratbindung ist nötig, bevor die Reduktion des hängenden Eisens durch ein von NADPH zur Verfügung gestelltes, einzelnes Elektron stattfinden kann. Anschließend folgt der Bildung der Sauerstoffbindung die Übertragung des zweiten Elektrons durch NADPH durch ein Elektronentransport-

system, um eine hochreaktive, oxidierende Spezies zu erlangen. Nur in dieser Zwischenstufe trägt das Eisenatom eine vierfach positive Partialladung (Ortiz de Montellano 1986). Eine genauere Betrachtung der möglichen Reaktionen zwischen der reaktiven Sauerstoffspezies und dem entsprechenden Sulfid als Substrat ist am Ende dieses Abschnitts am Beispiel der Chlorperoxidase zu finden.

Bei den flavinabhängigen Monooxygenasen erfolgt die Reaktion mit dem Substrat im Übergangszustand eines Flavin-Sauerstoff-Addukts (siehe Abb. 2-17). Die detaillierte

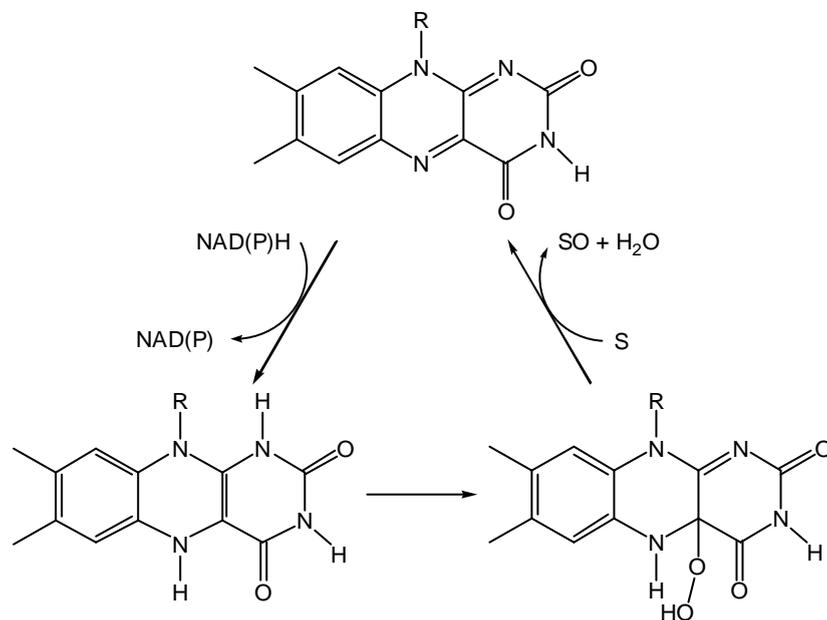
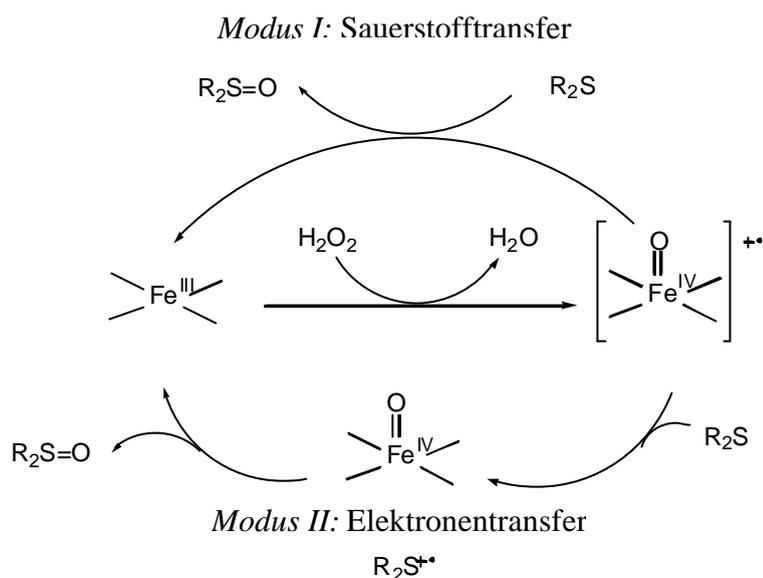


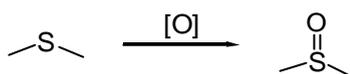
Abb. 2-17: Katalytischer Zyklus von flavinabhängigen Monooxygenasen (Holland 1988)

Beschaffenheit dieses Intermediats war Grundlage vieler mechanistischer Überlegungen (Dmitrienko et al. 1977). Für die enzymatische Sulfoxidation hat man prognostiziert, dass das in der Abbildung 2-17 dargestellte Hydroperoxid zwar an der asymmetrischen Induktion beteiligt ist, letztlich aber eine weitere, davon abgeleitete Spezies für die direkte Reaktion mit dem Sulfid verantwortlich ist. Trotz vieler substratabhängiger Studien zur Bestimmung der Übergangsstruktur des Flavinaddukts ist derzeit kein Hinweis für einen möglichen enzymatischen Reaktionsmechanismus beweisend.

Am Ende steht die Frage: Wie wird der Sauerstoff von der unmittelbaren reaktiven Spezies, dem Oxidans, auf das Sulfid übertragen? Wenn es sich bei der reaktiven Sauerstoffspezies um die in Abbildung 2-16 gezeigte Form mit Fe^{4+} handelt, sind zwei Reaktionswege für die Wechselwirkung mit der Schwefelfunktion denkbar (vgl. Abb. 2-18).



Modus I: Zwei-Elektronen-Oxidation



Modus II: Elektronen-Transfer-Oxidation

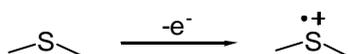


Abb. 2-18: Mechanismus der enantioselektiven Sulfoxidation mit Chlorperoxidase

(CPO) – Elektronentransfer versus Sauerstofftransfer

Einerseits ist eine Zwei-Elektronen-Oxidation möglich (Modus I: Sauerstofftransfer), die einer direkten Einführung des Sauerstoffatoms in eine C-H-Bindung entspricht. Andererseits führt auch eine Ein-Elektronen-Aufnahme (Modus II: Elektronentransfer) in Form einer radikalischen Reaktion zum Sulfoxid. Die Reaktionswege Modus I und Modus II unterscheiden sich durch den anfänglichen „Elektronenbedarf“ des Schwefels (zwei Elektronen im Modus I, ein Elektron im Modus II). Auf dieser Basis wurden auch Versuche mit verschiedenen *para*-substituierten Phenylmethylsulfiden durchgeführt. Experimente mit Hasenleberenzymen zeigten positiven, umsatzratenabhängigen Einfluss bezüglich der enantioselektiven Sulfoxidation bei polaren Intermediaten, wie sie als Radikalkationen im Reaktionsweg Modus II vorliegen. In enzymatischen Umsetzungen wurde zusätzlich eine Stabilisierung des gebildeten Intermediats festgestellt, was bei `whole-cell`-Systemen nicht der Fall war. Dieser Effekt könnte aber auch an der Wahl ungünstiger kinetischer Reaktionsparameter bei den Enzymassays liegen. Ein Vergleich der Enantiomerenüberschüsse von isosterischen Sulfoxiden zeigte den Einfluss von elektronenschiebenden und elektronenziehenden Substituenten der eingesetzten Sulfide, also die direkten Folgen der Elektronendichte der Schwefelfunktion während der Reaktion. So war der erhaltene *ee*-Wert in Reaktionen von Sulfiden mit elektronenziehender Gruppen bei Umsetzungen mit *Mortierella isabellina* signifikant höher, ein Effekt, der im entgegengesetzten Fall einer Destabilisierung des Übergangszustandes und einer begrenzten „Lebenszeit“ eines labilen Intermediats zugeordnet wird (Colonna et al. 2002).

2.5 Siderophore-Typing von nichtfluoreszierenden Pseudomonaden

Methoden zur Identifizierung von Bakterien sind von großem Interesse für taxonomische Zwecke, vor allem wenn sie präzise, schnell und einfach für eine große Zahl an Stämmen anwendbar sind. Eine solche Möglichkeit zur schnellen und aussagekräftigen Charakterisierung steht mit dem sogenannten Siderophore-Typing (kurz Siderotyping) grundsätzlich für fluoreszierende Pseudomonaden zur Verfügung. Die Typisierung basiert auf der Aufnahme von Pyoverdinmustern mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) sowie auf der Charakterisierung ihrer Eisentransporteigenschaften. Die Hälfte der fünfzig, den Pyoverdinen zugeschriebenen Strukturen sind im Rahmen

des Siderotypings entdeckt worden (Fuchs et al. 2001). Die Nützlichkeit des Siderophore-Typings als bestimmende Sonde hat man auch auf nichtfluoreszierende Pseudomonaden ausgedehnt, die ebenfalls ein identisches, spezienspezifisches Siderophore-System besitzen und so leicht voneinander unterscheidbar sind. Somit kann das Siderophore-Typing - insbesondere die spezifische Eisenaufnahme durch die Siderophore- als unabdingbare Technik zur fehlerfreien Identifizierung von Pseudomonaden auf dem Spezies-Level eingesetzt werden, welche die herkömmlichen phäno- und genotypischen Methoden hervorragend ergänzt (Meyer et al. 2002). Dies war auch der vordringliche Grund für die Verwendung dieser bei Standardzuordnungen nicht gängigen Spezialtechnik zur Identifizierung des in dieser Arbeit isolierten Bodenbakteriums *Pseudomonas frederiksbergensis*. Da das Siderophore-Typing keinesfalls zu den Standardmethoden bei der Charakterisierung von Bakterienstämmen gehört, werden die Grundlagen für die eingesetzten Techniken hier näher erläutert.

Die Technik des Siderophore-Typings basiert fast ausschließlich auf dem Vorhandensein und den Eigenschaften der Pyoverdine. Dies sind Chromopeptide bestehend aus drei Strukturabschnitten: einem Chinolinchromophor, einer Peptidkette und einer Seitenkette (siehe Abb. 2-19). Das Chromophor ist in allen Pyoverdinen

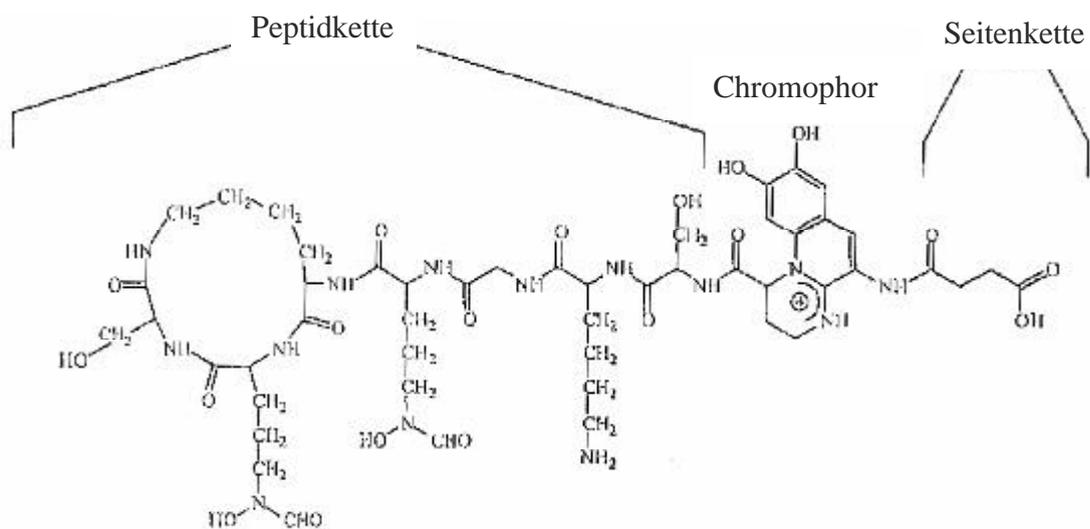


Abb. 2-19: Grundstruktur der Pyoverdine bestehend aus Peptidkette, Chromophor und Seitenkette; hier beispielhaft Pyoverdin aus *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 (Fuchs et al. 2001)

identisch, und seine Katecholeinheit stellt eine der Bindungsstellen für Fe^{3+} dar. Oft sind aus den Kulturlösungen zusätzliche Verbindungen zu isolieren, die sich von den Pyoverdinen nur in ihrer Chromophorstruktur unterscheiden. Die Aminogruppe des Chromophors ist an eine Seitenkette (zweites Strukturelement) gebunden, die strukturell immer aus einer Dicarbonsäure bzw. einem daraus abgeleiteten Säureamid besteht. Strukturelle Unterschiede zwischen den Pyoverdinen aus fluoreszierenden Pseudomonaden finden sich einzig und allein im dritten strukturellen Element, einer Peptidkette, die N-terminal mit einer Carboxylgruppe des Chromophors verknüpft ist. Nur eine begrenzte Anzahl an proteinogenen Aminosäuren wurde innerhalb der sechs bis zwölf Aminosäuren der Peptidseitenkette gefunden, die linear oder auch zyklisch aufgebaut sein kann. Andererseits sind einige ungewöhnliche Aminosäuren enthalten, die auch in der D-Form vorkommen können. Deren Aufgabe ist der Schutz vor proteolytischen Enzymen. Es gilt besonders zu erwähnen, dass die Peptidkette die zwei Stellen besitzt, die zusammen mit der Katecholfunktionalität des Chromophors für eine effiziente Bindung von Fe^{3+} nötig sind. Zusätzlich sind zumindest einige der verbleibenden Aminosäuren der Peptidkette für die Erkennung der Eisen-Pyoverdin-Moleküle am Rezeptorprotein der äußeren Zellmembrane verantwortlich, die normalerweise Pyoverdin- und damit stammspezifisch ist.

Interessanterweise scheint die durch heterologe Pyoverdine vermittelte Eisenaufnahme von der Gegenwart identischer Aminosäuresequenzen in ansonsten unterschiedlichen Peptidketten abzuhängen, die deshalb von der Rezeptorbindungsstelle erkannt werden sollte. Als homolog bezeichnet man die Pyoverdine, die von dem zur Eisenaufnahme getesteten *Pseudomonas*-Stamm produziert werden; heterolog bezieht sich auf verschiedene Strukturen, die von anderen *Pseudomonas*-Stämmen gebildet werden.

Die Isoelektrophorese wird als klassische analytische Methode schon lange erfolgreich in der Peptid- und Proteinanalytik eingesetzt. Dank des Peptidanteils, der ungefähr zwei Drittel der gesamten Struktur ausmacht, kann das entsprechende Pyoverdin vorläufig mit dieser Technik charakterisiert werden. Aufgrund der systematischen Aufarbeitung von mittlerweile mehr als Tausend pyoverdinhaltigen Stämmen ist allein durch die Isoelektrofokussierung eine leistungsfähige und einfache Unterscheidung zahlreicher

Pyoverdine möglich. Unter Berücksichtigung des pH-Gradienten auf dem verwendeten Gel und der parallelen Untersuchung eines Pyoverdinstandards können die pI-Werte sogar automatisiert gemessen werden. Von Vorteil sind an dieser Methode die extrem leichte Handhabbarkeit und die damit verbundene Zeitersparnis. Negativ wirkt sich die Tatsache aus, dass mögliche Pyoverdin-Isoformen (Pyoverdine mit identischer Aminosäurezusammensetzung) nicht unterscheidbar sind (Fuchs et al. 2001).

Eine weitere, gut funktionierende biologische Methode zur Unterscheidung von Pyoverdinen besteht darin, deren spezifische Eisenaufnahmefähigkeit zuverlässig zu bestimmen. Die strikte Spezifizierung der Erkennungsmerkmale, die normalerweise zwischen einem Pyoverdin und dem Rezeptor der äußeren Zellmembran des Pyoverdinproduzierenden Stammes zu beobachten ist, erlaubt die einfache Unterscheidung einer Anzahl undefinierter Bakterienisolate von denen, die dieselben Pyoverdine wie der Referenzstamm produzieren. Tatsächlich geht man davon aus, dass zwei Pyoverdine eine unterschiedliche Struktur besitzen, wenn die produzierenden Stämme keine kreuzweise gegenseitige Aufnahme von Eisen in Assays zeigen, welche die zwei entsprechenden Pyoverdine enthalten.

Kurz zum prinzipiellen experimentellen Ansatz: Unter Eisenmangel gewachsene Bakterien werden in Gegenwart eines Labelmixes aus $^{59}\text{FeCl}_3$ und aufgereinigtem Pyoverdin inkubiert. Der Suspension wird ein Aliquot entnommen und filtriert. Die auf dem Filterpapier verbleibenden Zellen werden gewaschen und deren Radioaktivität gemessen, die vom aufgenommenen Eisen-59 während der Inkubation herrührt. „Eisenausgehungerte“ Zellen nehmen das durch homologe Pyoverdine komplexierte Eisen innerhalb von 20 min Inkubationszeit auf. Keine Eisenaufnahme wird festgestellt, wenn die Zellen vorher in eisenhaltigem Medium gewachsen waren oder wenn das homologe Pyoverdin durch ein „fremdes“ Pyoverdin ausgetauscht wurde. Zur Veranschaulichung der Eisenaufnahme ist in Abbildung 2-20 die Struktur des Eisenkomplexes des *Pseudomonas aeruginosa*-Pyoverdins dargestellt. Als besonders positiv bewertet man an dieser Methode deren schnelle Versuchsdurchführung, wobei allerdings mit radioaktiver Markierung gearbeitet werden muss (Fuchs et al. 2001).

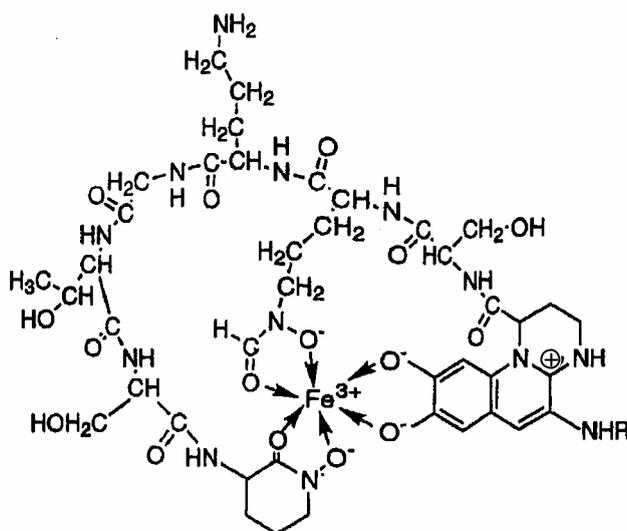


Abb. 2-20: Pyoverdinstruktur des Eisenkomplexes aus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; die Seitenkette R kann Bernsteinsäure, Bernsteinsäureamid oder Glutaminsäure sein (Meyer et al. 2002)

2.6 Optisch aktive Sulfoxide als pharmazeutische Wirkstoffe

Im Hinblick auf die Relevanz von Sulfoxiden als pharmazeutische Wirkstoffe sollten in der vorliegenden Arbeit auch die Sulfide von Omeprazol[®] (25*) und Modafinil[®] (27*) als Substrate in bakteriellen und enzymatischen Sulfoxidationsreaktionen eingesetzt werden. Omeprazol[®] (25*) wird als Protonenpumpen-Inhibitor erfolgreich in der Therapie von Refluxösophagitis eingesetzt, wo es z. B. Sodbrennen schnell beseitigt, den Patienten schmerzfrei macht und die Entzündung der Speiseröhre abheilt. Das Sulfoxid Modafinil[®] (27*) untersteht dem Betäubungsmittelgesetz und wurde für die Therapie der Narkolepsie zugelassen. Narkolepsie ist gekennzeichnet durch einen imperativen Schlafdrang sowie ausgeprägte Müdigkeit und häufiges Einschlafen am Tag. Die unterschiedlichen pharmakokinetischen Wirkungswege sind in diesem Fall noch nicht abschließend untersucht. Trotzdem wird in diesem Zusammenhang nochmals deutlich, dass enantiomerenreine Sulfoxide wichtige Verbindungen in der organischen Synthese darstellen.

Exemplarisch sei hier die Aktivität von Sulfoxidgruppen bei der Synthese von Arzneistoffen am Beispiel von Omeprazol[®] (**25***) genannt, welches mit vier Milliarden US \$ Jahresumsatz gehandelt wird (Colonna et al. 2002). Lange Zeit wurden diese Medikamente in ihrer racemischen Form verabreicht, da die enantiomerenreinen Produkte nicht zu den gewünschten Konditionen verfügbar waren. Am Beispiel von Omeprazol[®] (**25***) hat man gezeigt, dass das *S*-Enantiomer deutlich langsamer verstoffwechselt wird und somit dem Racemat in Erreichung seiner Ziele aufgrund höherer Wirkstoffspiegel überlegen ist. So heilen Speiseröhrenschäden bei Einnahme des enantiomerenreinen Wirkstoffes doppelt so schnell und die Therapiekosten reduzieren sich auf 50%. Ausschließlich das *S*-Enantiomer (Nexium[®]) ist für die sogenannte Bedarfstherapie bei der nicht-erosiven Refluxösophagitis zugelassen, bei der die Patienten symptomorientiert nur noch dann eine Tablette einnehmen, wenn es nötig ist. Damit sinkt der Medikamentenverbrauch gegenüber der Dauertherapie mit den klassischen Protonenpumpenhemmern durchschnittlich um ein Drittel.

2.7 Physiologie und Morphologie der charakterisierten Stämme

In der Familie der *Pseudomonadaceae* werden Gram-negative, polar begeißelte, gerade oder schwach gekrümmte Stäbchen zusammengefasst. Sie besitzen eine Größe von 0.5-1.0 µm x 1.5-4.0 µm und kommen einzeln und aneinander angelagert vor. Das Wachstum erfolgt aerob, Sporen werden nicht gebildet. Für das Wachstum werden ein neutraler pH-Wert und eine Temperatur im mesophilen Bereich bevorzugt (Madigan 2000). Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe, bei einigen Arten auch durch anaerobe Atmung (Denitrifikation, Nitrat-Atmung), aber nicht durch Gärung. Die Pseudomonaden sind chemoorganotroph, einige wachsen fakultativ chemolitotroph und verwenden H₂ oder CO als einzigen Elektronendonator. Es wird eine große Zahl organischer Substrate, darunter heterozyklische und aromatische Verbindungen verwertet, die von anderen Bakterien nicht angegriffen werden. Andererseits fehlen Pseudomonaden im Allgemeinen hydrolytische Enzyme, die notwendig sind, um Polymere in ihre Monomerbestandteile abzubauen. Aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit sind Pseudomonaden überall (im Boden, im Wasser, im Abwasser und in der Luft) anzutreffen. Sie sind ökologisch bedeutende Mikroorganismen im Boden und im

Wasser und wahrscheinlich für die Zersetzung von vielen löslichen Verbindungen verantwortlich, die aus dem Abbau von Pflanzen- und Tiermaterial in aeroben Biotopen stammen. Bleibt eine Nährlösung mit Mineralsalzen und organische Säuren oder Zucker offen stehen, so sind Pseudomonaden meistens die ersten Besiedler (Schlegel 1992).

Pseudomonas frederiksbergensis (DSM Nr. 13022) wurde 1999 aus einer Kohlevergasungsanlage in Ferderiksbergen bei Kopenhagen, Dänemark, isoliert und charakterisiert. Die Bakterien wachsen bei 4 und 30 °C, aber nicht bei 37 °C. Sie sind stäbchenförmig und ungefähr 0.5-0.8 x 1.5-3.0 µm groß. Die Kolonien sind glatt und leicht gelblich. *Pseudomonas frederiksbergensis* ist oxidase- und katalasepositiv, speichert Poly-β-hydroxybutyrat und denitrifiziert, kann aber D-Xylose nicht als Substrat verwerten (Andersen et al. 2000).

Die Gram-positive Spezies *Arthrobacter* ist normalerweise stäbchenförmig bis filamentös und besitzt einen hohen Guanin/Cytosin-Gehalt. *Arthrobacter* gehört zur Gattung der coryneformen Bakterien und zeichnet sich durch eine starke Tendenz zu Zellverzweigungen und zur Kokkenbildung aus.

Arthrobacter ist pleomorph, d. h. vielgestaltig. Er besitzt einen ungewöhnlichen Entwicklungszyklus, der die Umwandlung von einem Stäbchen zu einer Kugel und zurück zu einem Stäbchen beinhaltet. In jungen Kolonien und Nährlösungen wächst er in Form von unregelmäßig gestalteten Langstäbchen; alte Kulturen enthalten nur kokkoide Formen (Schlegel 1992). Manche Formen sind durch Geißeln beweglich. Sie sind primär aerobe Prokaryonten, die häufig Bewohner von Boden und Pflanzenmaterial sind. Außerdem besitzen sie eine bemerkenswerte Resistenz gegen Austrocknen und Nahrungsmangel, ungeachtet der Tatsache, dass sie keine Sporen oder andere Ruheformen bilden.

Arthrobacter überstehen eine mehrmonatige Trockenlagerung von Bodenmaterial, während die meisten Nicht-Sporenbildner absterben. *Arthrobacter* bilden eine heterogene Gruppe, die eine beträchtliche Ernährungsvielfalt aufweist. Es sind Stämme isoliert worden, die Herbizide, Coffein, Nicotin, Phenole und andere ungewöhnliche

organische Verbindungen abbauen. *Arthrobacter* scheint der mengenmäßig vorherrschende Vertreter der autochthonen Bodenmikroflora zu sein, d. h. er dominiert in Böden, in denen leicht zersetzbare, organische Substanz abgebaut ist und in dem Humus als Hauptfraktion der organischen Substanz übrig geblieben ist (Schlegel 1992).

Arthrobacter aureescens (DSM-Nr. 20116) hat eine Größe von 0.3-0.5 µm x 1.0-2.0 µm und besitzt einen oxidativen Stoffwechsel. Das Wachstum erfolgt unter aeroben Bedingungen bei einem pH-Wert von 4.5 bis 9.0 und einer Temperatur von 20-37 °C. Es besitzt einen ungewöhnlichen Entwicklungszyklus, der die Umwandlung von einem Stäbchen zu einer Kugel und zurück zu einem Stäbchen beinhaltet. Das Bakterium ist katalasepositiv aber nicht nitratreduktiv (Sato et al. 1999).

2.8 Problemstellung

Wie in den Abschnitten 2.1 bis 2.3 ausführlich erläutert wird, stellt die Synthese von asymmetrischen Sulfoxiden nach wie vor eine große Herausforderung für die bioorganische Chemie dar. Neben den wenig effektiven chemisch-präparativen Verfahren bieten auch die beschriebenen biokatalytischen Techniken nicht immer eine zufriedenstellende Zugangsmöglichkeit zu optisch aktiven Sulfoxiden. Der Grund dafür liegt vor allem in der eingeschränkten Substratazeptanz der Enzyme (hohe Substratspezifität), der Notwendigkeit des Einsatzes von teureren Cosubstraten und Cofaktoren sowie in den aufwendigen Verfahren zur Isolation und Aufreinigung der entsprechenden Enzyme. Daher bestand das Ziel dieser Doktorarbeit darin, Mikroorganismen (sog. `whole-cell`-Systeme) zur Herstellung optisch aktiver Sulfoxide zu nutzen, wie es an einigen wenigen Beispielen (vgl. Abschnitt 2.3.2) bereits versucht wurde. Folgende Aufgaben standen im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- Zuerst sollten in einem selektiven Screeningverfahren Mikroorganismen gefunden werden, die zur enantioselektiven Sulfoxidation befähigt sind. Dabei bot es sich an, auf die große Zahl der im Boden lebenden Mikroorganismen zurückzugreifen, da sie leicht verfügbar und in der Regel apathogen sind. Die

aus den Bodenproben selektierten Stämme sollten vereinzelt, die Anzuchtbedingungen optimiert und die katalytische Effizienz festgestellt werden.

- Besonders effektive Stämme waren dann mit den gängigen phäno- und genotypischen Methoden zu charakterisieren und identifizieren. Falls vorhanden, sollten kommerziell erhältliche Referenzstämme erworben und im direkten Vergleich zur Herstellung optisch aktiver Sulfoxide eingesetzt werden. Besonderer Wert war darauf zu legen, sowohl *R*- also auch *S*-selektive Mikroorganismen mit möglichst hoher Enantioselektivität zur Verfügung zu stellen.
- In einem ersten Substratscreening sollte die Fähigkeit der isolierten Stämme zur enantioselektiven Sulfoxidation auf eine Reihe einfacher, strukturvariiertes Arylalkylsulfide angewendet werden, um nähere Informationen bzgl. der Substratazeptanz der isolierten Mikroorganismen zu bekommen.
- Im Hinblick auf die Substratazeptanz waren dann auch N-heterozyklische organische Sulfide sowie die noch weiter vom arylischen Grundgerüst entfernten Furfuryle und Thiophene als Substrate in den Sulfoxidationsreaktionen zu prüfen.
- Insgesamt sollte auf das Ziel hingearbeitet werden, die prochiralen Sulfide als Vorstufen von pharmazeutisch verwendeten Sulfoxiden mittels der bis dahin etablierten Systeme biokatalytisch zu sulfoxidieren.
- Letztlich sollte noch versucht werden, die mit den isolierten Mikroorganismen in Schüttelkulturen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der enantioselektiven Sulfoxidation auf einen Bioreaktor zu übertragen und so die Möglichkeit zu bieten, optisch aktive Sulfoxide im Fermentationsmaßstab herzustellen.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen werden im folgenden Ergebnisteil (Abschnitt 3) in Form von Abbildungen und Tabellen dargestellt und im Text näher erläutert. Im Diskussionsteil (Abschnitt 4) erfolgt dann eine kritische Beurteilung der Ergebnisse, außerdem werden Schlussfolgerungen gezogen und dabei die Verwendbarkeit der eingesetzten Bakterienstämme zur enantioselektiven Sulfoxidation bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung geeigneter Mikroorganismen zur Sulfoxidation

Zur Isolierung von Mikroorganismen, die für biokatalytische Umsetzungen (wie die dieser Arbeit zum Ziel gesetzte enantioselektive Sulfoxidation) eingesetzt werden sollen, sind Bodenproben als Quelle gut geeignet, da ein Gramm Erde ca. 10^8 Bakterien und Fungi enthält (Blaine Metting Jr. 2000). Der aus dieser Zahl resultierende Artenreichtum bietet eine große Menge an Mikroorganismen unterschiedlichster Phäno- und Genotypen, die wiederum eine Vielzahl verschiedener Reaktionen katalysieren können (Kennedy und Gewin 1997; Katayama und Fujie 2000; Paul 2000).

