

**Biotransformation von
N-Alkyl- und N,N-Dialkylarylaminen
durch *Bacillus megaterium***

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

vorgelegt von
Marcus Taupp
aus Würzburg

Würzburg 2005

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:

Wissenschaft basiert auf Versuch, Zufall und Irrtum.

Meinen Eltern
und Dani

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 2002 bis Juni 2005 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, den großzügigen Freiraum innerhalb des Themengebietes, das entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Diskussionsbereitschaft zum Fortgang der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Hilfsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Heckel für die sehr gute Freundschaft, die vielen Diskussionsrunden und Anregungen sowie für die Einführung in viele mikrobiologische und analytische Arbeitstechniken.

Prof. Dr. Harmsen sowie seinen Mitarbeitern an der Poliklinik für Parodontologie der Universität Münster danke ich recht herzlich für die Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen sowie für zahlreiche Ratschläge und Hilfestellungen in mikrobiologischen Fragestellungen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Goebel sowie Frau Dr. Rdest vom Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg für die vielen Hinweise und Hilfen sowie die großzügige Bereitstellung von Ausrüstung und technischen Geräten.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Zimmermann und Frau Moret aus der pharmazeutischen Technologie des Instituts für Pharmazie der Universität Würzburg für die Benutzung des Großraumautoklaven zur Sterilisation des Fermenters.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums bedanke ich mich bei Christian Bremer, Sandra Keller, Britta Ullmann und Doris Korittke.

Markus Appel danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren und für die Hilfe bei deren Auswertung. Ein herzliches Dankeschön gilt der GC-MS-Crew für die Arbeiten im GC-Labor.

Den Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglichten und mich jederzeit in allen Bereichen tatkräftig unterstützen. Sehr danken möchte ich auch Dani, die durch Unterstützung und Ratschläge wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Publikationen

1. Veröffentlichungen

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.

Stritzker, Jochen; Janda, Jozef; Schoen, Christoph; Taupp, Marcus; Pilgrim, Sabine; Gentshev, Ivaylo; Schreier, Peter; Geginat, Gernot; Goebel, Werner. Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* aro mutants. *Infection and Immunity* **2004**, 72, 5622-5629.

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.* **2005**, 71, 2199-2202.

Taupp, Marcus; Harmsen, Dag; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Production of natural methyl anthranilate by microbial N-demethylation of N-methyl methyl anthranilate by the topsoil isolated bacterium *Bacillus megaterium*. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9586-9589.

Taupp, Marcus; Heckel, Frank; Harmsen, Dag; Schreier, Peter. Biohydroxylation of N,N-dialkylarylamines by the isolated topsoil bacterium *Bacillus megaterium*. *Enz. Micr. Technol.*, in press

Taupp, Marcus; Heckel, Frank; Harmsen, Dag; Schreier, Peter. Direct conversion and trapping of formaldehyde, formed via oxidative N-demethylation of N,N-dimethylaniline and N-ethyl-N-methylaniline by *Bacillus megaterium*, using a cysteamine-thiazolidine system. *J. Microbiol. Methods*, submitted

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**.

Erläuterungen

- Der vorliegenden Arbeit ist eine Zusammenfassung vorangestellt, in der die Verbindungen abweichend vom weiteren Text nummeriert sind. Hierzu wurden römische Ziffern zur Nummerierung verwendet. Wichtige Verbindungen werden auch im weiteren Text durch römische Ziffern gekennzeichnet, wenn die entsprechende Verbindung nicht zu den Substraten für die bakteriellen Umsetzungen gehört.
- Alle in dieser Arbeit für bakterielle Umsetzungen verwendeten Substrate sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen durchnummeriert. Die im Anhang aufgeführte Strukturmatrix fasst die Substrate im Überblick zusammen. Die entsprechenden Hydroxylierungsprodukte sind zusätzlich mit einem Stern und einer arabischen Zahl gekennzeichnet. Der Stern steht für ein entstandenes Hydroxylierungsprodukt; die arabische Zahl kennzeichnet die Position der Hydroxylgruppe am Aromaten.
- Die Benennung von Verbindungen orientiert sich an der in den „Chemical Abstracts“ verwendeten Nomenklatur.
- Die abgebildeten Chromatogramme und Spektren wurden von den Originalvorlagen gescannt oder unter Verwendung der Originaldaten erstellt.

- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen wurden im Text durch den Zusatz „®“ gekennzeichnet.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Anthranilat-Synthase
ATCC	American Type Culture Collection
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cfu	colony forming units
CPO	Chlorperoxidase
CYP	Cytochrom-P-450-Monooxygenasen
d	Duplett
d _f	Filmdicke von Trennphasen
δ	chemische Verschiebung delta
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM(Z)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EI	Elektronenstoßionisation
EMA	N-Ethyl-N-methylanilin
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	und andere (et alii)
F ₂₅₄	Fluoreszenzfarbstoff zur UV-Detektion bei 254 nm
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Fließmittel
FMN	Flavin-abhängige Monooxygenase
GC	Gaschromatographie
HRGC	high resolution gas chromatography
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSGC	Headspace gas chromatography
J	Kopplungskonstante
M	molar, mol/l
m	Multipllett
MA	Methylantranilat
mm	Milimeter
mol	Mol
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
NIH	National Institute of Health
NMMA	N-Methyl-methylantranilat
NMR	magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
OD	Optische Dichte (optical density)
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
ppm	parts per million oder chemische Verschiebung in Hertz
q	Quartett
rDNA	ribosomale Desoxynukleinsäure
R _t	Retentionszeit

s	Singulett
SP	Sojabohnen-Peroxidase
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär
TIC	Totalionenchromatogramm
U	Unit
u	Masseneinheit
u.a.	unter anderem
upm / rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 KENNNTNISSTAND	3
2.1 DIE VERWENDUNG VON BOKATALYSATOREN	3
2.1.1 ENZYME	3
2.1.2 MIKROORGANISMEN	4
2.1.2.1 Antibiotika	4
2.1.2.2 Aminosäuren	5
2.1.2.3 Aromastoffe	7
2.2 BIOTRANSFORMATIONEN DURCH CYTOCHROM P-450 UND PEROXIDASEN	8
2.2.1 Cytochrom P-450	9
2.2.1.2 Mikrobielle Cytochrom-P-450-Systeme	11
2.2.1.3 Hydroxylierungs- und N-Demethylierungsreaktionen durch Cytochrom-P-450.....	17
2.2.2 Peroxidasen	24
2.2.2.1 Mikrobielle Peroxidasen	25
2.2.2.2 Peroxidase katalysierte Hydroxylierung und N-Dealkylierung.....	25
2.3 DIE AROMASTOFFE N-METHYL-METHYLANTHRANILAT UND METHYLANTHRANILAT.....	29
2.3.1 Vorkommen und sensorische Eigenschaften	29
2.3.2 Verwendung von N-Methyl-methylantranilat und Methylantranilat.....	30
2.3.3 Darstellung von Methylantranilat	31
2.3.3.1 Chemische Methoden	31
2.3.3.2 Biotechnologische Herstellung von natürlichem Methylantranilat	34
2.3.3.2.1 Enzymatische Biotransformation	34
2.3.3.2.2 Enzymatische Veresterung von Anthranilsäure.....	36
2.3.3.2.3 <i>De novo</i> – Biosynthese von Methylantranilat.....	37
2.3.3.2.4 Mikrobielle Biotransformation	38
2.3.4 Die Anthranilat-Synthase	39
2.4 DAS BAKTERIUM <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	43
2.4.1 Allgemeine Charakterisierung von <i>Bacillus megaterium</i>	43
2.4.2 <i>Bacillus megaterium</i> als Biokatalysator in der industriellen Biotechnologie.....	44
2.5 FORMALDEHYD-ANALYTIK.....	45
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	53
3.1 ISOLIERUNG GEEIGNETER MIKROORGANISMEN ZUR BIOTRANSFORMATION	53
3.2 CHARAKTERISIERUNG DES ISOLIERTEN BAKTERIENSTAMMES	55
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung	55
3.2.2 Genotypische Charakterisierung	56
3.3 IDENTIFIZIERUNG DER BIOTRANSFORMATIONSPRODUKTE VON N-ETHYL-N-METHYLANILIN.....	57
3.4 DIVERSE N- UND P-ALKYLVERBINDUNGEN ALS SUBSTRATE	62

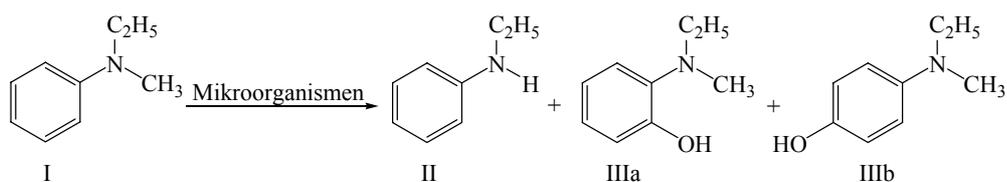
3.4.1	Substratscreening mit einfach strukturierten Aminen.....	62
3.4.2	Benzylische und aliphatische zyklische N,N-Dialkylverbindungen.....	65
3.4.3	Substituierte N,N-Dialkylarylverbindungen	66
3.4.4	N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p,p'</i> -benzidin und N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -benzidin	68
3.4.5	Umsetzungen von Phenylphosphinen	69
3.4.6	Biotransformation von N-Methyl-methylantranilat zu Methylantranilat.....	70
3.5	OXIDATIVE N-DEMETHYLIERUNG: ANALYTIK UND QUANTIFIZIERUNG VON FORMALDEHYD.....	70
3.5.1	Headspace-Analytik	71
3.5.2	Derivatisierung von Formaldehyd mit Dimedon.....	71
3.5.3	Derivatisierung von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	72
3.5.4	Derivatisierung von Formaldehyd mit Cysteamin.....	72
3.5.6	Inkubation stabil isotoopen-markierter Substrate	74
3.6	INDUKTION UND INHIBIERUNG VON CYTOCHROM P-450.....	79
3.6.1	Induktion von Cytochrom-P-450 durch Barbiturate	79
3.6.2	Inhibierung von Cytochrom-P450 durch spezifische Inhibitoren.....	87
3.7	N-DEMETHYLIERUNG VON N-METHYL-METHYLANTRANILAT.....	92
3.7.1	Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat mit <i>Bacillus megaterium</i>	92
3.7.2	Optimierung der Umsetzung zur Erhöhung der Ausbeute an Methylantranilat.....	93
3.7.2.1	Substratkonzentration und Inkubationsdauer	93
3.7.2.2	Inkubationstemperatur	94
3.7.2.3	pH-Wert des Mediums	95
3.7.2.4	Einfluss des Inkubationsmediums	97
3.7.3	Antibakterielle Wirksamkeit gegenüber <i>B. megaterium</i>	98
3.7.3.1	Inhibierungsversuche im Flüssigmedium	99
3.7.3.2	Inhibierungsversuche auf Agarplatten	100
3.7.4	Immobilisierung von <i>Bacillus megaterium</i> in Natrium-Alginatkapseln.....	101
3.7.5	Up-scaling im Bioreaktor	102
4	EXPERIMENTALTEIL.....	106
4.1	MATERIAL.....	106
4.1.1	Chemikalien	106
4.1.2	Mikroorganismen	106
4.1.3	Dünnschichtchromatographie	107
4.1.4	Säulenchromatographie	107
4.2	GERÄTE.....	107
4.2.1	Kapillargaschromatographie (HRGC)	107
4.2.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	108
4.2.3	Headspace-Gaschromatograph (HS-GC)	109
4.2.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	110
4.2.5	Geräte für mikrobiologische Umsetzungen	110
4.2.6	Sonstige Geräte	111

4.3 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	112
4.3.1 Herstellung von Agarplatten	112
4.3.2 Umimpfen der Bakterien	113
4.3.3 Isolierung von Mikroorganismen aus einer Bodenprobe.....	113
4.3.4 Herstellung der Wachstumsmedien	114
4.3.5 Substratscreening mit N-Ethyl-N-methylanilin (Standardaufarbeitung).....	118
4.3.6 Erweitertes Substratscreening	120
4.3.7 Induktion und Inhibierung von CYP	120
4.3.8.1 Head-Space-Analytik	121
4.3.8.2 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	121
4.3.8.3 Derivatisierung mit Dimedon	121
4.3.8.4 Derivatisierung mit Cysteamin	122
4.3.9 Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat	122
4.3.10 Immobilisierung von <i>Bacillus megaterium</i>	123
4.3.11 Einsatz des Bioreaktors	123
4.3.12 Überprüfung der antimikrobiellen Eigenschaften von NMMA und MA	126
4.3.13 Phänotypische Charakterisierung	127
4.3.14 Genotypische Charakterisierung	128
4.3.14.1 16S rDNA-Sequenzierung	128
4.3.14.2 DNA/DNA-Hybridisierung	130
4.4 SYNTHESSEN.....	132
4.4.1 Synthesen von N,N-Dialkyl-2-aminophenolen	132
4.4.2 Synthese von N,N-Dialkyl-4-aminophenolen	134
4.4.3 Synthese von N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol.....	136
4.4.4 Synthese von N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol.....	137
4.4.5 Synthese von N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin.....	138
4.4.6 Synthese von N,N-Di-[methyl- ¹³ C]-anilin	139
4.4.7 Synthese von N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin.....	139
4.4.8 Synthese von N-Ethyl-N-[methyl- ¹³ C]-anilin	140
STRUKTURMATRIX.....	141
LITERATURVERZEICHNIS.....	143

Zusammenfassung

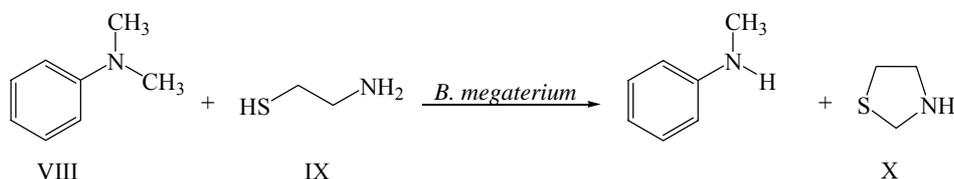
In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur bakteriellen Biotransformation von N-Alkyl- sowie N,N-Dialkylarylaminen mit dem Ziel der arylischen Hydroxylierung und N-Dealkylierung durchgeführt. Bodenproben wurden einem Screening-Verfahren unterworfen, um selektiv nach Mikroorganismen zu suchen, die zu den genannten Biotransformationen fähig waren.

1. In einem Screeningverfahren wurden unter Verwendung von N-Ethyl-N-methylanilin (I) als Standardsubstrat aus Bodenproben Mikroorganismen isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Biotransformation von (I) überprüft. Einer der isolierten Stämme setzte das zugeführte Substrat (I) effizient und reproduzierbar zu drei Hauptprodukten (II), (IIIa) und (IIIb) um. Deren Strukturaufklärung erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) sowie anhand eindimensionaler NMR-Experimente ($^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$). Identifiziert wurden zwei hydroxylierte Produkte, N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol (IIIa) und N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (IIIb), ferner wurde N-Ethylanilin (II), das N-Dealkylierungsprodukt von (I) gebildet. Die Identitäten von (IIIa) und (IIIb) wurden durch synthetisierte Referenzsubstanzen bestätigt.

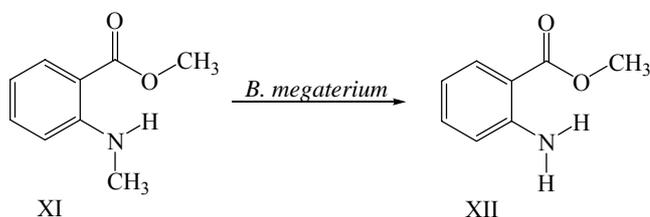


2. Die phänotypische und genotypische Charakterisierung dieses Bodenisolates als *Bacillus megaterium* erfolgte mittels mikroskopischer und färbetechnischer Methoden sowie der 16S rDNA-Sequenzierung. Zur eindeutigen Zuordnung wurde eine DNA/DNA-Hybridisierung gegenüber dem *Bacillus megaterium* Type-strain (DSM 32, ATCC 14581^t) durchgeführt.

situ, mittels Cysteamin-Zugabe (IX) in das Medium, mit Umsetzung zu Thiazolidin (X).



8. Anhand von Inkubationsversuchen mit den stabil-isotopenmarkierten Substraten N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin und N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin sowie N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin und N-Ethyl-N-[methyl-¹³C]-anilin wurde anhand der Massenspektren der gebildeten Thiazolidine eindeutig festgestellt, dass die Methylgruppe als Formaldehyd abgespalten wird.
9. Das Potential von *Bacillus megaterium* zur N-Dealkylierung wurde zur mikrobiellen N-Demethylierung von natürlichem N-Methyl-methylantranilat (XI) genutzt. Dadurch wurde der natürliche Aromastoff Methylantranilat (XII) gewonnen.