Zur Isolierung sulfoxidierender Bakterien wurden -wie im Abschnitt 5.3.2 beschrieben- zwei Bodenproben aufgearbeitet. Für ein effektives Screening wurde in drei Versuchsreihen einerseits Minimalmedium verwendet, das mit verschiedenen Konzentrationen Thioanisol (**1**) als einziger verwertbarer Kohlenstoffquelle versetzt war. Andererseits wurden in einer weiteren Serie dem so hergestellten Minimalmedium verschiedene Konzentrationen Glucose zugegeben, die der überwiegenden Anzahl an Bakterien und Fungi als Nährstoffquelle diente. Durch die gleichzeitige Anwesenheit des später zur enantioselektiven Oxidation angebotenen Substrats Thioanisol (**1**) wurde erreicht, dass Mikroorganismen, für die schwefelorganische Verbindungen toxisch wirken, nicht auf den Agarplatten anwachsen und somit im gesamten Screeningverfahren erst gar nicht auftauchen, um die Anzahl der auf die Fähigkeit der Sulfoxidation zu testenden Keime nicht unnötig zu erhöhen. Dabei anwachsende Kulturen zeigen einen Selektionsvorteil gegenüber den im Wachstum gehemmten oder unterdrückten Stämmen, der aus einer besseren Verwertbarkeit oder Toleranz oder gar einer möglichen Entgiftungsreaktion des zugesetzten Substrates resultiert. Parallel dazu wurde die aus den Bodenproben erhaltene Testlösung auch auf Vollmedium (Standard Methods Agar) ausplattiert. Agarplatten mit geringem Bewuchs, erkennbar an klar voneinander abgetrennten, sich nicht gegenseitig überwuchernden Kulturen, wurden ausgewählt und davon im

sogenannten Pick-Verfahren Reinkulturen entnommen. Auf diese Weise erhielt man achtzig Reinkulturen, die von nun an auf Vollmedium-Agarplatten kultiviert wurden und für die Überprüfung auf Sulfoxidationspotential zur Verfügung standen.

Anschließend erfolgte -wie im Abschnitt 5.3.6 ausführlich beschrieben- ein Bakterien-screening mit Thioanisol (**1**) als Standardsubstrat. Die Rahmenbedingungen hatte man schon in der Selektionsphase bewusst so gewählt, dass vorrangig Bakterien aus den Bodenproben isoliert wurden. Fungi, welche in der Regel deutlich langsamer wachsen, sollten auch wegen der aufwändigeren Handhabung im Labor auf keinen Fall im Vordergrund der Untersuchungen stehen. Nach der standardmäßigen Aufzucht jedes einzelnen isolierten Mikroorganismus in Flüssigkultur (vgl. Abschnitt 5.3.3) und der versuchten Umsetzung von Thioanisol zu Phenylmethylsulfoxid (**1***) wurden die Ansätze extraktiv aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht. Bei erfolgreicher Oxidation erfolgte eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*ee*-Wertes) des gebildeten Sulfoxides mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC). Die Stämme mit den besten *ee*-Werten wurden, wie im Folgenden beschrieben, charakterisiert und später für die Umsetzungsversuche zur enantioselektiven Sulfoxidation (Abschnitt 3.3) eingesetzt. Abbildung 3-1 gibt einen Überblick über die Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte.

3.2 Charakterisierung ausgewählter Bakterienstämme

Die Identifizierung der Mikroorganismen, die im Screeningverfahren mit dem Standardsubstrat Thioanisol (**1**) enantiomerenangereichertes Phenylmethylsulfoxid (**1***) lieferten, erfolgte sowohl mit phänotypischen als auch mit genotypischen Methoden. Beispielhaft ist dies im Folgenden am isolierten Stamm 33 (intern vergebene Labornummer) aufgezeigt, der als einziger Stamm im Bakterien-screening das *R*-Enantiomer von Phenylmethylsulfoxid [*(R)*-**1***] lieferte. Diese Spezies sollte den maßgeblichen Anteil der vorliegenden Arbeit bestimmen und diskussionswürdige Aspekte aufwerfen.

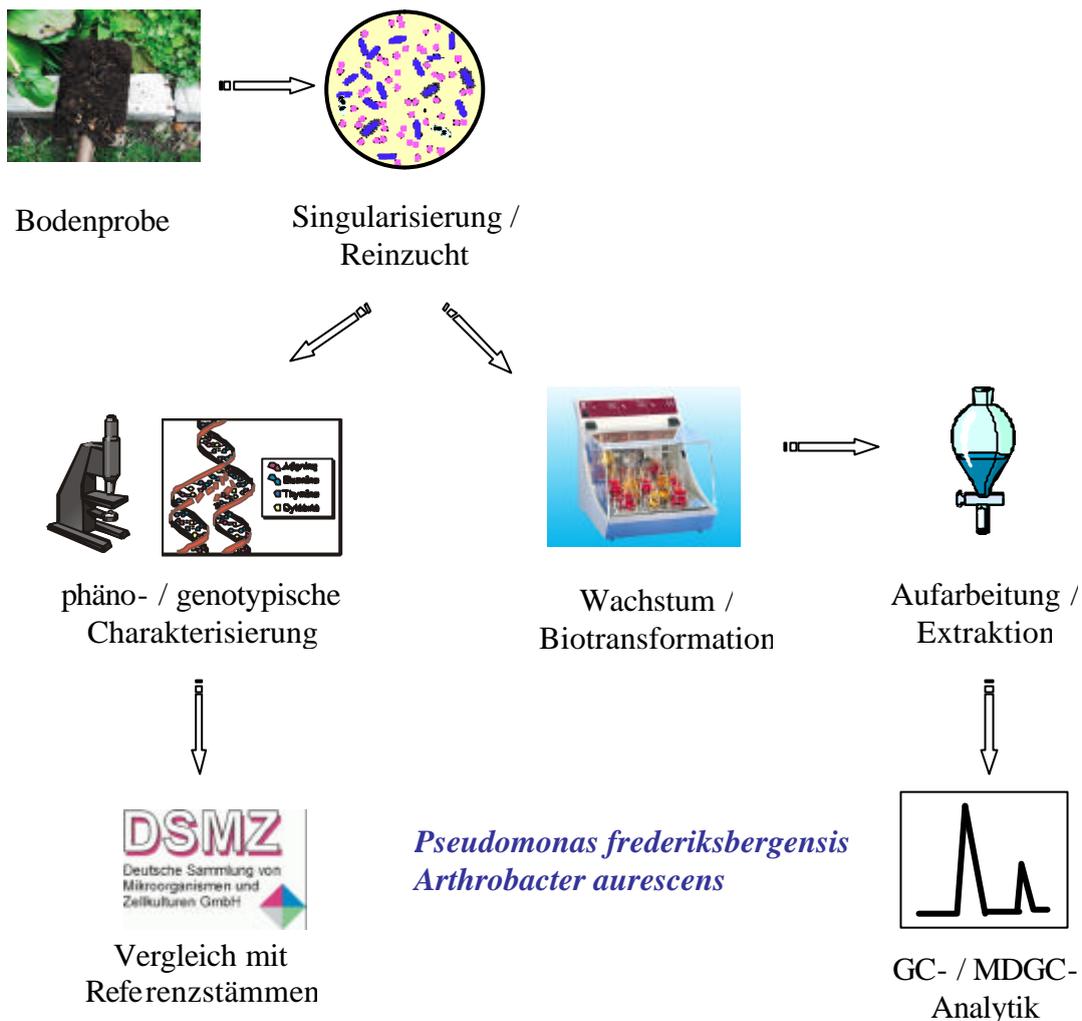


Abb. 3-1: Flussdiagramm: Bakterien screening - Substratscreening - Charakterisierung

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung

Bei der phänotypischen Charakterisierung wurden Standardmethoden angewendet, die neben Gestalt und Färbverhalten des Bakteriums verschiedene Enzymaktivitäten und Stoffwechseleigenschaften einschließen. Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine stäbchenförmige Gestalt des Bakteriums 33; die durchschnittliche Breite lag zwischen 0.7 und 0.8 μm , die Länge bei 1.5 bis 3.0 μm . Weiterhin wurde der Keim als Gram-negativ eingeteilt, was durch einen positiven Aminopeptidase-Test abgesichert wurde; dieses Enzym ist nur in der Zellwand Gram-negativer Bakterien in ausreichender Menge nachweisbar. Der Stamm wuchs bei 30 °C, bei 37 und 41 °C wurde dagegen

keine deutliche Trübung der Bakterienlösung festgestellt. Es handelt sich also um ein mesophiles Bakterium, zu denen die meisten Boden- und Wasserbakterien zählen. Zur weiteren taxonomischen Einordnung wurde der vorliegende Stamm bezüglich einiger enzymatischer Aktivitäten untersucht. Die Tests auf Katalase- und Oxidaseaktivität waren positiv, die der Urease und Lecithinase verliefen negativ. Außerdem wurde vom Identifizierungservice der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) das Profil der zellulären Fettsäuren als typisch für Organismen der RNA Gruppe I der Pseudomonaden bestimmt.

Im Rahmen der Charakterisierung wurde mit Hilfe des APIZYM 20 NE Tests (sog. „Bunte Reihe“, Durchführung siehe Abschnitt 5.2.4) ein Stoffwechselprofil des Stammes erstellt. Solche standardisierten Testsysteme werden bereits seit vielen Jahren in der Routineanalytik erfolgreich zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt. Umfangreiche Studien belegen die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Bei dem schnell durchzuführenden Test wurden verschiedene Enzymaktivitäten überprüft, weiterhin wurde dem Bakterium eine Reihe unterschiedlicher Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle angeboten und die Fähigkeit zur Verwertung dieser Substrate getestet. Zu den zwanzig Reaktionen des API 20 NE Tests wurde der Oxidasetest hinzugenommen. Zur Auswertung erfolgte eine Einteilung in Dreiergruppen, wobei bei positiven Reaktionen Zahlenwerte erhalten wurden, deren Addition das numerische Profil eines Stammes ergibt. Die Zuordnung war durch diesen Zahlencode über Tabellen (sogenannte Profilindices) möglich. Abbildung 3-2 soll die Vorgehensweise

07224 A REF. :
 Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo :

api 20 NE **bioMérieux**

24 h	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+			
48 h	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+			
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
24 h	1			0			4		7		5		5		5		7				
48 h																					

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :
 Stamm Nr. 33

Ident. :

Imprimé en France / Printed in France

Abb. 3-2: Auswertungsblatt des API 20 NE Teststreifens zur Identifizierung von nicht anspruchsvollen Gram-negativen Stäbchen (beispielhaft für Stamm 33)

bei der Identifizierung nach dem API 20 NE Testsystem anhand des Auswertungsbogens verdeutlichen.

Der Zahlencode 1047557 sowie die anderen angeführten Charakterisierungsergebnisse identifizierten Stamm 33 eindeutig als *Pseudomonas frederiksbergensis*, wie schon erwähnt, das einzige Bakterium im Screening, das die enantioselektive Sulfoxidation mit einem *ee*-Wert von 62% zugunsten des *R*-Enantiomers durchführte. Auf dieselbe Weise wurde auch das Isolat taxonomisch eingeordnet, das im Screening den höchsten *ee*-Wert (91%) für das *S*-Enantiomer lieferte (Stamm 49); die Identifizierung lieferte *Arthrobacter aurescens*. Beide Spezies sind bei der DSMZ kommerziell erhältlich und wurden als *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022 und *Arthrobacter aurescens* DSM 20116 im API 20 NE Testkit eingesetzt, um anhand identischer Enzymreaktionen und Stoffwechseleigenschaften das Ergebnis der Charakterisierung zu bestätigen. Tabelle 3-1 fasst die Ergebnisse der Farbreaktionen und Assimilationstests der Bakterienisolate 33 und 49 sowie der entsprechenden gekauften Referenzstämme *Pseudomonas frederiksbergensis* und *Arthrobacter aurescens* zusammen.

Die durchgeführten Farbreaktionen und Assimilationstests stimmten für das jeweilige Bakterienisolat und den gekauften Referenzstamm vollkommen überein und werden nachfolgend für das besonders interessante Stammpaar Isolat 33 / *Pseudomonas frederiksbergensis* erläutert (die weiteren Ergebnisse für Isolat 49 / *Arthrobacter aurescens* sind der Tabelle 3-1 zu entnehmen). So wurde Kaliumnitrat von beiden Stämmen reduziert. Die Farbreaktionen zum Nachweis der Indolproduktion aus Tryptophan und die Fermentation von Glucose verliefen negativ. Die folgenden Tests auf spezifische Enzymaktivitäten schlugen fehl: Arginindihydrolase, Urease, β -Glucosidase, Protease und β -Galactosidase. Dagegen wurden folgende Standardsubstrate in den Assimilationstests als Kohlenstoffquelle akzeptiert: Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, *N*-Acetylglucosamin, Gluconat, Caprat, Malat, Citrat und Phenylacetat. Lediglich Maltose und Adipat wurden nicht verwertet. Abschließend wurde mit Tetramethyl-*p*-phenylendiamin eine positive Cytochromoxidase-Reaktion erhalten.

Tab. 3-1: Ergebnisse der Farbreaktionen und Assimilationstests der isolierten Bakterienstämme 33 und 49 und der entsprechenden Referenzstämme *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022) sowie *Arthrobacter aurescens* (DSM 20116) im kommerziellen API 20 NE Testkit

Test	Substrat	Reaktion / Enzym	Ergebnis ^a			
			33	<i>Pseudo. fred.</i>	49	<i>Arthr. auresc.</i>
		Nitratreduktion zu Nitrit				
NO ₃	KNO ₃	Nitratreduktion zu Stickstoff	+	+	-	-
TRP	Tryptophan	Indolnachweis	-	-	-	-
GLU	Glucose	Fermentation	-	-	-	-
ADH	Arginin	Arginindihydrolase	-	-	-	-
URE	Harnstoff	Urease	-	-	-	-
ESC	Äsculin	Hydrolyse (β-Glucosidase)	-	-	-	-
GEL	Gelatine und Tusche	Hydrolyse (Protease)	-	-	-	-
PNPG	<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid	β-Galactosidase	-	-	+	+
GLU	Glucose	Assimilation ^b	+	+	+	+
ARA	Arabinose	Assimilation ^b	+	+	+	+
MNE	Mannose	Assimilation ^b	+	+	+	+
MAN	Mannit	Assimilation ^b	+	+	+	+
NAG	N-Acetylglucosamin	Assimilation ^b	+	+	+	+
MAL	Maltose	Assimilation ^b	-	-	+	+
GNT	Gluconat	Assimilation ^b	+	+	+	+
CAP	Caprat	Assimilation ^b	+	+	-	-
ADI	Adipat	Assimilation ^b	-	-	-	-
MLT	Malat	Assimilation ^b	+	+	+	+
CIT	Citrat	Assimilation ^b	+	+	+	+
PAC	Phenylacetat	Assimilation ^b	+	+	+	+
OX ^c	Tetraphenyl- <i>p</i> -phenylendiamin	Cytochromoxidase	+	+	+	+

^a Qualitatives Ergebnis, beschreibt den positiven (+) oder negativen (-) Ausgang der Farbreaktion / des Assimilationstests; identische Ergebnisse für Stamm 33 /

Pseudomonas frederiksbergensis und Stamm 49 / *Arthrobacter aurescens*.

^b Assimilation bedeutet Verwertung des angebotenen Substrats im bakteriellen Metabolismus.

^c Zusätzlicher Test, nicht im API 20 NE Testkit enthalten.

Allerdings wurde bereits bei den zum Vergleich durchgeführten Standardumsetzungen mit Thioanisol folgendes festgestellt: Für Stamm 49 -respektive *Arthrobacter aurescens*- wurde der gleiche Sinn der Enantioselektivität festgestellt, denn beide synthetisierten das *S*-Enantiomer von Phenylmethylsulfoxid [(*S*)-**1***]. Dagegen verhielten sich Stamm 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* entgegengesetzt enantioselektiv: Isolat 33 produziert bekanntlich das *R*-Enantiomer, *Pseudomonas frederiksbergensis* das *S*-Enantiomer des Sulfoxids bei der mikrobiellen Umsetzung von Thioanisol (**1**). Dieser Befund ist bei dem als identisch charakterisierten Stammpaar ungewöhnlich, denn ein und derselbe Bakterienstamm sollte auch gleiche Stoffwechselprodukte hervorbringen. Um die Identität von Stamm 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* abzusichern, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, auf die im Folgenden eingegangen wird.

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Da man mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) stark vergrößerte Oberflächen abbilden kann, wie sie auch mit dem Auge wahrgenommen werden, wurde diese Technik zum direkten Vergleich der als identisch charakterisierten Bakterienstämme 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* eingesetzt. So sollte nochmals bestätigt werden, dass es sich bei beiden Spezies trotz unterschiedlicher Biosyntheseleistung um *Pseudomonas frederiksbergensis* handelt. Die Details der Vorgehensweise sind im Abschnitt 5.3.10 beschrieben. Abbildung 3-3 zeigt die REM-Aufnahmen der beiden Stämme.

Der direkte Vergleich des bei der DSM erworbenen Stammes *Pseudomonas frederiksbergensis* 13022 (beide oberen Fotos) mit dem Bodenisolat 33 (unten im Bild) unterstreicht die bisherigen Ergebnisse: Sowohl im 2 µm-Ausschnitt als auch bei noch stärkerer Vergrößerung (1 µm, einzelnes Bakterium sichtbar) ist kein Unterschied zwischen beiden Spezies zu erkennen. Die poröse, flechtige Oberfläche des Untergrundes stammt vom Agar, denn die Proben wurden direkt aus Petrischalen ausgestochen und nach entsprechender Vorbereitung mittels REM abgebildet.

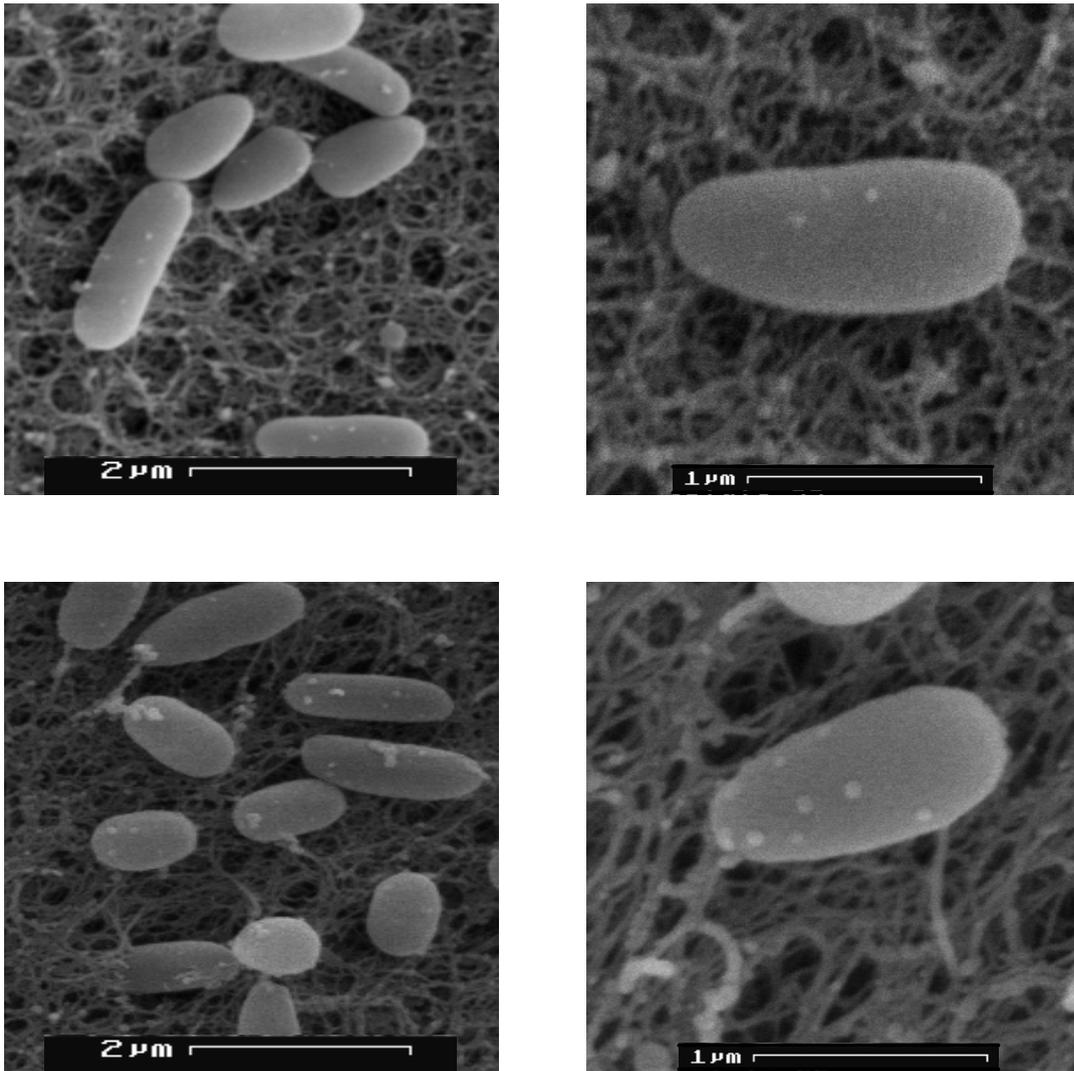


Abb. 3-3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Agarplatten:

Oben für *Pseudomonas frederiksbergensis* (gekaufter Stamm DSM Nr. 13022)

und unten für den aus einer Bodenprobe isolierten Stamm Nr. 33

3.2.3 Genotypische Charakterisierung

Parallel zu den verschiedenen phänotypischen Charakterisierungsmethoden und der REM wurde eine genotypische Charakterisierung am Insitut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg auf Basis der partiellen Sequenzierung der ribosomalen 16S rRNA durchgeführt. Kurz zusammengefasst werden dabei Fragmente der DNA unter Verwendung von unspezifischen Primern mit Hilfe der Polymerase-

Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Diese Fragmente werden anschließend mit der sog. Taq-cycle DyeDeoxyTM Terminator-Methode sequenziert. Bei der verwendeten AmpliTaq[®] DNA Polymerase FS handelt es sich um eine Mutante des Enzyms aus *Thermus aquaticus* (Taq), die zwei Punktmutationen enthält. Die erste ersetzt Phenylalanin durch Tyrosin an Position 667 (F667Y). Dadurch erhält man ein Enzym, das Didesoxynukleotide als Substrate besser akzeptiert. Weiterhin wurde Glycin an Position 46 durch Aspartat substituiert (G46D), womit die endogene 5' → 3' Nukleaseaktivität fast vollständig eliminiert werden konnte. Schließlich wurde dem Enzym noch eine thermostabile anorganische Phosphatase beigemischt, die eventuelle Rückreaktionen bei hohen Pyrophosphatkonzentrationen verhindert. Bedeutsam für die Sequenzierung sind nun die Didesoxynukleotide, die zum Kettenabbruch führen, da keine weitere 3'-Hydroxygruppe zur Elongation vorhanden ist. Um die vollständige Sequenzierung mittels einer einzigen Elektrophorese durchführen zu können, müssen vier verschiedene Didesoxynukleotide mit jeweils einem bestimmten charakteristischen Farbstoff markiert sein. Schließlich wird das Gel mit einem Argonionenlaser abgetastet und die spezifische Emission jedes Farbstoffs aufgezeichnet (Lukacs 2000). Die so erhaltene Sequenz wird dann mit Einträgen in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank verglichen. Eine detaillierte Beschreibung ist im Abschnitt 5.3.5 zu finden.

Die beschriebene Identifizierung auf Basis der 16S rRNA-Sequenzierung wurde mit Stamm 33 durchgeführt, der als einziges Isolat im Bakterienscreening (*R*)-Phenylmethylsulfoxid [(*R*)-1*] bildete; weiterhin wurden fünf *S*-selektive Stämme ausgewählt, welche die höchsten Enantiomerenüberschüsse (*ee*-Werte) im Screening zeigten. In Tabelle 3-2 sind die Ergebnisse der genotypischen Charakterisierung zusammengefasst.

Wie bereits erwähnt, wurde Stamm 33 (Zeile 3) mit einem *ee*-Wert von 62% (*R*) im EMBL-Datenbankabgleich mit 100%iger Übereinstimmung als *Pseudomonas frederiksbergensis* identifiziert. Die weiteren Isolate wurden ebenfalls mit sehr guten Identitäten den Spezies *Arthrobacter chlorophenicus* (Zeile 1), *Pseudomonas putida*

Tab. 3-2: Enantioselektivitäten der genotypisch charakterisierten, isolierten Bodenbakterien bei der asymmetrischen Oxidation von Thioanisol (**1**) zum entsprechenden Sulfoxid (**1***)

Zeile	Isolierter Stamm Nr.	Identifizierung ^a	Identität ^b [%]	Enantioselektivität [% <i>ee</i>] ^c
1	23	<i>Arthrobacter chlorophenicus</i>	98	57 (<i>S</i>)
2	25	<i>Pseudomonas putida</i>	100	55 (<i>S</i>)
3	33	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	100	62 (<i>R</i>)
4	44	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	50 (<i>S</i>)
5	49	<i>Arthrobacter aureescens</i>	98	92 (<i>S</i>)
6	55	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	100	57 (<i>S</i>)

^a Identifiziert mittels partieller Sequenzierung der 16 S r-RNA.

^b Übereinstimmung mit Eintrag in der Gen-Datenbank.

^c Bestimmt mittels multidimensionaler Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (Fehler $\pm 1.5\%$ der angegebenen Werte), *ee* steht für Enantiomerenüberschuss; die Absolutkonfigurationen sind bekannt (Colonna et al. 1990).

(Zeile 2), *Pseudomonas fluorescens* (Zeile 4), *Arthrobacter aureescens* (Zeile 5) und *Pseudomonas aureofaciens* (Zeile 6) zugeordnet. Die *ee*-Werte für das jeweils gebildete (*S*)-Phenylmethylsulfoxid [(*S*)-**1***] lagen dabei zwischen 50 und 92%. Sie wurden mittels multidimensionaler Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 5.2.3), bestimmt. Die Absolutkonfigurationen wurden von literaturbekannten Sulfoxidationsreaktionen mit Chlorperoxidase (CPO) abgeleitet (Colonna et al. 1990). Für die weiteren geplanten Versuche wurde neben Stamm 33 das Bakterium *Arthrobacter aureescens* (Isolat 49) ausgewählt, das mit 92% (*S*) den höchsten *ee*-Wert der *S*-selektiven Mikroorganismen hervorbrachte.

Da -wie schon in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben- Stamm 33 im Vergleich zu seinem bei der DSMZ erworbenen Analogon unterschiedliche Enantioselektivität aufwies, wurde auch auf molekularer Ebene deren Identität nochmals überprüft und abgesichert. Dazu wurden von der isolierten und von der gekauften Spezies

Pseudomonas frederiksbergensis Teile der 16S rRNA sequenziert und die Sequenzen verglichen (sogenanntes Alignment, siehe Abb. 3-4).

1	CCTAACACATGCAACTTCGACCGCCAGCACCGCTACTTCTA	P. frederiksbergensis.seq
1	CCTAACACATGCAACTTCGACCGCCAGCACCGCTACTTCTA	Strain 33.seq
41	CCTGCTGCGCGACCGCCGCAACCGCTGAGTAATGCCTAGCAA	P. frederiksbergensis.seq
41	CCTGCTGCGCGACCGCCGCAACCGCTGAGTAATGCCTAGCAA	Strain 33.seq
81	TCTGCCCTGCTAGTTCGGGATRACCGCTCGCAAAACCGACCCCT	P. frederiksbergensis.seq
81	TCTGCCCTGCTAGTTCGGGATRACCGCTCGCAAAACCGACCCCT	Strain 33.seq
121	AATACCGCATACGTECTACCGGAGAAAGCAGGGGACCCTTC	P. frederiksbergensis.seq
121	AATACCGCATACGTECTACCGGAGAAAGCAGGGGACCCTTC	Strain 33.seq
161	GGGCCTTGGCGCTATCAGATGAGCCCTAGCTCCGATTACCTA	P. frederiksbergensis.seq
161	GGGCCTTGGCGCTATCAGATGAGCCCTAGCTCCGATTACCTA	Strain 33.seq
201	GTTGCTGACGCTAATGCGCTCACCAAGCGGACGATCCGTAAC	P. frederiksbergensis.seq
201	GTTGCTGACGCTAATGCGCTCACCAAGCGGACGATCCGTAAC	Strain 33.seq
241	TGGTCTCAGACGATGATCAGTTCACACTGCAACTGAGACAC	P. frederiksbergensis.seq
241	TGGTCTCAGACGATGATCAGTTCACACTGCAACTGAGACAC	Strain 33.seq
281	GGTC CAGACTCCTACGGGAGCCAGCCACTGCGCAATATTGG	P. frederiksbergensis.seq
281	GGTC CAGACTCCTACGGGAGCCAGCCACTGCGCAATATTGG	Strain 33.seq
321	ACAAATCGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGCTGTCTG	P. frederiksbergensis.seq
321	ACAAATCGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGCTGTCTG	Strain 33.seq
361	AAGTAGCTCTTTCGATTGTTAAAGCACTTTAAGTTCCGACG	P. frederiksbergensis.seq
361	AAGTAGCTCTTTCGATTGTTAAAGCACTTTAAGTTCCGACG	Strain 33.seq
401	AAGGCCATTTACCTAATACGTAAGTCTTTTTCAGCTTACCG	P. frederiksbergensis.seq
401	AAGGCCATTTACCTAATACGTAAGTCTTTTTCAGCTTACCG	Strain 33.seq
441	ACACAAATAA	P. frederiksbergensis.seq
441	ACACAAATAA	Strain 33.seq

Abb. 3-4: Alignment der partiell sequenzierten 16S rRNA des isolierten Stammes 33 mit *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022)

In Abbildung 3-4 sind jeweils die Basenabfolgen von *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022) und von Stamm 33 untereinander dargestellt, identische Sequenzbereiche sind schwarz unterlegt. Es ist unschwer zu erkennen, dass in dem aufgezeigten 449-Basen-langen Ausschnitt alle aufeinanderfolgenden Basen identisch sind; es liegt eine 100%ige Übereinstimmung der sequenzierten 16S rRNA im direkten Vergleich der beiden Stämme vor.

3.2.4 Siderophore-Typing

Zusätzlich zu den verschiedenen Identifizierungsmethoden wurde für den Spezialfall, nämlich *Pseudomonas frederiksbergensis*-Stamm 33, noch die Technik des Siderophore-Typings angewendet. Diese von Meyer und Mitarbeitern für fluoreszierende Pseudomonaden beschriebene Methode wurde weiterentwickelt und erlaubt mittlerweile auch die taxonomische Zuordnung nichtfluoreszierender Pseudomonaden wie *Pseudomonas frederiksbergensis* anhand Spezies-spezifischer Pyoverdine (Meyer et al. 2002). Die praktische Vorgehensweise beim Siderophore-Typing ist im Abschnitt 5.3.9 beschrieben, die Grundlagen sind im Abschnitt 2.5 zu finden.

Das Siderophore-Typing wurde für den gekauften Stamm *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022), das Isolat 33 und eine weitere *Pseudomonas frederiksbergensis* Spezies (JAJ28) aus der Sammlung von Prof. Meyer jeweils in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei wurden die pyoverdinbedingten, spezifischen Eisenaufnahmekapazitäten direkt miteinander verglichen. Tabelle 3-3 zeigt die Ergebnisse des Siderophore-Typings.

Tab. 3-3: 'Cross-Incorporation' [Eisen(59)-Aufnahme] zwischen dem isolierten Stamm 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* und ihren entsprechenden Siderophoren

<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> Stämme			
%	DSM 13022 ^a	Isolat 33 ^b	JAJ 28 ^c
DSM 13022 ^a	100	95	103
Isolat 33 ^b	99	100	100
JAJ 28 ^c	96	96	100
Blindwert	0	0	0

^a *P. frederiksbergensis* von der DSMZ (Braunschweig, Germany, DSM 13022).

^b Aus Bodenprobe isolierter *P. frederiksbergensis*.

^c Zum Vergleich wurde ein *P. frederiksbergensis* von Prof. Meyer's Sammlung aus Strassburg, Frankreich, eingesetzt.

Das Siderophorensystem des gekauften Stammes *Pseudomonas frederiksbergensis* bewerkstelligt eine Eisenaufnahme mit einer Effizienz von 95% verglichen mit der von Stamm 33. Im umgekehrten Vergleich akzeptiert Stamm 33 die Siderophor-gesteuerte Eisenaufnahme mit 99%iger Effektivität bezüglich *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022. Analoge Ergebnisse wurden beim Abgleich von *Pseudomonas frederiksbergensis* JAJ28 mit Isolat 33 erzielt. Somit unterstreicht auch die aussagekräftige Technik des Siderophore-Typings nochmals die Feststellung, dass es sich beim isolierten Stamm 33 um eine *Pseudomonas frederiksbergensis*-Spezies handelt.

Fazit:

Nach Abschluss der verschiedensten Charakterisierungsmethoden bleibt festzuhalten, dass das Bakterienisolat 49 als *Arthrobacter aurescens* identifiziert wurde; auch in seiner Biosyntheseleistung bezüglich der enantioselektiven Sulfoxidation ist es mit dem kommerziell erhältlichen Vergleichsstamm (DSM 20116, Type Strain) zur Deckung zu bringen.

Der isolierte Stamm 33 wurde mit verschiedensten Methoden der Spezies *Pseudomonas frederiksbergensis* zugeordnet. Allerdings verhält sich dieser Stamm im Vergleich zum gekauften *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022) bei der Sulfoxidation umgekehrt enantioselektiv. Es muss sich bei dem Isolat 33 also um eine Subspezies von *Pseudomonas frederiksbergensis* handeln, bei der ein anderes Enzymsystem für die Produktion der *R*-selektiven Sulfoxide verantwortlich ist und unterschiedliche konkurrierende Enzyme letztlich für die Produktion des *R*-Enantiomers im Überschuss sorgen. Dieser Fall ist -soweit das anhand der uns zugänglichen Literatur beurteilbar ist- das erste beschriebene Beispiel dafür, dass genetisch nicht manipulierte Stämme derselben Spezies unterschiedliche Enantiomere in einer definierten Reaktion bilden.

3.3 Diverse Sulfide als Substrate in mikrobiellen und enzymatischen Umsetzungen

3.3.1 Substratscreening mit einfach strukturierten Sulfiden

Im ersten Schritt des Substratscreenings wurden verschiedene, einfach strukturierte organische Sulfide eingesetzt, um die Substratselektivität und die Effekte bei der Veränderung der Substituenten der Schwefelfunktion auf die Enantioselektivität und den Enantiomerenüberschuss (*ee*-Wert) aufzuklären. Die praktische Durchführung der bakteriellen 'whole-cell'-Umsetzungen ist ausführlich im Abschnitt 5.3.6 erläutert. Beispielhaft zeigt Abbildung 3-5 die Umsetzung mit dem Standardsubstrat Thioanisol (**1**).

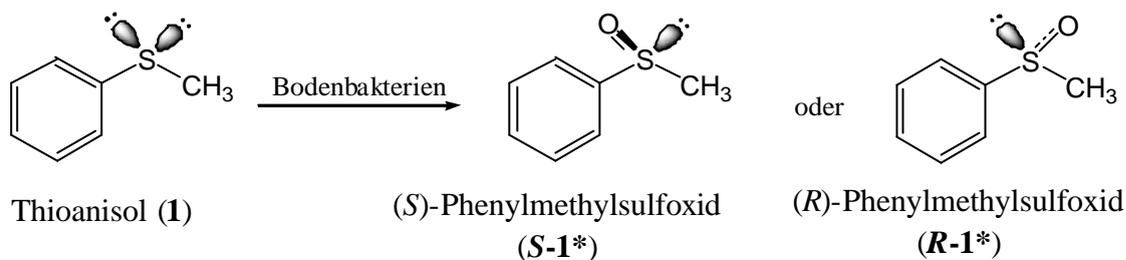


Abb. 3-5: Screeningverfahren: Thioanisol (**1**) als Substrat für die mikrobielle enantio-selektive Sulfoxidation

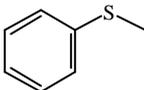
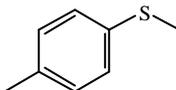
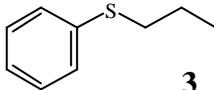
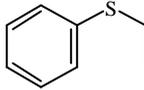
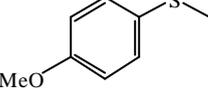
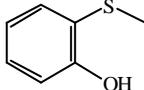
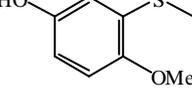
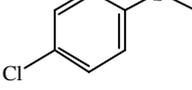
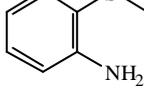
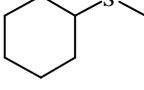
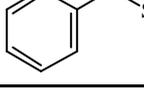
Je nach dem im entsprechenden Bakterium vorhandenen Enzym oder Enzymsystem wird bei positivem Versuchverlauf entweder das *R*- oder das *S*-Enantiomer des aus dem eingesetzten prochiralen Sulfid durch Oxidation entstandenen Sulfoxids im Überschuss gebildet. Nach der Oxidation wird das einzelne verbleibende freie Elektronenpaar in der Rangordnung der vier unterschiedlichen Substituenten am Schwefel am niedrigsten eingestuft, am Schwefelatom ist dadurch ein chirales Zentrum entstanden; die biosynthetisierten Sulfoxide sind in der Regel optisch aktiv. Der gemessene Enantiomerenüberschuss wird kurz als *ee*-Wert bezeichnet und errechnet sich aus der Gleichung $ee\ (\%) = ([R] - [S]) : ([R] + [S]) \cdot 100$, wobei in eckigen Klammern die Konzentration des *R*- oder des *S*-Enantiomers angegeben wird. Werden zur Trennung der Enantiomere chromatographische Methoden wie die GC an chiraler Phase eingesetzt, werden zur Berechnung anstelle der Stoffmenge *n* die Flächen unter

den getrennten Enantiomerenpeaks herangezogen. Aufgrund dieser Definition ergibt sich für ein racemisches Gemisch [$n(R) = n(S)$] ein *ee*-Wert von 0%, während ein *ee*-Wert von zumindest 95% eine enantiomerenreine Verbindung beschreibt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Absolutkonfiguration aufgrund der gaschromatographischen Elutionsreihenfolge der Enantiomere an einer chiralen stationären Phase zugeordnet. Da diesbezügliche Techniken ausführlich in der Literatur beschrieben sind (Schreier et al. 1995), wird hier nur kurz die verwendete Methode angesprochen: Die biokatalytisch gewonnenen, optisch aktiven Sulfoxide wurden an einer modifizierten β -Cyclodextrin-Phase aufgetrennt (vgl. Abschnitt 5.2.3). Aufgrund der Elutionsreihenfolge wurde die Konfiguration am Stereozentrum durch Vergleich mit authentischen Referenzverbindungen festgelegt. Diese Analytik wurde mittels multidimensionaler Gaschromatographie durchgeführt. Hierbei wurde eine herkömmliche chirale Säule zur Vortrennung einer Probe verwendet. Durch eine Säulenschaltung (in diesem Fall ein MCSS: Moving-Column-Switching-System) wurde nur die relevante Analysenkomponente selektiv auf die chirale Trennphase transferiert. Dieses gaschromatographische Verfahren ermöglichte die direkte Analyse der chiralen Sulfoxide aus dem extrahierten Reaktionsansatz und verlängert die Haltbarkeit der teureren chiralen Phase.

Die im Substratscreening zur enantioselektiven Sulfoxidation erhaltenen *ee*-Werte mit Bakterienisolat 33 und 49 sowie die von den entsprechenden Referenzstämmen *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022 und *Arthrobacter aureescens* DSM 20116, fasst Tabelle 3-4 zusammen. Die jeweilige Absolutkonfiguration (*R* oder *S*) ist aus Umsetzungen mit Chlorperoxidase (CPO) bekannt (Colonna et al. 1990). Für jedes eingesetzte Substrat wurde die enzymatische Reaktion mit CPO, wie im Abschnitt 5.3.8 beschrieben, durchgeführt und das dabei gebildete Enantiomerenpaar (CPO produziert das *R*-Enantiomer im Überschuss) mittels multidimensionaler Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, bestimmt (vgl. Abschnitt 5.2.3). Als racemische Referenzen dienten die nach 5.4.4 (Vayssie und Elias 1998) synthetisierten Sulfoxide.

Tab. 3-4: Enantioselektive Sulfoxidation im Substratscreening mit Bakterienisolat 33 und 49 sowie entsprechenden Referenzstämmen *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022) und *Arthrobacter aurescens* (DSM 20116)

Zeile	Substrat	Enantioselektivität ^a			
		Isolat 33	Isolat 49	<i>P. fred.</i>	<i>A. auresc.</i>
1	 1	62 (<i>R</i>)	91 (<i>S</i>)	91 (<i>S</i>)	73 (<i>S</i>)
2	 2	62 (<i>R</i>)	26 (<i>S</i>)	> 99 (<i>S</i>)	12 (<i>S</i>)
3	 3	12 (<i>R</i>)	64 (<i>S</i>)	81 (<i>S</i>)	78 (<i>S</i>)
4	 4	< 5	< 5	< 5	< 5
5	 5	89 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	> 99 (<i>S</i>)	18 (<i>S</i>)
6	 6	84 (<i>R</i>)	97 (<i>S</i>)	95 (<i>S</i>)	97 (<i>S</i>)
7	 7	< 5	< 5	< 5	< 5
8	 8	56 (<i>R</i>)	71 (<i>S</i>)	96 (<i>S</i>)	< 5
9	 9	< 5	< 5	< 5	< 5
10	 10	23 (<i>R</i>)	59 (<i>S</i>)	70 (<i>S</i>)	15 (<i>S</i>)
11	 11	< 5	< 5	< 5	< 5

^a Bestimmt mittels multidimensionaler Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, auf einer 2,3-Diethyl 6-*t*-butyldimethylsilyl β -Cyclodextrin Säule; Fehler $\pm 1.5\%$ der angegebenen Werte; Absolutkonfigurationen bekannt aus der Literatur (Colonna et al. 1990).

Für die folgende Beschreibung entspricht die Substratnummer auch der Zeilennummer in Tabelle 3-4. Das Standardsubstrat Thioanisol (**1**) wurde vom isolierten Stamm 33 mit einem *ee*-Wert von 62% zum (*R*)-Phenylmethylsulfoxid [(*R*)-**1***] sulfoxidiert. Sein Referenzstamm *Pseudomonas frederiksbergensis* synthetisierte ebenso wie Isolat 49 fast enantiomerenreines (*ee*-Wert 91%) Sulfoxid und *Arthrobacter aurescens* mit einem *ee*-Wert von 73%, alle zugunsten des *S*-Enantiomers.

Die Einführung einer Methylgruppe in *para*-Position beim *p*-Tolylmethylsulfid (**2**) führte bei den *Pseudomonas frederiksbergensis*-Spezies kaum zu Veränderungen in der Enantiomerenanreicherung [wieder ein *ee*-Wert von 62% (*R*) beim Isolat, sogar >99% (*S*) beim Referenzstamm], dagegen wurde dieses Substrat vom Isolat 49 mit einem *ee*-Wert von 26% (*S*) und *Arthrobacter aurescens* mit einem von nur 12% (*S*) kaum enantiomerenangereichert gebildet.

Die Verlängerung der Alkylseitenkette am Beispiel von *n*-Propylphenylsulfid (**3**) sorgte beim Isolat 33 für einen dramatischen Einbruch des *ee*-Wertes (nur noch 12% *R*-Enantiomer), der bei *Pseudomonas frederiksbergensis* mit 81% (*S*) bei weitem nicht so deutlich ausfiel. Mit den beiden *Arthrobacter*-Spezies wurden akzeptable *ee*-Werte von 64 und 78% erzielt. Die sterische Hinderung der Isopropyl-Funktionalität im Substrat *i*-Propylphenylsulfid (**4**) brachte die enantioselektive Sulfoxidation der eingesetzten Bakterien vollkommen zum Erliegen; es wurden nur noch Spuren von racemischen Sulfoxid detektiert, das durch Autoxidation während der Inkubationszeit entstanden ist.

Das *p*-Methoxyderivat (**5**) hingegen wurde äußerst erfolgreich sulfoxidiert, denn Isolat 33 zeigte einen *ee*-Wert von 89% (*R*) an, und *Pseudomonas frederiksbergensis* führte wieder zu einer enantiomerenreine *S*-Sulfoxidation. Auch das Isolat 49 erreichte einen beachtlichen *ee*-Wert von 88%; lediglich *Arthrobacter aurescens* fiel mit 18% (*S*) aus der Reihe. Trotz mehrerer unabhängiger Versuchsansätze konnte die optische Aktivität in diesem Fall nicht erhöht werden, der Grund dafür bleibt unklar.

Umso erfreulicher gestaltete sich die Umsetzungsreihe mit 2-Hydroxyphenylmethylsulfid (**6**). Hier wurden durchweg hohe Enantiomerenüberschüsse zwischen 84 und 97% erzielt, für Isolat 33 wurde das *R*-Enantiomer erhalten.

Die Verwendung von 2-Methylthio-4-hydroxyanisol (**7**) als Substrat für die bakterielle enantioselektive Sulfoxidation schlug fehl. Keines der eingesetzten Stammpaare akzeptierte dieses sperrige Molekül für die Sulfoxidationsreaktion; wieder wurden Spuren an racemischem Autoxidationsprodukt gefunden.

Die Anlagerung eines Halogenatoms am aromatischen Ring erbrachte ebenfalls enantiomerenangereicherte Sulfoxide, wie am Beispiel 4-Chlorthioanisol (**8**) gezeigt werden konnte. *Pseudomonas frederiksbergensis* sulfoxidierte [*ee*-Wert von 96% (*S*)-Sulfoxid] wieder nahezu enantiomerenrein, das isolierte Analogon, Stamm 33, brachte, wie gewohnt, moderatere optische Aktivität hervor [*ee*-Wert von 56% (*R*)]. Isolat 49 erreichte einen *ee*-Wert von 71% (*S*), der Referenzstamm *Arthrobacter aurescens* führte unerklärlicher Weise erneut keine enantioselektive Sulfoxidation durch.

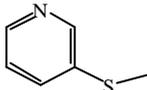
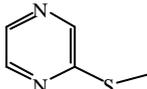
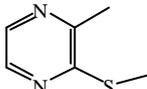
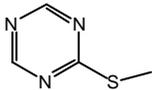
Aminofunktionalitäten wie bei 2-Aminothioanisol (**9**) kommen bei den verwendeten Bakterienstämmen nicht als Substrate für die enantiomerenangereicherte Sulfoxidation in Betracht.

Cyclohexylmethylsulfid (**10**) wurde als Substrat in den Schüttelkulturen eingesetzt, um den Wirkungsgrad der Arylsubstituenten zu prüfen. Selbst wenn der Enantiomerenüberschuss generell niedriger ausfiel, so erreichte *Pseudomonas frederiksbergensis* mit einem *ee*-Wert von 70% (*S*) doch eine brauchbare Stereoselektivität. Isolat 33 produzierte das *R*-Enantiomer in 23%igem Überschuss. Beim Isolat 49 wurde der *ee*-Wert zu 59% (*S*) bestimmt, der bei *Arthrobacter aurescens* mit 15% (*S*) nochmals deutlich niedriger war. Letztlich wurde noch Benzylmethylsulfid (**11**) den Bakterienstämmen als Substrat für die Sulfoxidation angeboten, allerdings ohne Erfolg.

3.3.2 N-Heterozyklische Sulfide

In der Weiterführung des Substratscreenings wurden stickstoffhaltige heterozyklische Sulfide mit pseudoaromatischer Struktur für die bakterielle `whole-cell`-Sulfoxidation eingesetzt. Da das Stammpaar *Arthrobacter aurescens* diese Substanzklasse generell nicht als Substrat zur biokatalytischen Umsetzung akzeptiert, erfolgten die Versuche mit den *Pseudomonas frederiksbergensis*-Spezies. Wie in Tabelle 3-5 gezeigt, dienten Vergleichsumsetzungen mit CPO zur Ableitung der Absolutkonfiguration.

Tab. 3-5: Enantioselektivitäten bei der Oxidation von N-heterozyklischen Sulfiden

Zeile	Substrat	Enantioselektivität ^a		
		Isolat 33	<i>P. frederiksbergensis</i>	CPO
1	 12	< 10 (<i>R</i>)	67 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)
2	 13	< 5	62 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)
3	 14	< 5	27 (<i>S</i>)	90 (<i>R</i>)
4	 15	< 5	< 5	- ^b

^a Bestimmt mittels multidimensionaler Gaschromatographie /Massenspektrometrie; Fehler $\pm 2,0$ % der angegebenen Werte; Absolutkonfigurationen bekannt aus der Literatur (Colonna et al. 2002).

^b Kein Sulfoxid detektierbar.

Die Variation der aromatischen Grundstruktur durch ein Stickstoffatom, wie im Fall von 3-Methylthiopyridin (**12**), ergab bei der enantioselektiven Sulfoxidation mit *Pseudomonas frederiksbergensis* einen *ee*-Wert von 67% zugunsten des *S*-Enantiomers. Bei Isolat 33 war hier schon ein sehr geringer Enantiomerenüberschuss von < 10% (*R*) zu verzeichnen (Zeile 1). Ein weiteres Stickstoffatom, wie beim Substrat 2-Methylthiopyrazin (**13**), reduzierte den *ee*-Wert bei Umsetzungen mit *Pseudomonas frederiks-*

bergensis auf 62% (*S*), bei Isolat 33 war keine Enantiomerenanreicherung mehr zu erkennen (Zeile 2).

Mit dem 2-Methyl-3-methylthiopyrazin (**14**) als Substrat wurde eine Methylgruppe in direkter Nachbarschaft zur *S*-Methyl-Funktionalität eingeführt, was jetzt auch deutlichen Einfluss auf den *ee*-Wert bei Umsetzungen mit *Pseudomonas frederiksbergensis* hatte; hier wurden 27% *S*-Enantiomere im Überschuss gemessen, Isolat 33 sulfoxidierte konsequenter Weise das Substrat überhaupt nicht (Zeile 3). Drei Stickstoffatome im aromatischen System, wie beim Methylthio-*sym*-triazin (**15**), brachten die enantioselective Sulfoxidation vollkommen zum Erliegen (Zeile 4). CPO sulfoxidierte in den Vergleichsumsetzungen 3-Methylthiopyridin (**12**) und 2-Methylthiopyrazin (**13**) enantiomerenrein (Zeilen 1 und 2) und 2-Methyl-3-methylthiopyrazin (**14**) (Zeile 3) mit einem *ee*-Wert von 90% (*R*). Lediglich Methylthio-*sym*-triazin (**15**) wurde nicht als Substrat akzeptiert; in diesem Fall war kein Sulfoxid detektierbar.

3.3.3 Furfuryle und Thiophene

Um im Substratscreening noch weiter von der aromatischen Grundstruktur der zur enantioselectiven Sulfoxidation eingesetzten Substrate abzuweichen, wurden aus der Heteroaromaten-Substanzklasse der Furfuryle und Thiophene je ein Vertreter zu Testzwecken ausgewählt (siehe Abb. 3-6). Allerdings wurde weder in den bakteriellen



Abb. 3-6: Strukturformeln für Furfurylmethylsulfid (**16**) und 2-(Methylthio)thiophen (**17**)

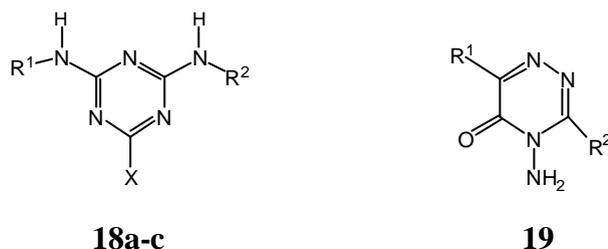
Standardumsetzungen mit den Isolaten 33 und 49 noch bei den gekauften Referenzstämmen *Pseudomonas frederiksbergensis* und *Arthrobacter aureus* Sulfoxidationsprodukte von Furfurylmethylsulfid (**16**) detektiert. Gleiches gilt für

2-(Methylthio)thiophen (**17**), das mit einem Schwefelatom in der Seitenkette und einem zweiten im Fünfring theoretisch sogar zwei Angriffspunkte für die Sulfoxidation bietet.

3.3.4 Schwefelhaltige Pestizide

Im Hinblick auf die praktische Anwendbarkeit der bakteriellen Sulfoxidationsreaktionen wurden auch verschiedene schwefelhaltige Pestizide in standardisierten Schüttelkulturen eingesetzt. In einer ersten Versuchsreihe dienten erneut stickstoffhaltige Verbindungen als Substrate (siehe Tab. 3-6). Die Triazinherbizide Desmetryn[®]

Tab. 3-6: Zur enantioselektiven Sulfoxidation eingesetzte Triazin-Herbizide



	Handelsname	X	R ¹	R ²
18a	Desmetryn	SCH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
18b	Ametryn	SCH ₃	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂
18c	Methoprotryn	SCH ₃	CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₃ OCH ₃
19	Metribuzin	- ^a	C(CH ₃) ₃	SCH ₃

^a Sulfidfunktionalität bereits im Rest R².

(**18a**), Ametryn[®] (**18b**) und Methoprotryn[®] (**18c**) sowie Metribuzin[®] (**19**) als weiterer Stickstoffheterozyklus wurden in blindwertkontrollierten und voneinander unabhängigen Versuchen weder durch die Bodenisolate 33 und 49 noch mittels der gekauften Referenzstämme *Pseudomonas frederiksbergensis* und *Arthrobacter aureus* sulfoxidiert. Nach Versuchsdurchführung wurden durch gaschromatographisch-massenspektrometrischer Untersuchung lediglich die Substrate wieder gefunden.

Weiterhin wurden die beiden Organophosphorpestizide Fenamiphos[®] (**20**) und Fenthion[®] (**21**) sowie das strukturell verwandte Mercaptodimethur[®] (**22**) nicht als Substrate für die enantioselektive Sulfoxidation akzeptiert. Vollständigkeitshalber sind auch noch die kommerziell erhältlichen Pestizide Ethiofencarb[®] (**23**) und Tetrasul[®] (**24**) verwendet worden, allerdings jeweils ohne Erfolg. Abbildung 3-7 zeigt die Strukturformeln der eben aufgezählten organischen Pestizide.

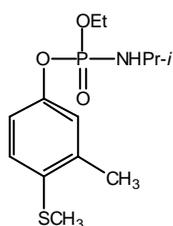
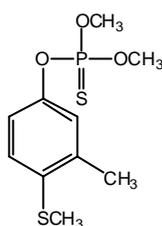
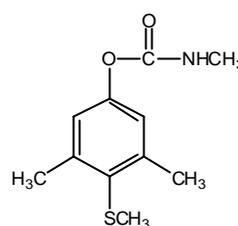
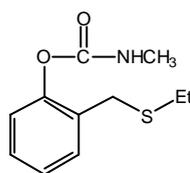
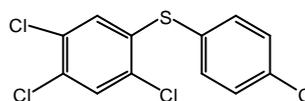
Fenamiphos (**20**)Fenthion (**21**)Mercaptodimethur (**22**)Ethiofencarb (**23**)Tetrasul (**24**)

Abb. 3-7: Die zur enantioselektiven Sulfoxidation eingesetzten Organophosphorpestizide [Fenamiphos (**20**) und Fenthion (**21**)] sowie weitere Pestizide

Wie bei den anderen Strukturen, wurden auch die Pestizide im Substratscreening enzymatischen Reaktionen mit CPO unterzogen. Erfreulicherweise wurden hier die beiden Organophosphorpestizide erfolgreich in der enzymatischen enantioselektiven Sulfoxidation umgesetzt. Für das Sulfoxid von Fenamiphos[®] (**20***) wurde ein Enantiomerenüberschuss von 74% und für das Fenthionsulfoxid (**21***) von 62% erhalten. Aufgrund der hohen Siedepunkte der Sulfoxide war es nicht möglich, den *ee*-Wert standardmäßig über die Messanordnung der multidimensionalen Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (MDGC-MS), zu bestimmen; deshalb

wurde eine mit einer 2,3-Diethyl-6-*t*-butyl-dimethyl- β -cyclodextrin-Phase belegte Trennsäule direkt im GC-MS System (GC 3 mit MS 1, siehe Abschnitt 5.2.2) verwendet. Nur so war es möglich, die Enantiomerenverteilung der Organophosphorpestizid-Sulfoxide gaschromatographisch zu analysieren. Eine ausführliche Abhandlung dieser Thematik, einschließlich der Hintergründe für die Versuchsreihen mit Pestiziden, ist im Diskussionsteil (Abschnitt 4.4) zu finden.

3.3.5 Omeprazol[®] und Modafinil[®]

Die Verwendung der beiden Sulfoxide Omeprazol[®] (**25***) und Modafinil[®] (**26***) als Arzneistoffe war Grundlage für die Überprüfung der entsprechenden Sulfide auf deren Sulfoxidationsfähigkeit. Abbildung 3-8 zeigt die pharmazeutisch als Wirkstoffe

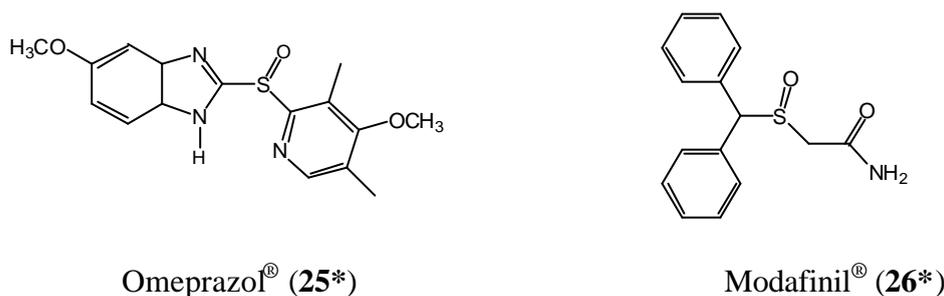


Abb. 3-8: In der Pharmazie als Wirkstoffe eingesetzte Sulfoxide Omeprazol[®] (**25***) und Modafinil[®] (**26***)

eingesetzten Sulfoxide Omeprazol[®] (**25***) und Modafinil[®] (**26***). Dazu wurden deren Sulfide [Omeprazolsulfid (**25**) und Modafinilsulfid (**26**)] als Substrate sowohl in bakteriellen (Isolate 33 und 49, *Pseudomonas frederiksbergensis* und *Arthrobacter aurescens*) als auch in enzymatischen (CPO) Umsetzungen eingesetzt. Nach den angewendeten Umsetzungstechniken wurde in keinem der beiden Fälle das Sulfoxid aus dem entsprechenden Sulfid biosynthetisiert. Im Diskussionsteil (Abschnitt 4.5) wird nochmal näher auf diese Fehlschläge eingegangen.