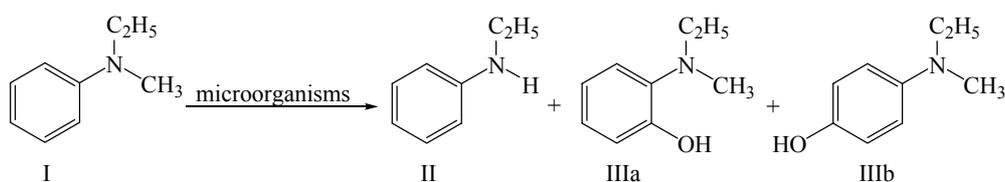
10. Zur Optimierung der bakteriellen Biotransformation von N-Methyl-methylantranilat zu Methylantranilat wurden in Bezug auf Wachstumsmedium, Inkubationstemperatur, pH-Wert des Inkubationsmediums sowie Substratkonzentration verschiedene Variationen durchgeführt.
11. Die antimikrobiellen Eigenschaften von N-Methyl-methylantranilat und Methylantranilat gegenüber *Bacillus megaterium* wurden durch Hemmhofbildung sowie der Bestimmung der Inhibierungskonzentration im Flüssigmedium nachgewiesen. Sowohl Substrat als auch Produkt erwiesen sich in den unterschiedlichen Tests als antibakteriell.

12. Im Anschluß an Versuche zur Immobilisierung, die zu geringeren Ausbeuten führten, erfolgten schließlich Umsetzungen im Bioreaktor. Hierbei ließen sich die bei den Schüttelkulturen erhaltenen Ergebnisse direkt proportional auf den Fermenter übertragen.

Summary

The goal of this study was to conduct the microbial biotransformation of N-alkyl- and N,N-dialkylarylamines. Main objective was the aryl hydroxylation and N-dealkylation of this class of substrates. By this, microorganisms were isolated from topsoil and a selective screening process was started to search for microorganisms capable of conducting the biotransformations mentioned above.

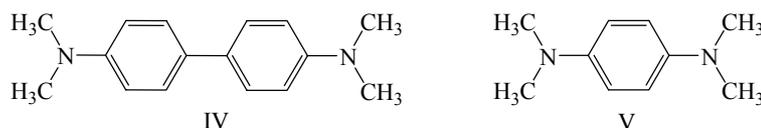
1. In a screening process and by the use of N-ethyl-N-methylaniline (I) as substrate, microorganisms of soil samples were isolated and proven of their ability to biotransform N-ethyl-N-methylaniline (I). One isolate showed three biotransformation products (II), (IIIa) and (IIIb). Structure determination was done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and nuclear magnetic resonance experiments ($^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$). N-ethyl-N-methylaniline (I) was biohydroxylated to N-ethyl-N-methylaniline-2-aminophenol (IIIa) and N-ethyl-N-methyl-4-aminophenol (IIIb), N-demethylation of N-ethyl-N-methylaniline afforded N-ethylaniline (II). (IIIa) as well as (IIIb) were also identified by synthesized reference samples



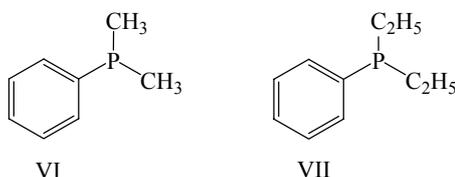
2. The soil isolate was characterized and identified phenotypical and genotypical by color reactions and the standard 16S rDNA method being *Bacillus megaterium*. To complete the assignment of the isolate to the species *Bacillus megaterium*, DNA/DNA-hybridization analysis against the *Bacillus megaterium* type (DSM 32, ATCC 14581^t) strain was conducted.
3. In an extended substrate screening, structural properties for a successful biotransformation of N-alkyl- and N,N-dialkylarylamines by *Bacillus megaterium*

were investigated. Substituent influences were proven in a further substrate screening regarding hydroxylation as well as N-dealkylation.

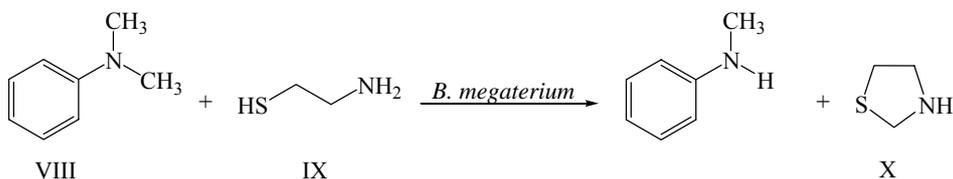
4. Bulky and large substrates like N,N,N',N'-tetramethyl-*p,p'*-benzidine (IV) and N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-benzidine (V) were not hydroxylated by the microorganisms. But, N-demethylation was observed whereas (IV) was more accepted than (V).



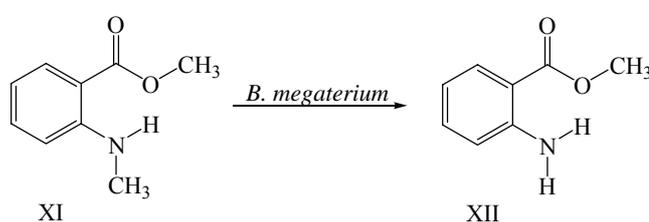
5. Exchange of nitrogen against phosphorus by using dimethylphenylphosphine (VI) and diethylphenylphosphine (VII) as substrates finally stopped all biotransformation activity of *Bacillus megaterium*. Neither aryllic hydroxylation nor P-dealkylation occurred.



6. Trials to influence the bacterial activity towards the substrate N,N-diethylaniline, elicitors and inhibitors were used to affect cytochrome-P-450. Certain barbiturates clearly increased aryllic hydroxylation as well as N-dealkylation. Repression of these metabolites was shown by metyrapone, pyridine, n-octylamine and imidazole.
7. N-demethylation reaction of *Bacillus megaterium* was further investigated for a detection of formaldehyde. Formaldehyde, built after N-demethylation of N,N-dimethylaniline (VIII) or N-ethyl-N-methylaniline, was caught by added cysteamine (IX) and derivatized to thiazolidine (X).



8. Incubation of the stable isotope labelled substrates N,N-di-(trideuteromethyl)-aniline and N-ethyl-N-(trideuteromethyl)-aniline as well as N,N-di[methyl- ^{13}C]-aniline and N-ethyl-N-[methyl- ^{13}C]-aniline and the resulting mass spectral fragmentations of the build labelled thiazolidines clearly stated that formaldehyde comes from methylgroups.
9. Observed N-dealkylation reactions of *Bacillus megaterium* were used to produce the food flavour methyl anthranilate (XII) by microbial N-demethylation of N-methyl methyl anthranilate (XI).



10. Several variations of the standard conditions were proven for the optimization of the bacterial biotransformation from N-methyl methyl anthranilate to methyl anthranilate: incubation temperature, pH-value, substrate concentration and media.
11. Antimicrobial activities of N-methyl methyl anthranilate and methyl anthranilate against *Bacillus megaterium* were tested by using the paper disc diffusion assay and determination of the minimum inhibitory concentration in liquid medium. Substrate as well as product exhibited antimicrobial activity in both tests.
12. To improve the stability of *Bacillus megaterium*, bacterial cells were immobilized in sodium-alginate-globules resulting in very low yields of methyl anthranilate. Finally, as a summarization of all obtained methyl anthranilate results, an upscaling was done in the bioreactor in a direct proportional way.

1 Einleitung

Die Biotechnologie ist eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Der gezielte Einsatz von Enzymen und Mikroorganismen zu selektiven Biotransformationen beschäftigt immer mehr auch die Organische Chemie, in der die Verwendung von Biokatalysatoren lange Zeit als exotisches Randgebiet galt. Mikroorganismen enthalten eine Vielzahl selektiver Enzyme für die verschiedensten Anwendungen und besitzen somit die Fähigkeit zur regio-, diastereo- und enantioselektiven Synthese sowie zur gezielten Gewinnung von Naturstoffen und Synthesebausteinen. Mikrobielle Kulturen stellen erneuerbare Biokatalysatoren dar, die jederzeit in der erforderlichen Menge kultiviert werden können. Hierbei erübrigen 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 biotechnologischer Verfahren, um den Einsatz in einem breiten Wirkspektrum zu verwirklichen (Patel et al. 2003, Faber und Kroutil 2005).

Besonders im Hinblick auf Funktionalisierungsreaktionen bieten mikrobielle Systeme die Möglichkeit, diese selektiv und unter einfachen und schonenden Bedingungen durchzuführen (Liese 2002). Aber Mikroorganismen sind nicht nur „Synthesekünstler“, sondern können auch zur Überprüfung des Metabolismus von Pharmaka verwendet werden. Aufgrund von Enzymsystemen, die zum Teil sehr große Ähnlichkeiten zu den Säugetier-Enzymen aufweisen, werden Medikamente bzw. Xenobiotika meist ähnlich metabolisiert (Venisetty und Ciddi 2003). Somit stellen mikrobielle Biotransformationssysteme eine einfach zu handhabende Möglichkeit dar, eventuell im Tiermodell auftretende Metabolite zu identifizieren oder vorherzusagen (Azerad 1999, Srisilam und Veeresham 2003).

Der Einsatz von Mikroorganismen zur Durchführung von gezielten Biotransformationen hat sich auch in der Aromaindustrie während der letzten Jahre stetig fortentwickelt. Durch das gesteigerte Bedürfnis des Konsumenten nach „natürlichen“ Aromastoffen besteht hier im Bereich der Biotechnologie ein Bedarf an Biokatalysatoren (Schreier 1997). Dies setzt ein enges Zusammenarbeiten der Bereiche wie Enzymkinetik und klassischer Mikrobiologie mit neuen Ansätzen der molekularen Biotechnologie voraus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst in einem selektiven Screeningverfahren Mikroorganismen isoliert werden, die zur Biotransformation von N,N-Dialkylarylaminen befähigt sind. Hierzu bot es sich an, aus einer Bodenprobe Mikroorganismen zu isolieren und diese gezielt mit dem Substrat N-Ethyl-N-methylanilin zu inkubieren. Das Hauptaugenmerk war auf die durch Versuche mit Lebermikrosomen schon bekannten Metabolite zu legen. Im Vordergrund stehen hier arylische Hydroxylierung, die N-Dealkylierung und die N-Oxidation.

Zur Biotransformation fähige Bodenkeime sind mit den gängigen phäno- und genotypischen Methoden zu charakterisieren und zu identifizieren. Die Strukturen der biokatalytisch gebildeten Umsetzungsprodukte sollten mittels verschiedener Methoden wie Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), eindimensionaler NMR-Experimente ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) und synthetisierter Referenzsubstanzen aufgeklärt werden. In einem erweiterten Substrat-Screening sollten die strukturellen Voraussetzungen der Biotransformation untersucht werden. Hierbei lag das Augenmerk auf den Einfluss der arylischen Grundstruktur, aber auch Substituenteneffekte sollten betrachtet werden.

Durch verschiedene Induktions- und Repressionsversuche war geplant, Aussagen über die für die Biotransformation verantwortlichen Enzymsysteme zu treffen.

Letzlich sollte noch versucht werden, die gesammelten Erkenntnisse auf einen biotechnologisch-wirtschaftlich interessanten Prozess zu übertragen.

2 Kenntnisstand

2.1 Die Verwendung von Biokatalysatoren

2.1.1 Enzyme

Enzyme werden schon lange als Biokatalysatoren verwendet: zuckerhaltige Nahrungsmittel werden zu Alkohol vergoren, durch Milchsäure- und Hefegärung entstehen Sauermilch- und Sauerteigprodukte. Heute werden Enzyme als Biokatalysatoren gezielt eingesetzt, um wirtschaftlich wichtige Produkte möglichst selektiv in großen Ausbeuten, hoher Reinheit und unter milden Reaktionsbedingungen herzustellen. Enzyme haben im Vergleich zur chemischen Synthese eine Reihe von Vorteilen (van Beilen und Li 2002). Folgende Auflistung gibt die Vorteile enzymkatalysierter Biotransformationen wieder:

- Enantio- und Regioselektivität
- Substratspezifität
- Meist milde Reaktionsbedingungen
- Wiederverwendbarkeit in Form von Enzym-Immobilisaten
- Einfache Herstellung in reiner Form und ohne Nebenaktivitäten durch Protein-Engineering

Einschränkungen für die Anwendung von Enzymen in der Biotechnologie beruhen auf einer begrenzten Substratelektivität, Enzyminhibierungen und Instabilitäten durch die benötigten Temperaturen oder pH-Werte. Diese Nachteile lassen sich oft durch geschickte Auswahl der Reaktionsparameter oder Immobilisierung zum Teil wieder ausgleichen (Burton et al. 2002, Cherry und Fidanstef 2003).

2.1.2 Mikroorganismen

Der Einsatz von Mikroorganismen zur gezielten Stoffproduktion, aber auch die Bio-transformation von sog. Prekursoren durch Mikroorganismen, hat in den letzten Jahrzehnten wesentlich zugenommen. Bakterien, Hefen und Pilze enthalten eine Vielzahl selektiver Enzyme für die verschiedensten Anwendungsbereiche und können jederzeit in der erforderlichen Menge kultiviert werden. Im Folgenden werden kurz einige wichtige Bereiche der mikrobiellen Stoffproduktion dargestellt.

2.1.2.1 Antibiotika

1928 wurde von Alexander Fleming auf einer Staphylokokken-Kultur eine Pilzinfektion entdeckt, die das Wachstum der Staphylokokken hemmte. Die Aufreinigung des dafür verantwortlichen Antibiotika-Gemisches und die Strukturaufklärung von Penicillin wurde mehr als 10 Jahre später von Howard Florey bewerkstelligt (Chain et al. 1940, Chain and Florey 1944). Erfolgreiche Tierversuche und Therapieerfolge bei einer an einer Streptokokken-Infektion erkrankten Patientin lösten ein britisch-amerikanisches Großprojekt aus, das im Schatten des 2. Weltkrieges stand. 1945 konnte Benzyl-Penicillin bereits in kg-Mengen hergestellt werden, allerdings wirkt es nur gegen Gram-positive Mikroorganismen (Neu 1977). 1944 fand Selman Waksman in einer Kultur von *Streptomyces griseus* ein auch gegen Gram-negative Erreger wirksames Antibiotikum, das Streptomycin (Schatz et al. 1944).

In den darauffolgenden Jahren etablierte sich die industrielle Herstellung; aufgrund systematischer Screeningversuche entdeckte man zahlreiche neue Antibiotika und entwickelte die technologischen Voraussetzungen für synthetische Herstellungen (Holzgrave 2004). Tabelle 2-1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Antibiotikagruppen und ihre Anwendungen. Der häufig praktizierte, unkritische Einsatz von Antibiotika bei Bagatellerkrankungen sowie bei der Massentierhaltung führte zu einem erhöhten Auftreten antibiotikaresistenter Mikroorganismen. Durch Zulassungsbeschränkungen auf genau festgelegte Einsatzgebiete und die Entwicklung neuer Antibiotika versuchte man, die Resistenzen einzudämmen (Roberts 2002). Durch Kombination von Screening, Zellfusion verschiedener Antibiotika-Bildner und der Suche nach spezifischen Targets auf Ba-

sis der Genom-Analyse pathogener Mikroorganismen findet derzeit die Suche nach sowohl neuen Antibiotika als auch neuen systematischen Ansatzpunkten für die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe statt (Holzgrabe und Bechthold 2000, Tohyama et al. 2004).

Tab. 2-1: Überblick über wichtige Antibiotikagruppen und ihre Anwendungen (Schmid 2002)

Antibiotikagruppe	Grundstruktur	Beispiele (Anwendung)
Kohlenhydrat-Antibiotika	Aminoglykoside	Streptomycin (Medizin) Kasugamycin (Reis-Fungizid)
makrocyclische Lactone	Makrolid-Antibiotika Polyen-Antibiotika Ansamycine	Erythromycin (Medizin) Pimaricin (Käseherstellung) Rifamycin (Tuberkulose)
Chinone und verwandte Antibiotika	Tetracycline Anthracycline	Tetracyclin (Medizin) Doxorubicin (Tumor-Therapie)
Aminosäure- und Peptid-Antibiotika	Aminosäure-Derivate β -Lactam-Antibiotika	Cyclosporin (Transplantationsmedizin) Penicilline, Cephalosporine (Medizin)
N-haltige Heterocyclen	Nucleosid-Antibiotika	Polyoxine, Blasticidin S (Fungizide)
O-haltige Heterocyclen	Polyether-Antibiotika	Monensin (Geflügelmast)
alicyclische Antibiotika	Cycloalkan-Derivate	Cycloheximid (Blattfungizid)
aromatische Antibiotika	Benzol-Derivate	Chloramphenicol (Medizin)

Industriell hergestellt werden heute etwa 200 Antibiotika; bei den meisten handelt es sich um halbsynthetische Antibiotika, in denen die ursprünglich gefundene biologische aktive Leitstruktur mit chemischen oder biotechnologischen Methoden variiert wird (Demain 2002, Elander 2003).

2.1.2.2 Aminosäuren

Aminosäuren sind die Hauptbestandteile von zellulärem Protein, aber auch wichtige Nährstoffe für alle lebenden Zellen. Ihre Bedeutung ist eng verknüpft mit dem Nährwert, besonders bei folgenden essentiellen Aminosäuren: Lysin, Threonin, Methionin,

Tryptophan, Phenylalanin, Valin, Leucin, Isoleucin und, in gewissem Ausmaß, Arginin und Histidin. Anwendung finden Aminosäuren in verschiedenen Gebieten, abhängig von ihrem Eigengeschmack, dem Nährwert oder ihren physiologischen Eigenschaften. Auch zur Aufbesserung von Tierfutter oder in der pharmazeutischen Industrie für Infusionslösungen werden Aminosäuren benötigt.

Erste Versuche zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren wurden 1957 von Kinoshita und Udaka durchgeführt. In einem Screening nach Bakterien, die zur Ausscheidung von Aminosäuren befähigt sind, wurde ein Gram-positives Bodenbakterium entdeckt, das auxotroph für das Vitamin Biotin war und unter Biotinmangel spontan Glutamat ausschied (Kinoshita et al. 1957). In den darauffolgenden Jahren wurde eine Reihe von Bakterien isoliert, die zur Glutamatexkretion befähigt waren. Später wurden alle diese Isolate zu *Corynebacterium glutamicum* reklassifiziert (Liebl et al. 1991). Nach dem erfolgreichen Einführen von *C. glutamicum* für die kommerzielle Produktion großer Mengen an Aminosäuren wurden auch andere Mikroorganismen, vor allem *Escherichia coli*, erfolgreich eingesetzt.

Tab.2-2: Aminosäureproduktion (2002/2003) und ihre Anwendungsbereiche (Krämer 2004)

Aminosäure	Geschätzte Produktion (Tonnen/Jahr)	Hauptherstellungsmethode	Hauptverwendungszweck
L-Glutamat	1 000 000	Fermentation	Geschmacksverstärker
L-Lysin	600 000	Fermentation	Futterzusatz
D,L-Methionin	400 000	Chemische Synthese	Futterzusatz
Glycin	22 000	Chemische Synthese	Lebensmittelzusatz
L-Threonin	20 000	Fermentation	Futterzusatz
L-Aspartat	10 000	Enzymatische Katalyse	Süßmittel (Aspartam)
L-Phenylalanin	10 000	Fermentation	Süßmittel (Aspartam)
L-Cystein	3 000	Enzymatische Katalyse	Futterzusatz
L-Arginin	1 000	Fermentation	Arzneimittel
L-Tryptophan	500	Fermentation	Arzneimittel

In der heutigen Biotechnologie wird für die Produktion von Aminosäuren hauptsächlich auf die zwei genannten Mikroorganismen *C. glutamicum* (Glutamat, Lysin, aromatische Aminosäuren) und *E. coli* (Threonin, aromatische Aminosäuren) zurückgegriffen (vgl. Tab. 2-2). Die Verwendung anderer Mikroorganismen, z. B. *Serratia marcescens*, ein Verwandter von *E. coli*, hat sich aus wirtschaftlichen Gründen nicht durchgesetzt (Aida et al. 1986, Leuchtenberger 1996). War in den letzten Jahrzehnten die Suche nach Produktionsstämmen von Mutation, Selektion und Screeningprozessen geprägt, werden heute nach Einführung und Etablierung von molekularbiologischen Methoden gezielt Mikroorganismen modifiziert, um das gewünschte Produkt in möglichst hoher Ausbeute zu erlangen. Die Kombination dieser sog. Hochleistungsstämmen mit ihren maßgeschneiderten Eigenschaften und neue Kultivierungs- und Fermentationstechniken eröffnen ein weites Feld zur gezielten Stoffproduktion (Ikeda und Nakagawa 2003, Kirchner und Tauch 2003).

2.1.2.3 Aromastoffe

Die Herstellung von Aromastoffen durch biotechnologische Prozesse gewann in den letzten Jahren sehr an Bedeutung. Aufgrund legislativer Vorgaben zählen diese Aromastoffe zu den „natürlichen“ Aromastoffen, die vom Verbraucher gegenüber „künstlichen“ und „naturidentischen“ Aromastoffen favorisiert werden. Unterscheiden muss man bei der biotechnologischen Aromastoffproduktion zwischen einer *de novo*-Synthese und einer Biotransformation von Vorläuferkomponenten. Bei der *de novo*-Synthese werden Vorläuferverbindungen wie Kohlenhydrate, Fette und Proteine abgebaut und die Produkte zu komplexen Aromastoffen biotransformiert. Dieses Prinzip wird schon seit sehr langer Zeit unbewußt und heute gezielt zur Produktion von fermentierten Lebensmitteln wie Käse, Joghurt, Bier und Wein angewandt (Hamada et al. 1991, Imhof und Bosset 1994). Vor allem im Bereich der Pilze und Hefen werden durch *de novo*-Synthese Aromastoffe gebildet, aber auch Bakterien sind dazu befähigt (vgl. Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Aromastoffproduktion durch verschiedene Mikroorganismen

Charakteristischer Aromastoff	Mikroorganismus	Literatur
Pilze:		
1-Octen-3-ol	<i>Lentinus edodes</i>	Armstrong und Brown, 1994
2-Phenylethanol	<i>Ascoidea hylecoeti</i>	Berger, 1995
Benzaldehyd	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Fabre et al., 1996
Vanillin	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>	Falconnier et al., 1994
Pyrazine	<i>Aspergillus sp.</i>	Seitz 1994
Hefen:		
Furaneol	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Hecquet et al., 1996
Phenylethanol	<i>Kluyveromyces sp.</i>	Welsh 1994
Citronellol, Geraniol	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Welsh 1994
Bakterien:		
Nootkaton	<i>Enterobacteriaceae</i>	Janssens et al. 1992
Geosmin	<i>Streptomyces citreus</i>	Pollak und Berger, 1996
2-Acetyl-1-pyrrolin	<i>Bacillus cereus</i>	Romanczyk et al., 1995

Bei der Biotransformation werden gezielt Vorstufen, sog. Prekursoren, von den jeweiligen Mikroorganismen zum entsprechenden Aromastoff metabolisiert. Durch dieses Verfahren kann gezielt nur ein einziger Aromastoff produziert werden, während bei den üblichen Fermentationen häufig komplexe Aromastoffgemische entstehen (Krings und Berger 1998, Vandamme und Soetaert 2002, Schrader et al. 2004, Serra et al. 2005).

2.2 Biotransformationen durch Cytochrom P-450 und Peroxidasen

Funktionalisierungsreaktionen umfassen im Wesentlichen Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. Im Laufe der Evolution wurden im tierischen und humanen Stoffwechsel mehrere Enzymsysteme zur Biotransformation von Fremdstoffen entwickelt, um Xenobiotika gezielt so zu verändern, dass sie leicht ausgeschieden werden können. Bei diesen Fremdstoffen handelt es sich meist um lipophile Verbindungen, die durch enzymatische Reaktionen in wasserlösliche Produkte umgewandelt werden. Traditionell unterscheidet man zwischen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen. In Phase-I-Reaktionen wird die Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse lipophiler Fremdstoffe katalysiert; Enzyme der Phase-II-Reaktionen koppeln den so veränderten Fremdstoff mit einem endogenen Substrat. Zum Konjugat von Phase-I-Stoffwechselreaktionen werden funktionelle Gruppen oft durch oxidierende Enzyme eingeführt: durch Monooxygenasen wie die Cytochrom-P-450-abhängigen und die flavinabhängigen Monooxygenasen sowie durch Peroxidasen (Dekant und Vamvakas 1995).

2.2.1 Cytochrom P-450

Die Cytochrom P-450-Monooxygenasen (CYP) werden auch als unspezifische Monooxygenasen bezeichnet und beinhalten eine sehr große Familie von Hämproteinen, welche die Oxidation einer breiten Palette physiologischer und nicht-physiologischer Stoffe katalysieren. CYP werden in beinahe allen lebenden Organismen wie z.B. Bakterien, Hefen, Pflanzen, Tieren, aber zum Beispiel nicht in Helminthen, gefunden (Precious und Barrett 1989). Säugetier-CYP finden sich in beinahe allen Organen und Geweben. Die Enzyme sind Membran-gebunden und größtenteils im Endoplasmatischen Retikulum, zum Teil aber auch in den Mitochondrien lokalisiert (Coon et al. 1992). Die Entstehung und Evolution von CYP konnte bis zu den frühen Tagen der biologischen Evolution zurückverfolgt werden, also bis vor circa 3.5 Billionen Jahre. Das Aufkommen von atmosphärischem Sauerstoff und die dadurch entstehenden reduktiven Reaktionen könnten die Entwicklung von CYP favorisiert haben. Erst später entwickelten sich dann schrittweise die mannigfaltigen Oxidationen von endogenen Substraten wie Steroiden, Fettsäuren, Leukotrienen, Prostaglandinen und Pheromonen sowie die Detoxifizierung von

Xenobiotika. Diese zeitlich lange Evolutionsdauer ist vereinbar mit der Allgegenwärtigkeit, der Vielseitigkeit und der Vielzahl an Isoenzymen von CYP (Nebert und Gonzales 1987, Nelson et al. 1993). Die CYP sind sog. B-Typ-Cytochrome, die Protoporphyrin IX (wie in Hämoglobin, Myoglobin, Katalase oder Peroxidase) enthalten (vgl. Abb. 2-1).

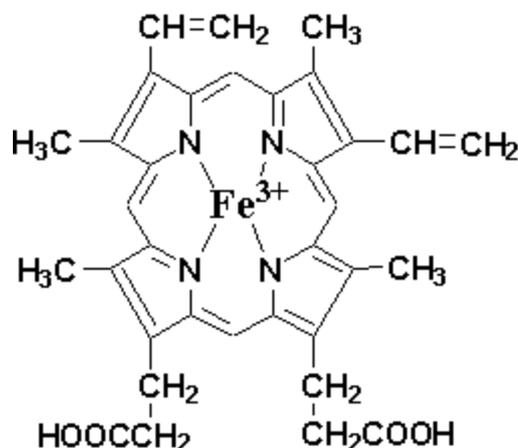


Abb. 2-1: Struktur des Eisen-Protoporphyrin IX von CYP (Stryer 1996)

Diese Hämproteine haben eine Molekularmasse von 45 bis 55 kDa, die aus einer Peptidkette mit etwa 400-500 Aminosäuren und dem Eisen-Protoporphyrin-IX- Hämgerüst als prosthetischer Gruppe bestehen (Goeptar et al. 1995). Die Polypeptidkette besteht aus einem lipophilen Anteil, um das Enzym in der Membran zu verankern, und einer dem Cytosol zugewandten hydrophilen Seite. Das Eisen als Zentralatom kann zwischen verschiedenen Oxidationsstufen wechseln; vier der sechs Koordinationsstellen des Eisens werden von den Stickstoffatomen der Pyrrol-Ringe besetzt. Das Hämgerüst ist mit dem restlichen Apoprotein über den Schwefel eines Cysteinrestes verknüpft, der den fünften Liganden des Zentralatoms darstellt. Die sechste Koordinationsstelle des Eisens kann entweder durch Wasser, Sauerstoff, Cyanid, Kohlenmonoxid, N-/S- und O-haltige Verbindungen oder gar nicht besetzt sein (Poulos und Raag 1992). CYP wurde Ende 1950 das erste Mal als Pigment in Säugetier-Lebermikrosomen identifiziert. Nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionat bildete das Pigment ein Kohlenmonoxid-Addukt mit einer charakteristischen Absorption bei 450 nm (Garfinkel 1958, Klingenberg

1958). Dieses Pigment wurde als ein Hämoprotein identifiziert, das ein B-Typ-Porphyrin enthält.

Die Entwicklungen der folgenden Jahre führten zu der Erkenntnis, dass CYP aus der Leber eng mit dem oxidativen Metabolismus von Steroiden und Xenobiotika verbunden ist. Diese Oxidasen sind die Endpunkte von Elektronentransportketten, bei denen sowohl NAD(P)H als auch das Substrat oxidiert werden. Die CYP binden und aktivieren molekularen Sauerstoff; dieser wird dann katalytisch in zahlreiche lipophile Substrate eingeführt. Dies wird durch die Reduktion von Sauerstoff-gebundenen Häm-Eisen und der Bildung eines vorübergehenden hochvalenzigen Oxo-Eisen-Intermediates erreicht. Durch die Einführung eines Sauerstoffatoms kommt es unter anderem zu Epoxidierungen von Aromaten und Alkenen, N- und S-Oxidationen, zu aliphatischen und aromatischen Hydroxylierungen, N-Hydroxylierungen sowie N- und S-Dealkylierungen (Lewis und Pratt 1998). Proteinanalysen bewiesen, dass multiple Formen dieses Enzymes in Mensch und Tier vorkommen. Unterschiedliche CYP-Formen sind entweder ausgeprägt substratspezifisch oder sie akzeptieren eine breite Palette an Substraten. Die Einteilung der CYP erfolgt in Familien durch arabische Ziffern, Unterfamilien durch Großbuchstaben und in einzelne Isoenzyme durch arabische Ziffern (Nelson 1999).

2.2.1.2 Mikrobielle Cytochrom-P-450-Systeme

Die Anzahl an charakterisierten eukaryotischen CYP geht in die Hunderte und die Zahl an Substraten in die Tausende. Das erste mikrobielle CYP wurde in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, und nachfolgende Studien bestätigten die Anwesenheit in zahlreichen Hefen und Pilzen (Lindenmayer und Smith 1964). Das erste bakterielle CYP wurde in *Bradyrhizobium japonicum* entdeckt (Appleby 1967); bis 1984 stieg die Anzahl mikrobieller CYP-Systeme auf 41 an. CYP-Systeme finden sich im Grunde genommen in jedem lebendem Organismus. Interessanterweise scheint z.B. *Escherichia coli* frei von CYP zu sein, während *Salmonella typhimurium* wiederum im Besitz davon ist. *E. coli* besitzt jedoch ein Elektronentransport-System, das die Funktion von heterolog exprimiertem P-450 unterstützt (Jenkins und Waterman 1994). Bakterielle CYP sind lösliche Enzyme, während beinahe alle eukaryotischen Gegenspieler Membran-gebunden sind. Dadurch wurde die Überexpression und Aufreinigung bakterieller Enzyme we-

sentlich erleichtert. Neben der physiologischen Rolle und dem biotechnologischen Potential bakterieller CYP (Urlacher et al. 2004) wurden diese sowohl spektroskopisch als auch strukturanalytisch intensiv untersucht und charakterisiert (Li und Poulos 2004, Locuson und Wahlstrom 2005). Die am Besten charakterisierten bakteriellen CYP sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Charakterisierte bakterielle Cytochrom-P-450-Systeme (Munro und Lindsay 1996)

Trivialname	Systematischer Name	Bakterielle Quelle	Eigenschaften
P-450cam	CYP 101	<i>P. putida</i>	Campher-Hydroxylase
P-450 BM-3	CYP 102	<i>B. megaterium</i>	Fettsäure-Hydroxylase
P-450 pinF1	CYP 103	<i>A. tumefaciens</i>	in Pflanzen induzierbar
P-450 pinF2	CYP 104	<i>A. tumefaciens</i>	in Pflanzen induzierbar
P-450 SU1	CYP 105A1	<i>S. griseolus</i>	durch Herbizide induzierbar
P-450 SU2	CYP 105B1	<i>S. griseolus</i>	durch Herbizide induzierbar
P-450 VD25	CYP 105A2	<i>A. autotrophica</i>	Vitamin-D ₃ -Hydroxylase
P-450 (choP)	CYP 105C1	<i>Streptomyces sp.</i>	Cholesterin-Stoffwechsel
P-450soy	CYP 105D1	<i>S. griseus</i>	Xenobiotika-Biotransformation
P-450 BM-1	CYP 106A1	<i>B. megaterium</i>	Fettsäure-Hydroxylase
P-450meg	CYP 106A2	<i>B. megaterium</i>	Steroid-Hydroxylase
P-450ery F	CYP 107A1	<i>S. erythraea</i>	Erythromycin-Biosynthese
P-450 (mycG)	CYP 107E1	<i>M. griseorubida</i>	Mycinamicin-Biosynthese
P-450terp	CYP 108	<i>Pseudomonas sp.</i>	Terpineol-Oxidation
P-450lin	CYP 111	<i>P. incognita</i>	Linalool-8-methyl-Hydroxylase
P-450 BJ-1	CYP 112	<i>B. japonicum</i>	anaerob expremiert
P-450 BJ-3	CYP 114	<i>B. japonicum</i>	anaerob expremiert
P-450 BJ-4	CYP 117	<i>B. japonicum</i>	anaerob expremiert
P-450eryK	CYP 113A1	<i>S. erythraea</i>	Erythromycin

Nachfolgend werden einige bakterielle P-450-Systeme im Detail vorgestellt, wobei das Hauptaugenmerk auf die sehr gut charakterisierten Systeme P-450cam und P-450 BM3 aus *Bacillus megaterium* gelegt wird.