3.4 Einsatz des Fermenters

Durch den Einsatz eines Fermenters (Bioreaktors) sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob die bisher (in der Größenordnung von 100 ml-Schüttelkulturen) durchgeführten bakteriellen Umsetzungen auch auf biotechnologisch einsetzbare Fermentationsansätze übertragbar sind. In allen Fermentationsansätzen wurde *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022 verwendet, weil dieser Stamm im Substratscreening immer die höchsten *ee*-Werte und Produktausbeuten erbrachte. Vor Beginn der Umsetzungen im Bioreaktor musste eine Wachstumskurve aufgenommen werden, um entsprechende Starterkulturen für den Fermentationsprozess zu züchten und die Fermentationsparameter dem zeitlichen Verlauf des Bakterienwachstums anzupassen. Dies geschah in Form einer sogenannten Zellzahlstudie, wie sie graphisch in Abbildung 3-9 dargestellt ist. Die Details des Verfahrens zur Bestimmung von Gesamt- und Lebendzellzahl beschreibt Abschnitt 5.3.11.

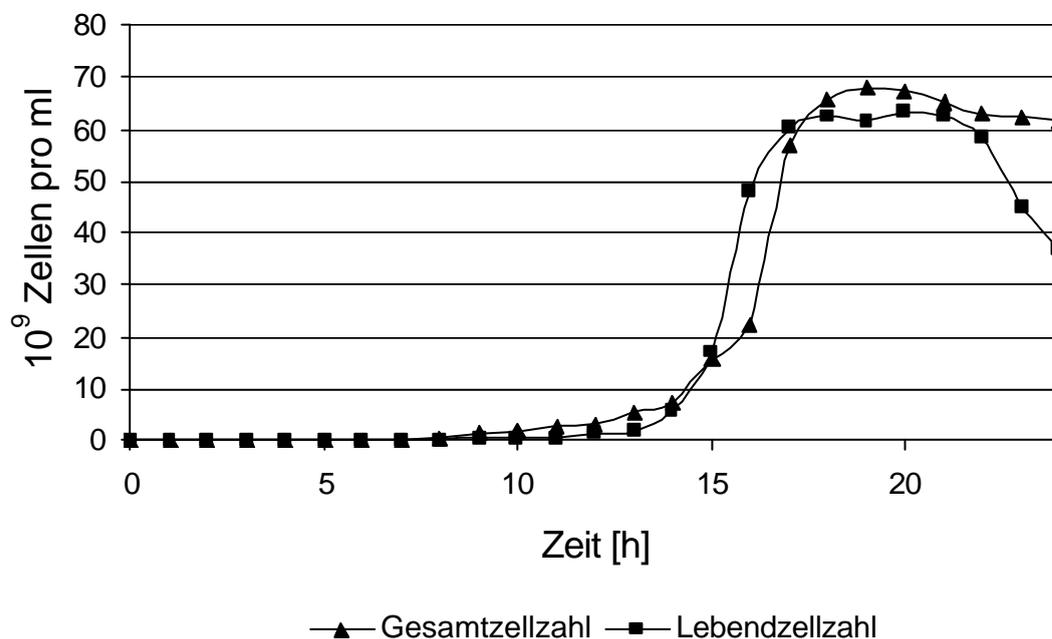


Abb. 3-9: Zeitprofil des Bakterienwachstums im Verlauf der Inkubation:

Zellzahl-Studie am Beispiel von *Pseudomonas frederiksbergensis*

Bei *Pseudomonas frederiksbergensis* wurde ein für Bakterien typischer Wachstumsverlauf festgestellt. Nach dem Animpfen des Nährmediums passten sich die Zellen zunächst den neuen Bedingungen in der sogenannten lag-Phase an, in der kein Wachstum feststellbar ist. Diese Phase war mit 12 h überdurchschnittlich lang. Nach 12-14 h begannen die Bakterien zu wachsen. In der zweiten Phase teilten sich die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit, man bezeichnet dies auch als exponentielle oder log-Phase, die bei *Pseudomonas frederiksbergensis* zwischen 14 und 18 h nach Animpfung lag. In diesem Zeitraum wurde die vorhandene Glucose von dem Stamm zur Energiegewinnung und zum Wachstum abgebaut. Das wäre dann auch genau der Zeitraum, in dem beispielsweise aus dem Substrat Thioanisol (**1**) das Stoffwechselprodukt Phenylmethylsulfoxid (**1***) biosynthetisiert werden kann. Nach 18 h war kein Anstieg der Zellzahl mehr zu verzeichnen; infolge abnehmender Glucosekonzentration verlangsamten die Zellen in dieser sogenannten stationären Phase ihr Wachstum und stellten es schließlich ein. In der vierten typischen Entwicklungsphase der Bakterienkultur, auch Absterbephase genannt, nahm die Lebendzellzahl ab 21 h Inkubationsdauer wieder ab. Diese letzte Phase war auch der einzige Bereich, in dem sich die Lebendzellzahl von der Gesamtzellzahl unterschied; die Gesamtzellzahl erfasste dort natürlich auch die abgestorbenen Zellen. Ansonsten verliefen deren Zeitprofile während der gesamten Inkubationszeit sehr schön parallel zueinander.

Auf Grundlage dieser Wachstumskurve wurden Fermentationsversuche durchgeführt, wie sie im Abschnitt 5.3.7 ausführlich beschrieben sind. Mit einer 18 h vorgezogenen Starterkultur von *Pseudomonas frederiksbergensis* (sogenannte seed culture) wurde der Bioreaktor angeimpft. Über die Steuerung wurden die Fermentationsparameter wie Temperatur (30 °C), steriler Luftfluss (0.2 l/min), Sauerstoffsättigung (DO₂ 10%) sowie die davon abhängige Drehzahl des Rührwerks (Agit 100-400 upm) programmiert. Über die Schlauchpumpe wurde ständig 5%ige Glucoselösung mit einem Fluss von 0.1 ml/min steril zugegeben. Nach 24 h Inkubationszeit, in der die Kultur im Fermentationsgefäß anwuchs, wurde über eine weitere Schlauchpumpe das Thioanisol (**1**) mit einem Fluss von 0.6 ml/h als Substrat für die mikrobielle Umsetzung unter sterilen Bedingungen zudosiert. Nun wurde über die sterile Entnahmestelle stündlich

eine Probe entnommen und analysiert. Abbildung 3-10 zeigt die erreichten Umsetzungsraten und Ausbeuten.

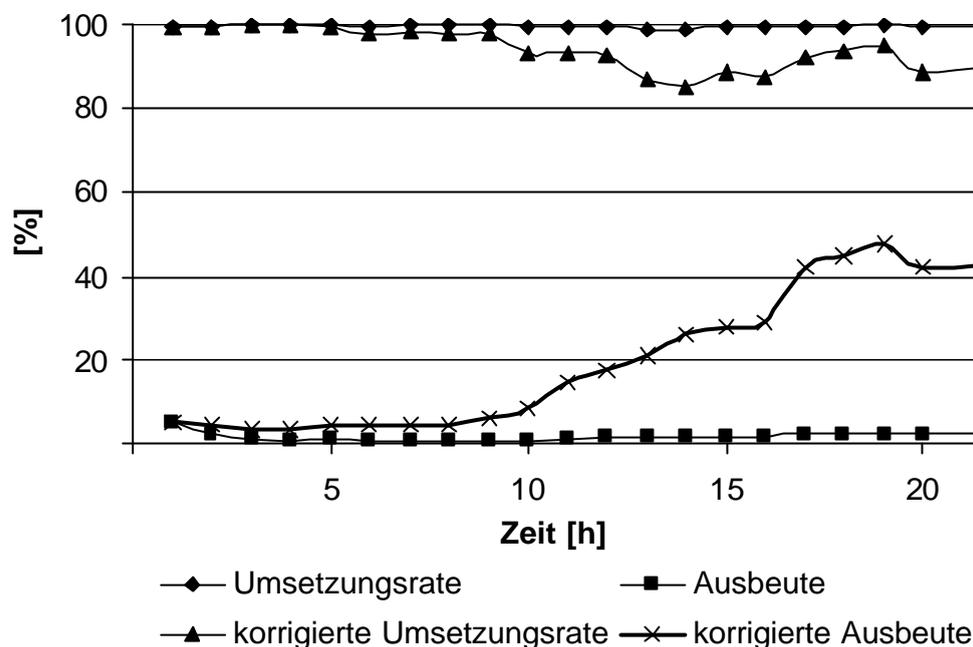


Abb. 3-10: Zeitlicher Verlauf der Umsetzungsraten und Ausbeuten bei der Fermentation von Thioanisol (**1**) mit *Pseudomonas frederiksbergensis* (0.1 ml/min 50%ige Glucose, 0.6 ml/h Thioanisol, 30 °C, 10% Sauerstoffsättigung)

Schon nach 1 h lag die Umsetzungsrate [verbrauchtes Thioanisol (**1**)] bei 100%, was in Anbetracht einer Ausbeute an Phenylmethylsulfoxid (**1***) von weniger als 5% auffällig hoch war. Aufgrund mehrerer Ansätze und der Durchführung einer Blindwertfermentation (Ansatz ohne Bakterien) wurde festgestellt, dass der Teil des Sulfids, das nicht zum Sulfoxid umgesetzt worden war, unter den Fermentationsbedingungen (Temperatur, ständiger Luftdurchsatz und Rühren) aus dem Reaktionsgefäß verdampfte. Im Labor war dies auch geruchlich wahrnehmbar. Da das Sulfoxidationsprodukt während der gesamten Fermentationszeit aus dem enantiomerenreinem (*S*)-Phenylmethylsulfoxid [(*S*)-**1***] bestand, verläuft diese Sulfoxidation in exzellenter Enantioselektivität. Das entsprechende Sulfon wurde zu keiner Zeit als Folgeprodukt detektiert.

In Abbildung 3-10 sind die Werte für die korrigierte Umsetzungsrate und die korrigierte Ausbeute aufgetragen. Diese Daten wurden unter Berücksichtigung der Tatsache korrigiert, dass größere Mengen des Sulfids aus dem System verdampfen und somit nicht zum Sulfoxid umgesetzt werden. Es wurde also von Stunde zu Stunde die Menge des detektierten Sulfoxids auf die tatsächlich vorhandene Menge an Sulfid bezogen. Der Anteil des verflüchtigten Sulfids war aus der Blindwertfermentation (ohne Bakterien) bekannt. Ziel dieses Blindversuches war es, die Autoxidationsrate von Thioanisol während der 24-stündigen Fermentation zu bestimmen. Diese Nebenreaktion trat aber in so geringem Maße auf, dass lediglich Spuren an racemischem Sulfoxid detektiert wurde, die keinen Einfluss auf den *ee*-Wert hatten. Gleichzeitig wurde erfasst, welcher Anteil an Sulfid unter den eingestellten Fermentationsparametern das Reaktionsgefäß verlässt und so nicht zur Sulfoxidation zur Verfügung stand. Durch Berücksichtigung dieses Anteils stieg die Ausbeute (korrigierter Wert) nach 24 h Fermentation auf beinahe 50% an, was genau der Ausbeute an Oxidationsprodukt von Thioanisol (**1**) bei der Umsetzung mit *Pseudomonas frederiksbergensis* in der Schüttelkultur entspricht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das weniger flüchtige 4-Chlorthioanisol (**8**) als Substrat im Fermentationsprozess eingesetzt. Trotzdem konnte die Verflüchtigung auch dieses Substrates unter den Reaktionsbedingungen nicht unterdrückt werden; es wurden letztlich ähnlich niedrige Ausbeuten wie in den Ansätzen mit Thioanisol (**1**) erzielt. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Bioreaktor-Fermentationssystem leistungsfähig funktioniert, jedoch die eingesetzten flüchtigen Substrate unter diesen Bedingungen nicht für eine effektive enantioselektive Sulfoxidation im großtechnischen Maßstab verwendet werden können.

Da schon in den Schüttelkulturen des Substratscreenings trotz hoher *ee*-Werte teilweise geringe Ausbeuten an Sulfoxid erzielt wurden sollte in einem weiteren Fermentationsansatz der Einfluss des Substrats am Beispiel von Thioanisol (**1**) bzw. des Produkts Phenylmethylsulfoxid (**1***) auf das Wachstum der Bakterien überprüft werden. Eventuell von diesen Substanzen ausgehende toxische Effekte hätten störende Folgen für die gesamte bakterielle Reaktion (Absterben der Mikroorganismen) und würden die teilweise niedrigen Ausbeuten erklären. Ein solcher Hemmversuch wurde unter

Standardbedingungen im Fermenter mit dem Bakterium *Pseudomonas frederiksbergensis* durchgeführt. Die Sauerstoffelektrode des Bioreaktors diente dabei als adäquates analytisches Messinstrument. Aus den vorhergehenden Fermentationsansätzen war bekannt, dass der durch stetige sterile Luftzufuhr und das Rührwerk eingetragene Sauerstoff vollkommen verbraucht wird, solange sich die Zellen in der Wachstumsphase befinden. Die vor Versuchsbeginn geeichte Sauerstoffelektrode misst den Nullwert (0%) der Sauerstoffsättigung. Sterben die Zellen ab und verbrauchen somit keinen Sauerstoff mehr, steigt der Wert langsam auf 100% an, was einer maximalen Sauerstoffsättigung der wässrigen Fermentationslösung entspricht. In Abbildung 3-11 sind die Sauerstoffsättigung und der Enantiomerenüberschuss von Phenylmethylsulfoxid (**1***) im zeitlichen Verlauf der Fermentation mit *Pseudomonas frederiksbergensis* dargestellt.

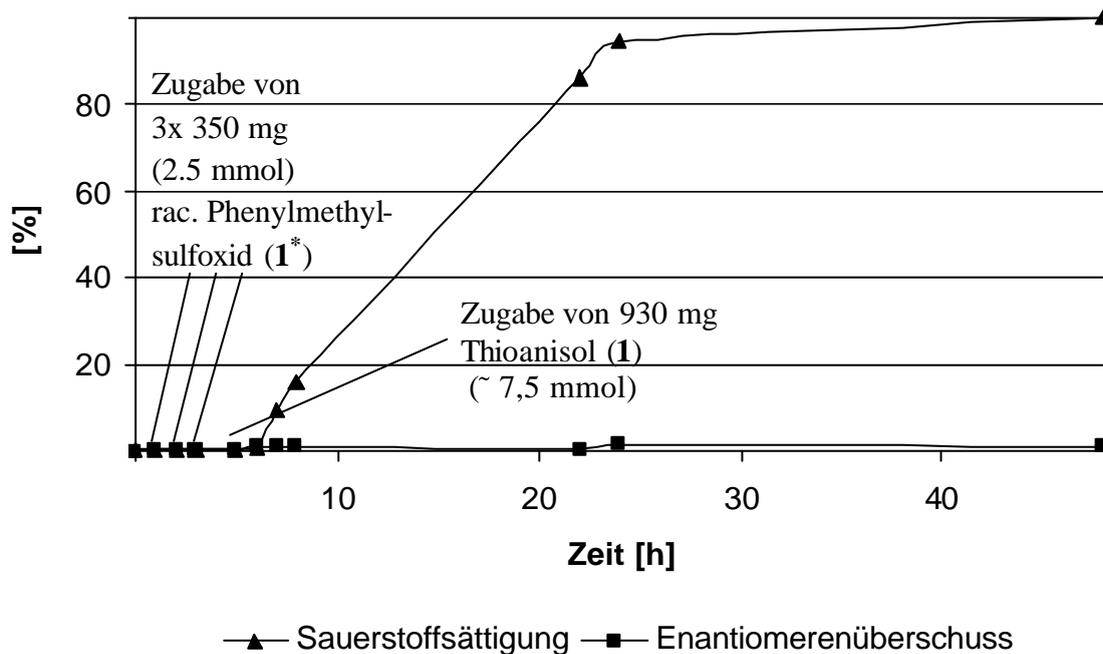


Abb. 3-11: Einfluss von Substrat [Thioanisol (**1**)] und Produkt [Phenylmethylsulfoxid (**1***)] auf das Bakterienwachstum in Relation zur Sauerstoffsättigung und zum Enantiomerenüberschuss (% *ee*) bei der Fermentation mit *Pseudomonas frederiksbergensis*

Nach 1, 2 und 3 h wurden jeweils 350 mg (2.5 mmol) kommerziell erhältliches racemisches Phenylmethylsulfoxid (**1***) zugegeben. Der Enantiomerenüberschuss des racemischen Sulfoxids war zu Beginn erwartungsgemäß 0%, änderte sich aber auch nicht, wodurch eine kinetische Racematspaltung ausgeschlossen wurde. Allerdings blieb auch der Wert für die Sauerstoffsättigung bei 0%, und somit hatte das potentielle Fermentationsprodukt in der Phase des starken Bakterienwachstums keinen direkten (oder besser als nicht-kritisch zu bezeichnenden) toxischen Effekt auf das System. Nach 5 h wurden 930 mg (7.5 mmol) Thioanisol (**1**) in die Fermentationslösung pipettiert. Unmittelbar danach begann die Sauerstoffsättigung anzusteigen, nach 24 h wurde von der Bakterienlösung kein Sauerstoff mehr verbraucht, obwohl per Schlauchpumpe ständig Glucoselösung als Kohlenstoffquelle zudosiert wurde; folglich waren die Bakterienzellen abgestorben. Dass nach Zugabe des Substrats auch kein Anstieg des Enantiomerenüberschusses erkennbar war, ist auf die in der Fermentationslösung vorhandene hohe Konzentration an racemischem Sulfoxid zurückzuführen, welches am Anfang zugegeben wurde. Kleine Mengen an produziertem enantiomerenangereicherten Sulfoxid fallen bei der Messung des *ee*-Wertes dann nicht ins Gewicht.

3.5 Toxizitätstests nach dem Blättchenverfahren

Nach den eben beschriebenen Ergebnissen des Hemmversuchs im Fermenter wurden weitere Inhibierungsversuche mittels des sogenannten Blättchentests (disc diffusion method) durchgeführt. Auch wenn dieser Test kaum quantitative Aussagen bzgl. der Toxizität eines Stoffes zulässt, so kann durch Vergleiche mit bekannten Antibiotika doch gezeigt werden, inwieweit die eingesetzten Chemikalien selber oder die gewünschten Biosyntheseprodukte das Wachstum des verwendeten Bakterienstammes einschränken oder gar verhindern. Im Gegensatz zum beschriebenen Hemmversuch im Fermenter wurden das Substrat Thioanisol (**1**) und das Produkt Phenylmethylsulfoxid (**1***) in voneinander unabhängigen Versuchsreihen getestet, wodurch den Einzelsubstanzen gewisse wachstumshemmende Eigenschaften zugeordnet werden konnten. Abbildung 3-12 zeigt Photographien von Agarplatten mit den aufgelegten Blättchen (engl. discs) und von ihnen induzierte Hemmhöfe.

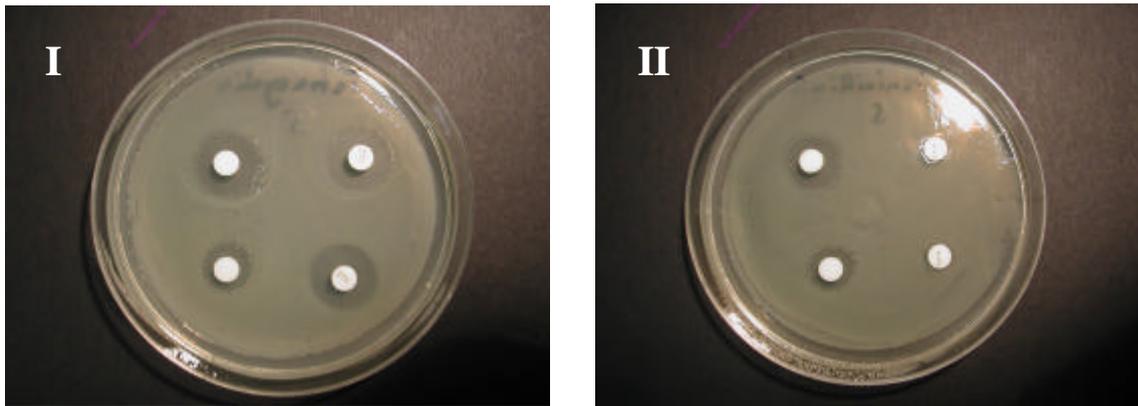


Abb. 3-12: Inhibierungsversuche mittels Blättchentest (‘disc diffusion method’)

Teilbild I: links für Thioanisol (1), rechts für Tetracyclin

Teilbild II: links für Thioanisol (1), rechts für Penicillin G

Die Inhibierungsversuche wurden beispielhaft mit dem Bakterium *Pseudomonas frederiksbergensis* -wie im Abschnitt 5.3.12 beschrieben- durchgeführt. Abbildung 3-12 (I) zeigt links oben den Vergleich von 10 µl/Disk und links unten von 5 µl/Disk Thioanisol (1) mit kommerziell erhältlichen Disks, die 10 µg/Disk Tetracyclin enthalten, das als Breitbandantibiotikum gegen Gram-positive und Gram-negative Kokken und Bakterien eingesetzt wird. Konzentrationsabhängig sind bei den mit Thioanisol (1) getränkten Blättchen deutliche Hemmhöfe zu erkennen. Selbstverständlich unterbindet auch Tetracyclin das Wachstum von *Pseudomonas frederiksbergensis* nachhaltig. Zum Vergleich wurde Penicillin G unter analogen Bedingungen eingesetzt (Abb. 3-12, Teilbild II), das nur gegen Gram-positive Keime und Gram-negative Kokken wirkt. Gram-negative Stäbchen wie *Pseudomonas frederiksbergensis* werden nicht im Wachstum gehemmt. Weiterhin wurden die Antibiotika Gentamycin (wirksam gegen Gram-positive und Gram-negative Keime) und Nystatin (wirksam gegen Hefen und Pilze) im Hemmhoftest aufgenommen. Um zumindest ein „halbquantitatives“ Maß der von Thioanisol (1) und Phenylmethylsulfoxid (1*) ausgehenden toxischen Wirkung auf *Pseudomonas frederiksbergensis* zu erhalten, wurden die Hemmhöfe ausgemessen; diese Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tab. 3-7: Inhibierungswirkung von Thioanisol (**1**) und Phenylmethylsulfoxid (**1***) auf *Pseudomonas frederiksbergensis* im Vergleich zu kommerziellen Antibiotika nach dem Blättchentest

Inhibierungszonen ^a , Durchmesser ^b [mm]					
Penicillin G	Tetracyclin	Gentamycin	Nystatin	S ^c	SO ^d
0	17	22	0	12	11
0	17	22	0	15	14

^a Jeweils zwei voneinander unabhängige Inhibierungsversuche wurden durchgeführt, 10^9 cfu pro Agarplatte.

^b Beinhaltet auch den Eigendurchmesser der Disk von 6 mm.

^c S bedeutet Sulfid Thioanisol (**1**); oberer Wert für 5 μ l, unterer Wert für 10 μ l Sulfid.

^d SO ist Phenylmethylsulfoxid (**1***); oberer Wert für 5 μ l, unterer Wert für 10 μ l Sulfoxid.

In jeweils zwei voneinander unabhängigen Inhibierungsversuchen wurden erwartungsgemäß durch Penicillin G und Nystatin keine Hemmhöfe ausgebildet. Die Blättchen mit Tetracyclin enthielten je 10 μ g Wirkstoff und induzierten Hemmhöfe von 17 mm Durchmesser (der Hemmhofdurchmesser beinhaltet auch den Eigendurchmesser der Disk von 6 mm). Der Einsatz von 10 μ g Gentamycin pro Disk produzierte Hemmhöfe von 22 mm Durchmesser. Bei 5 μ l Thioanisol (**1**) pro Disk wurden Hemmhöfe von 12 mm Durchmesser erhalten, die bei Erhöhung der Konzentration auf 10 μ l/Disk auf 15 mm anwuchsen. Auch das Sulfoxidationsprodukt Phenylmethylsulfoxid (**1***) sorgte während der 24-stündigen Inkubation der Agarplatten für -wenn auch kleinere- Hemmhöfe von 11 mm (bei 5 μ l/Disk) bzw. 14 mm (bei 10 μ l/Disk). Insgesamt wirken also sowohl das eingesetzte Substrat (Sulfid) als auch das gewünschte Produkt (Sulfoxid) auf den zur bakteriellen Sulfoxidation notwendigen Stamm wachstumshemmend, was im Diskussionsabschnitt 4.7 nochmals aufgegriffen wird.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Sulfidstruktur auf die Sulfoxidationsfähigkeit der Bakterien

Bei den Versuchen zur enantioselektiven Sulfoxidation mit einfachen organischen Sulfiden wurden -wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben- unterschiedlich ausgeprägte Enantioselektivitäten von den verwendeten Bakterienstämmen hervorgerufen. Nicht nur, dass der aus der Spezies *Pseudomonas frederiksbergensis* isolierte Stamm 33 grundsätzlich *R*-selektive Sulfoxide bildete, auch war die Größenordnung des *ee*-Wertes stark von der chemischen Struktur der zur bakteriellen Sulfoxidation eingesetzten Sulfide abhängig. Dies war bei den beiden Stammgruppen *Pseudomonas frederiksbergensis* / Isolat 33 und *Arthrobacter aurescens* / Isolat 49 deutlich zu erkennen. Generell muss festgehalten werden, dass das Isolat 33 im Vergleich zu seinem kommerziell erhältlichen Referenzstamm immer einen geringeren Enantiomerenüberschuss bildete, allerdings unter strikter Bevorzugung des *R*-Sulfoxids. Dagegen lieferte Isolat 49 höhere *ee*-Werte als dessen Referenzstamm *Arthrobacter aurescens*. Abhängig von der Sulfidstruktur sanken die *ee*-Werte bei Umsetzungen mit Isolat 49 ab, was letztlich für racemische Sulfoxidation mit *Arthrobacter aurescens* sorgte (vgl. Tab. 3-4). Allerdings wurden nur Spuren an racemischem Sulfoxid detektiert, weshalb davon ausgegangen wird, dass das entsprechende Substrat in diesen Fällen vom Bakterium nicht zur Sulfoxidation akzeptiert wurde. Somit wurde lediglich umgebungsluftabhängiges Autoxidationsprodukt registriert.

Trotzdem ist bei der enantioselektiven Sulfoxidation der organischen Sulfide **1-11** durch die eingesetzten Bakterienstämme eine eindeutige Tendenz bezüglich des Einflusses der Sulfidstruktur auf die Enantiomerenüberschüsse zu erkennen. Diese sollen dem Beispiel von *Pseudomonas frederiksbergensis* folgend aufgezeigt werden. Die Höhe des *ee*-Wertes ist dabei nicht immer vergleichbar, aber der Einfluss der verschiedenen Substituenten am Thioanisol-Grundgerüst ist auf sämtliche bakteriellen 'whole-cell'-Systeme zu übertragen (anhand Tabelle 3-4 zu vergleichen). Das Modellsubstrat

Thioanisol (**1**), dessen IUPAC-Name Phenylmethylsulfid die Grundstruktur der verwendeten Sulfide mit einer arylischen Komponente und einer direkt daran gebundenen Thiomethyl-Funktionalität beschreibt, wurde mit einem hohen Enantiomerenüberschuss von 91% sulfoxidiert. Eine *para*-Substitution wie in den Fällen von *p*-Tolylmethylsulfid (**2**), 4-Methoxythioanisol (**5**) und 4-Chlorthioanisol (**8**) führte im Wesentlichen zu enantiomerenreinen Sulfoxiden. Interessanterweise ist hierbei die Enantioselektivität unabhängig vom elektronischen Einfluss der *para*-Substituenten, die offensichtlich eine perfekte Passform am Aktionszentrum des für die enantioselektive Sulfoxidation verantwortlichen Enzyms gewährleisten und für hohe Enantioselektivitäten durch eine optimale räumliche Anordnung sorgen. Sowohl die Oxidation von Sulfiden mit „elektronenschiebenden“ Gruppen (Me, MeO) als auch die mit einer „elektronenziehende“ Gruppe (Cl) brachten exzellente *ee*-Werte (> 95%) hervor.

Zur Überprüfung des Effekts der Alkylseitenkette am zu oxidierenden Schwefelatom wurde *n*-Propylphenylsulfid (**3**) als Substrat für die enantioselektive Sulfoxidation eingesetzt. Dabei wurden niedrigere *ee*-Werte gemessen, womit ein ausgeprägter Einfluss der Alkylseitenkette auf die Enantioselektivität der Sulfoxidation festgestellt wurde. Dieser Effekt wurde bei Verwendung des Isopropylderivates **4** deutlich verstärkt. Generell wurden Sulfide mit einer verzweigten Alkylseitenkette vom Enzymsystem der Bakterien nicht zur Anreicherung eines der Enantiomere in der asymmetrischen Sulfoxidation akzeptiert.