P-450cam aus *Pseudomonas putida*

Das P-450cam-System aus *Pseudomonas putida* (ATCC 17453) wurde schon 1965 entdeckt (Hedegaard und Gunsalus 1965) und später in homogener Form erhalten (Gunsalus und Wagner 1978). Dieses Enzym katalysiert die 5-*exo*-Hydroxylierung des Monoterpens *D*-Campher; diese Hydroxylierung stellt den Anfangsschritt des Abbauwegs von Campher zu Acetat und Isobutyrat dar (Martinis et al. 1991). Das Gen für die P-450cam (camC) sowie die Gene für viele andere Enzyme für den Campher-Abbauweg liegen auf einem 230 kb großen CAM-Plasmid. Das camC-Gen wurde geklont, in *E. coli* exprimiert und die Nucleotidsequenz bestimmt (Unger et al. 1986). Eine 2.6 Angström große, Campher-gebundene P-450 Kristallstruktur wurde 1985 und eine noch höher aufgelöste Struktur 1987 erhalten (Poulos et al. 1987). Danach folgten die Strukturen der Substrat-freien Form sowie der P-450cam-Komplexe mit strukturvariierten Substraten sowie mit den entsprechenden Inhibitoren (Raag and Poulos 1991). Die räumliche Struktur blieb in allen Formen erhalten, wobei sich mit insgesamt 414 Aminosäuren (M_r 45000) eine triangulare Prismenstruktur mit circa 60 x 55 x 30 Angström ausbildete. 12 α -Helices-Segmente nehmen circa 40 % der Struktur ein, während eine antiparallele β -Faltblattstruktur 10 % einnimmt (Poulos et al 1987). In Abwesenheit vom Substrat ist das hydrophobe aktive Zentrum mit einem geordneten Netzwerk von sechs wasserstoffgebundenen Wassermolekülen belegt, wovon eines an das Häm-Eisen gebunden ist (Martinis et al 1991). Der Cystein-Ligand zum P-450cam-Häm wurde durch die Kristallstruktur als Cys-357 identifiziert. Die Stellung dieses phylogenetisch konservierten Restes lieferte einen guten Anhaltspunkt zum Vergleich der Primärstruktur mit anderen P-450-Systemen. Anhand dieser Kristallstruktur wurde ein Molekül Wasser oder möglicherweise ein Hydroxidion als sechster Ligand identifiziert; während der Katalyse ist diese Stelle mit molekularem Sauerstoff belegt (Poulos et al 1987). Anhand spektroskopischer Studien über P-450cam wurden viele Intermediate während des katalytischen Zyklus identifiziert (vgl. Abb. 2-2). Im Ruhezustand befindet sich das Häm-Eisen im low-spin Zustand ($S = 1/2$) und das Eisen liegt als Fe^{3+} vor. Durch die Bindung von Campher wird das Wasser im aktiven Zentrum durch das Substrat ersetzt und das Eisen gelangt in einen high-spin Zustand ($S = 5/2$). Diese Verschiebung des Spins wird begleitet von einem Anstieg im Reduktionspotential (-300 mV bis -170 mV), wodurch die

Ein-Elektronen-Reduktion von P-450cam durch Putidaredoxin ermöglicht wird (Sligar 1976).

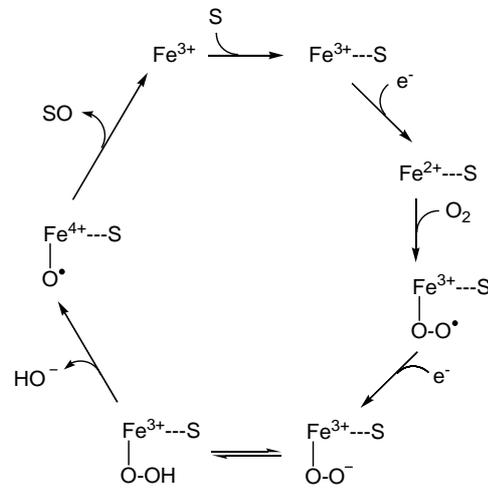


Abb. 2-2: Darstellung des katalytischen Zyklus von Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen (Holland 1988)

Durch diese Reduktion zu Fe^{2+} bindet die high-spin-Form Sauerstoff. Dieses Intermediat wird als ein Superoxid-Anion beschrieben, das an Fe^{3+} gebunden ist (Bangcharoenpaupong et al. 1986). Die weitere Ein-Elektronen-Reduktion dieses Fe^{2+} -Disauerstoff-Intermediates führt zu einem extrem kurzlebigen „aktiven Sauerstoff“-Komplex. Für P-450cam ist der Elektronentransfer zum Häm generell der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse (Martinis et al. 1991).

Die Funktionen der verschiedenen Aminosäuren wurden ebenso untersucht. Die Position von Phenylalanin als Phe-350 wird auch in anderen CYP streng beibehalten und bildet van der Waals-Wechselwirkungen mit der Häm-Gruppe in P-450cam. Der Ersatz von Phe-350 durch Leucin führte zur Bildung eines Apoproteins, wodurch sich die Bedeutung dieses Restes zeigte. Ein Austausch des Eisen-Ligandes Cys-357 gegen Histidin oder Serin verhinderte ebenso die Häm-Einlagerung. Das Campher-Molekül bildet van der Waals-Bindungen mit verschiedenen Resten, z.B. Phe-87, Leu-244, Val-247 oder Val-295 aus. Dies positioniert das Substrat und behält die Regioselektivität und Stereospezifität der Monooxygenierung bei. Die einzige Wasserstoffbrückenbindung zwischen Campher und P-450cam wird mit Tyr-96 ausgebildet. Ein Austausch dieser

Aminosäure führte zu einer geringeren Aktivität und dem Verlust der absoluten Regio-spezifität der Hydroxylierung (Sligar et al. 1991).

P-450 BM-3 aus *Bacillus megaterium*

Während der letzten Jahrzehnte hat das P-450 BM-3 System aus *Bacillus megaterium* ATCC 14581 wachsende Aufmerksamkeit erlangt, da es das am Besten geeignete prokaryotische Modell für das mikrosomale Säugetier-CYP-System darstellt. Dieses CYP ist das einzige bakterielle „class II“ P-450-System. Eine Fettsäurehydroxylase-Aktivität wurde Mitte der 70iger Jahre entdeckt und das für die Reaktion verantwortliche Enzym als ein P-450-Enzym identifiziert. Insgesamt wurden in *Bacillus megaterium* drei P-450-Systeme identifiziert, die als P-450 BM-1, P-450 BM-2 und P-450 BM-3 bezeichnet wurden. P-450 BM-3 wurde aufgereinigt und verschiedenen Umsetzungen unterworfen. Dieses Enzym zeigte eine schnelle Monooxygenierung von gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen von C₁₂-C₁₈. Höchste Enzymaktivitäten wurden gegenüber Pentadecansäure (C₁₅) und Palmitinsäure (C₁₆) festgestellt; hierbei wurden Aktivitäten bis zu 4600 mol⁻¹ min⁻¹ mol⁻¹ festgestellt, die zu den höchsten je beschriebenen P-450-Aktivitäten zählen. Andere Substrate stellten einfach ungesättigte Fettsäuren, Fettalkohole und Fettsäureamide mit vergleichbaren Kettenlängen dar (Narhi und Fulco 1986). Fettsäureester und n-Alkane waren keine Substrate für P-450 BM-3, jedoch wurde eine Alkan-abhängige NADPH-Oxidation nachgewiesen (Munro et al. 1993). Die Hydroxylierung von Fettsäuren fand bevorzugt in der ω-2-, aber auch in der ω-1- und ω-3-Position statt (Miura und Fulco 1974). Ungesättigte Fettsäuren wurden an den Doppelbindungen auch epoxidiert (Buchanan und Fulco 1978).

P-450 BM-3 hat eine im Vergleich zu anderen CYP ungewöhnlich große Molekülmasse. Das Enzym benötigt für seine Aktivität nur das Substrat und NADPH. Das aufgereinigte Enzym enthält ein Mol FAD, FMN und Häm pro Mol Enzym. Eine eingeschränkte Proteolyse spaltete P-450 BM-3 in ein 66 kDa großes Polypeptid, das die beiden Flavine enthielt, und in eine 55 kDa große Häm-enthaltende Domäne. Die Flavin-Domäne behielt auch nach der Spaltung ihre Reduktase-Aktivität bei, und die Häm-Domäne konnte immer noch Substrat binden; durch Bindung von Kohlenmonoxid entstand

das charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm (Narhi und Fulco 1987). Die proteolytisch erzeugten Dömanen waren nicht zur Fettsäure-Hydroxylierung befähigt. Das Gen, das P-450 BM-3 (CYP102) codiert, wurde geklont und in *E. coli* exprimiert. Das aufgereinigte Enzym aus *E. coli* war in der Funktionalität, der Immunochemie und der Elektrophorese identisch zu dem aus *B. megaterium*; ebenso war die N-terminale Aminosäuresequenz identisch (Narhi et al. 1988). Die Häm-Domänenstruktur ließ, im Vergleich zu P450cam, bemerkenswerte Gemeinsamkeiten und Unterschiede erkennen. Wie bei P450cam auch entspricht die Form einem dreieckigen Prisma und das Häm ist zwischen I- und L-Helices eingelagert. Cys-400 ist der fünfte Ligand zum Häm-Eisen und die sechste Koordinationsposition ist von einem Molekül Wasser belegt. Die Fettsäure bindende Tasche ist größer als die von P-450cam, enthält eine umfangreiche β -Faltblattstruktur und ist gesäumt von nicht-aromatischen, hydrophoben Resten. Von besonderer Wichtigkeit für das Andocken des Substrats ist eine Stelle mit hydrophoben Resten am Tascheneingang. Insgesamt sind die Falt- und Sekundärstrukturmerkmale zwischen P-450cam und P-450 BM-3 ähnlich; die L-Helix, der C-terminale Anteil der I-Helix und die Schleife mit dem Cystein-Liganden blieben erhalten. Jedoch besitzt das P-450 BM-3 System vier Haupt-Peptid-Einlagerungen mit 7-17 Aminosäuren. Thr-268 und Glu-409 in P-450 BM-3 entsprechen Thr-252 und Glu-366 in P-450cam. Allerdings wurde kein Lösungsmittelkanal beobachtet, wie er für P-450cam als Protonenquelle vorgeschlagen wurde. Stattdessen wurde vorgeschlagen, das Thr-268 von P-450 BM-3 ein Proton direkt an den Eisen-gebundenen Disauerstoff abgibt. Dieses Proton würde von einem Wassermolekül stammen, das in einer Aushöhlung der P-450 BM-3 I-Helix angesiedelt ist. Dieses kann wiederum von der Lösemittel-ausgesetzten Aminosäure Glu-267 protoniert werden (Ravichandran et al. 1993).

Eine Mutagenese von Gly-570, Trp-574 und Tyr-536 innerhalb der Reduktase-Domäne von P-450 BM-3 zeigte deutlich die Wichtigkeit in der Bindung von FMN. Die Eigenschaften von Mutanten von Trp-96 wurden speziell untersucht, da Trp-96 streng in den P-450-Systemen beibehalten wird und es die Rolle eines Elektronen-Transport-Vermittlers einnimmt. In P-450 BM-3 führte der Austausch von Trp-96 gegen aromatische (Phe, Tyr) oder nicht-aromatische (Ala) Aminosäuren zu einem Abfall des Häm-Gehaltes und einem geänderten Spin-Status-Balance im Häm. Trotzdem blieb die Fettsäu-

re-Hydroxylaseaktivität ähnlich dem Wild-Typ erhalten, sobald eine Angleichung im Häm-Gehalt stattgefunden hatte (Munro et al. 1994).

Am meisten verblüffend an P-450 BM-3 war die Tatsache, dass sich das Enzym durch Barbiturate induzieren ließ. Das Induzieren von verschiedenen Säugetier-CYP durch Phenobarbital ist ein bekanntes Phänomen, und Phenobarbital-induzierte mRNA-Anhäufung ist das Ergebnis eines Anstieges der Transkriptionsrate (Pike et al. 1985, Gonzalez 1989). Durch Zugabe von Phenobarbital (8 mM) in das Wachstumsmedium wurde eine ungefähr 28-fache Induktion von P-450 BM-3 bewirkt, wobei Phenobarbital nicht als Substrat fungiert. Dieser Anstieg an P-450 erleichterte wesentlich die Reinigung des Enzyms aus *B. megaterium*. Andere Barbiturate und Säureamide stellen ebenso Induktoren dar. Das Barbiturat Methohexital ist eines der besten Induktoren, wobei festgehalten werden muss, dass lipophilere Substanzen allgemein bessere Induktoren darstellen (Kim und Fulco 1983).

Genetische Studien bestätigten, dass eine 1 kb große 5'-angrenzende Region des P-450-Gens notwendig für eine Barbiturat-induzierbare Expression ist. Eine hohe Ähnlichkeit besteht in der Nucleotid-Sequenz zwischen 17 Basenpaaren in der 5'-angrenzenden Region der Gene für P-450 BM-3, P-450 BM-1 (auch durch Barbiturat induzierbar) und zwei Barbiturat-sensiblen Ratten-CYP (Wen et al. 1989).

2.2.1.3 Hydroxylierungs- und N-Demethylierungsreaktionen durch Cytochrom-P-450

Hydroxylierungen stellen hauptsächlich Funktionalisierungsreaktionen dar, die im Zuge von Phase-I-Reaktionen durchgeführt werden. Die Substratklasse der N,N-Dialkylarylverbindungen (**1-8**) ermöglichen mehrere Biotransformationsmöglichkeiten: arylische Hydroxylierung oder Epoxidierung (die letztlich auch zu einer Hydroxylierung führt), N-Oxidation und N-Dealkylierung. Im Folgenden werden die arylische Hydroxylierung und die N-Demethylierung durch CYP dargestellt.

Die Oxidation von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen durch CYP ist eine teilweise komplexe Metabolisierung, die zu einer großen Vielfalt an instabilen Intermediaten oder stabilen Metaboliten führen kann. Die stabilsten Produkte einer aromatischen Ringoxidation sind phenolische Verbindungen; arylische Epoxide sind meist Vorläuferverbindungen hierfür und stellen eine Gruppe an toxischen Intermediaten dar, die durch

aromatische Oxidationen gebildet werden (vgl. Abb. 2-3). Diese Epoxide wurden durch Abfang-Experimente (Jerina et al. 1968) und durch Isolierung von Naphtalen-Oxiden aus mikrosomalen Biotransformations-Experimenten nachgewiesen (Jerina et al. 1970). Das Einführen einer Hydroxyl-Gruppe in ein aromatisches Ringsystem durch CYP läuft über eine Epoxidierung des Aromaten, gefolgt von einer chemischen Öffnung des Epoxid-Ringes, einer Hydrid-Wanderung zum vicinalen Kohlenstoffatom und einer Keto-Enol-Tautomerisierung ab (Jerina und Daly 1974).