Die erfolgreichen Umsetzungsreihen mit 2-Hydroxythioanisol (**6**) zeigen, dass eine einzelne OH-Funktionalität sogar in direkter Nachbarschaft zur Schwefel-Methyl-Bindung die Höhe des *ee*-Wertes positiv beeinflusst. Dagegen kommt die bakterielle Sulfoxidation bei Einführung einer Methoxygruppe und einer Hydroxygruppe, wie im Substrat 2-Methylthio-4-hydroxyanisol (**7**), vollkommen zum Erliegen. Aufgrund der förderlichen Effekte der MeO- und der OH-Gruppe als Monosubstituenten in der Enantioselektivität, sind die Gründe des Versagens beim 2-Methylthio-4-hydroxyanisol (**7**) in dessen sterischer Sperrigkeit zu suchen, die vermutlich die Anlagerung des Moleküls an die Enzymbindungsstelle verhindert. Die mit 2-Aminothioanisol (**9**)

durchgeführten Versuchsreihen verdeutlichen, dass Aminoverbindungen für die enantioselektive Sulfoxidation mit den vorhandenen bakteriellen Systemen nicht in Betracht kommen.

Aber nicht nur Arylalkylsulfide, sondern auch Dialkylsulfide wurden zu optisch aktiven Sulfoxiden umgesetzt. Bestes Beispiel war Cyclohexylmethylsulfid (**10**), mit dem allerdings geringere *ee*-Werte als für Phenylmethylsulfoxid (**1***) erzielt wurden (vgl. Tab. 3-4). Somit ist die arylische Komponente im organischen Sulfid maßgeblich an der hohen Kontrolle der Enantioselektivität verantwortlich.

Abschließend wurde noch ein Benzylderivat umgesetzt, um die Bedeutung der Stellung des Schwefelatoms in der Sulfidstruktur zu prüfen. Leider wurde Benzylmethylsulfid (**11**) nicht als Substrat in der bakteriellen Sulfoxidation angenommen, was eine Nachbarschaft der Schwefelfunktion zum Arylringsystem des Substrats zwingend erfordert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass organische Sulfide mit einer Schwefelfunktion in direkter Nachbarschaft zu einem arylischen Ringsystem ohne sperrige Seitengruppen sich gut als Substrate in der bakteriellen enantioselektiven Sulfoxidation eignen. Eine *para*-Substitution am Phenylring wirkt sich zusätzlich positiv aus. Die Bildung eines bevorzugten Enantiomers durch das im Bakterienstamm für die asymmetrische Sulfoxidation verantwortliche Enzymsystem blieb jeweils über das ganze Substratscreening konstant. Dies war beispielsweise in der einzigen, bekannten Studie zur unterschiedlichen Enantioselektivität in Sulfoxidationsreaktionen durch ein und denselben Bakterienstamm, nämlich *Pseudomonas putida*, nicht der Fall (vgl. Abschnitt 2.3.2, Boyd et al. 1998). Zwar wurden durch das beteiligte Enzym NDO meist das *S*-Sulfoxid und durch die rekombinante TDO das *R*-Sulfoxid aus den entsprechenden Sulfiden im Überschuss hergestellt, diese Enantiopräferenz war aber nicht konsequent für alle Substrate gegeben. Somit sind in dieser Arbeit besonders beständige, bakterielle `whole-cell`-Systeme beschrieben, die ihre biokatalytische Eigenschaft nicht erst durch molekularbiologische Veränderungen erlangten, sondern natürlicher Weise mit den gewünschten Enzymaktivitäten ausgestattet sind.

4.2 Bedeutung der Arylstruktur in Sulfiden als Substrate für die bakterielle

Sulfoxidation

Um den aus Abschnitt 4.1 bekannten Einfluss der Arylstruktur auf die Substratazeptanz durch die verwendeten bakteriellen Systeme näher zu untersuchen, wurde der Arylring in mehreren Schritten durch den Einbau eines oder auch mehrerer Stickstoffatome zunehmend verändert. Danach wurden wiederum jeweils die Enantiomerenüberschüsse der Sulfoxide aus diesen Substraten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

3-Methylthiopyridin (**12**) als N-Heterozyklus mit einem Stickstoffatom verringerte den *ee*-Wert im Vergleich zu der mit Thioanisol (**1**) sehr erfolgreichen Biokatalyse mit *Pseudomonas frederiksbergensis* auf 67% zugunsten des *S*-Enantiomers. Die zusätzliche Insertion eines zweiten Stickstoffatoms am Beispiel von 2-Methylthiopyrazin (**13**) war nur auf Kosten einer *ee*-Wert-Abnahme zu realisieren. Die Einführung einer Methylseitengruppe am Heteroaromat neben der Schwefelfunktionalität im 2-Methyl-3-methylthiopyrazin (**14**) sorgte für eine dramatische Reduktion des *ee*-Wertes. Das Triazinderivat Methylthio-*sym*-triazin (**15**) wurde nicht mehr zur bakteriellen Sulfoxidation akzeptiert.

Das Bakterienisolat 33 reagierte noch extremer auf die störenden Einflüsse der Stickstoffatome im Ringsystem des jeweiligen Substrats. War im monosubstituierten 3-Methylthiopyridin (**12**) wenigstens noch ein kleiner Enantiomerenüberschuss zugunsten des *S*-Enantiomers zu verzeichnen, wurden die Substrate **13**, **14** und **15** nicht sulfoxidiert. In dieser Versuchsreihe wurde es noch deutlicher, dass das Bakterienisolat im Vergleich zum gekauften Referenzstamm geringere *ee*-Werte liefert, dafür aber konsequent in entgegengesetzter Enantioselektivität. Bisher wurde in Studien zur enantioselektiven Sulfoxidation der Einfluss einer steigenden Zahl an Stickstoffatomen im Arylring nicht berücksichtigt.

Zur Kontrolle wurden auch hier enzymatische Umsetzungen dieser Substrate mit CPO durchgeführt, die die Substrate **12**, **13** und **14** enantiomerenrein zum *R*-Sulfoxid umsetzten. Lediglich Methylthio-*sym*-triazin (**15**) wurde von dem aufgereinigten Enzym nicht verwertet.

Hiermit konnte nochmals die Notwendigkeit der aromatischen Struktur für die bakterielle enantioselektive Sulfoxidation gezeigt werden. Eingriffe in das Ringsystem stören sowohl die davon ausgehende Hydrophobizität als auch die elektronischen Eigenschaften der Substrate und wirken sich negativ auf die *ee*-Werte aus. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass CPO selbst nicht das aktive Enzym für die Sulfoxidation im Isolat 33 darstellt. Obwohl die *R*-Selektivität grundsätzlich gegeben wäre, sprechen die gegen Null gehenden *ee*-Werte im Fall von Isolat 33 gegen eine Beteiligung von CPO am entscheidenden biokatalytischen Reaktionsschritt.

4.3 Furfuryle und Thiophene als Substrate für die bakterielle Sulfoxidation

Mit zwei weiteren Substanzklassen wurde die Substratakzeptanz der zur enantioselektiven Sulfoxidation vorgegebenen Bakterien weiter spezifiziert. Dazu wurden Furfurylmethylsulfid (**16**) und 2-(Methylthio)thiophen (**17**) mit heterozyklischen Fünfringsystemen verwendet. Beim Furfurylmethylsulfid (**16**) ist ein Sauerstoffatom im Ring enthalten, außerdem ist das zu oxidierende Schwefelatom eine Methylen-Einheit vom Fünfring entfernt. Im Gegensatz dazu befindet sich beim 2-(Methylthio)thiophen (**17**) das Schwefelatom direkt am ungesättigten Fünfring, der als Heteroatom ebenfalls Schwefel enthält. Beide Strukturen sind in Abbildung 3-6 aufgezeigt; sie wurden weder vom Stammpaar *Pseudomonas frederiksbergensis* / Isolat 33 noch von *Arthrobacter aurescens* / Isolat 49 als Substrat für die Sulfoxidation verwertet. Auch wenn diese Tatsache abzusehen war, diente sie zur erneuten Bestätigung, dass die in den eingesetzten Bakterienstämmen für die biokatalytische Sulfoxidationsreaktion verantwortlichen Enzyme einen arylischen Substituenten in der Grundstruktur für einen positiven Reaktionsverlauf voraussetzen. Zusätzlich ist die Anordnung des prochiralen Schwefelatoms in direkter Nachbarschaft zum Arylsystem ausschlaggebend. Ein möglichst ungestörtes π -Elektronensystem mit seiner Eigenschaft

der Elektronendelokalisierung scheint das Sulfoxidationssystem maßgeblich zu unterstützen.

4.4 Schwefelhaltige Pestizide als Substrate für die bakterielle Sulfoxidation

Da Sulfoxide häufig die Abbauprodukte von schwefelhaltigen Pestiziden sowohl in der Pflanze als auch im Boden darstellen, wurde diese Substanzklasse in die Substratliste für die mikrobiellen Sulfoxidationsreaktionen aufgenommen. Gerade bei den in Boden gelangten Wirkstoffen liegt eine Verstoffwechslung durch Mikroorganismen nahe. Auf dem Gebiet der phosphor- und schwefelhaltigen Pestizide sind viele Abbaureaktionen beschrieben (Kertesz et al. 1994). Lediglich die Tatsache, dass aus prochiralen, Schwefel-enthaltenden Verbindungen optisch aktive Sulfoxide resultieren können, wurde bislang nicht näher untersucht und stellte einen weiteren, innovativen Punkt der vorliegenden Arbeit dar. Das racemische Sulfoxid als Abbauprodukt hingegen ist seit langem bekannt (Miles 1991).

Der Vollständigkeit halber wurden in einer ersten Versuchsreihe die Triazinherbizide (siehe Tab. 3-6) als Substrate sowohl zur bakteriellen Sulfoxidation als auch zur enzymatischen Umsetzung mit CPO eingesetzt. Hierbei wurde noch einmal bestätigt, dass ein Sulfid mit drei im Aromaten enthaltenen Stickstoffatomen nach den in dieser Arbeit angewandten Umsetzungsmethoden keine Oxidationsbasis mehr bietet. Auch der eventuelle Einfluss der verschiedenen Seitenketten im Fall von Desmetryn[®] (**18a**), Ametryn[®] (**18b**) und Methoprotryn[®] (**18c**) ließ sich nicht bestätigen.

In weiteren Versuchsreihen wurden Pestizide verwendet, die dem Standardsubstrat Thioanisol (**1**) strukturell deutlich ähnlicher sind (vgl. Abb. 3-7). Diese Wirkstoffe enthalten allesamt Arylsysteme, und bis auf Ethiothencarb (**23**) ist die zu oxidierende Schwefelfunktionalität auch direkt daran gebunden. Dass keines der Pestizide durch die bakteriellen 'whole-cell'-Systeme verstoffwechselt wurde, lässt sich einerseits durch deren -anwendungsbedingt erwünschten- toxischen Einfluss auf lebende Spezies erklären; schließlich sind diese Verbindungen als wirkungsvolle Pestizide im Einsatz. Der Wirkmechanismus für die Pestizide ist allerdings nicht ohne weiteres auf

Mikroorganismen übertragbar. Der negative Verlauf der bakteriellen Sulfoxidation der Pestizide anhand der bisherigen Erkenntnisse lässt klar werden, dass -wie schon mehrfach erwähnt- sperrige Seitenketten am Arylsystem einen Ausschlussgrund für die Sulfoxidation durch die verwendeten Bakterienstämme darstellen. Insbesondere im Fall von Tetrasul (**24**) -mit einem Phenylrest in der Seitenkette am Schwefelatom- ist der nicht-sulfoxidierende Reaktionsverlauf eindeutig damit zu erklären.

Aufgrund dieser Resultate lag es auf der Hand, die Pestizide auch mit CPO umzusetzen, da bei einem isolierten Enzym zumindest die Toxizität ausgeblendet werden kann. Die Triazinherbizide wurden aufgrund der erfolglosen Sulfoxidationsreaktionen hier nicht mehr berücksichtigt. Zumindest für die beiden Organophosphorpestizide Fenamiphos[®] (**20**) und Fenthion[®] (**21**) verliefen die Versuche positiv, denn sie wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben, mit 74% bzw. 62% zum entsprechenden Sulfoxid umgesetzt. Wiederum ist die Struktur der Verbindungen, nämlich eine Methylthio-Funktionalität in direkter Nachbarschaft zu einem Arylsystem, dafür verantwortlich. Die als sperrig zu bezeichnenden Phosphorester in *para*-Position scheinen keinen negativen Einfluss auf die enantiomerenangereicherte enzymatische Sulfoxidationsreaktion zu haben.

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit die Absolutkonfiguration der im Überschuss gebildeten, optisch aktiven Sulfoxide von Fenamiphos[®] (**20**) und Fenthion[®] (**21**) nicht aufgeklärt wurde, so sind diese Sulfoxide dennoch erstmals enzymkatalytisch mit CPO hergestellt worden. Dass es sich bei CPO um ein sehr strukturselektives System handelt, zeigt der negative Reaktionsverlauf bei Mercaptodimethur[®] (**22**). Die zweite Methylgruppe am Arylring neben dem zu oxidierenden Schwefelatom oder der Ersatz des Phosphoresters durch eine O-Carbonylfunktion brachte die Sulfoxidation zum Erliegen. Bei Ethiophencarb[®] (**23**) wirkte sich die Methylengruppe zwischen Arylsystem und Schwefelatom zusätzlich negativ aus. Auch wenn CPO -wie weiter oben schon dargelegt- mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ein für die Sulfoxidation in den verwendeten Bakterienstämmen verantwortliches Enzym ist, so sind doch deutliche Parallelen im Hinblick auf die Substratazeptanz zu erkennen.

4.5 Omeprazol[®] und Modafinil[®]

Begründet durch deren Relevanz als pharmazeutische Wirkstoffe (vgl. Abschnitt 2.6), wurden die prochiralen Sulfide der Verbindungen Omeprazol[®] (**25***) und Modafinil[®] (**27***) erworben und zur Sulfoxidation eingesetzt. Betrachtet man die Strukturformeln der Sulfide (Abb. 3-8), wird allerdings schnell klar, dass sich diese Substanzen mit den hier verwendeten biokatalytischen Systemen nicht effektiv umsetzen lassen. Weder mit *Arthrobacter aurescens* und *Pseudomonas frederiksbergensis* noch mit dem isolierten Enzym CPO gelang die Biokatalyse der entsprechenden Sulfoxide. Der Versuch war aber aus wissenschaftlichen Gründen berechtigt. Mit dem Pilz *Cunninghamella echinulata* MK40 hatte man derartige Sulfide bereits mikrobiell erfolgreich zum entsprechenden optisch aktiven Sulfoxid umgesetzt (Yoshida et al. 2001).

4.6 Einsatz des Bioreaktors

Aufgrund des biotechnologischen Interesses der Produktion von optisch aktiven Sulfoxiden im großtechnischen Maßstab war ein Kapitel dieser Arbeit der Übertragung der mit den einfachen organischen Sulfiden in Schüttelkulturen erzielten Ergebnisse auf einen Bioreaktor (Fermenter) gewidmet. Ziel war es, die Anwendbarkeit der asymmetrischen Sulfoxidation mit dem Stamm *Pseudomonas frederiksbergensis* grundsätzlich abzuklären, der in den Schüttelkulturen immer die besten Umsetzungsraten und Enantioselektivitäten lieferte. Die einzelnen *ee*-Werte und Reaktionsverläufe sind dem Abschnitt 3.4 zu entnehmen, auch soll hier nicht mehr auf technische Details des Fermentationsprozesses aus Abschnitt 5.3.7 eingegangen werden. Die Bewertung der aufgetretenen Probleme und deren Lösungsansätze stehen im Vordergrund der Diskussion.

In strenger Anlehnung an die Ergebnisse des Bakterienwachstums in der Zellzahlstudie mit *Pseudomonas frederiksbergensis* (vgl. Abb. 3-9) wurden Fermentationen mit dem Standardsubstrat Thioanisol (**1**) durchgeführt. Auch wenn der *ee*-Wert des (*S*)-Phenylmethylsulfoxids [(*S*)-**1***] durchweg bei > 95% lag und die Umsetzung damit als enantiomerenrein bezeichnet werden kann, ließ die Ausbeute zu wünschen übrig.

Große Teile des permanent zudosierten Sulfids verflüchtigten sich unter den vorgegebenen Umsetzungsbedingungen aus dem Reaktionsansatz. So stand der Anteil an eingesetztem Sulfid mit der Menge an isoliertem Sulfoxid in keinem Verhältnis, schon gar nicht im Hinblick auf eine potentielle biotechnologische Anwendbarkeit. Auch die Verwendung des weniger flüchtigen 4-Chlorthioanisols (**8**) als Substrat im Fermentationsprozess konnte diesen Nachteil nicht maßgeblich beheben. Die zum Bakterienwachstum nötige Wärme, der Luftdurchsatz sowie die hohen Drehzahlen des Rührwerks (zur optimalen Sauerstoffversorgung der wachsenden Bakterien) waren für hohe Verluste verantwortlich. So war es nur durch Einkalkulierung des in einer Blindfermentation ermittelten Verlustes an Sulfid möglich, korrigierte und damit für die Fermentation eigentlich aussagekräftige Werte für die Ausbeute an enantiomerenreinem Sulfoxid zu erhalten (vgl. Abb. 3-10). Das (*S*)-Phenylmethylsulfoxid [(*S*)-**1***] war allerdings leicht isolierbar und stand als Referenz für die Enantiomerenanalytik zur Verfügung.

Es bleibt also festzuhalten, dass der Fermentationsprozess an sich zwar problemlos einzuleiten und zu steuern war, die verwendeten Sulfide als Substrate sich aber nicht zur Anwendung im Bioreaktor mit dem Bakterium *Pseudomonas frederiksbergensis* eigneten. Die Sulfoxidation von Omeprazolsulfid (**25**) mit dem oben genannten Pilz *Cunninghamella echinulata* MK40 stellt aber beispielsweise sehr wohl eine großtechnische biotechnologische Anwendungsmöglichkeit auf dem Gebiet der mikrobiellen enantioselektiven Sulfoxidation dar.

Wie sich erst später herausstellte, haben die Sulfide selbst, wie auch die resultierenden Sulfoxide, einen toxischen Einfluss auf die eingesetzten Bakterienstämme. Dies wurde ebenfalls in einem Fermentationsversuch mit *Pseudomonas frederiksbergensis* bestätigt, bei dem den in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterien nacheinander Phenylmethylsulfoxid (**1***) und dann Thioanisol (**1**) zugegeben wurde (vgl. Abb. 3-11). Dazu machte man sich die Messmöglichkeit der im Fermenter angebrachten Sauerstoffelektrode zunutze. Befinden sich die aeroben Bakterien im Wachstum, wird viel Sauerstoff verbraucht; sterben sie ab, steigt die Sauerstoffsättigung im Medium langsam auf 100%. Die Zugabe von Sulfoxid zeigte nicht sofort einen

direkten Einfluss auf das Bakterienwachstum, bei Addition von Sulfid allerdings war ein unmittelbares Absterben der Bakterienzellen am deutlichen Anstieg der Sauerstoffsättigung zu erkennen. Wenn also die Substrate direkt und die Produkte der biokatalytischen Reaktion (eventuell zeitverzögert) toxisch auf die sulfoxidierenden Bakterien wirken, scheidet von vorne herein der Einsatz des Bioreaktors. Dies ändert aber nichts an der Tatsache, dass beispielsweise in *Pseudomonas frederiksbergensis* ein effektives Enzymsystem zur enantiomerenreinen Sulfoxidation vorhanden ist. Die Isolierung und Charakterisierung dieses Oxidationsenzym sowie dessen enantiokomplementäres Analogon in *Pseudomonas frederiksbergensis* Isolat 33 stellt somit ein attraktives, vielversprechendes und vorrangiges Aufgabenfeld für künftige Forschungsprojekte dar.

4.7 Toxizitätsbewertung nach dem Blättchentest

Die im Abschnitt 4.6 diskutierten Ergebnisse bzgl. toxischer Einflüsse von Sulfid und Sulfoxid auf das Bakterienwachstum wurden zumindest halbquantitativ mit Hilfe des sog. Blättchentests (disc diffusion method) nachvollzogen. Nach der im Abschnitt 5.3.12 beschriebenen Methode wurde das Modellsystem mit *Pseudomonas frederiksbergensis* als Bakterienstamm und Thioanisol (**1**) oder Phenylmethylsulfoxid (**1***) als potentiell toxische Verbindungen verwendet. Wie aus Tabelle 3-7 ersichtlich, bilden sowohl das auf die Disks aufgetragene Sulfid als auch das Sulfoxid Hemmhöfe, die in ihrer Größe mit den Hemmhöfen kommerziell erhältlicher Antibiotika durchaus vergleichbar sind. Natürlich ist die Konzentration des entsprechenden Wirkstoffes bei Tetracyclin oder Gentamycin mit 10 µg pro Disk um den Faktor 1000 geringer als bei 10 µl Sulfid oder Sulfoxid pro Disk, was aber bei den hochwirksamen Antibiotika auch durchaus zu erwarten ist. Immerhin konnte so die Größenordnung eines toxischen Einflusses des eigentlich als Umsetzungsedukt eingesetzten Sulfids und des als Produkt zu erwartenden Sulfoxids auf das Bakterienwachstum abgeschätzt werden. Weiterhin wurde mittels dieser qualitativen Sonde der toxische Effekt vom Sulfoxid überhaupt erst nachgewiesen, da im Fermentationstest kein unmittelbarer, schneller Anstieg der Sauerstoffkonzentration bei Zugabe von Phenylmethylsulfoxid (**1***) gemessen wurde. Offensichtlich läuft die Inhibierung des Bakterienwachstums durch das Sulfoxid

langsamer und auch in geringerem Ausmaß (kleinere Hemmhöfe) ab. Das Sulfid hingegen hat einen schnelleren, ausgeprägten toxischen Effekt auf *Pseudomonas frederiksbergensis*. Dieser Nachteil lässt nun keinen Zweifel mehr an der Ursache des ungünstigen Verlaufs der Fermentationsreaktionen im Speziellen und der geringen Ausbeuten im Substratscreening im Allgemeinen.

4.8 Die neue Subspezies *Pseudomonas frederiksbergensis* Isolat 33

Das Bodenisolat 33 wurde -wie auch fünf weitere Stämme (vgl. Tab. 3-2)- nach einer standardisierten genotypischen Methode auf Grundlage der 16S rRNA als *Pseudomonas frederiksbergensis* identifiziert. Die Tatsache, dass das Isolat 33 im Vergleich zum kommerziell erhältlichen *Pseudomonas frederiksbergensis* (DSM 13022) ausschließlich das entgegengesetzte Stereoisomer in den Sulfoxidationsreaktionen mit Arylalkylsulfiden bildete, verpflichtete zu erheblich ausführlicheren und spezielleren Charakterisierungsmethoden bezüglich dieses neuen Phänomens. Diese detaillierten Untersuchungen beinhalteten Farb- und Assimilationsreaktionen, Oberflächenfettsäureprofile, direkte RNA-Vergleiche und letztlich noch die Spezialtechnik des Siderophore-Typings. Die ausgeprägte Homologie zwischen Isolat 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* wurde bei allen angewandten Methoden bestätigt. Besonders das Siderophore-Typing mit einem weiteren Stamm derselben Spezies (JAJ 28 aus der Sammlung von Prof. Meyer) zeigte, dass Isolat 33 denselben Siderotyp aufweist wie DSM 13022 und JAJ 28 und somit als *Pseudomonas frederiksbergensis* einzustufen ist. Somit sind zum ersten Mal zwei natürliche, nicht genetisch manipulierte Stämme von *Pseudomonas frederiksbergensis* beschrieben, die entgegengesetzte Enantioselektivität in allen Sulfoxidationsreaktionen mit mehreren organischen Sulfiden als Substrate aufweisen. Bis heute gibt es nur ein weiteres Beispiel für dieses Phänomen der entgegengesetzten Enantioselektivität, nämlich bei der Sulfoxidation durch *Pseudomonas putida* mit einer Naphthalindioxygenase (NDO), verglichen mit einem rekombinanten Stamm derselben Spezies, der eine Toluoldioxygenase (TDO) enthält (Boyd et al. 1998).

Selbstverständlich müssen sich die beiden anscheinend „identischen“ Stämme auf molekularer Ebene, wenn auch nur minimal, unterscheiden. Wenn man davon ausgeht, dass die unterschiedlichen Enantiomere von verschiedenen Enzymen produziert werden, dann sollten sich *Pseudomonas frederiksbergensis* Isolat 33 und *Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022 zumindest in den Aminosäuresequenzen unterscheiden, die für die Sulfoxidationsenzyme kodieren. Deshalb wäre es eine vorrangige Aufgabe, diese Enzyme zu isolieren und zu charakterisieren. Der ausschlaggebende Unterschied auf molekularer Ebene zwischen den beiden Stämmen von *Pseudomonas frederiksbergensis* ist aber nicht ein durch molekularbiologische Manipulation herbeigeführter, sondern ein genuiner, der möglicherweise durch Umwelteinflüsse begründet ist. Vielleicht hat genau an der Stelle im Enzym eine Punktmutation stattgefunden, die als aktives Zentrum im Enzym für die asymmetrische Sulfoxidation verantwortlich ist. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine Veränderung im Umfeld des Bakteriums den biosynthetischen Zyklus beeinflusst und damit zur Bildung eines differenzierten Enzymsystems geführt hat. Solche Beispiele sind aus der Literatur bekannt (Croal et al. 2004).

Es könnten auch die beschriebenen NDO- und TDO-Enzyme (Boyd et al. 1998) an den hier beschriebenen Sulfoxidationsreaktionen durch *Pseudomonas frederiksbergensis* beteiligt sein. Insgesamt lässt sich festhalten, dass das hier vorgestellte neue Phänomen der Produktion von Sulfoxiden mit entgegengesetzter Enantioselektivität durch zwei geno- und phänotypisch identische Spezies von *Pseudomonas frederiksbergensis* eine prioritätsmäßige, intensive Suche nach derartigen natürlichen Mikroorganismen rechtfertigt.

5 Experimentalteil

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die für die Biotransformationen verwendeten Chemikalien wurden alle von den Firmen Acros (Acros Organics, Geel, Belgien), Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), ChemPur (ChemPur Feinchemikalien und Forschungsbedarf GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Aldrich-Gruppe), Lancaster (Lancaster Synthesis GmbH, Frankfurt, Deutschland), Riedel de Haën (Aldrich-Gruppe), Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Aldrich-Gruppe) in p.a Qualität bezogen. Bei diesen Firmen wurden auch die Edukte für die Synthese von 2-Methylthio-4-hydroxyanisol, 3-Methylthiopyridin und Methylthio-*sym*-Triazin (siehe 5.4) gekauft. Der Standard Methods Agar stammt von Bio Mérieux (bioMérieux, Nürtingen, Germany). Die Testplättchen für die antimikrobiellen Tests (antimicrobial susceptibility test discs) lieferte Oxoid (Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland). Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert.

5.1.2 Enzyme

Die im Rahmen der Sequenzierung der isolierten Bakterienstämme verwendeten Polymerasen AmpliTaq[®] GOLD DNA-Polymerase sowie die AmpliTaq[®] DNA-Polymerase, FS wurden von Perkin Elmer erworben (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

Für die Enzymumsetzungen wurde die Chlorperoxidase von Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) bezogen und ist folgendermaßen spezifiziert: Chlorperoxidase (EC 1.11.1.10) from *Caldariomyces fumago*, crude suspension in 0.1 M sodium phosphate, pH 4; 22300 units/ml (1 unit oder 1 U katalysiert

die Umsetzung von 1.0 μmol Monochlordimedon pro min bei einem pH-Wert von 2.75 und einer Temperatur von 25 °C in Gegenwart von Kaliumchlorid und H_2O_2 .

5.1.3 Mikroorganismen

Die für diese Arbeit eingesetzten Bakterienstämme stammen aus zwei Bodenproben, die im Frühjahr 2001 aus dem heimischen Garten in Geiselwind entnommen wurden. Nach Isolierung, Reinzucht und phänotypischer Charakterisierung wurde die genotypische Charakterisierung am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch den Identification Service der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bestätigt. Zur weiteren Absicherung des Identifizierungsergebnisses wurde für *Pseudomonas frederiksbergensis* ein Siderophore Typing von Prof. Meyer (Laboratoire de Microbiologie et Génétique, Strasbourg, Frankreich) durchgeführt.

Die entsprechenden Referenzstämme wurden ebenfalls von der DSMZ bezogen:

Pseudomonas frederiksbergensis (DSMZ Nr. 13022)

Arthrobacter aurescens (DSMZ Nr. 20116)

5.1.4 API 20 NE Testkit

Für die phänotypische Charakterisierung der isolierten Bakterienstämme wurde der API 20 NE Testkit für nicht anspruchsvolle, Gram-negative Stäbchen eingesetzt. Dieser wurde speziell für die den *Enterobacteriaceae* untergeordnete Gattungen entwickelt, z.B. den Pseudomonaden. Der Testkit wurde von Bio Mérieux (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) bezogen und der entsprechende Bakterienstamm gemäß beiliegendem Auswertungsbogen zugeordnet.