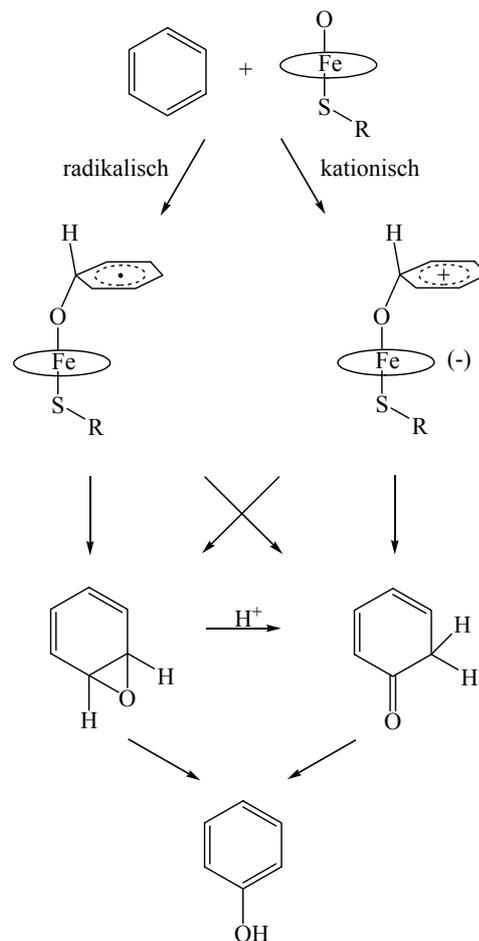


Abb. 2-3: Mechanismus für die durch Cytochrom-P-450 katalysierte Oxidation von aromatischen Verbindungen (Korzekwa et al. 1985)

Der Mechanismus der Ringoxidation blieb für viele Jahre undurchsichtig. Der Reaktionsverlauf führt während der Bildung eines vierflächigen Übergangszustandes zu einem Verlust der Aromatizität; dieser aromatische Zustand wird nur für Endprodukte wie z.B.

den Phenolen wieder erreicht. Der erste Schritt besteht aus einer Ein-Elektronen-Oxidation durch den aktivierten CYP-Sauerstoff-Komplex (Cavalieri et al. 1988, Cavalieri und Rogan 1992, Ackland 1993). Substituenten mit einsamen Elektronenpaaren (z.B. Halogene) beschleunigen die Ringoxidation, vermutlich weil sie diesen ersten Schritt erleichtern (Guengerich und Macdonald 1984). Für die Hydroxylierung sind jedoch insgesamt zwei möglich Reaktionswege denkbar; zum einem die arylische Epoxidierung gefolgt von einer 1,2-Migration zum entsprechendem Phenol (Abb. 2-4) oder die schrittweise Phenol-Bildung durch einen Angriff des elektrophilen FeO-Komplexes, gefolgt von einer 1,2-Migration (Abb. 2-5).

Frühere Arbeiten behandelten die Epoxidierung als einen, sowohl für Arene als auch für Olefine, konzertiert ablaufenden Prozess.

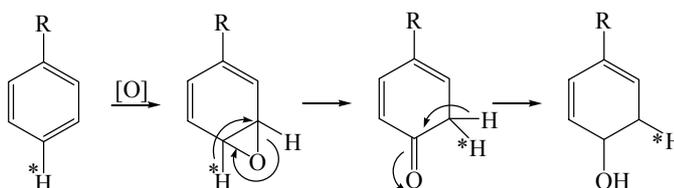


Abb. 2-4: Arylische Epoxidierung durch Cytochrom-P-450, die durch eine 1,2-Migration zum stabilen Phenol führt (Guengerich 2001)

In diesem Zusammenhang steht auch die oft zitierte „NIH-Shift“, einer Deuterium-Wanderung (vgl. Abb. 2-5). Der Name bezieht sich auf das National Institute of Health, wo diese Entdeckung gemacht wurde. Dieser Prozess, der ursprünglich als 4,3-Shift des Wasserstoffs bezeichnet wurde, wird sehr oft als Beweis für das Vorhandensein eines intermediären Epoxides herangezogen. Jedoch sind auch andere Mechanismen, die elektrophile FeO-Intermediate miteinbeziehen, in Einklang mit einer solchen Migration zu bringen. Der NIH-Shift an sich ist kein absoluter Beweis für das Vorhandensein eines Epoxids; bessere Beweise wären die Nachweise von Dihydrodiolen oder Hydroxy-GSH-Konjugaten.

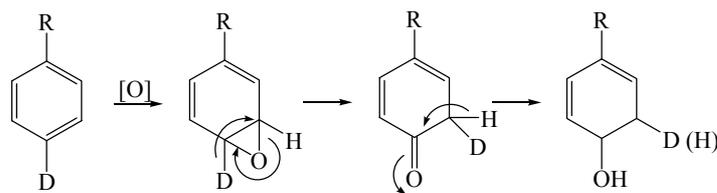


Abb. 2-5: Verlagerung von Deuterium während der aromatischen Hydroxylierung durch Cytochrom-P-450 (Cryle et al. 2003)

Der einfachste Fall einer oxidativen N-C-Spaltung ist die N-Demethylierung. Den direkten Weg stellt eine anfängliche Wasserstoffabspaltung gefolgt von einer α -Kohlenstoffatom-Hydroxylierung dar (Heimbrook et al. 1984, Burka et al. 1985). Das sich bildende Carbinolamin ist instabil und hydrolysiert rasch zum N-demethylierten Amin und zum N-demethylierten Formaldehyd. Dieser wird durch Dehydrogenasen zu Ameisensäure und dann weiter zu CO_2 oxidiert. Es existieren allerdings auch Carbinolamine, die stabil genug sind, um sie analytisch zu erfassen und nachzuweisen (vgl. Abb. 2-6).

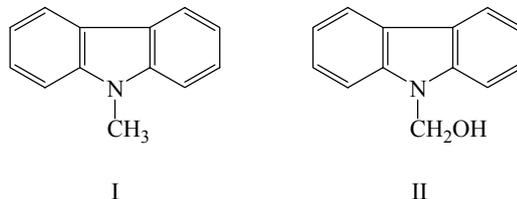


Abb. 2-6: N-Methylcarbazol (I) und das durch Biotransformation mit Lebermikrosomen gebildete stabile N-Carbinolamin N-Hydroxymethylcarbazol (II) (Gorrod und Temple 1976)

N-Hydroxymethylcarbazol, ein durch Lebermikrosomen transformierter Metabolit von N-Methylcarbazol, hat man ebenso wie ein mögliches Konjugat davon (O-Glucuronid) im Urin verschiedener Versuchstiere nachgewiesen und identifiziert (Gorrod und Temple 1976). N-Hydroxymethylcarbazol zersetzt sich spontan bei einer Temperatur von $37\text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von 7.4; diese Zersetzungsreaktion wurde bei der Anwesenheit von Lebermikrosomen wesentlich beschleunigt.

In einer systematischen Studie von N,N-Dimethyl-Derivaten von Arylaminen, Aryltriazinen, Arylformamidinen und arylischen Harnstoffderivaten wurde nach einer Inkubation mit Lebermikrosomen Formaldehyd nachgewiesen. Nur bei den Harnstoffderivaten waren die Formaldehyd-Vorläuferverbindungen (die entsprechenden Carbinolamine) stabil genug, um sie kolorimetrisch nachzuweisen (Ross et al. 1982). Carbinolamine von aromatischen Amiden schienen besonders stabil zu sein, wie z.B. das N-Hydroxymethylbenzamid, das eine Halbwertszeit von ungefähr 10^4 min in einer Pufferlösung bei einem pH-Wert von 7.4 und bei 37 °C aufwies (Ross et al. 1983). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass elektrochemische Faktoren für die Stabilität der Carbinolamine verantwortlich sind. Aber auch Stabilisierung durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen scheint eine Rolle zu spielen. Dies wird für die N-Carbinole des Methylxanthins, aber auch für Methyltheobromin, Methylparaxanthin und Methyltheophyllin beschrieben. Diese Verbindungen waren alle stabil genug, um sie analytisch erfassen und charakterisieren zu können (Lander et al. 1988).

N-Oxide als Intermediate bei der N-Dealkylierung von tertiären Aminen wurden verschiedentlich postuliert (Bickel 1969). Während Umlagerungsmechanismen in solchen Prozessen als realistisch eingestuft wurden, existieren keine überzeugenden Nachweise, dass N-Oxide in der Tat an der metabolischen N-Demethylierung bzw. allgemein an der N-Dealkylierung beteiligt sind (Lindeke 1982). N-Oxide wie z.B. das N,N-Dimethylanilin-N-Oxid wurden allerdings durch CYP reduziert; dabei fungierte das entsprechende N-Oxid als Sauerstoffspender gegenüber dem Enzym (Heimbrook et al. 1984, Seto und Guengerich 1993). Die N-Demethylierung folgte unverzüglich, ohne dass dem tertiären Amin Zeit blieb, das aktive Zentrum des Enzyms zu verlassen. Diese Reaktion hatte allerdings eine sehr geringe Umsatzrate und war nur auf einige wenige Substrate beschränkt (Burka et al. 1985). N-Demethylierungsreaktionen spielen generell bei fast allen N-methylierten Aminen eine große Rolle, und beinahe bei jeder N-CH₃-Gruppe wurden diese Reaktionen nachgewiesen (vgl. Abb. 2-7 und 2-8). Sowohl sekundäre als auch tertiäre Amine werden N-demethyliert, allerdings werden tertiäre Amine wesentlich schneller N-demethyliert als sekundäre Amine. Die N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (**2**) wurde mit aus Lebermikrosomen aufgereinigten CYP durchgeführt.

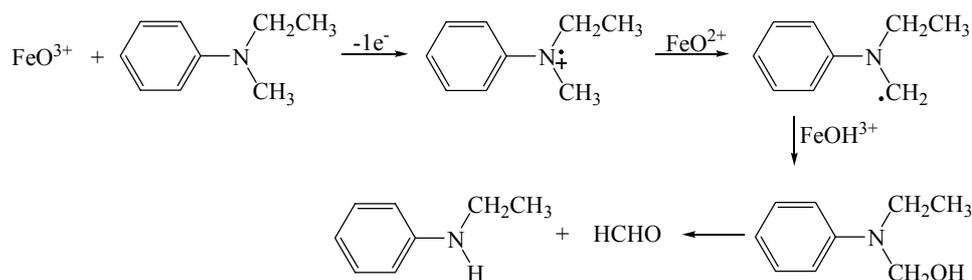


Abb. 2-7: Oxidative N-Demethylierung von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) durch CYP 2B1 (Seto und Guengerich 1993). Die N-Demethylierung läuft wesentlich schneller (20 mal schneller) ab als eine ebenfalls mögliche N-Deethylierung

Hierbei zeigte sich, dass CYP2B4 aus Kaninchen und CYP2B1 (beide durch Phenobarbital induzierbar) aus Ratten wesentlich aktiver waren als CYP1A2 aus Kaninchen oder CYP1A1 aus Ratten (Pandey et al. 1989). Substituenteneinflüsse wurden anhand zwölf verschiedener *para*-substituierter N,N-Dimethylaniline untersucht; die hierzu nötigen Lebermikrosomen wurden aus Phenobarbital-vorbehandelten Ratten gewonnen. Quantitative Struktur-Metabolismus-Beziehungen zeigten, dass die Affinität mit der Lipophilität des Substrates zunahm, während die Geschwindigkeit der Reaktion mit steigender Lipophilität des Substrates und einer Abnahme der Elektronen ziehenden Kraft des Substituenten anstieg (Galliani et al. 1984, MacDonald et al. 1989).

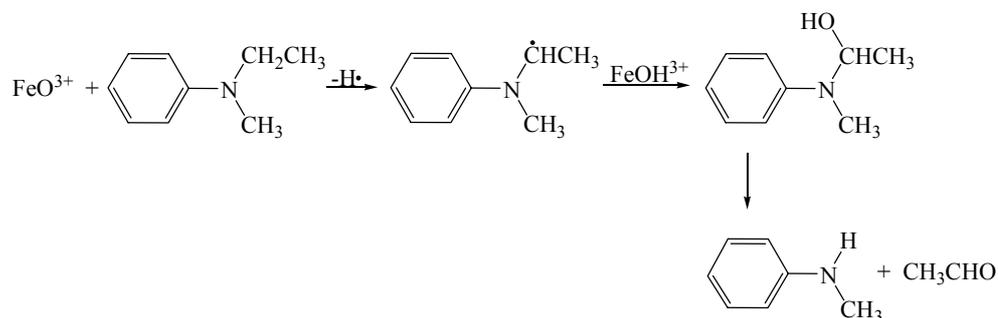


Abb. 2-8: Oxidative N-Deethylierung von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) durch CYP 2B1 (Guengerich 2001)

Die Betrachtung des Mechanismus im Detail zeigt, dass der FeO^{2+} -Komplex die Entfernung eines Protons vom Aminium-Radikal und möglicherweise von anderen Radikalen erleichtert (Okazaki und Guengerich 1993). Diese Ansicht erscheint sinnvoll, da FeO^{2+} eine verhältnismäßig starke Base darstellt. Die Fähigkeit von FeO^{2+} , ein Proton abstrahieren zu können, erscheint auch aufgrund des geringen kinetischen Wasserstoff-Isotopeneffekts, der einem hohen intramolekularem Isotopeneffekt für die Wasserstoff-Abstraktion (durch CYP) bzw. dem Prozess eines Zwei-Elektronen-Transfers (Peroxidasen) gegenübersteht (Miwa et al. 1983, Hollenberg et al. 1985; Abb. 2-9).

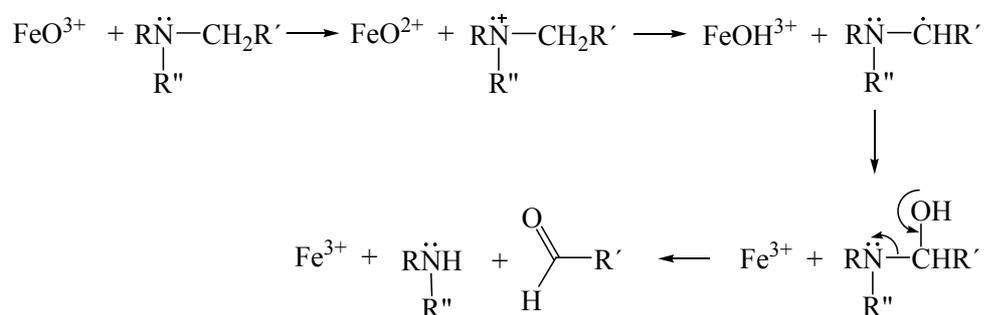


Abb. 2-9: N-Dealkylierung via 1-Elektronen-Transfer, Protonen-Abspaltung und Sauerstoff-Aufnahme (Guengerich 2001)

Für die Rolle eines Ein-Elektronen-Transfers existieren mehrere schlüssige Beweise: ein niedriger kinetischer Wasserstoff-Isotopeneffekt (Baciacchi et al. 1998), eine Mechanismus-basierende Inhibierung von CYP durch verschiedene 1-substituierte Cycloalkylamine (MacDonald et al. 1982, Bondon et al. 1989), das Abfangen von Radikalen während der Oxidation von 4-Alkyl-1,4-dihydropyridinen (Guengerich und Böcker 1988, Lee et al. 1988) und der bevorzugten N-Demethylierung von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) (Seto und Guengerich 1993, Guengerich et al. 1996).

Studien zum Metabolismus von N,N-Dialkylarylaminen wurden sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* durchgeführt. Umsetzungen mit Lebermikrosomen aus Kaninchen oder Ratten lieferten die für Phase-I-Reaktionen typischen Biotransformationsprodukte. Sowohl N-Oxidation als auch N-Dealkylierung wurden beobachtet (Horn 1937, Gorrod et al. 1975). Als weitere Metabolite wurden auch arylische Hydroxylierungsprodukte nachgewiesen, die als die entsprechenden N,N-Dialkyl-2- und N,N-Dialkyl-4-aminophenole

identifiziert wurden (Gorrod und Patterson 1980). Hierbei hat man festgestellt, dass bei Umsetzungen der Substrate N,N-Dimethylanilin (**2**), N,N-Diethylanilin (**3**) sowie N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) bevorzugt und in einer wesentlich größeren Menge das 4-Hydroxylierungsprodukt gebildet wurden, während eine 2-Hydroxylierung nur in geringsten Mengen nachweisbar war (Kiese und Renner 1974, Gorrod und Gooderham 1981).

2.2.2 Peroxidasen

Peroxidasen kommen in Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren vor. Sie werden entweder nach ihrer Quelle, z.B. der Meerrettichperoxidase (HRP) und der Lactoperoxidase oder aber nach ihrem Substrat wie z.B. der Chlor- oder Ligninperoxidase, benannt. Die meisten Peroxidasen sind Häm-Enzyme; manche aktive Zentren enthalten aber auch Selen (Glutathion-Peroxidase), Vanadium (Brom-Peroxidase), Mangan (Mangan-Peroxidase) und Flavin (Flavo-Peroxidase) (Kuwahara et al. 1984, de Boer et al. 1986). Die Funktion der Peroxidasen besteht darin, bestimmte Substrate zu oxidieren oder Hydroperoxide zu reduzieren. Peroxidasen katalysieren eine Vielzahl an Reaktionen wie z.B. die Oxidation von aromatischen Verbindungen, Heteroatom-Oxidationen, Epoxidierungen und enantioselektive Reduktion von racemischen Hydroperoxiden (Adam et al. 1999). Diese Reaktionen beziehen sich sowohl auf organische und anorganische Substrate, wobei Wasserstoffperoxid, Alkylhydroperoxide oder aber auch Acylhydroperoxide als Elektronenakzeptor dienen.

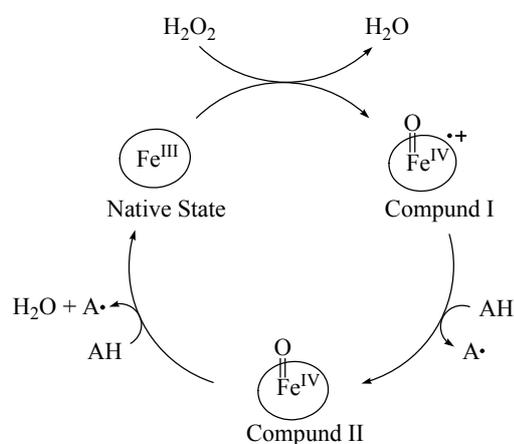


Abb. 2-10: Katalytischer Zyklus der Meerrettich-Peroxidase (Dawson 1988)

Der erste Schritt des Reaktionsweges dieser Reaktionen umfasst die Zugabe von H_2O_2 zum Fe^{III} -Ruhezustand, um ein als „Compound I“ bezeichnetes Eisen-Oxo-Derivat zu bilden (Abb. 2-10). Dieses gut untersuchte „Compound I“ besteht aus einer Fe^{IV} -Sauerstoff-Struktur und einem Kationen-Radikal. Im zweiten Schritt wird „Compound I“ zu „Compound II“ reduziert; dieser „Compound II“ enthält ebenso eine Fe^{IV} -Sauerstoff-Struktur. Der Ausgangszustand wird durch eine Ein-Elektronen-Reduktion von „Compound II“ durch ein Phenol oder Enol erreicht. In diesem Reaktionsschritt erfolgt ein Elektronen- und Protonentransfer mit gleichzeitiger Reduktion von Fe^{IV} zu Fe^{III} und der Abspaltung von Wasser als Abgangsgruppe.

2.2.2.1 Mikrobielle Peroxidasen

Die Chlorperoxidase (CPO) aus *Caldariomyces fumago* stellt eine der bekanntesten mikrobiellen Peroxidasen dar. Sie ist an der Biosynthese von Caldariomycin beteiligt, ist aber auch durch Arbeiten im Rahmen von enantioselektiven enzymatischen Sulfoxidationen bekannt geworden (Thomas et al. 1970, Fu et al. 1992, Heckel 2005). Andere bekannte mikrobielle Peroxidasen sind die Ligningperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* und die Cytochrom c Peroxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Biontek et al. 2001, Erman und Vitello 2002).

2.2.2.2 Peroxidase katalysierte Hydroxylierung und N-Dealkylierung

Mason und Mitarbeiter waren die Ersten, die eine durch HRP katalysierte Hydroxylierung von aromatischen Verbindungen durch molekularen Sauerstoff in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure als Cofaktor beobachteten (Mason et al. 1957, Abb. 2-11). Immobilisierte HRP katalysierte sogar die Hydroxylierung von Benzol mit H_2O_2 oder *m*-Chlorperbenzoesäure, wenn Benzol als Lösungsmittel verwendet wurde (Akasaka et al. 1995). Insbesondere aromatische Amine stellen typische Substrate für Peroxidasen dar. Hierzu zählen vor allem Anilin, *p*-Toluidin, *o*-Phenyldiamin und *o*-Anisidin. Diese Verbindungen werden bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oder Hydroperoxiden durch Peroxidase-Katalyse zu Radikalen oxidiert, die durch Reaktion mit weiteren aro-

matischen Verbindungen zu Dimeren, Oligomeren oder Polymeren reagieren (Sakurada et al. 1990, Casella et al. 1994).

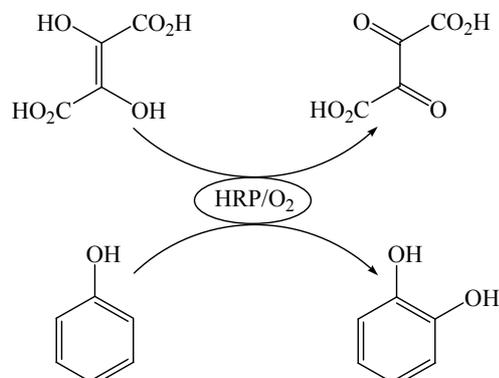


Abb. 2-11: Peroxidase katalysierte Hydroxylierung von Phenol (Dordick et al. 1986, Klibanov et al. 1981)

CPO katalysiert die Peroxid-abhängige N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (**2**) und anderen N-Methylarylaminen (sekundär und tertiär). Die Stöchiometrie der Bildung von N-Methylanilin und Formaldehyd aus N,N-Dimethylanilin ist 1:1. Die Umsatzrate der durch CPO katalysierten N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (**2**) war durch EtOOH circa 20-30 mal größer als eine durch CYP katalysierte N-Demethylierung (Nordblom et al. 1976). Eine Reihe verschiedener Peroxide, Hydroperoxide und Persäuren unterstützen die Demethylierung. Die Anfangsgeschwindigkeit der Demethylierung wird vom Oxidationsmittel bestimmt; EtOOH erwies sich als das Effektivste. CPO setzt verschiedene Arylamine um, wobei die Umsatzrate stark vom Substrat abhängig ist (Kedderis et al. 1980). Auch HRP wies katalytische Aktivität gegenüber N,N-Dimethylanilin (**2**) auf. Ebenso zeigte sich hier eine wesentlich höhere N-Demethylierungsaktivität als Umsetzungen durch CYP (Kedderis und Hollenberg 1983, Pandey et al. 1989). Im Gegensatz zur CPO-Umsetzung wird die HRP-katalysierte Demethylierung durch Natriumchlorat wesentlich gefördert.

Da die Demethylierung die Spaltung von Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen bedingt, wurden Deuterium-markierte Substrate eingesetzt, um die chemischen Mechanismen sowie die Kinetik der Gesamtreaktion zu untersuchen. Hierzu wurden N-Methyl-N-Tri-

deuteromethylanilin mit CYP 1A1 und 2B1 aus Lebermikrosomen sowie mit CPO und HRP umgesetzt (Miwa et al. 1983, Hollenberg et al. 1985). Der Isotopeneffekt für die N-Demethylierung durch HRP war relativ hoch (> 8.5), während er für CYP 1A1 und 2B1 sowie für CPO gering war (< 3.1). Diese Beobachtung des hohen Isotopeneffektes für die Demethylierung durch HRP (H_2O_2 oder EtOOH) führte zu dem Schluss, dass die Isotopeneffekte unabhängig vom Oxidationsmittel sind. Der hohe Isotopeneffekt für die Demethylierung ist erklärbar mit einem radikalischen Mechanismus der Kohlenstoff-Wasserstoff-Spaltung. Dies führte zu dem Schluss, dass ein symmetrischer Übergangszustand eine Wasserstoffatom-Abspaltung zur Folge hat, der von einer Hydroxylradikal-Rekombination gefolgt wird. Diese Ergebnisse lieferten einen sehr starken Beweis dafür, dass HRP die N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (**2**) über eine Wasserstoff-Atomabstraktion des α -Kohlenstoffatoms verläuft. Im Gegensatz zu den hohen Isotopeneffekten bei HRP wurden bei CYP und CPO relativ kleine Isotopeneffekte festgestellt. Diese geringen Werte belegen eine anfängliche Bildung eines Anilinium-Radikals, die von einer Deprotonierung des α -Kohlenstoffatoms gefolgt wird (Lewis und Ho 1980).

Die verschiedenen chemischen Mechanismen für die Häm-Protein katalysierte N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (**2**) sind in Abb. 2-12 zu finden. Der eine Weg ist mit einem Transfer von einem Elektron (e^-) des Amins zur Eisen-Oxo-Species des Häm-Proteins verbunden. Hierdurch bildet sich ein Aminium-Kationenradikal. Dieses Radikal unterliegt dann einer Deprotonierung ($-\text{H}^+$), um ein neutrales Radikal zu bilden. Das generierte Radikal kann dann ein Carbinolamin mit dem entstehenden Häm-Eisen-gebundenen Hydroxylradikal ($+\text{OH}^\cdot$) bilden. Das dabei entstandene instabile Carbinolamin zersetzt sich, und es entstehen Formaldehyd sowie das sekundäre Amin.

Alternativ kann sich das neutrale Radikal auch direkt durch eine Wasserstoffabspaltung ($-\text{H}$) des Amins bilden. Der enzymgebundene Sauerstoffrest kann dann mit dem Radikal das Carbinolamin bilden, das sich wiederum zu Formaldehyd und dem sekundären Amin zersetzt. Ein solcher Reaktionsweg, der eine Stickstoffoxidation ($-\text{e}^-$) gefolgt von einer α -Kohlenstoffdeprotonierung mit sich führt, würde einen relativ kleinen Isotopeneffekt (< 3) aufweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Effekten für die durch CYP und CPO katalysierten Demethylierungen. Diese Bildung eines Radikals durch anfäng

liche Abspaltung von Wasserstoff würde einen Isotopeneffekt von 9 bis 11 bewirken. Dies stimmt mit den Werten für HRP und z.B. Lactoperoxidase überein (Jones et al. 1990).

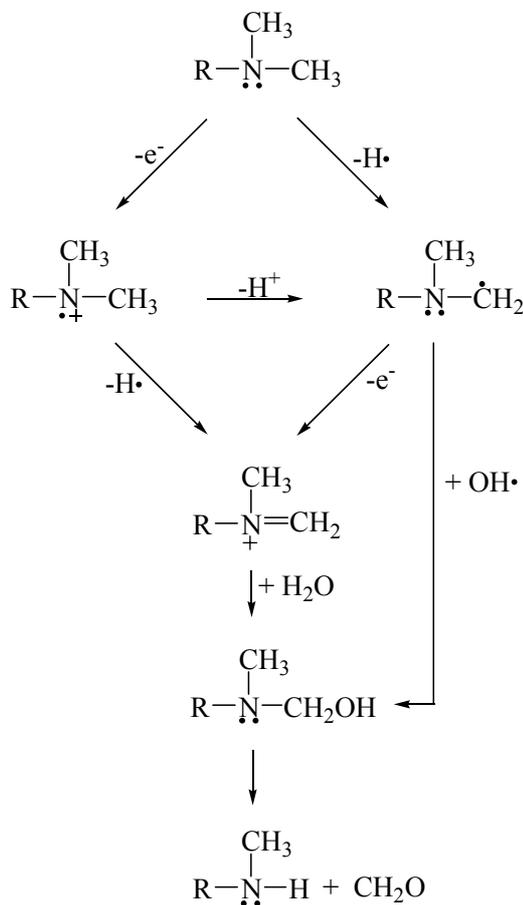


Abb. 2-12: Mögliche Mechanismen für die oxidative N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilin (2) durch Häm-Proteine (Hollenberg 1992)

2.3 Die Aromastoffe N-Methyl-methylantranilat und Methylantranilat

2.3.1 Vorkommen und sensorische Eigenschaften

N-Methyl-methylantranilat (NMMA) (**30**) ist eine blassgelbe, fluoreszierende Flüssigkeit mit feinem Mandarinenduft. NMMA ist die Hauptkomponente des Petitgrain-Öls aus Mandarinenblättern, ist aber auch in Orangen-, Mandarinen- und Tangerinenschalenölen (Shaw und Wilson 1981, Mondello et al. 2003, Frizzo et al. 2004) sowie in Grapefruitsaft als auch Sternfrucht (*Carambola averrhoa*) beschrieben (Römpp 1995). Die Geruchsschwelle von NMMA (**30**) liegt bei 20.3 ppb in Wasser (Shaw und Wilson 1981). Methylantranilat (MA) ist eine gelbliche Flüssigkeit, stellt die charakteristische Aromakomponente von *Concord*-Trauben dar und wurde auch in verschiedenen ätherischen Ölen wie z.B. Neroli, Bergamotte und Walderdbeeren identifiziert; in der sensorischen Prüfung wird es als Aroma von Orangenblüten und Walderdbeeren beschrieben (Römpp 1995).

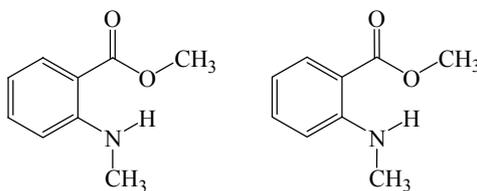


Abb. 2-13: Die Aromastoffe N-Methyl-methylantranilat (**30**) und Methylantranilat

Methylantranilat hat eine Geruchsschwelle von 0.003 ppm in Wasser (Amann 2002). Die Aromastoffe in chinesischem grünen Tee, der mit Jasminblüten (*Jasminum sambac*) parfümiert wurde, bestehen aus 66 Komponenten, die mittels GC-MS analysiert und identifiziert wurden. Zu den Hauptkomponenten zählen Linalool, Methylantranilat, 4-Hexanolid, 4-Nonanolid 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon und (E)-2-Hexenylhexanoat, die man mittels Aromaextrakt-Verdünnungsanalysen und sensorische Analysen identifiziert hat. Das Weglassen von Methylantranilat und der Ersatz von (*R*)-(-)-Linalool gegen (*S*)-(+)-Linalool führten zu großen Änderungen im angewandten Ge-

ruchsmodell. Diese zwei Geruchskomponenten wurden demzufolge als Schlüsselaromastoffe des Jasmin-Tees bestimmt (Ito et al. 2002, Kenji und Masuda 2002).

Methylantranilat wurde für Honig als Indikator zur Unterscheidung zwischen Citrus-Honig und Nicht-Citrus-Honig vorgeschlagen. Allerdings hängt der Gehalt an MA im Honig von Faktoren wie z.B. den Lagerbedingungen ab (Bonvehi und Coll 1995, Nozal et al. 2001). Anhand des Nachweises von Methylantranilat in Honig wurde eindeutig zwischen Orange-, Eukalyptus-, Rosmarin-, Lavendel-, und Thymianhonig unterschieden (Perez et al. 2002).

Da die beiden Aromastoffe NMMA (**30**) und MA keine Stereozentren aufweisen, wie dies bei vielen anderen Aromastoffen der Fall ist, kommt zur Unterscheidung zwischen natürlicher und synthetischer Herkunft nur die Isotopenverhältnis-Analyse in Frage. Sie ist in der Gruppe von Mosandl für NMMA (**30**) sowohl für die ^{13}C - als auch für die ^{15}N -Werte durchgeführt worden (Faulhaber et al. 1997).

2.3.2 Verwendung von N-Methyl-methylantranilat und Methylantranilat

Aufgrund ihrer Aromaeigenschaften werden NMMA (**30**) und MA vielfach in der Lebensmittel-, aber auch in der Kosmetikindustrie verwendet. Die Aromaindustrie verbraucht circa 27 Tonnen Methylantranilat pro Jahr, allerdings besteht für natürliches Methylantranilat, im Gegensatz zu N-Methyl-methylantranilat (**30**), keine greifbare Bezugsquelle, da Methylantranilat in Pflanzen nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt (Lomascolo et al. 1999). Die meisten Anwendungsgebiete finden die beiden Aromastoffe in der Lebensmittelindustrie, gefolgt von der Kosmetikindustrie, was u.a. auch durch die vielen Patentanmeldungen für Aromamischungen bzw. Einsatzgebiete zu erkennen ist (Kiyomitsu 2003, Kikue et al. 2003, Kiyomitsu 2004, Kenichiro et al. 2004). NMMA (**30**) wird vor allem in Seifen- und Kosmetikparfümierungen und in Fruchtaromen speziell für Mandarinenaromen verwendet. Methylantranilat findet Verwendung in der Parfümerie für Blütendüfte und in der Lebensmittelindustrie für Trauben- und Citrusaromen (Römpp 1995). Methylantranilat ist aufgrund seiner Aromaeigenschaften auch ein wirkungsvolles Abschreckungsmittel für viele Tierarten, vor allem für Vögel und Nagetiere (Mason et al. 1991, Nolte et al. 1993, Avery et al. 1995). Dabei

werden kommerziell erhältliche Mischungen, bei denen Methylantranilat in Kügelchen eingekapselt ist, eingesetzt (Moran 2001).