5.1.5 Dünnschichtchromatographie

Träger: DC Alufolien-Fertigplatten Kieselgel F_{254} , Schichtdicke 0.2 mm (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland). Detektion: UV bei 254 nm

5.2 Geräte

5.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

GC 1: Varian Aerograph 3300 (Varian, Darmstadt, Deutschland)

Injektor:	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 220 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250 °C
Trennsäule:	J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm:	50 °C, 3 min isotherm, 4 °C/min, 240 °C, 10 min isotherm
Trärgas:	2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure
Make-up Gas:	30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergase:	30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min Luft

GC 2: Fisons Instruments GC 8160 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)

Injektor:	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 250°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 310 °C
Trennsäule:	SGE RH-5 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm:	60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm
Trärgas:	2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure
Make-up Gas:	30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergase:	30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min Luft

Datenaufnahme und –auswertung mittels Software *Chrom-Card for Windows*.

5.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

GC 3: Fisons Instruments GC 8060 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)

Injektor: Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Autosampler: Fisons AS 800
Trennsäule: SGE RH-5 MS (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm: 60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm
Trärgas: 2.0 ml/min Helium 5.0, constant pressure

MS 1: Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)

Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur: Ionenquelle 220 °C, Transferline 300 °C
Quellendruck: $1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplikator: 350 V
Massenbereich: 38-450 u

Datenaufnahme und –auswertung mittels *Xcalibur*

GC 4: Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, USA)

Injektor: Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 220 °C
Autosampler: Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule: J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm: 50 °C, 3 min isotherm, 4 °C/min, 250 °C, 10 min isotherm
Trärgas: 2.0 ml/min Helium 5.0, constant flow

MS 2: Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)

Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur: Ionenquelle 150 °C, Transferline 250 °C
Quellendruck: $1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multiplikator: 1300 V
Massenbereich: 38-450 u

Datenaufnahme mittels *HP Chem Station*, nach Konvertierung mit *File Converter*
 Datenauswertung mittels *Xcalibur*

5.2.3 Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)

GC 5: Zweisäulenofen SiChromat (Siemens, Karlsruhe, Deutschland)

Injektor:	Split Injektor (1:20), Temperatur 220 °C
Detektor 1:	Flammionisationsdetektor, Temperatur 250 °C
Detektor 2:	Flammionisationsdetektor, Temperatur 220 °C
Trennsäule 1 (achiral):	J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trennsäule 2 (chiral):	2,3-Diethyl-6- <i>t</i> -butyl-dimethyl- β -cyclodextrin-Phase
Temperaturprogramm:	Säule 1: 60 °C, 10 °C/min, 240 °C, 10 min isotherm Säule 2: 60 °C, 20 min isotherm, 2 °C/min, 200 °C
Trärgas:	Helium 5.0, Ofen 1: 1.75 bar, Ofen 2: 1.0 bar
Make-up Gas:	Stickstoff 5.0
Brennergase:	Wasserstoff 5.0, Luft
Säulenkopplung:	„Life-T-Stück“, pneumatische Säulenkopplung

GC 6 und 7: 2 Öfen gekoppelt zur chiralen Trennung (Fisons Instruments GC 8160 und 8130, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)

Injektor:	Split Injektor (1:20), Temperatur 220 °C
Detektor 1:	Flammenionisationsdetektor, Temperatur 250 °C
Detektor 2:	Flammenionisationsdetektor, Temperatur 220 °C
Trennsäule 1 (achiral):	J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trennsäule 2 (chiral):	2,3-Diethyl-6- <i>t</i> -butyl-dimethyl- β -cyclodextrin-Phase
Temperaturprogramm:	Säule 1: 60 °C, 10 °C/min, 240 °C, 10 min isotherm Säule 2: 60 °C, 20 min isotherm, 2 °C/min, 200 °C
Transferkapillaren:	0.25 mm I.D., unbelegt desaktiviert, Temperatur 200 °C
Trärgas:	Helium 5.0, Säulenkopfdruck 165 kPa

Make-up Gas:	Stickstoff 5.0
Brennergase:	Wasserstoff 5.0, Luft
Säulenkopplung:	<u>M</u> oving <u>C</u> olumn <u>S</u> witching <u>S</u> ystem, MCSS, elektrisch betrieben, eingebaut in einem Glasdom (desaktiviert, inert) in Ofen 1 zwischen Säule 1 und 2, mechanische, ventillose Säulenkopplung
Domdruck:	72 kPa
Mitteldruck:	85 kPa

Anstelle von Detektor 2 wird an das Ende der chiralen Säule in der Regel das Massenspektrometer MS 1 mit Hilfe einer beheizten Transferkapillare gekoppelt. So sind MDGC-MS Messungen möglich.

5.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker NMR (400/100 Hz)
Lösungsmittel:	CDCl_3 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wird relativ zum Lösungsmittelsignal (^1H -NMR: 7.27 ppm, ^{13}C -NMR: 77.0 ppm) oder unter Verwendung des Standards Trimethylsilan [(TMS) $\delta = 0.00$] angegeben. Zur Wiedergabe der Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Die Kopplungskonstante J wird in Hertz angegeben.

5.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Gerät:	Zeiss DSM962 scanning electron microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
optimaler Arbeitsabstand:	6 mm
Kathodenstrom:	70 A
Sputtersystem:	SCD005 für Palladium/Kohle, Bal-Tec, Witten,

Deutschland

kritische CO₂-Trocknung: CPD030, Ba-Tec, Schalksmühle, Deutschland

5.2.6 Geräte für mikrobiologische Umsetzungen

Autoklav 1:	Wolf Sanoclav, Typ StS-201, Wolf, Geislingen, Deutschland
Autoklav 2:	Dampfsterilisator Vakulab S3000, Münchner Medizin Mechanik, München Deutschland
Temperatur:	121 °C
Autoklavierzeit:	16 min
Sterile Werkbank:	Laminar Airflow Bench, Nuair, Modell Nr. NU440600E, Plymouth, UK
Inkubationsschrank:	Heraeus Typ T6, Kandro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Schüttelinkubatoren:	GFL 3031, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland GFL 3033, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Temperatur:	30 °C
Schüttelgeschwindigkeit:	120 upm
Bioreaktor:	Bio Flow 3000, New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kompressor:	Jun Air Modell 6, Jun Air, Nørresundby, Dänemark
Kühlzentrifuge:	Beckmann J2-21, Rotor JA 10, Beckman Zentrifugen, Krefeld, Deutschland

Betriebsparameter:	9000 upm, 4 °C, 20 min
Mikroskop:	HM-LUX (4-10-40x16), Typ 307, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zählkammer:	Netzteilung nach Thoma (420), Supe Rior, Marienfeld, Deutschland
Abmessungen:	Tiefe 0.100 mm, 400 Quadrate je 0.0025 mm ²

5.2.7 Sonstige Geräte

Photometer:	Spectronic [®] Genesys [™] 2 PC, Spectronic Instruments, Milton Roy Company, USA
Waagen:	Mettler PL 300, Analysenwaage, Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland Mettler P 1200N, Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland Sartorius BP 210 S Analysenwaage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Rotationsverdampfer:	Büchi Rotavapor mit Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz, Deutschland)
Kühlmittelpumpe:	KLP 2209 Multitemp, KLB Produkter, Bromma, Schweden
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex TK 52, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland

Vortexer:	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
pH-Meter:	WTW pH 330, Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
UV-Lampe:	Benda NU-6KL, Benda, Wiesloch, Deutschland
RNA-Sequenzbestimmer:	373A automatischer Sequenzbestimmer für RNA/DNA Bestimmungen, ABI, Weiterstadt, Deutschland

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.3.1 Herstellung von Agarplatten

Als Vollmedium wurde im Bakterienscreening (Isolierung einzelner Bakterienkulturen aus den Mikroorganismen der Bodenprobe, siehe 5.3.2) und zur Kultivierung der vereinzelt Reinkulturen der sogenannte Standard Methods Agar der Firma bioMérieux verwendet, dessen Rezept für einen Liter demineralisiertes Wasser in Tabelle 5-1 dargestellt ist.

Tab. 5-1: Zusammensetzung des Standard-Methods-Agar^a

Bestandteil	Konzentration [g/l]
Pankreashydrolysat von Casein (bio-Trypcase)	5.0
Hefeextrakt	2.5
Glucose	1.0
Agar	15.0

^a Eingesetzt im Bakterienscreening sowie zur Bakterienlagerung.

In der Laborpraxis werden allerdings immer nur 5.875 g des Standard Methods Agar in 250 ml demineralisiertem Wasser suspendiert, unter Erhitzen gelöst und dann autoklaviert; dadurch kühlt das keimfreie Medium schneller auf ca. 50 °C ab und wird in der

sterilen Werkbank blasenfrei in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren ist der Nährboden einsatzbereit und kann auch einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Nur im Bakterienscreening wird ein Minimalnährboden verwendet. Hierzu dient 1.5% Agar in Wasser gelöst, autoklaviert, evtl. mit einer Kohlenstoffquelle und/oder einem Substrat versetzt und ebenfalls in Petrischalen blasenfrei gegossen.

5.3.2 Isolierung von Mikroorganismen aus einer Bodenprobe

Zur Isolierung von Mikroorganismen aus einer Bodenprobe wurde ca. 1 g Gartenerde in 50 ml sterilisiertes Leitungswasser gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Vom Überstand wurden 100 µl in 900 µl sterile Salinelösung pipettiert und daraus eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100000 hergestellt. Jeweils 100 µl der unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurden auf verschiedene Nährböden ausplattiert:

I Minimalagar mit verschiedenen Konzentrationen Thioanisol als Substrat (einzige Kohlenstoffquelle)

II Minimalagar mit verschiedenen Konzentrationen Glucose als Kohlenstoffquelle und Thioanisol als schwefelhaltiges Substrat

III Standard Methods Agar (Vollmedium)

Je nach Wachstum und Kolonienzahl wurden die Platten 18 bis 138 h bei 30 °C inkubiert. Sobald deutliches Wachstum erkennbar war, wurden die entsprechenden Petrischalen aus dem Inkubationsschrank genommen, **einzelne** Kolonien mit einer sterilen Impföse vom Agar abgenommen („gepickt“, deshalb auch „Pick“-Verfahren) und auf frisch hergestellte Vollmediumplatten übertragen. Die so erhaltenen Reinkulturen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und alle vier bis sechs Wochen auf frischen Standard Methods Agar umgeimpft. So standen die isolierten Stämme jederzeit für Umsetzungen in Schüttelkulturen zur Verfügung.

5.3.3 Herstellung der Wachstumsmedien

Zur Anzucht der Stämme für bakterielle Umsetzungen wurde ein Minimalmedium nach Dworkin verwendet (Tab. 5-2, Dworkin und Forster 1958). Vor dem Autoklavieren

wurden jedem 100 ml Ansatz 375 µl einer sogenannten *Pseudomonas* Spurenelementlösung zugegeben (Tab. 5-3, Atlas 1993). Das Nährmedium wurde nun für 16 min bei

Tab. 5-2: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Dworkin^a

Salz	Summenformel	Konzentration [g/l]
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	4.0
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	6.0
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	0.2

^aStandardmedium zur Anzucht von Flüssigkulturen im Bakterien- und Substratscreening.

Tab. 5-3: Zusammensetzung der *Pseudomonas* Spurenelementlösung^a

Substanz	Summenformel	Menge [mmol]	Konzentration [mg/l]
Borsäure	H ₃ BO ₃	3.7	232
Eisensulfat-Heptahydrat	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.065	180
Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.0	174
Cobaltsulfat-Heptahydrat	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.34	96
Ammoniummolybdat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.019	22
Kupfersulfat-Pentahydrat	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03	8
Mangansulfat-Monohydrat	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.035	6

^aZugesetzt zu jeder bakteriellen Umsetzung mit Dworkin-Medium.

121 °C autoklaviert und nach der Abkühlung wurden 750 µl 50%ige Glucoselösung zupipettiert, um nichtenzymatische Bräunungsreaktionen (Maillard-Reaktionen) und somit eine Verfärbung des Mediums (verbunden mit einem Verbrauch der zugesetzten Glucose während der Heißbehandlung im Autoklaven) zu vermeiden. Das so hergestellte Nährmedium stand jederzeit zur Animpfung mit Bakterienmaterial zur Verfügung.

5.3.4 Phänotypische Charakterisierung mittels APIZYM 20 NE Test

Das APIZYM 20 NE Testsystem dient zur Charakterisierung und Identifizierung von Gram-negativen Bakterien, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae gehören. Der acht konventionelle und zwölf Assimilations-Reaktionen enthaltene Teststreifen wurde zur Klassifizierung von sogenannten Nonfermentern eingesetzt und fand bei der Einteilung von nicht anspruchsvollen Bakterienstämmen Anwendung, wie sie häufig in Bodenproben vorkommen. Die physiologischen Tests wurden in miniaturisierter Form in kleinen Kunststoffbechern durchgeführt, die auf einem Plastikstreifen angeordnet waren (siehe Abb. 5-1).



Abb. 5-1: API 20 NE Teststreifen zur phänotypischen Charakterisierung von nicht anspruchsvollen, Gram-negativen Bakterien

Vom unbekanntem Stamm wurde eine Kolonie von einer Agarplatte unter sterilen Bedingungen entnommen und in 0.85%iger Natriumchloridlösung suspendiert. Mit dieser Lösung wurden die Kunststoffbecherchen für die konventionellen Tests (Nitratreduktion, Indol-Nachweis, Glucosefermentation, Arginindihydrolase, Urease, β -Glucosidase, Protease, β -Galactosidase) befüllt, die die entsprechenden Substrate in dehydratisierter Form enthalten. Positive oder negative Reaktionen wurden durch Farbumschläge ermittelt, die spontan auftraten oder mit Hilfe von weiteren Reagenzien während der 24- oder 48-stündigen Inkubation des Teststreifens bei 30 °C erfolgten. Zur Überprüfung der Assimilationsreaktionen (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannit, N-Acetylglucosamin, Maltose, Gluconat, Caprat, Adipat, Malat, Citrat und Phenylacetat) wurde die Bakteriensuspension in ein mitgeliefertes Minimalmedium (AUX-Medium) gegeben, welches anschließend in die Inkubationsbecher gefüllt wurde. Für anaerobe Reaktionen wurden die kleinen Becher mit Paraffinöl überschichtet. Auch

hier konnte nach 24 oder 48 Stunden eine positive Substratverwertung anhand einer deutlich sichtbaren Trübung abgelesen werden. Mit einem der APIZYM-Packung beiliegenden Auswertungsschema erhielt man einen Zahlencode, der dann in einem Profilindex nachgeschlagen werden konnte und in dem der entsprechende Name des identifizierten Stammes hinterlegt war.

5.3.5 Genotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

Für die zur genotypischen Charakterisierung notwendigen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die intakten Zellen nach der Methode von Woods et al. (1993) vorbereitet. Unter Verwendung von literaturbekannten Primern, die spezifisch für das 16S rRNA-Gen sind, wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte mittels einer PCR vervielfältigt. Vor der Sequenzierung wurden die eigentlichen Amplikone dann von überschüssigen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTs), Primern und anderen Reaktionsprodukten abgetrennt. Einsträngige DNA als Matrize für die Sequenzierung wurden durch Anwendung der Streptavidin-coated Magnetic Bead Separation Technique erhalten (Hultman et al. 1989). In der Praxis wurden die Zellen im Luria Bertani (LB)-Medium (Trypton 19 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l) angezogen, zentrifugiert und mit 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6) resuspendiert und mit dem gleichen Puffer so weit verdünnt, dass bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte von 1.0 vorlag. Ein Aliquot dieser Zellsuspension (1 µl) wurde für die PCR verwendet.

Die Amplifizierung der Gene mittels PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Der Ansatz enthielt 5 µl des zehnfach konzentrierten Polymerasesynthesepuffers „Puffer 2“ (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% Gelatine; P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Zugewetzt wurden weiterhin 1 U der AmpliTaq[®] GOLD DNA- Polymerase sowie je 200 µM der Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Als Primer wurden je 10 pmol „244“ (CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG) und „FD1“ (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) eingesetzt.

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde ein „Purification Kit“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Je nach Konzentration wurden 2-7 µl des dabei erhaltenen Eluats zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach der Sanger-Methode unter Verwendung des „ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Sie wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl entsprechend den vom Hersteller mitgelieferten Angaben durchgeführt. Als Primer wurde einer der beiden PCR-Primer, in der Regel „FD1“ benutzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Einträgen in der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory) verglichen. Die Sequenzierung der 16S rRNA, die durch zusätzliche Sequenzierung der 23S rRNA überprüft und ergänzt werden kann, wird seit Jahren erfolgreich in der Bakteriologie eingesetzt (Drancourt et al. 2000).

Zur Bestimmung der Basenfolge des Amplikons wurde die Didesoxy-Methode verwendet, die auch als Kettenabbruchtechnik oder, nach ihrem Erfinder, als Sanger-Methode bezeichnet wird. Dieses Verfahren wurde 1977 erstmals beschrieben (Sanger et al. 1977) und seitdem nur geringfügig modifiziert und verbessert. Eine Taq-Polymerase verlängert die Primer mit den vorhandenen vier 2'-Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP-Moleküle) entlang einer einsträngigen Matrize. Ebenfalls im Reaktionsansatz enthaltene 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP-Moleküle) können als dNTP-Analoga von der Taq-Polymerase über ihre 5'-Phosphatgruppen in die wachsende DNA-Kette eingebaut werden. Ihnen fehlt allerdings die 3'-Hydroxygruppe, die für die Ausbildung der folgenden Phosphodiesterbrücke und somit für die Kettenverlängerung erforderlich ist. Es kommt also zu einem zufälligen Abbruch der Sequenzierungsreaktion.

Bei der verwendeten Taq-Polymerase handelt es sich um eine Mutante des Enzyms aus *Thermus aquaticus* (Taq), nämlich um die AmpliTaq[®] DNA-Polymerase, FS, bei der im aktiven Zentrum des Enzyms eine Punktmutation durchgeführt wurde. Phenylalanin an Position 667 wurde durch Tyrosin ersetzt (F667Y), wodurch die Didesoxynucleotide besser als Substrate akzeptiert werden (Tabor und Richardson 1995). Am N-terminalen

Ende liegt eine weitere Punktmutation vor. Durch die Substitution von Glycin mit Aspartat an Position 46 (G46D) wird die endogene 5' → 3'-Nukleaseaktivität des Enzyms nahezu vollständig eliminiert. Schließlich wurde dem Enzym eine thermostabile anorganische Phosphatase zugesetzt, die eine mögliche Rückreaktion bei hohen Pyrophosphatkonzentrationen verhindert. Durch den Einbau der Didesoxynucleotide entstehen also unterschiedlich lange Ketten, die alle mit derselben Base enden. Diese wurden anschließend in einer hochauflösenden, denaturierenden Gelelektrophorese getrennt. Für den Nachweis der Ketten bediente man sich in der Regel radioaktiver oder fluoreszierender Marker. Radioisotope lassen sich in die Sequenzierungsprimer oder in die wachsende Kette einbauen. Um eine Fluoreszenzmarkierung einführen zu können, müssen die Primer, an die man die Farbstoffe (engl. Dye) koppelt, eine 5'-Aminogruppe tragen. Es können Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe eingesetzt werden.

Bei Verwendung von vier unterschiedlichen Fluorochromen signalisiert die Farbe eines Fluoreszenzfarbstoffs eine der vier Didesoxyreaktionen, so dass die Base anhand ihrer charakteristischen Fluoreszenz identifiziert wurde. Bei der Verwendung von Dichlorrhodaminfarbstoffen wurden im Vergleich zum Einsatz von Rhodaminfarbstoffen bessere Ergebnisse erzielt. Zur weiteren Empfindlichkeitssteigerung der Methodik wurde zusätzlich ein Fluoresceindonor wie z.B. 6-Carboxyfluorescein an das Rhodamin gebunden (BigDye™). Die Verwendung dieser Moleküle ermöglichte, mit jedem Primer zu sequenzieren, ohne diesen extra mit einem Farbstoff markieren zu müssen. Die erhaltenen Gele wurden schließlich mit einem Argonionenlaser abgetastet und die spezifische Emission der Farbstoffe aufgezeichnet. Jeder Farbstoff markiert nun die Stränge, die an einem der vier möglichen Didesoxynucleotide abbrechen. Die Verarbeitung der Rohdaten zu Elektropherogrammen sowie die weiterführende Analyse ergaben letztendlich die Sequenz der Basenfolge.

Die Standardkettenabbruchmethode bringt die Beschränkung mit sich, dass von jedem Komplex aus Matrize und Primer nur ein einziges markiertes DNA-Molekül synthetisiert werden kann. Ihre Empfindlichkeit ist daher durch die Molarität der Matrize begrenzt. Dies ist problematisch, wenn man große Matrizen oder gereinigte

Fragmente wie PCR-Produkte sequenziert. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, wurde nach Abschluss der Sequenzierung die Matrize denaturiert und die Reaktion wiederholt. Durch diese zyklische Durchführung, die unter Verwendung der Taq-Polymerase als „Taq Cycle“-Methode bezeichnet wird, konnte eine hohe Anzahl an Kettenabbruchprodukten erreicht werden.

Da trotz der hochentwickelten Methodik Sequenzierungsfehler auftreten können, wurden von den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Stämmen beide komplementären DNA-Stränge (sense und anti-sense) sequenziert. Durch gegenseitiges Abgleichen ließ sich die Fehlerquote deutlich verringern (Weil 2001).

5.3.6 Allgemeine Vorschrift zur bakteriellen Biotransformation von Sulfiden zu Sulfoxiden

Vorinkubation

In vier Erlenmeyerkolben (300 ml) wurden 100 ml Dworkinmedium und 375 µl Pseudomonas-Sporenelementlösung gegeben. Die Kolben wurden mit einem 100-ml Becherglas verschlossen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 750 µl einer 50%igen sterilen Glucoselösung als Kohlenstoffquelle zupipettiert. Anschließend erfolgte das Animpfen mit Bakterienmaterial unter sterilen Bedingungen in drei der vier Kolben mittels einer Impföse (Platindraht). Der vierte Kolben verblieb als Blindprobe (Reagentienblindwert zur Erfassung von Produkten, die schon ohne Bakterien gebildet werden, z.B. Autoxidationsprodukte) frei von Bakterien. Die Ansätze wurden im Schüttelinkubator bei einer Drehzahl von 120 upm und einer Temperatur von 30 °C für 24 h vorinkubiert.

Substratzugabe und Inkubation

Nach der Vorinkubation wurden die Erlenmeyerkolben aus dem Schüttelinkubator entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurden allen vier Erlenmeyerkolben jeweils 100 µmol des entsprechenden Sulfids als Substrat für die bakterielle Umsetzung zugegeben. Danach wird die Inkubation bei 30 °C und 120 upm für weitere 18 h fortgesetzt.

Aufarbeitung der Umsetzung

Nach der Inkubationszeit wurden die Erlenmeyerkolben aus dem Inkubator entnommen, das Becherglas abgenommen und jeder Kolben mit Parafilm verschlossen. Zum Aufbrechen der Bakterienzellwände wurden die Kolben für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde die Bakterienuspension in 500-ml Zentrifugenbecher umgefüllt, mit demineralisiertem Wasser nachgespült, austariert und für 25 min bei 9000 upm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in einen 500-ml Scheidetrichter überführt und der Zentrifugenbecher mit demineralisiertem Wasser nachgespült. Die wässrige Lösung wurde zweimal mit je 100 ml Diethylether und zweimal mit je 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde verworfen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und über einem Faltenfilter in einen 500 ml Rundkolben filtriert. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 40 °C und einem Druck von 570 mbar abgezogen. Der Rückstand wurde in wenig Ether aufgenommen und in ein 1.7-ml GC-Probengläschen überführt. Die Proben wurden zur GCMS- und MDGC-MS Analytik verwendet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Extraktion der Bakterienpellets

Um sicherzustellen, dass bei den bakteriellen Umsetzungen die eingesetzten Sulfide beim Zentrifugieren nicht komplett oder teilweise unumgesetzt in den Zentrifugationsrückstand gelangen, wurde dieser Rückstand ebenso extrahiert. Dazu wurden die Pellets aus den Zentrifugenbechern mit demineralisiertem Wasser herausgewaschen und in einem 300-ml Erlenmeyerkolben vereinigt. Nach Zugabe von 100 ml Ether wurde für 2 h mit einem Magnetrührer gerührt. Die organische Phase wurde in einem 500-ml Scheidetrichter abgetrennt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 40 °C und einem Druck von 570 mbar abgezogen. Der Rückstand wurde in wenig Ether aufgenommen, in ein 1.7-ml GC-Probengläschen überführt und stand zur Kontrollanalytik mittels GCMS zur Verfügung.

5.3.7 Einsatz des Fermenters

Ein Foto mit Beschreibung des eingesetzten Fermenters New Brunswick Scientific BioFlo 3000 zeigt die Abbildung 5-2. Eine kleine Menge Bakterienmaterial des Stammes, der für die Umsetzung eingesetzt werden soll, wurde mit einer sterilen Impföse von einer Nährbodenplatte in einen Erlenmeyerkolben überführt, der 100 ml sterile Dworkinlösung und 750 µl 50%ige Glucose enthält. Der Kolben wurde mit einem passenden Becherglas bedeckt und im Schüttelinkubator bei 30 °C und einer Drehzahl von 120 upm für 24 h vorinkubiert (Seed Culture). Parallel dazu wurde das Reaktionsgefäß des Fermenters (7) mit 3 l Dworkinlösung befüllt, 15 ml Pseudomonas-Spurenelementlösung zugegeben, der Deckel aufgesetzt und mittels vier Schrauben fixiert. Die Aufsatzstelle des Rührermotors (1) wurde mit der zugehörigen Metallschutzkappe bedeckt. Aus Platzgründen im Autoklaven wurde der Rückflusskühler (3) abgeschraubt; alle Eingänge wurden blind verschlossen. Sollten keine passenden Verschlusskappen vorhanden sein, genügt hier auch eine feste Umschließung mit Alufolie. Ebenso wurde mit den Filtern am Deckel, sowie mit dem Gewindestück des Rückflusskühlers verfahren. Der Gummiball zur Probenentnahme wurde abgenommen; die darunter befindliche Glaswolle wurde nach drei Autoklaviervorgängen ausgetauscht. Abschließend wurden die Gewinde, v. a. am Septum noch leicht gelöst, um Überdrücke bei dicht verschlossenem Gerät und damit die Gefahr eines Glasbruches zu vermeiden. Das Reaktionsgefäß und der Rückflusskühler wurden unter Druck 16 min lang auf eine Temperatur von 121 °C erhitzt.

Nach dem Autoklavieren wurde der Rückflusskühler in der sterilen Werkbank wieder auf das Reaktionsgefäß aufgeschraubt. Sobald das Fermentationsmedium abgekühlt war, wurde das Gerät in seine Halterung auf der Konsole gesetzt und alle benötigten Anschlüsse wiederhergestellt, z. B. Wasseranschluss für Temperaturregelung (8), Temperaturfühler (9), Sauerstoffelektrode (DO₂-Elektrode; 4) und Luftzufuhr (10). Anschließend wurde die Kühlwasserzufuhr geöffnet, wobei ein Druck von 1.4 bar nicht überschritten werden darf. Der Kompressor für die Luftzufuhr wurde auf einen Druck von 0,7 bar eingeregelt. Der Fermenter war nun betriebsbereit.