2.3.3 Darstellung von Methylantranilat

2.3.3.1 Chemische Methoden

Zur Herstellung vom Methylantranilat existieren mehrere klassische Verfahren, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen. Der Hauptweg ist die basenkatalysierte Reaktion von Isatosäureanhydrid mit Methanol oder die Veresterung von Anthranilsäure mit Methanol. Reaktionen mit sterisch gehinderten Gruppen stellten schon immer eine Herausforderung in Bezug auf Ansatzvergrößerung, Selektivität und Aufreinigung dar. Die Herstellung von Methylantranilat fällt unter diese Gruppe und erfordert die Veresterung einer *ortho*-substituierten Carboxyl-Gruppe. Diese Reaktion ist bekannt für dabei auftretende Schwierigkeiten. Erste Versuchsmodifikationen wurden bereits 1899 von Walbanum durchgeführt, dem es gelang, Methylantranilat in sehr hoher Reinheit herzustellen (Bedoukian 1986). Einige Anthranilate waren sogar schon um 1841 bekannt, als Fritsche bei der Synthese von Indigo für die Farbstoffindustrie die Anthranilsäure entdeckte (Fritsche 1841). Bei der Synthese von Anthranilsäure wurde auch das Isatosäureanhydrid entdeckt, das sich als eine geeignete Komponente zur Herstellung von sehr reinem Methylantranilat erwies. Anthranilsäure wurde durch die Reaktion von Phtalimid mit Natriumhypochlorit im Alkalischen hergestellt (Abb. 2-14).

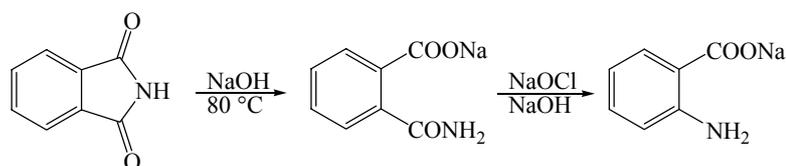


Abb. 2-14: Reaktion von Phtalimid mit Natriumhypochlorit im Alkalischen (Yadav und Krishnan 1998)

Das Isatosäureanhydrid, von dem bekannt war, dass es ein Zwischenprodukt der obigen Reaktion darstellt, wurde anschließend durch eine modifizierte Hofmann-Reaktion syn-

thetisiert und isoliert (Abb. 2-15). Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, dass sich nur das Isatosäureanhydrid bildete.

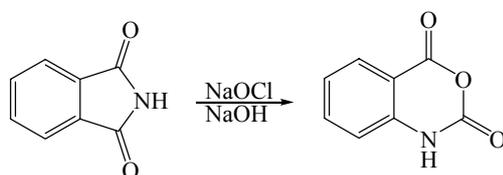


Abb. 2-15: Synthese von Isatosäureanhydrid aus Phtalimid durch eine modifizierte Hofmann-Reaktion (Yadav und Krishnan 1998)

Die Veresterung von Anthranilsäure ist erschwert durch das Vorhandensein einer *ortho*-Aminogruppe (Abb. 2-16). Da die Veresterung säurekatalysiert abläuft, sind große Mengen an Säure notwendig, um das Salz desamins zu generieren, das anschließend mit einem Überschuss an Methanol verestert wird.

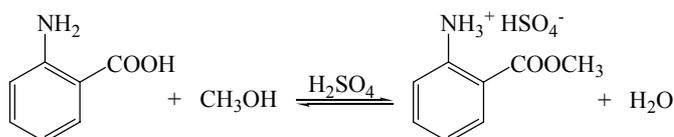


Abb. 2-16: Säurekatalysierte Veresterung der Anthranilsäure mit Methanol (Yadav und Krishnan 1998)

Das Produkt wird mit Alkali behandelt, um die überschüssige Säure zu neutralisieren. Die abgetrennte, ölige Flüssigkeit wird anschließend unter Vakuum destilliert, um reines Methylantranilat zu erhalten. Der Reaktionsmechanismus ist einer einfachen Veresterung gleichzusetzen (Abb. 2-17). Allerdings verbraucht dieser Prozess aufgrund der Amino-Funktionalität große Mengen an Schwefelsäure und Methanol. Sobald die *ortho*-Position der Anthranilsäure durch das Sulfat-Salz blockiert ist, kann die restliche Schwefelsäure als Katalysator für die Veresterung wirken. Es muss ein großer Überschuss an Methanol verwendet werden, um den Angriff des Sauerstoffatoms vom Methanol auf das sich bildende Carbo-Kation des Amin-Salzes zu erleichtern.

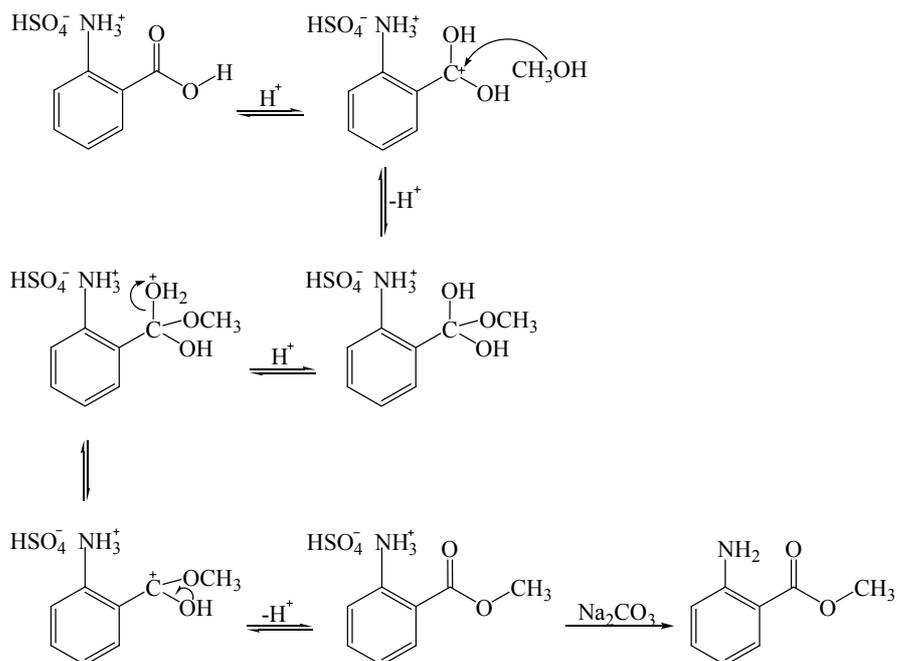


Abb. 2-17: Reaktionsmechanismus der säurekatalysierten Veresterung von Anthranilsäure mit Methanol zu Methylantranilat (Yadav und Krishnan 1998)

Die Blockierung der Aminogruppe erleichtert den bevorzugten Angriff des Sauerstoffatoms auf das Carbokation, da dieses elektronegativer ist als das Stickstoff-Kation. Eine Harzbildung kann jedoch meistens nicht effektiv genug verhindert werden, und die Ausbeuten sind häufig geringer als erwartet. Mehrere Patente decken die Herstellung von Methylantranilat aus Isatosäureanhydrid ab (Abb. 2-18). Ramachandra produzierte auf diese Weise Methylantranilat mit einer sehr hohen Reinheit (Ramachandra und Mahapatra 1980).

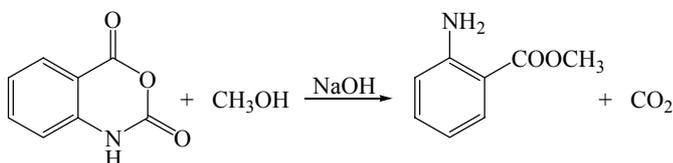


Abb. 2-18: Reaktion von Isatosäureanhydrid mit Methanol im Alkalischen (Yadav und Krishnan 1998)

Staiger synthetisierte bereits 1959 Methylantranilat aus Isatosäureanhydrid und Methanol mit wässrigem NaOH und erreichte damit Ausbeuten um die 95 % (Staiger und Miller 1959).

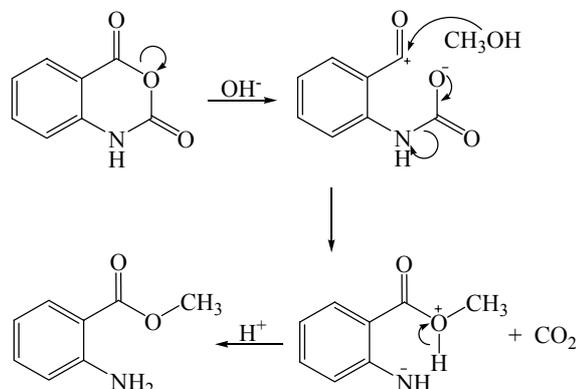


Abb. 2-19: Reaktionsmechanismus für die Herstellung von Methylantranilat aus Isatosäureanhydrid (Yadav und Krishnan 1998)

2.3.3.2 Biotechnologische Herstellung von natürlichem Methylantranilat

2.3.3.2.1 Enzymatische Biotransformation

Häm-enthaltende Enzyme wie Peroxidasen oder CYP besitzen die Fähigkeit, eine Vielzahl von Stoffumwandlungen zu katalysieren (siehe auch Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Zu diesen Reaktionen gehören aromatische und aliphatische Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Dehalogenierungen, Heteroatom-Oxidationen und Dealkylierungen an Heteroatomen (Dawson 1988; Griffin 1991; Ortiz de Montellano 1992). Aus biotechnologischer Sicht wird die Anwendung von Peroxidasen klar bevorzugt, da diese Enzyme viel leichter zugänglich sind und Wasserstoffperoxid als billiges Oxidationsmittel verwendet werden kann (Low et al. 1996). Von der Vielzahl der Peroxidasen (Lactoperoxidase, Ligninperoxidase, Chloroperoxidase, Meerrettichperoxidase) ist die Meerrettichperoxidase, im Hinblick auf die katalytischen Mechanismen, eine der am Besten erforschten Peroxidasen. Allerdings stehen einer gezielten biotechnologischen Anwendung eine begrenzte Thermostabilität und ein relativ teurer Preis entgegen (McEldoon und Dordick 1996). Sojabohnen-Peroxidase (SP) dagegen zeigt ein günstigeres Temperaturverhalten und kann relativ einfach aus Sojabohnen-Schalen, einem Nebenprodukt

der Lebensmittelindustrie, gewonnen werden; eine Anwendung in der Biotechnologie ist somit auch wirtschaftlicher (Toiguchi et al. 1989). Microperoxidase 8, ein Mini-Enzym mit einer möglicherweise sehr breiten Substratspezifität und einer hohen Temperaturstabilität, kann ebenso als Peroxidase für die Biotechnologie Verwendung finden (Osman et al. 1996).

Aufgrund dieser Eigenschaften und der Fähigkeit der Peroxidasen, eine Vielzahl von Reaktionen zu katalysieren, wurden verschiedene kommerziell erhältliche sowie aufgereinigte Peroxidasen zur N-Demethylierung von N-Methyl-methylantranilat (**30**) getestet (van Haandel et al. 2000, Abb. 2-20). Hierbei zeigte sich, dass die Sojabohnen-Peroxidase als Biokatalysator geeignet ist, um Methylantranilat mit großer Ausbeute und in hoher Reinheit darzustellen. Besonders bei hohen Temperaturen und einem niedrigen pH-Wert, dem Optimum für die Sojabohnen-Peroxidase, zeigte sie gegenüber der Meerrettich-Peroxidase und der Microperoxidase 8 deutliche Vorteile. Inkubationen mit NMMA (**30**) wurden in einem Kaliumacetat-Puffer (pH 4) für die Sojabohnen-Peroxidase bzw. Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.6) für die Meerrettich-Peroxidase und die Microperoxidase 8 durchgeführt.



Abb. 2-20: N-Dealkylierung von N-Methyl-methylantranilat (**30**) zu Methylantranilat durch Sojabohnen-Peroxidase (van Haandel et al. 2000)

Die Ansätze enthielten 5 μM des Proteins und 1mM an NMMA (**30**). Die Inkubations-Mixtur wurde für 2 Minuten bei 70 $^{\circ}\text{C}$ für die SP und 37 $^{\circ}\text{C}$ für die HRP und MP8 vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid gestartet und nach 1 Minute durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. SP konnte durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 10 min eine Ausbeute von 82 % an MA produ-

zieren; zu den restlichen Umsetzungen wurden keine exakten Ausbeuten angegeben (Van Haandel et al. 2002).

2.3.3.2.2 Enzymatische Veresterung von Anthranilsäure

Eine andere Möglichkeit, Methylantranilat herzustellen, besteht in der Veresterung von Anthranilsäure mit Methanol (siehe auch Kapitel 2.3.3.1). Aufgrund des chemischen Prozesses kann das erzeugte Methylantranilat nicht als „natürliches“ Methylantranilat bezeichnet werden. Eine Veresterung durch einen enzymatischen Prozess mittels einer Lipase liefert dagegen „natürliches“ Methylantranilat, unter der Voraussetzung dass sowohl das Methanol als auch die Anthranilsäure natürlichen Ursprungs sind. Lipasen finden eine breite Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, da sie sich durch eine hohe Enzymstabilität in organischen Lösungsmitteln und einer geringen Substratspezifität auszeichnen (Thiem 1995). Die biologische Funktion der Lipasen liegt im hydrolytischen, schrittweisen Abbau von Triacylglyceriden zu Di- und Monoacylglyceriden, freien Fettsäuren und Glycerin. Interessant für biochemische Anwendungen sind Lipasen als Biokatalysatoren für viele natürliche und synthetische Substrate, die sie mit hoher Enantio- und Regioselektivität umsetzen. Lipasen katalysieren die Hydrolyse von wasserlöslichen Estern, die Alkoholyse, die Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole sowie Umesterungsreaktionen (Bornscheuer und Kazlauskas 1999). Lipasen kommen in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor; man unterscheidet deswegen auch zwischen mikrobiellen, tierischen und fungalen Lipasen. Die Gruppe der bakteriellen Lipasen wird in die Untergruppen der *Pseudomonas*- und *Staphylococcus*-Familie unterteilt, die der Pilze in die *Rhizomucor*- und *Candida rugosa*-Familie (Boland et al. 1991). Yamada berichtete 1965 über die Isolierung und Aufreinigung einer hochaktiven Lipase aus der Hefe *Candida cylindracea* (Yamada und Machada 1965). Mit dieser Lipase wurde aus Anthranilsäure und Methanol in wässrigem Medium (Acetatpuffer, pH 4.0) Methylantranilat hergestellt (Kittleson und Pantaleone 1994, Abb. 2-21). Allerdings werden teilweise recht lange Inkubationszeiten benötigt, die Ausbeuten sind eher als gering zu bezeichnen, und vor allem benötigt man ständig ein mehr oder weniger aufgereinigtes Enzym für die Umsetzung, was je nach Reinheit dementsprechend teuer ist. Problematisch zu betrachten ist auch, dass höhere

Konzentration als 10 % Methanol denaturierend auf das Enzym wirken, wodurch praktisch nie mehr als 10 % Ausbeute an Methylantranilat erwartet werden kann.

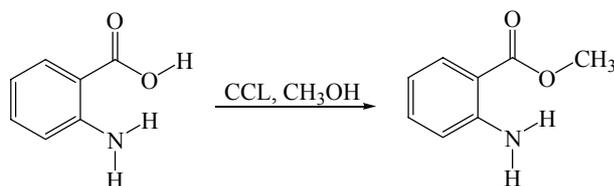


Abb. 2-21: Enzym-katalysierte Veresterung von Anthranilsäure mit Methanol durch eine Lipase aus *Candida cylindraceae* (CCL) (Kittleson und Pantaleone 1994)

2.3.3.2.3 *De novo* – Biosynthese von Methylantranilat

Die zu den Polyporaceae gehörenden Basidiomyceten *Pycnoporus cinnabarinus* und *Poria cocos* besitzen die Fähigkeit, mittels *de novo*-Synthese den Aromastoff Methylantranilat herzustellen (vgl. auch Kapitel 2.3.4). Der filamentöse Fungus *Poria cocos*, gewachsen in Minimalmedium, produzierte mehrere Aromakomponenten, die man als Linalool, Nerolidol, 1-Octen-3-ol und Phenylethanol identifiziert hat. Ebenso wurden stickstoffhaltige Aromastoffe nachgewiesen; hierbei handelt es sich um Ester der Anthranilsäure und Anthranilaldehyd. Die Konzentrationen dieser Komponenten wurden zum Teil signifikant erhöht, wenn ein lipophiles Adsorbens wie z.B. Chromosorb (Chromosorb 102) oder ein Lipid (Miglyol) während der Fermentation dem Medium hinzugefügt wurden. Dadurch erreicht man bis zu 5 mg/L an Methylantranilat (Berger et al. 1987).