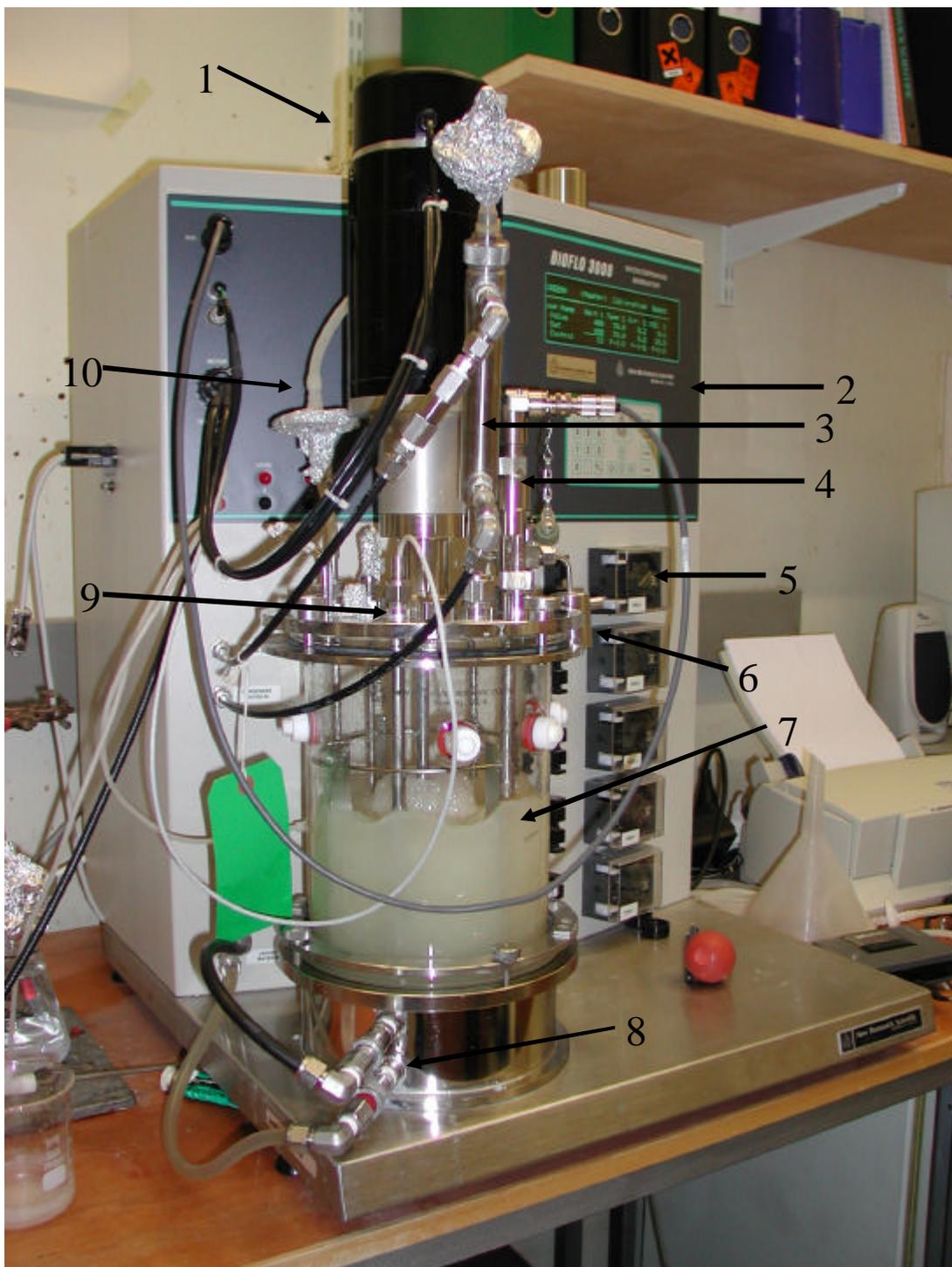


Abb. 5-2: New Brunswick Scientific BioFlo 3000 Bench-Top Fermenter

- | | |
|----------------------|--------------------------------|
| 1 Motor mit Rührwerk | 2 Steuerung und Display |
| 3 Rückflusskühler | 4 Sauerstoffelektrode |
| 5 Schlauchpumpen | 6 sterile Entnahmestelle |
| 7 Fermentationsgefäß | 8 Anschluss Temperaturregelung |
| 9 Temperaturfühler | 10 sterile Luftzufuhr |

Über die Steuerung mit Display (2) wurde die Kalibrierung der DO₂-Elektrode vor Beginn einer Fermentation durchgeführt, dies ist allerdings nur bei jeder dritten bis fünften Fermentation notwendig. Hierbei handelt es sich um eine Zweipunkt-Kalibrierung, es wurden die Werte für 0 und 100% Sauerstoffsättigung der Fermentationslösung festgelegt. Ebenfalls über die Steuerung wurden die weiteren Fermentationsparameter wie Temperatur (30 °C), steriler Luftfluss (0.2 l/min), Sauerstoffsättigung (DO₂ 10%), sowie die von DO₂ abhängige Drehzahl des Rührwerks (Agit 100-400 upm) programmiert. Unter sterilen Bedingungen wurden 7.5 ml 50%ige Glucoselösung und die Seed Culture zugegeben; der Fermentationsprozess war nun eingeleitet, die Mikroorganismen setzten ihr in der Seed Culture begonnenes exponentielles Wachstum im Fermentationsmedium fort. Über eine Schlauchpumpe (5) wurde ständig 5%ige Glucoselösung mit einem Fluss von 0.1 ml/min steril zugegeben. Nach 24 h Inkubationszeit, in der die Kultur im Fermentationsgefäß anwächst, wurde über eine weitere Schlauchpumpe das Sulfid mit einem Fluss von 0.3 ml/h als Substrat unter sterilen Bedingungen für die mikrobielle Umsetzung zugesetzt. Von nun an wurde über die sterile Entnahmestelle (6) stündlich eine 40-ml Probe entnommen, die mit Ether (Et₂O) extrahiert und mittels GC-MS auf die Umsetzungsrate des Sulfids oder auf die Ausbeute an Sulfoxid untersucht wurde. In sehr ähnlicher Art und Weise wurden auch Blindwertfermentationen und Fermentationshemmversuche durchgeführt.

5.3.8 Allgemeine Vorschrift für enzymatische Reaktionen mit Chlorperoxidase

In 21 ml wässrigem Citratpuffer (20.69 g Citronensäuremonohydrat C₆H₈O₇·H₂O und 196.4 ml 1N NaOH ad 1 l demineralisiertes Wasser, pH 5) wurden 0.21 mmol Sulfid als Substrat und 3.35 pmol Chlorperoxidase (CPO) vorgelegt. Anschließend wurden 0.42 mmol H₂O₂ in 2.15 ml Citratpuffer in 150 µl Portionen alle 5 min zugegeben und nach Beendigung noch weitere 5 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit 100 ml Ether und danach zweimal mit 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, die organischen Phasen wurden gesammelt, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 600 mbar auf ca. 1 ml eingengt. Diese Lösung wurde direkt zur GCMS- und MDGC-MS Analytik verwendet.

5.3.9 Siderophore-Typing

Beim Siderophore-Typing wurden zur Charakterisierung von Bakterienspezies einerseits Werte aus der isoelektrischen Focussierung (IEF) verwendet. Dabei wurden die Siderophore aus den Bakterienzellen, die unter Eisenmangel gewachsen sind, auf einem Gel einem elektrischen Feld ausgesetzt und wanderten verschieden weit; es entstanden charakteristische Siderophor-IEF-Muster. Selbstverständlich besitzen identische Stämme mit identischen Siderophoren auch identische IEF-Muster.

Andererseits wurde die Einteilung der jeweiligen Spezies aufgrund der deutlich aussagekräftigeren siderophorabhängigen Eisenaufnahme vorgenommen, bei der die Inkorporation von radioaktivem ^{59}Fe durch die Siderophore in die Bakterienzellen gemessen wurde. Durch Mischung von kommerziell erhältlichem, markiertem Eisenchlorid ($^{59}\text{FeCl}_3$) mit 100 μl Kulturmedium wurde der sogenannte Marker-Mix erhalten, der für die beiden zu vergleichenden Stämme von *Pseudomonas frederiksbergensis* hergestellt wurde. Diese wiederum wurden in sogenanntem CAA Medium (casamino acid medium) gezüchtet, nach 24 h geerntet, gewaschen und in frischem CAA Medium resuspendiert. In gleicher Weise wurde ein dritter, unabhängiger Stamm von *Pseudomonas frederiksbergensis* als Positivkontrolle behandelt. Alle drei Ansätze wurden anschließend in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Gegenwart des Marker-Mix für 20 min inkubiert. Ein 1-ml Aliquot der Lösung wurde über 0.45- μm Filterpapier filtriert, der Filter zweimal mit frischem Inkubationsmedium gewaschen und die Radioaktivität des Rückstandes gemessen. Diese Radioaktivität entspricht dem durch die Siderophore aufgenommenen ^{59}Fe . Die Gesamtradioaktivität, der die Bakterienzellen während der Inkubation ausgesetzt waren, bestimmte man durch Messen des verbleibenden unfiltrierten Milliliters aus den 2-ml Gesamtvolumen. Die im Verhältnis zur vorhandenen ^{59}Fe -Menge tatsächlich aufgenommene Radioaktivität wurde zur Identitätsprüfung zweier Stämme direkt miteinander verglichen. Für jeden Marker-Mix wurde ein Blindwertversuch durchgeführt (Ansatz ohne Bakterien), um die vollständige Löslichkeit und Komplexierungsrate des markierten Eisens durch die Siderophore sicherzustellen.

5.3.10 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Ein Rasterelektronenmikroskop erzeugt Oberflächenabbildungen, wie sie auch vom menschlichen Auge wahrgenommen werden. Zur Probenvorbereitung wurden kleine bakterientragende Agarstücke unter sterilen Bedingungen aus den Petrischalen ausgestochen und 24 h in 6.25%iger Glutaraldehydlösung fixiert. Um ein Platzen der Bakterien bei der späteren Vakuumbehandlung zu vermeiden, wurden die Agarstücke in einem Acetongradienten (50% - 75% - 90% - 100% - 100% Aceton über Molekularsieb) entwässert und mit superkritischem Kohlendioxid getrocknet. Die fixierten und getrockneten Präparate wurden anschließend mit einer dünnen, leitenden Metallschicht belegt, um statische Aufladungsphänomene zu vermeiden, welche die Bildqualität beeinträchtigen würden; dazu wurden die Proben mit einem Gemisch aus Palladium und Aktivkohle bedampft. Durch einen Elektronenstrahl, der Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über die metallisierte Oberfläche geführt wurde, ließ sich ein Bild von Bakterienstämmen erzeugen, das für Zuordnungs- und Vergleichszwecke gut geeignet war (siehe Abb. 3-3). Eine große Bedeutung kommt dabei der im Vergleich zur Lichtoptik bedeutend besseren Schärfentiefe zu. Abbildung 5-3 zeigt eine fotografische Aufnahme des eingesetzten Rasterelektronenmikroskops, Abbildung 5-4 dessen schematischen Aufbau.



Abb. 5-3: Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM962

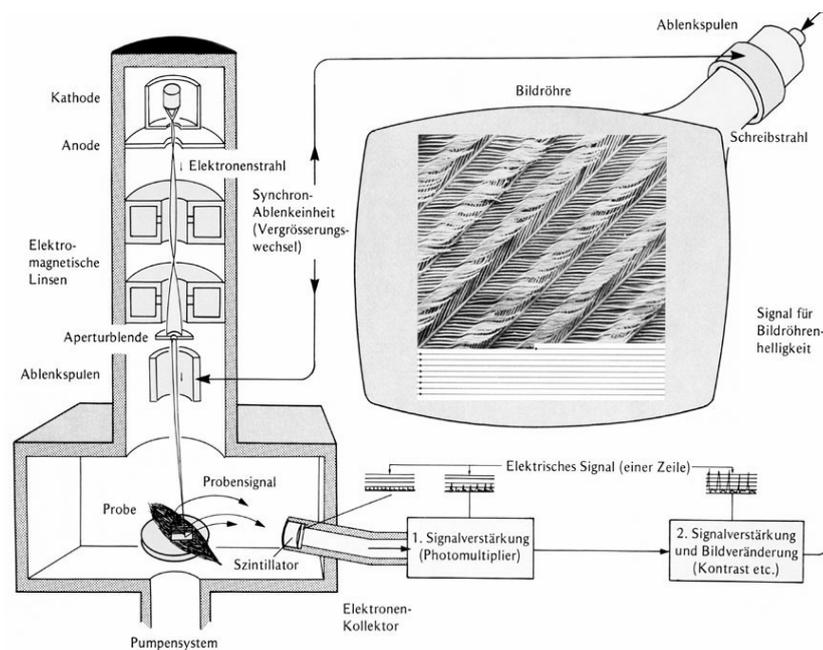


Abb. 5-4: Schematischer Aufbau des eingesetzten Rasterelektronenmikroskops

5.3.11 Durchführung der Zellzahlstudie

Zur Bestimmung der Gesamt- und der Lebendzellzahl wurde eine sogenannte Zellzahlstudie mit dem Bodenbakterium *Pseudomonas frederiksbergensis* durchgeführt. Dazu wurde eine Seed Culture -wie im Abschnitt 5.3.7 beschrieben- vorbereitet. Eine 3-ml Probe dieser Bakterienlösung wurden nach 24 h in einen 300-ml Erlenmeyerkolben überführt, der 750 µl 50%ige Glucoselösung als Kohlenstoffquelle enthielt (standardisiertes Verfahren, siehe Abschnitt 5.3.6). Aus diesem Ansatz wurden nun stündlich 2 ml Reaktionslösung entnommen und jeweils die optische Dichte der Bakterienlösung am Photometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen. Näherte sich die optische Dichte dem Wert 0.4, so wurde für die nächste Entnahme ein entsprechender Verdünnungsschritt eingeführt, der für den Erhalt linearer und miteinander vergleichbarer Ergebnisse erforderlich war und später bei der Berechnung berücksichtigt wurde. Direkt nach der Messung der optischen Dichte wurden 100 µl der Bakterienlösung aus der Küvette entnommen und davon unter sterilen Bedingungen eine Verdünnungsreihe bis zum Faktor 10^8 hergestellt. Jeweils 50 µl der einzelnen Verdünnungen wurden auf Agarplatten (Standard Methods Agar) ausplattiert und im

Inkubationsschrank bei 30 °C bebrütet. Sobald deutliches Wachstum erkennbar war (es müssen einzelne, nicht verwachsene Spots zu sehen sein), wurden die Kolonien auf den entsprechenden Platten gezählt und pro Entnahmestunde ein Mittelwert für die Lebenszellzahl gebildet.

Parallel wurden zur Bestimmung der Gesamtzellzahl 100 µl 36.5%ige Formaldehydlösung in die Küvette gegeben, wobei innerhalb von 5 min die Zellen absterben. Danach befüllte man eine Thomakammer mit der Bakterienlösung und zählte unter dem Mikroskop die Zellen in vier Quadraten (entspricht jeweils 16 Kleinquadrate des Volumens 0.00025 mm³); der Mittelwert ergab unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsschritte die Gesamtzellzahl.

5.3.12 Toxizitätstests mit Hilfe des Blättchenverfahrens

Da es sich bei den eingesetzten Sulfiden überwiegend um wenig wasserlösliche Substanzen handelt, wurde der sogenannte Blättchentest verwendet, bei dem die Substanzlösung in definierter Menge auf sterile Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm aufgebracht wurde, die dann auf die flächig mit Bakterienlösung (10⁹ cfu) angeimpfte Agarplatten gelegt wurden. Nach dem Auflegen saugten sich die Scheibchen mit Wasser voll, das Sulfid wurde zumindest teilweise im 96% Wasser enthaltenden Agar gelöst und diffundierte entsprechend der entstandenen Konzentration und der Substanzeigenschaft in den Agar (Fick'sches Gesetz). Je größer der nach der Bebrütung entstandene Hemmhof war, desto empfindlicher war der geprüfte Stamm gegen das eingesetzte Sulfid. Der resultierende Hemmhofdurchmesser diente zur Bemessung der Toxizität, exakte quantitative Aussagen sind mit dieser Methode allerdings nicht möglich (Süßmuth et al. 1999).

Zum allgemeinen Nachweis der Toxizität der verwendeten Sulfide und der daraus produzierten Sulfoxide wurden für den Blättchentest sterile Filterpapierscheiben mit jeweils 5 und 10 µl Thioanisol oder Phenylmethylsulfoxid eingesetzt. Als Referenzen und Bezugsgrößen dienten kommerziell erhältliche Blättchen mit 1µg Penicillin G, 10 µg Tetracyclin, 10 µg Gentamycin und 100 µg Nystatin.

5.4 Synthesen

5.4.1 Synthese von 2-Methylthio-4-hydroxyanisol (nach Morey et al. 1990)

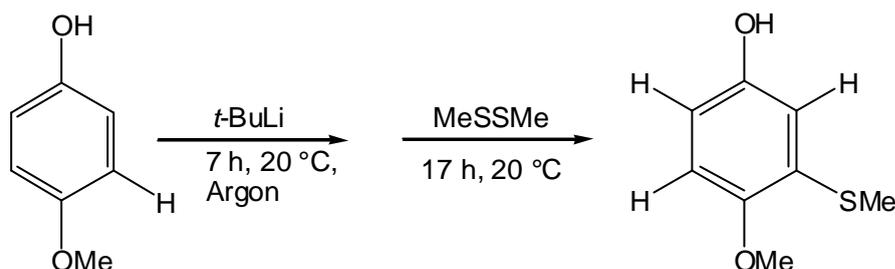


Abb. 5-5: Synthesesequenz für 2-Methylthio-4-hydroxyanisol (7)

Ein ofengetrockneter Rundkolben (100 ml), der durch ein Gummiseptum verschlossen war, wurde 30 min mit Argon begast. Anschließend wurde der Kolben mit 1.5 g (13.4 mmol) 4-Methoxyphenol, 0.96 g t -Butanol und 12 ml Tetrahydrofuran (THF) bestückt. Die Mischung wurde bei 0 °C gerührt und mittels einer Spritze wurden 20.4 ml $t\text{-BuLi}$ in Pentan tropfenweise zugegeben und weitere 6 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 2.82 g (30.0 mmol) Dimethyldisulfid in 12 ml getrocknetem THF zugegeben und weitere 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Synthesesequenz zeigt Abbildung 5-5.

Zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde die Lösung mit 20 %iger NaOH basifiziert und jeweils vier Mal mit 50 ml Hexan und 50 ml Ether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 20%iger wässriger HCl angesäuert und das Produkt je vier Mal mit 50 ml Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten etherischen Phasen wurden mit 40 ml demineralisiertem Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Am Rotationsverdampfer wurde bis zur Trockene eingengt und das verbleibende Öl an einer Kieselgelsäule aufgetrennt (Fließmittel: Hexan:Ether = 80:20), um die Bis- und Tris-(Methylthio)-substituierten Produkte sowie Reste des p -Hydroxyanisols

abzutrennen. Die mit einer Ausbeute von 13% erhaltenen schwachgelben, nahezu quadratischen Kristalle wurden in einer Dichlormethan-Ether-Mischung umkristallisiert.

HRGC-EI-MS (70 eV) von 2-Methylthio-4-hydroxyanisol

R_t (DB-5) = 23.14 min

m/z (%) = 170 (100), 155 (92), 137 (74), 111 (77), 109 (60), 99 (43), 85 (56), 65 (66)

$^1\text{H-NMR}$: 6.70 (d, 1 H), 6.67 (d, 1 H), 6.57 (dd, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 2.40 (s, 3 H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 150.5, 150.0, 128.6, 113.2, 111.6, 111.3, 56.4, 14.6

5.4.2 Synthese von 3-Methylthiopyridin (nach Jacob III und Shulgin 1981)

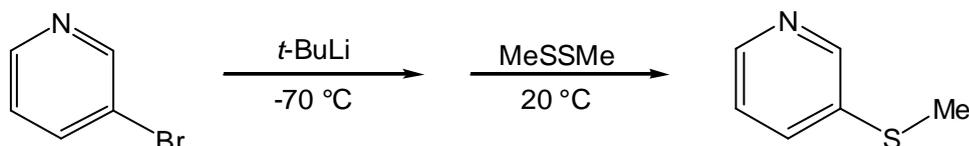


Abb. 5-6: Synthesesequenz für 3-Methylthiopyridin (**12**)

In einem 125-ml Dreihalskolben wurden unter einer Stickstoff-Schutzatmosphäre 2.0 ml 3-Brompyridin (20.8 mmol) mit 40 ml Ether gut gemischt und mittels Aceton/Trockeneisbad auf $-70\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt. Anschließend wurden mit Hilfe eines Tropftrichters 12.6 ml 1.6-M Butyllithiumlösung in Hexan (20 mmol) langsam hinzugegeben. Es bildete sich sofort ein hellgelber Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min gerührt und anschließend wurden 2.0 ml Dimethyldisulfid hinzugefügt (vgl. Abb. 5-6). Das Kühlbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird das Gemisch mit 50 ml 1M-Schwefelsäure angesäuert und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 20 ml Ether extrahiert, um nicht abreagiertes Dimethyldisulfid zu entfernen.

Dann wurde die wässrige Phase auf ungefähr pH 10 eingestellt, um das als Kation vorliegende 3-Methylthio-Pyridin zu neutralisieren und mit 100 ml Ether extrahiert. Nach dreimaliger Extraktion wurden die etherischen Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es wurde ein braunes Öl erhalten, das an einer Kieselgelsäule mittels des Lösungsmittelgemischs Ether-Pentan (90:10) chromatographisch aufgereinigt wurde. Hierbei werden die ungefähr 50-ml umfassenden Fraktionen eingeeengt, mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf das Produkt hin und mittels Gaschromatographie (GC) auf die Reinheit hin untersucht. Die entsprechend reinen Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden eingeeengt und in einem GC-Gläschen gesammelt. Nach der säulenchromatographischen Trennung wurden 690 mg (5.5 mmol) 3-Methylthiopyridin erhalten, was einer Ausbeute von 26.5% entspricht. Zur Bestätigung der Struktur wurde ein NMR-Spektrum aufgenommen.

HRGC-EI-MS (70 eV) von 3-Methylthiopyridin:

R_t (Carbowax) = 26.36 min

m/z (%) = 125 (100), 110 (20), 92, (12), 83 (17), 79 (12), 78 (7), 51 (8)

$^1\text{H-NMR}$: 8.49 (d, 1 H), 8.36 (dd, 1 H), 7.55 (m, 1 H), 7.18 (m, 1H), 2.40 (s, 3 H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 147.9, 146.2, 135.4, 134.2, 123.4, 77.0, 15.7

5.4.3 Synthese von Methylthio-*sym*-Triazin (nach Schaefer und Peters 1959)

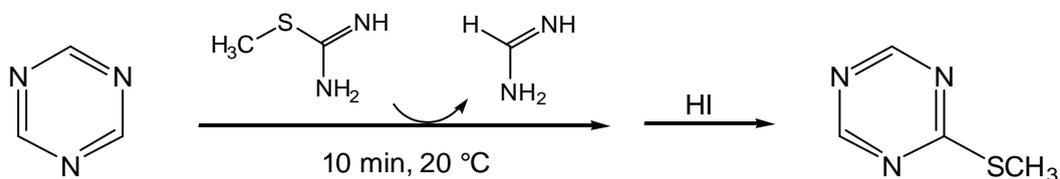


Abb. 5-7: Synthesesequenz für Methylthio-*sym*-Triazin (15)

Eine Mischung aus 3.78 g (17 mmol) 2-Methylpseudothiourea-Sulfat und 2.18 g (17 mmol) Jodwasserstoffsäure wurde hergestellt, um 2-Methylpseudothiourea-Sulfat in das Hydroiodid zu überführen. Danach wurde die Mischung mit 1.40 g (17 mmol) Triazin und 4.0 ml Acetonitril unter starkem Schütteln suspendiert (ca. 10 min). Kurz darauf begann die Kristallisation von Formamidin-Hydroiodid unter Bildung des Reaktionsproduktes Methylthio-*sym*-Triazin (**15**) und gleichzeitiger Erwärmung. Zur Reinigung des Produktes wurde das Reaktionsgemisch mit Ether extrahiert und anschließend an einer Kieselgelsäule mit dem Fließmittel Aceton/Ether (20/80) aufgereinigt. Es wurden 216 mg (1.7 mmol) an Methylthio-*sym*-Triazin (**15**) erhalten, die Ausbeute lag bei nur 10%. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 5-8 präsentiert.

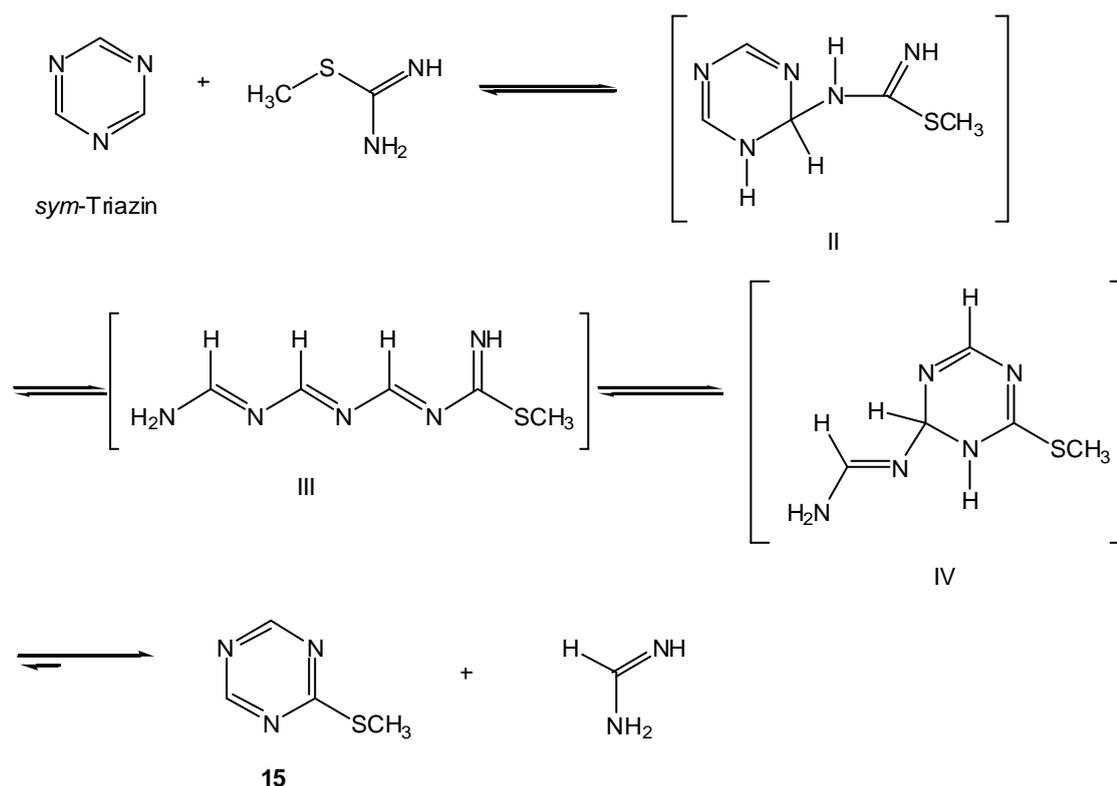


Abb. 5-8: Reaktionsmechanismus für die Bildung von Methylthio-*sym*-Triazin (**15**)

Im ersten Schritt der Reaktion wird durch einen nukleophilen Angriff des Amidin-Moleküls auf ein elektropositives Kohlenstoffatom des Triazin-Rings eingeleitet. Das entstehende Intermediat II lagert sich in einem Tautomerengleichgewicht über die Zwischenstufen III und IV unter Eliminierung von Formamidin in das gewünschte Methylthio-*sym*-triazin (**15**) um (vgl. Abb. 5-8). Aufgrund des vorliegenden Gleichgewichts beruht der Erfolg der Reaktion darauf, dass das Produkt **15** gegenüber der Ausgangsverbindung stabilisiert wird.

HRGC-EI-MS (70eV) von Methylthio-*sym*-Triazin

R_t (Carbowax) = 23.56 min

m/z (%) = 127 (100), 81 (8), 74 (14), 73 (47), 54 (15), 53 (12)

¹H-NMR: 9.10 (s,2H), 2.42 (s,3H)

¹³C-NMR: 181.5, 166.5, 14.9

5.4.4 Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Sulfoxide als Referenzen aus den entsprechenden Sulfiden (nach Vayssie und Elias 1998)

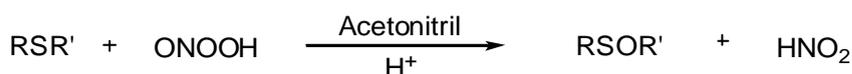
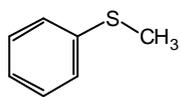


Abb. 5-9: Allgemeine Reaktionsgleichung für die Synthese von racemischen Sulfoxiden als Referenzsubstanzen

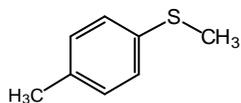
Die Umsetzung von H₂O₂ mit salpetriger Säure führte zur sog. Peroxy-salpetrigen Säure OHOOH, ein Isomer der Salpetersäure, das ein stärkeres Oxidationsmittel als H₂O₂ darstellt und für Sauerstoff-Transfer-Reaktionen auf organische Sulfide bestens geeignet ist (Vayssie und Elias 1998). So wurden in einem Reaktionsschritt 0.11 mmol des entsprechenden Sulfids in 1 ml mit 1M HCl angesäuertem Acetonitril gelöst und dieser Vorlage 10.3 mg (0.15 mmol) Natriumnitrit (NaNO₂) und 330 mg 30%ige

Lösung (0.3 mmol) H_2O_2 zugegeben. Hierbei wurde das vorgelegte Sulfid sofort zum entsprechenden Sulfoxid umgesetzt. Eine Veränderung des Verhältnisses $\text{NaNO}_2 : \text{H}_2\text{O}_2 = 1:2$ hin zu höheren H_2O_2 -Gehalten ergab eine Verschiebung zum Sulfon als Hauptreaktionsprodukt. Das entstandene Sulfoxid wurde mit 50 ml Ether aus der Reaktionslösung extrahiert und der Extrakt am Rotationsverdampfer eingengt. Nach dieser einfachen und zeitsparenden Methode wurden Sulfoxide aus den entsprechenden Sulfiden als Referenzmaterialien für die Analytik mittels GC-MS und MDGC-MS hergestellt.

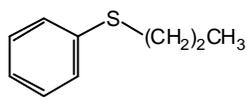
Strukturmatrix



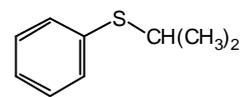
1



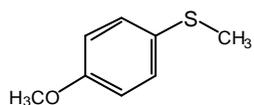
2



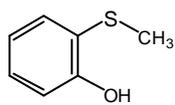
3



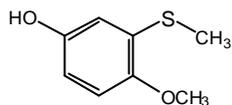
4



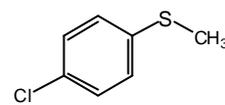
5



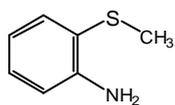
6



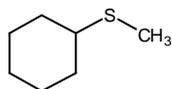
7



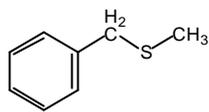
8



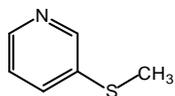
9



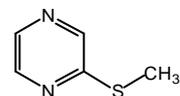
10



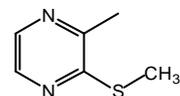
11



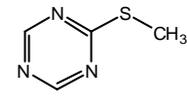
12



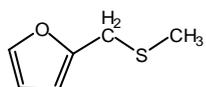
13



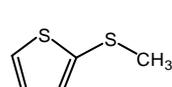
14



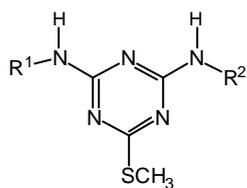
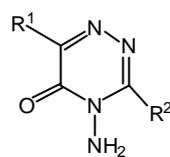
15



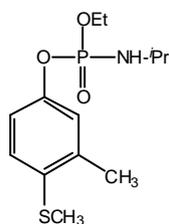
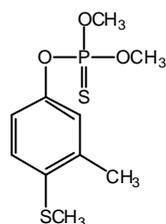
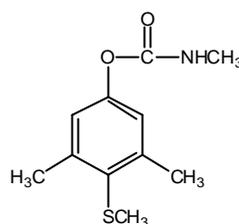
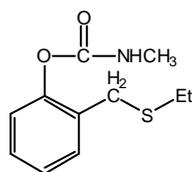
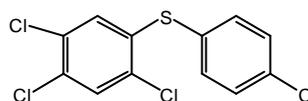
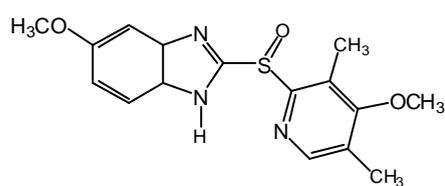
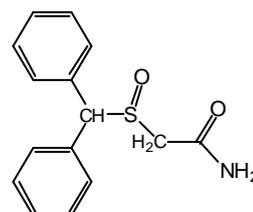
16



17

**18a-c****19**

Substrat	R ¹	R ²
18a	CH(CH ₃) ₂	CH ₃
18b	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂
18c	CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₃ OCH ₃

**20****21****22****23****24****25*****26***

Literaturverzeichnis

Abushanab, E., Reed, D., Suzuki, F., Sih, C. J.; Stereospecific microbial oxidation of thioethers to sulfoxides. Application to the synthesis of R-mevalonolactone. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *37*, 3415-3418.

Adam, W., Korb, M. N., Roschmann, K. J., Saha-Möller, C. R.; Titanium-catalyzed, asymmetric sulfoxidation of alkyl aryl sulfides with optically active hydroperoxides. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3423-3428.

Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. R., Weichold, O., Hoch, U., Häring, D., Schreier, P.; Biotransformations with peroxidases. In T. Scheper (ed.) *Advances in biochemical engineering / biotechnology*, Springer Verlag, Heidelberg, **1999**.

Adam, W., Mock-Knoblach, C., Saha-Möller, C. R.; Asymmetric synthesis with the enzyme *Coprinus peroxidase*: Kinetic resolution of chiral hydroperoxides and enantioselective sulfoxidation. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4834-4839.

Adam, W., Lukacs, Z., Saha-Möller, C.R., Weckerle, B., Schreier, P.; Microbial asymmetric CH oxidations of simple hydrocarbons: a novel monooxygenase activity of the topsoil microorganism *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *16*, 2923-2926.

Adam, W., Lukacs, Z., Harmsen, D., Saha-Möller, C. R., Schreier, P.; Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons with the topsoil-microorganism *Bacillus megaterium*. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 878-882.

Adam, W., Lukacs, Z., Saha-Möller, C. R., Schreier, P.; Biocatalytic kinetic resolution of racemic hydroperoxides through the enantioselective reduction with free and immobilized microorganisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4887-4892.

Adam, W., Lukacs, Z., Kahle, C., Saha-Möller, C. R., Schreier, P.; Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized *Bacillus megaterium* cells. *J. Mol. Catal. B - Enzym.* **2001**, *11*, 377-385.

Adam, W., Heckel, F., Saha-Möller, C. R., Schreier, P.; Biocatalytic synthesis of optically active oxyfunctionalized building blocks with enzymes, chemoenzymes and microorganisms. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *661*, 17-29.

Adam, W., Heckel, F., Saha-Möller, C. R., Taupp, M., Schreier, P.; A highly enantioselective biocatalytic sulfoxidation by the topsoil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 983-985.

Adam, W., Heckel, F., Saha-Möller, C. R., Taupp, M., Meyer, J. M., Schreier, P.; Opposite enantioselection in the bacterial whole-cell sulfoxidation by two phenotypically and genotypically similar strains of *Pseudomonas frederiksbergensis*. *Appl. Environ. Microb.* in press

Ader, U., Andersch, P., Berger, M., Goergens, U., Seemayer, R., Schneider, M.; Hydrolases in organic synthesis: preparation of enantiomerically pure compounds. *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1165-1170.

Ahmad, S., Henderson, K., Dumsday, G., Zachariou, M.; Microbial biotransformations: Stereoselective synthesis of pharmaceutical drug precursors. *Austr. Biotechnol.* **2001**, *11*, 26-28.

Allen, C. C. R., Boyd, D. R., Dalton, H., Sharma, N. D., Haughey, S. A., Mc Mordie, R., Austin S., Mc Murray, B. T., Shelldrake, G. N., Sproule, K.; Sulfoxides of high enantiopurity from bacterial dioxygenase-catalyzed oxidation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *2*, 119-120.

Allenmark, S. G., Andersson, M. A.; Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis of series of aromatic cyclic sulfoxides. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1089-1094.

Alphand, V., Gaggero, N., Colonna, S., Furstoss, R.; Microbiological transformations. 35. Enantioselective one-step preparative scale synthesis of 1,3-dithiane 1-oxide via whole-cell bacterial oxidation. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6117-6120.

Andersen, K. K.; Synthesis of (+)-ethyl *p*-tolyl sulfoxide from (-)-menthyl (-)-*p*-toluenesulfinate. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *21*, 93-95.

Andersen, S. M., Johnsen, K., Sorensen, J., Nielsen, P., Jacobsen, C. S.; *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50*, 1957-1964.

Atlas, R. M. In L. C. Parks (ed.) Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, **1993**.

Auret, B. J., Boyd, D. R., Henbest, H. B., Ross, S.; Stereoselectivity in the oxidation of thioethers to sulfoxides in the presence of *Aspergillus niger*. *J. Chem. Soc. C: Organic* **1968**, *18*, 2371-2374.

Auret, B. J., Boyd, D. R., Henbest, H. B., Watson, C. G., Balenovic, K., Polak, V., Johanides, V., Divjak, S.; Species-strain dependence of stereoselectivity in microbial oxidation of thio ethers. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 65-68.

Balenovic, K., Bregant, N., Francetic, D.; Oxidation of organic sulfides with optically active peroxy acids. Asymmetric synthesis of sulfoxides. *Tetrahedron Lett.* **1960**, *19*, 20-22.

Berglund, P.; Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13-22.

Blaine Metting Jr., F.; Soil microbiology ecology, Marcel Dekker Inc., New York, **2000**.

Bohe, L., Hanquet, G., Lusinchi, M., Lusinchi, X.; The stereospecific synthesis of a new chiral oxaziridinium salt. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7271-7274.

Bolm, C., Bienewald, F.; Asymmetric oxidation of dithioacetals and dithioketals catalyzed by a chiral vanadium complex. *Synlett* **1998**, *12*, 1327-1328.

Boyd, D. R., Sharma, N. D., Haughey, S. A., Kennedy, M. A., Mc Murray, B. T., Sheldrake, G. N., Allen, C. C. R., Dalton, H., Sproule, K.; Toluene and naphthalene dioxygenase-catalysed sulfoxidation of alkyl aryl sulfides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 1929-1933.

Buist, P. H., Marecak, D. M., Partington, E. T., Skala, P.; Enantioselective sulfoxidation of a fatty acid analog by baker's yeast. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5667-5669.

Buist, P. H., Marecak, D. M.; Stereochemical analysis of a quasisymmetrical dialkyl sulfoxide obtained by a diverted biodehydrogenation reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5877-5878.

Carrea, G., Redigolo, B., Riva, S., Colonna, S., Gaggero, N., Battistel, E., Bianchi, D.; Effects of substrate structure on the enantioselectivity and stereochemical course of sulfoxidation catalyzed by cyclohexanone monooxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1063-1068.

Cashman, J. R., Olsen, L. D., Bornheim, L. M.; Enantioselective S-oxygenation by flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 344-349.

Cavanaugh, D. J.; Oxidation of chlorpromazine by peroxidase and catalase. *Science* **1957**, *125*, 1040-1041.

Colombo, A., Marturano, G., Pasini, A.; Chiral induction in the oxidation of thioanisole with chiral oxotitanium(IV) Schiff base complexes as catalysts. The importance of the conformation of the ligands. *Gaz. Chim. Ital.* **1986**, *116*, 35-40.

Colonna, S., Banfi, S., Annunziata, R., Casella, L.; Enantio and diastereoselectivity in the periodate oxidation of sulfides catalyzed by bovine serum albumin. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 891-895.

Colonna, S., Manfredi, A., Spadoni, M., Casella, L., Gullotti, M.; Asymmetric oxidation of sulfides to sulfoxides catalyzed by titanium complexes of N-salicylidene-L-amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: Org. Bioorg. Chem.* **1987**, 71-73.

Colonna, S., Gaggero, N., Manfredi, A., Casella, L., Gullotti, M., Carrea, G., Pasta, P.; Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10465-10468.

- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P.; Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: an efficient system for enzymic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95-106.
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G., Pasta, P.; Horseradish peroxidase-catalyzed sulfoxidation is enantioselective. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *4*, 357-358.
- Colonna, S., Gaggero, N., Pasta, P., Ottolina, G.; Enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides catalyzed by bacterial cyclohexanone monooxygenases. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, *20*, 2303-2307.
- Colonna, S., Del Sordo, S., Gaggero, N., Carrea, G., Pasta, P.; Enzyme-mediated catalytic asymmetric oxidations. *Heteroatom Chem.* **2002**, *13*, 467-473.
- Croal, L. R., Gralnick, J. A., Malasarn, D., Newman, D. K.; The Genetics of Geochemistry. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 175-202.
- Czarnik A. W.; Cyclodextrin-mediated chiral sulfoxidations. *J. Org. Chem.* **1984**; *49*, 924-927.
- Davis, F. A., Weismiller, M. C., Murphy, C. K., Reddy, R. T., Chen, B. C.; Chemistry of oxaziridines. 18. Synthesis and enantioselective oxidations of the [(8,8-dihalocamphoryl)-sulfonyl]oxaziridines. *J. Org. Chem.* **1992**; *57*, 7274-7285.
- Davis, F. A., Reddy, R. T., Han, W., Carroll, P. J.; Chemistry of oxaziridines. 17. N-(Phenylsulfonyl)(3,3-dichlorocamphoryl)oxaziridine: a highly efficient reagent for the asymmetric oxidation of sulfides to sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**; *114*, 1428-1437.
- De Santis, G., Jones, J. B.; Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 324-330.
- Di Furia, F., Modena, G., Seraglia, R.; Synthesis of chiral sulfoxides by metal-catalyzed oxidation with t-butyl hydroperoxide. *Synthesis* **1984**, *4*, 325-326.
- Dingermann, T.; Gentechnik – Biotechnik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- Dmitrienko, G. I., Snieckus, V., Viswanatha, T.; On the mechanism of oxygen activation by tetrahydropterin and dihydroflavin-dependent monooxygenases. *Bioorg. Chem.* **1977**, *6*, 421-429.
- Drabowicz, J., Mikolajczyk, M.; Asymmetric oxidation of sulfides to sulfoxides catalyzed by β -cyclodextrin. *Phosphorus Sulfur* **1984**, *21*, 245-248.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Mertelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D.; 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 3623-3630.

- Dworkin, M., Forster J. W.; Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen *J. Bact.* **1958**, *75*, 592-603.
- Ebbon, G. P., Callaghan, P.; The conversion of S-n-propyl-L-cysteine into its sulfoxide by microsomal preparations from rat liver. *Biochem. J.* **1968**, *110*, 339.
- Estabrook, R. W., Cooper, D. Y., Rostenthal, O.; The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.* **1963**, *338*, 741-755.
- Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, Springer Verlag, Berlin, **2000**.
- Faurie, R., Thommel, J.; Microbial Production of L-Amino-Acids. Springer Verlag, Berlin, **2003**.
- Firth, B. E., Miller, L. L.; Oxidations on DSA and chirally modified DSA and tin dioxide electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**; *98*, 8272-8273.
- Fu, H., Kondo, H., Ichikawa, Y., Look, G. C., Wong, C. H.; Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis: enantioselective reactions of chiral hydroperoxides with sulfides and bromohydroxylation of glycals. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265-7270.
- Fuchs, R., Schäfer, M., Geoffroy, V., Meyer, J.M.; Siderotyping – a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 31-57.
- Fukushima, D., Kim, Y. H., Iyanagi, T., Oae, S.; Enzymic oxidation of disulfides and thiol-sulfonates by both rabbit liver microsomes and a reconstituted system with purified cytochrome P-450. *J. Biochem.* **1978**, *83*, 1019-1027.
- Galli, E., Colmegna, A., Orsini, F., Sello, G., Bestetti, G., Di Gennaro, P.; Microorganisms as biocatalysts. Bioconversion examples. *Chim. Indust.* **2002**, *84*, 63-65.
- Gillette J. R., Kamm, J. J.; The enzymatic formation of sulfoxides: the oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1960**, *130*, 262-267.
- Groves, J. T., Viski, P.; Asymmetric hydroxylation, epoxidation, and sulfoxidation catalyzed by vaulted binaphthyl metalloporphyrins. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3628-3634.
- Gutierrez, S., Cardoza, R. E., Casqueiro, J., Martin, J. F.; Commercial production and biosynthesis of fungal antibiotics: an overview. *Mycology Series* **2004**, *20*, 401-411.
- Häring, D., Schüler, E., Adam, W., Saha-Möller, C. R., Schreier, P.; Semisynthetic enzymes in asymmetric synthesis: Enantioselective reduction of racemic hydroperoxides catalyzed by Seleno-Subtilisin. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 832-835.

Harrison, P. W. B., Kenyon, J., Phillips, H.; Dependence of rotatory power on chemical constitution. XXIX. Resolution of sulfoxides into their optically active forms. *J. Chem. Soc., Abstr.* **1926**, 2079-90.

Hartmeier, W.; Coimmobilization of enzymes and whole cells. *Food Biotechnol.* **1990**, *4*, 399-407.

Holland, H. L., Popperl, H., Ninniss, R. W., Chenchiah, P. C.; The oxidation of organic sulfides by *Mortierella isabellina*. 2. Effects of substituents on the stereochemistry of sulfoxide formation. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 1118-1120.

Holland, H. L.; Chiral sulfoxidation by biotransformation of organic sulfides. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 473-485.

Holland, H. L., Brown, F. M., Larsen, B. G.; Biotransformation of organic sulfides IV. Formation of chiral benzyl alkyl and phenyl alkyl sulfoxides by *Helminthosporium* species NRRL 4671. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 647-652.

Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E., Uhlen, M.; Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using Magnetic Beads as solid support. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 4937-4946.

Izumi, Y.; Methoden der asymmetrischen Synthese – enantioselektive katalytische Hydrierung. *Angew. Chem.* **1971**, *83*, 956-966.

Jacob III, P., Shulgin, A. T.; Metallation – Sulfidation: A convenient method for the synthesis of aryl alkyl sulfides and of unsymmetrical diaryl sulfides. *Synth. Comm.* **1981**, *11*, 1957-1968.

Jäger, K. E., Reetz, M. T.; Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 68-73.

Kagan, H. B., Dunach, E., Nemecek, C., Pitchen, P., Samuel, O., Zhao, S. H.; A short route to chiral sulfoxides using titanium-mediated asymmetric oxidation. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1911-1916.

Kagan, H. B., Fiaud, J. C.; Kinetic resolution. *Top. Stereochem.* **1988**, *18*, 249-330.

Kagan, H. B., Rebiere, F.; Some routes to chiral sulfoxides with very high enantiomeric excesses. *Synlett* **1990**, *11*, 643-650.

Kagan, H. B., Diter, P.; Asymmetric sulfoxidation – chemical and enzymatic *In* P. Page (ed.) *Organosulfur chemistry – synthetic and stereochemical aspects*, Academic Press, San Diego, **1998**.

Karklins, R., Lemba, J., Viesturs, U.; Biotechnology for organic acids production. *GIT Lab. Journal* **2001**, *5*, 281-283.

Katayama, A., Fujie, K.; Characterization of soil microbiota with the quinone profile. *Soil Biochem.* **2000**, *10*, 303-347.

Katopodis, A. G., Smith Jr., H. A., May, S. W.; New oxyfunctionalization capabilities for ω -hydroxylases. Asymmetric aliphatic sulfoxidation and branched ether demethylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 897-899.

Kazlauskas, R. J., Weber, H. K.; Improving hydrolases for organic synthesis. *Curr. Op. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 121-126.

Kelly, D. R., Knowles, C. J., Mahdi, J. G., Taylor, I. N., Wright, M. A.; The enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides with *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871, *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872, *Xanthobacter autotrophicus* DSM 431 (NCIMB 10811) and the black yeast NV-2. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 365-368.

Kennedy, A. C., Gewin, V. L.; Soil microbial diversity: Present and future considerations. *Soil Sci.* **1997**, *162*, 607-617.

Kertesz, M. A., Cook, A. M., Leisinger, T.; Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 195-215.

Kokubo, C., Katsuki, T.; Highly enantioselective catalytic oxidation of alkyl aryl sulfides using Mn-salen catalyst. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13895-13900.

Komori, T., Nonaka, T.; Stereochemical studies of the electrolytic reactions of organic compounds. Part 22. Electroorganic reactions on organic electrodes. 3. Electrochemical asymmetric oxidation of phenyl cyclohexyl sulfide on poly(L-valine)-coated platinum electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5690-5691.

Komori, T., Nonaka T.; Stereochemical studies of the electrolytic reactions of organic compounds. 25. Electroorganic reactions on organic electrodes. 6. Electrochemical asymmetric oxidation of unsymmetric sulfides to the corresponding chiral sulfoxides on poly(amino acid)-coated electrodes *J. Am. Chem. Soc.* **1984**; *106*, 2656-2659.

Krämer, R.; Production of Amino Acids: Physiological and Genetic Approaches. *Food Biotechnol.* **2004**, *18*, 171-216.

Lee, Y. C., Hayes, M. G., Mc Cormick, D. B.; Microsomal oxidation of alpha-thiocarboxylic acids to sulfoxides. *Biochem. Pharmacol.* **1970**, *19*, 2825-2832.

Liese, A.; Replacing chemical steps by biotransformations: Industrial application and processes using biocatalysis. In K. Drauz, H. Waldmann (eds) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2002**.

Light, D. R., Waxman, D. J., Walsh, C.; Studies on the chirality of sulfoxidation catalyzed by bacterial flavoenzyme cyclohexanone monooxygenase and hog liver flavin adenine dinucleotide containing monooxygenase. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2490-2498.

Loughlin, W. A.; Biotransformations in organic synthesis. *Biores. Technol.* **2000**, *74*, 49-62.

Lukacs, Z.; Mikrobielle asymmetrische Synthesen: Reduktion von Hydroperoxiden und Hydroxylierung von unfunktionalisierten Kohlenwasserstoffen. Dissertation, Universität Würzburg, **2000**.

Maccioni, A., Montanari, F., Secci, M., Tramontini, M.; Asymmetric synthesis and absolute configuration of sulfoxides. *Tetrahedron Lett.* **1961**, *20*, 607-611.

Madigan, M. T.; Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, **2000**.

Marasco, E., Schmidt-Dannert, C.; Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. *Appl. Biotechnol., Food Science and Policy* **2003**, *1*, 145-157.

March, R. B., Metcalf, R. L., Fukuto, T. R., Maxon, M. G.; Metabolism of Systox in the white mouse and American cockroach. *J. Econ. Entomol.* **1955**, *48*, 355-363.

May, S. W., Phillips, R. S.; Asymmetric sulfoxidation by dopamine .beta.-hydroxylase, an oxygenase heretofore considered specific for methylene hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5981-5983.

Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., Palleroni, N. J. ; Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environm. Microbiol.* **2002**, *68*, 2745-2753.

Miles, C. J.; Degradation products of sulfur-containing pesticides in soil and water. *ACS Symposium Series* **1991**, *459*, 61-74.

Montanari, F.; Configurational assignment to aryl alkyl sulfoxides based on asymmetric synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *24*, 3367-3371.

Morey, I., Costa, A., Deya, P. M., Suner, G.; Saá, M.; Direct lithiation of alkoxyphenols: metalation vs. demethylation. An experimental and theoretical (MNDO) study. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3902-3909.

Mutschler, E.; Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1986**.

Naruta, Y., Tani, F., Maruyama, K.; Catalytic and asymmetric oxidation of sulfides with iron complexes of chiral twin coronet porphyrins. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1990**, *19*, 1378-1380.

Naruta, Y., Tani, F., Maruyama, K.; Enantioselective oxidation of sulfides catalyzed by iron complexes of chiral twin coronet porphyrins. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 533-542.

Nüesch, J.; Physiologische und biochemische Aspekte indurstieller Fermentationsprozesse. *Path. Microbiol.* **1969**, *34*, 158-194.

Oea, S.; Organic chemistry of sulfur, Plenum Press, New York, **1977**.

Oae, S., Mikami, A., Matsuura, T., Ogawa-Asada, K., Watanabe, Y., Fujimori, K., Iyanagi, T.; Comparison of sulfide oxygenation mechanism for liver microsomal FAD-containing monooxygenase with that for cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *131*, 567-573.

Ohta, H., Okamoto, Y., Tsuchihashi, G.; Asymmetric synthesis of chiral sulfoxides via microbial oxidation of sulfides. *Chem. Lett.* **1984**, *2*, 205-208.

Ohta, H., Okamoto, Y., Tsuchihashi, G.; Studies on enzymic oxidation of sulfides. Part III. Oxidation of allylic sulfides with *Corynebacterium equi*. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2229-2231.

Ortiz de Montellano, P. R.; Cytochrome P-450: Structure, mechanism and biochemistry, Plenum Press, New York, **1986**.

Ottolina, G., Pasta, P., Carrea, G., Colonna, S., Dallavalle, S., Holland, H. L.; A predictive active site model for the cyclohexanone monooxygenase catalyzed oxidation of sulfides to chiral sulfoxides. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1375-1386.

Ozaki, S. I., Ortiz de Montellano, P. R.; Molecular Engineering of Horseradish Peroxidase: Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7056-7064.

Page, P. C. B., Heer, J. P., Bethell, D., Collington, E. W., Andrews, D. M.; Highly enantioselective catalytic asymmetric oxidation of sulfides using hydrogen peroxide. *Synlett* **1995**, *7*, 773-775.

Palucki, M., Hanson, P., Jacobsen, E. N.; Asymmetric oxidation of sulfides with hydrogen peroxide catalyzed by (salen)Mn(III) complexes. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7111-7114.

Patel, R. N.; Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enz. Microb. Technol.* **2002**, *31*, 804-826.

Paul, E. A. In M. E. Summer (ed.) Soil biology and biochemistry, CRC Press, Boca Raton, **2000**.

Pitchen, P., Kagan, H. B.; An efficient asymmetric oxidation of sulfides to sulfoxides. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1049-1052.

Pitchen, P., Dunach, E., Deshmukh, M. N., Kagan, H. B.; An efficient asymmetric oxidation of sulfides to sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8188-8193.

Reid, E. E.; Organic chemistry of bivalent sulfur Vol. II, Chemical Publishing, New York, **1960**.

Roberts, S. M.; Preparative biotransformations: The employment of enzymes and whole cells in synthetic organic chemistry. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1998**, *1*, 157-169.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.; DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463-5467.

Sato, Y., Tsukamoto, T., Sato, M.; Rapid degradation of carbaryl by two novel strains of *Arthrobacter spp.* isolated from forest soil. *J. For. Res.* **1999**, *4*, 275-280.

Schaefer, F.C., Peters, G.A.; Synthesis of the *sym*-triazine system. II. Preparation of monosubstituted *sym*-triazines by reaction of *sym*-triazine with amidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1470-1474.

Schlegel, H. G.; Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.

Schreier, P., Bernreuther, A., Huffer, M.; Analysis of chiral organic molecules. Methodology and Applications, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, **1995**.

Schreier, P.; Enzymes and flavour biotechnology In R. G. Berger (ed.) Biotechnology of aroma compounds, Springer Verlag, Berlin, **1997**.

Secundo, F., Carrea, G., Dallavalle, S., Franzosi, G.; Asymmetric oxidation of sulfides by cyclohexanone monooxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1981-1982.

Shaw, N. M., Robins, K. T., Kiener, A.; Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv. Synth. Cat.* **2003**, *345*, 425-435.

Shinkai, S., Yamaguchi, T., Manabe, O., Toda, F.; Enantioselective oxidation of sulfides with chiral 4a-hydroperoxyflavin. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1988**, *21*, 1399-1401.

Smith, R. V., Davis, P. J., Kerr, K. M.; Microbial transformations of pergolide to pergolide sulfoxide and pergolide sulfone. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 733-736.

Stanbury, P., Whitaker, A.; Principles of fermentation technology, Pergamon Press, New York, **1984**.

Sugimoto, T., Kokubo, T., Miyazaki, J., Tanimoto, S., Okano, M.; Stereoselective formation of aromatic sulfoxides by oxidation of sulfides and sulfoxides in the presence of bovine serum albumin. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1979**, *23*, 1052-1053.

Sugimoto, T., Kokubo, T., Miyazaki, J., Tanimoto, S., Okano, M.; Stereoselective oxidation of aromatic sulfides and sulfoxides in the binding domain of bovine serum albumin. *Bioorg. Chem.* **1981**, *103*, 311-323.

Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. In R. Süßmuth (ed.) Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.

Tabor, S., Richardson, C. C.; A single residue in DNA polymerase of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 6339-6343.

Takata, T., Yamazaki, M., Fujimori, K., Kim, Y. H., Oae, S., Iyanagi, T.; Stereochemistry of sulfoxides by enzymic oxygenation of sulfides with rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *Chem. Lett.* **1980**, *11*, 1441-1444.

Takata, T., Yamazaki, M., Fujimori, K., Kim, Y. H., Iyanagi, T., Oae, S.; Enzymic oxygenation of sulfides with cytochrome P-450 from rabbit liver. Stereochemistry of sulfoxide formation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 2300-2310.

Theil, F.; Lipases as a tool for the synthesis of chiral intermediates. *Chim. Oggi* **2000**, *18*, 61-64.

Tischler, W., Wedekind, F.; Immobilized enzymes: Methods and applications. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 95-126.

Vayssie, S., Elias, H.; Fast oxidation of organic sulfides by hydrogen peroxide by in situ generated peroxytrifluoroacetic acid. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37*, 2088-2090.

Vetter, A. H., Berkessel, A.; Schiff-base ligands carrying two elements of chirality: matched-mismatched effects in the vanadium-catalyzed sulfoxidation of thioethers with hydrogen peroxide. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1741-1744.

Walkenstein S. S., Seifert, I; Fate, distribution and excretion of S35 promazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1959**, *125*, 283-286.

Walker, A. J.; Asymmetric carbon-carbon bond formation using sulfoxide-stabilised carbanions. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 961-998.

Waxman, D. J., Light, D. R., Walsh, C.; Chiral sulfoxidations catalyzed by rat liver cytochromes P-450. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2499-2507.

Weil, K.; 3-(R)-Hydroxysäuren als Produkte selektiven Fettsäureabbaus – Studien zur β -Oxidation in *Stenotrophomonas maltophilia*. Dissertation, Universität Würzburg, **2001**.

Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R.; Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *31*, 1927-1931.

Yadav, R. P., Agarwal, P., Upadhyay, S. N.; Microbial lipases: tool for drug discovery. *J. Sci. Ind. Res.* **2000**, *59*, 977-987.

Yoshida, T., Kito, M., Tsujii, M., Nagasawa, T.; Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK40. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1217-1222.

Zhang, S., Chu, J., Zhuang, Y.; A multi-scale study of industrial fermentation processes and their optimization. *In* *Advances in biochemical engineering / biotechnology*, Springer Verlag, Heidelberg, **2004**.

Zhao, S. H., Samuel, O., Kagan, H. B.; Asymmetric oxidation of sulfides mediated by chiral titanium complexes: mechanistic and synthetic aspects. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5135-5144.

Lebenslauf

Name: Heckel
Vorname: Frank Theodor
Geburtsdatum: 16.09.1976
Geburtsort: Erlangen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Bekenntnis: evangelisch
Anschrift: Steigerwaldstraße 6, 96160 Geiselwind

Vater: Eckhard Heckel, Lehrer
Mutter: Roswitha Heckel, geb. Müller, Hausfrau
Geschwister: Andreas Heckel, geb. 04.03.1979, Polizeiobermeister im BGS

Schulbildung: September 1982 bis Juli 1986: Grundschule Geiselwind
September 1986 bis Juni 1995: Gymnasium Steigerwald
Landschulheim Wiesentheid

Bundeswehr: Juli 1995 bis Juni 1996: Autokranfahrer beim schweren
Pionierbataillon 12 in Volkach am Main

Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg:
November 1996 bis Juli 1998: Grundstudium
Oktober 1998: Vorprüfung für Lebensmittelchemiker
November 1998 bis Juli 2000: Hauptstudium
November 2000: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

seit Januar 2001: Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität
Würzburg

Hobbies: Feuerwehr, Angeln, Schießen

Ehrenamtliche Tätigkeiten:

- Oberlöschmeister und Jugendwart bei der Freiwilligen
Feuerwehr Markt Geiselwind
- seit Mai 2002: Marktgemeinderat in Geiselwind