Die Fähigkeit von *Pycnoporus cinnabarinus*, Methylantranilat mittels *de novo*-Synthese herzustellen, wurde in einem Screening-Verfahren festgestellt. Verschiedene Variationen hat man durchgeführt, um die Ausbeute zu steigern. Der Einfluss der Stickstoffquelle auf die Produktion von Methylantranilat zeigte sich darin, dass verschiedene N-Quellen unterschiedliche Mengen an Methylantranilat lieferten. Diammoniumtartrat erwies sich als am besten geeignet; es wurden 8 mg/L Methylantranilat innerhalb von 6 Tagen produziert. Bactopepton oder Casaminsäuren lieferten nur 5 mg/L Methylantranilat, allerdings schon nach 4 Tagen Inkubationsdauer. Verschiedene Koh

lenstoffquellen wurden verwendet, um eine Beeinflussung der Bildung an Methylantranilat zu erfassen. Nur unter Verwendung von Maltose, Glycerol, Glucose, Fructose und Saccharose wurde Methylantranilat von *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 gebildet; die Verwendung von Arabinose, Stärke, Galactose, Mannitol, Malzextrakt oder Lactose führten zu keiner Bildung von Methylantranilat. Da während des Wachstums des Pilzes eine pH-Wert-Erniedrigung von pH 5.5 auf pH 3.1 stattfand, wurden verschiedene gepufferte Medien getestet; hierbei zeigte sich das ungepufferte Medium allerdings als das Beste mit 8 mg/L an Methylantranilat (Gross et al. 1990).

2.3.3.2.4 Mikrobielle Biotransformation

Methylantranilat kann auch durch mikrobielle N-Demethylierung von N-Methylmethylantranilat (**30**) gewonnen werden. Verwendet man hierzu als Vorstufe natürliches N-Methylmethylantranilat aus dem Blattöl von *Citrus reticulata*, dann entsteht durch die mikrobielle N-Demethylierung daraus der natürliche Aromastoff Methylantranilat. Da sowohl Methylantranilat als auch die Vorstufe N-Methylmethylantranilat (**30**) toxische Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen aufweisen, ist dieser Prozess nicht unproblematisch. Verschiedene fungale Mikroorganismen, die zu den *Trametes*- und *Polyporus*-Species gehören, sind allerdings befähigt, die N-Demethylierung von N-Methylmethylantranilat (**30**) zu katalysieren (Page und Farbood 1989). Die Verwendung von *Trametes versicolor* ATCC 42394 als Biokatalysator wurde in einem Hefe-Malz-Medium durchgeführt. 100 mL dieses Mediums wurden sterilisiert und mit 5 mL einer 3-Tages-Kultur angeimpft. Nach 3-tägiger Vorinkubationsdauer hat man verschiedene Mengen an NMMA (**30**) hinzugefügt. Die besten Umsetzungsergebnisse erzielte man, wenn die Substratmenge 0.2 % des Gesamtgewichtes des Inkubationsmediums ausmachte. Man erhielt nach 3 Tagen Inkubationsdauer 0.057 mL MA (28.7 %), nach 6 Tagen 0,065 mL an MA (32.8 %). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit *Polyporus spp.* erreicht. Generell stellt diese Biotransformation eine gute Möglichkeit dar, natürliches Methylantranilat zu produzieren. Allerdings ist dieser Prozess teuer, die Ausbeuten sind gering, die Inkubationszeiten und vor allem die Vorinkubationszeiten sind sehr lang und ein unerwünschtes Nebenprodukt, das N-Formylmethylantranilat, wird gebildet (Lomascolo et al. 1999).

2.3.4 Die Anthranilat-Synthase

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan entstehen aus einer gemeinsamen Ausgangsverbindung. Dieses Ausgangsprodukt entsteht durch die Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat (vgl. Abb. 2-22). Der hierbei gebildete offenkettige C₇-Zucker verliert seine Phosphorylgruppe und zyklisiert zu 5-Dehydrochinat. Die darauffolgende Wasserabspaltung führt zum 5-Dehydroshikimat, das mit Hilfe von NADPH zu Shikimat reduziert wird. Die Phosphorylierung des Shikimats durch ATP ergibt Shikimat-5-phosphat, das mit einem zweiten Molekül Phosphoenolpyruvat kondensiert. Das 3-Enolpyruvyl-Zwischenprodukt verliert seine Phosphorylgruppe und wird zu Chorismat, der gemeinsamen Vorstufe aller drei aromatischen Aminosäuren (Knaggs 2003). Tryptophan dient in Mikroorganismen und Pflanzen als Substrat für die Proteinbiosynthese, jedoch spielt es in einigen Pflanzen eine wichtige Rolle als Vorstufe von Sekundärmetaboliten wie z.B. Auxin, Indolessigsäure oder anderen Molekülen, die die Pflanze gegen Pathogene und Herbivoren schützen.

Die Synthese von Tryptophan aus Chorismat umfasst 5 Schritte, wobei die Anthranilat-Synthase (EC 4.1.3.27) den ersten Schritt der sich anschließenden Folgereaktionen katalysiert.

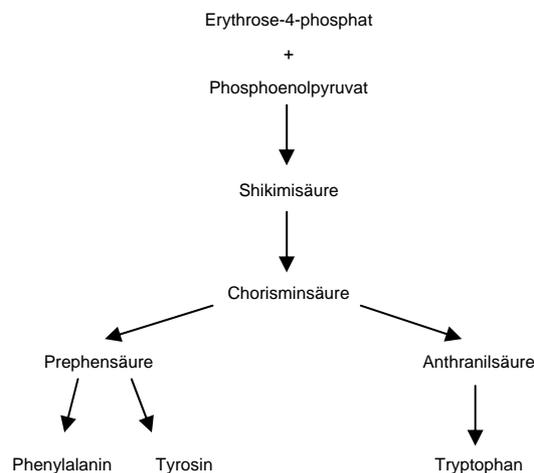


Abb. 2-22: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs der aromatischen Aminosäuren (Stryer 1999)

In beinahe allen Mikroorganismen stellt die Anthranilat-Synthase (AS) ein Oligomer aus nichtidentischen Untereinheiten dar, die als AS α -Untereinheit und AS β -Untereinheit bezeichnet werden. In einigen Mikroorganismen sind diese Untereinheiten miteinander zu einem $\alpha\beta$ -Dimer oder zu einem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer verknüpft (Kawamura et al. 1978). Die AS α -Untereinheit wird von den Genen *trpE* in Prokaryoten (Bakterien und Blau-Grün-Algen) und TRP2 und ASA1/ASA2 in Eukaryoten (Fungi und Pflanzen) codiert. Da die β -Untereinheit des AS-Enzymkomplexes manchmal noch andere Enzyme der Tryptophan-Biosynthese enthält, codieren auch andere Gene, neben *trpG* (Prokaryoten) und TRP3 und ASB (Eukaryoten), die multifunktionale Untereinheit (Hutter et al. 1986). Obgleich die AS in Pflanzen zwei Untereinheiten besitzt, beinhaltet der Enzymkomplex keine weiteren Funktionalitäten. Die Gene für diese Untereinheiten wurden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. (Niyogi und Fink 1992). AS-Isoenzymformen hat man in Zellkulturen von Tabak- und Kartoffelpflanzen gefunden; dagegen wurde im Bereich der Mikroorganismen nur bei *Pseudomonas aeruginosa* Isoenzyme nachgewiesen (Niyogi et al. 1993). In allen Organismen katalysiert die AS α -Untereinheit die NH_3 -abhängige Synthese von Anthranilat, und die AS β -Untereinheit bindet Glutamin, um den Transfer der Amid-Gruppe des Glutamins zur AS α -Untereinheit zu erleichtern (Abb. 2-23).

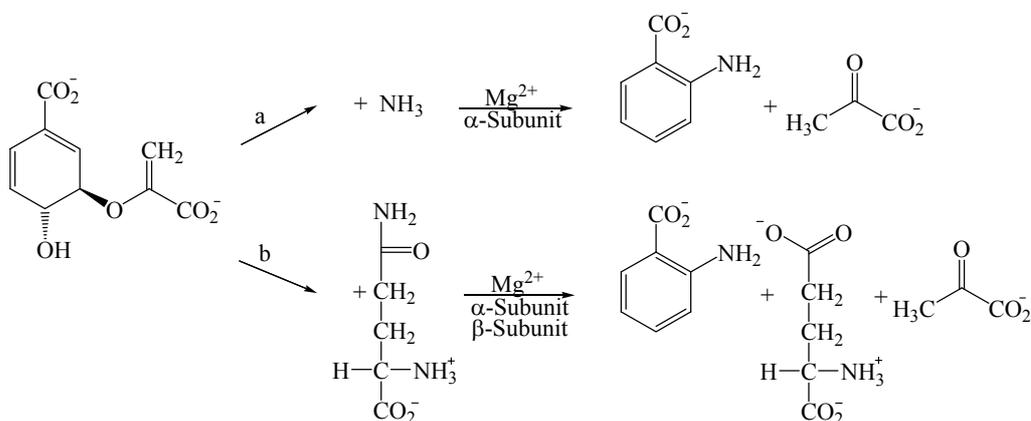


Abb. 2-23: Bildung von Anthranilat aus Chorismat. Die α -Untereinheit der AS katalysiert die NH_3 -abhängige Synthese von Anthranilat (Weg a); die β -Untereinheit bindet Glutamin und erleichtert so den Transfer der Amid-Gruppe zur α -Untereinheit (Romero 1995)

Die Verwendung von Glutamin durch AS erfordert sowohl die AS α -Untereinheit als auch die AS β -Untereinheit, wohingegen die Verwertung des Ammoniaks nur die AS α -Untereinheit erfordert (Zalkin 1985).

Die Verfügbarkeit der AS durch Plasmide, die die Gene für die Produktion von einer oder beiden AS-Untereinheiten tragen, hat zu einer Serie von mechanistischen Studien beigetragen (Zalkin 1985). Die größere α -Untereinheit ist verantwortlich für die Bindung von Chorismat und die regiospezifische Aminierung und Pyruvat-Eliminierung (Walsh et al. 1987). Die α -Untereinheit kann Anthranilat direkt aus Chorismat und hohen Konzentrationen an Ammoniak synthetisieren. Die niedermolekulare β -Untereinheit besitzt Glutaminase-Aktivität, die das Co-Substrat Glutamin über ein γ -Glutamyl-S-cysteinyl-Enzym-Intermediat hydrolysieren und somit Ammoniak für die Aminierung bereitstellen kann (Walsh 1990). Die Glutamin-Bindungsstelle wurde durch reaktive Glutamin-Analoga, die das aktive Zentrum blockieren, identifiziert. Zum Beispiel wird die Glutamin-abhängige AS-Aktivität der multifunktionalen AS von *Neurospora crassa* durch Azaserin (6-Diazo-5-oxo-L-serin) oder DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucin) inaktiviert (Paukert et al. 1982).

Das wahrscheinliche Zwischenprodukt in der Umwandlung von Chorismat zu Anthranilat stellt das Amino-Analogon von Isochorismat dar, das *trans*-6-Amino-5-[1-carboxyvinyl)-oxy]-1,3-cyclohexadien-1-carboxylat (Abb. 2-24).

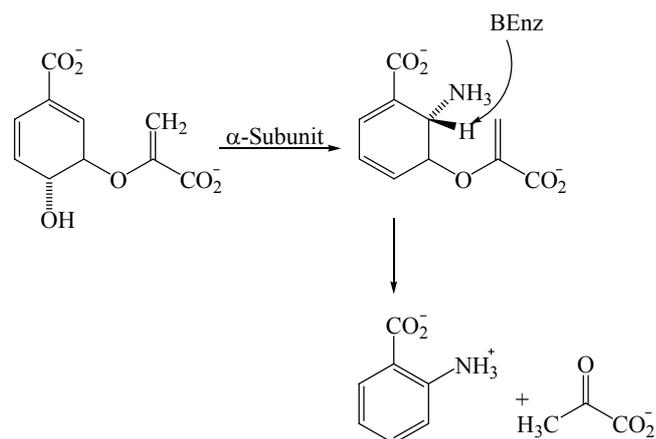


Abb. 2-24: *Cis*-Eliminierung/Aromatisierung von Chorismat zur Bildung von Anthranilat (Romero 1995)

Für die Bildung dieses Intermediates wurde eine *syn*-1,5-Verdrängung der Hydroxylgruppe gegen Ammoniak vorgeschlagen (Policastro et al. 1984). Magnesium spielt bei der Magnesium-abhängigen AS eine offensichtliche Rolle: Mg^{2+} bildet mit der Hydroxygruppe ein Chelat und lässt sie dadurch zu einer besseren Abgangsgruppe werden. Dergleiche Mechanismus wird auch für die Isochorismat-Synthase vorgeschlagen; in diesem Fall wird das Magnesiumion an das Enzym gebunden, mit mindestens einem Molekül Ammoniak in seinem Koordinationsbereich (Kozlowski und Bartlett 1991). Der nachfolgende Schritt besteht in einer durch eine *cis*-Eliminierung bedingten Aromatisierung.

Anthranilsäure dient als Zwischenprodukt zur Synthese vieler anderer Verbindungen wie z.B. den Alkaloiden Arborin, Rutacridon oder der Nodulisporsäure aus dem Fungus *Nodulisporum* (Johne et al. 1970, Baumert et al. 1983, Byrne et al. 2002). Bei der Synthese dieser Alkaloide wird Anthranilsäure am Stickstoffatom zur N-Methylanthranilsäure methyliert. Diese Methylierung wird durch einen Methylgruppentransfer bewerkstelligt (Abb. 2-25); als Spender dient das S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Der Transfer wird durch sogenannte Methyltransferasen katalysiert, in diesem Fall von einer Anthranilsäure-N-methyltransferase (Maier et al. 1995).

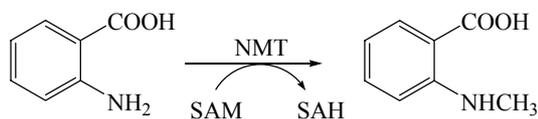


Abb. 2-25: N-Methylierung der Anthranilsäure zu N-Methyl-anthranilsäure durch S-Adenosyl-L-methionin (NMT: N-Methyltransferase, SAM: S-Adenosyl-L-methionin, SAH: S-Adenosyl-L-homocystein) (Eilert und Wolters 1989)

2.4 Das Bakterium *Bacillus megaterium*

2.4.1 Allgemeine Charakterisierung von *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium wurde bereits vor über 100 Jahren (1884) von de Bary beschrieben. Es ist ein Gram-positives Bodenbakterium, das außer im Boden sehr unterschiedliche Habitate wie zum Beispiel Seewasser, Sedimente aber auch Lebensmittel wie z.B. getrocknetes Fleisch, Reis, Milch und Bienenhonig besiedelt (Vary 1992). Namensgebend war die Tatsache seines charakterisch großen Durchmessers: dieses Stäbchen ist 1.5 µm dick und 4 µm lang und besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit zur Sporulation. Geringste Mengen an Mangan im Wachstumsmedium genügen, um eine vollständige Sporulation durchzuführen (Weinberg 1964). Physiologische Untersuchungen an *Bacillus megaterium* klassifizierten diese Spezies als obligat aerobes, Sporenbildendes Bakterium, das Urease-positiv und Voges-Proskauer negativ ist und kein Nitrat reduzieren kann. *Bacillus megaterium* hat ein Wachstumsoptimum zwischen 25 °C und 30 °C, wächst aber auch bis 45 °C und bei Temperaturen zwischen 3 °C und 20 °C (Priest et al. 1988).

Bacillus megaterium besitzt die interessante Eigenschaft, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen nutzen zu können. So kann *Bacillus megaterium* eine Vielzahl von Zuckern verwerten und wurde z.B. in Mais-Sirup, Abfällen aus der Fleischindustrie und auch in petrochemischen Abwässern gefunden (Vary 1994). Aufgrund der Fähigkeit, solch verschiedenartige Kohlenstoffquellen verwerten zu können und seiner ausgeprägten Fähigkeit zur Sekretion von Proteinen ins Wachstumsmedium, ist *Bacillus megaterium* zu einem interessanten Bakterium für die biotechnologische Industrie und Anwendung geworden (siehe auch Kapitel 2.4.3).

Durch phylogenetische Untersuchungen der 16S rRNA wurde *Bacillus megaterium* in die Gruppe 1 der Gattung *Bacillus* eingeordnet (Ash et al. 1991, Priest 1993; Abb. 2-26). Es besteht somit eine relativ nahe Verwandtschaft zu *Bacillus subtilis*, dem Modellorganismus der Gram-positiven Bakterien, der in die Gruppe 2 eingeordnet wurde.

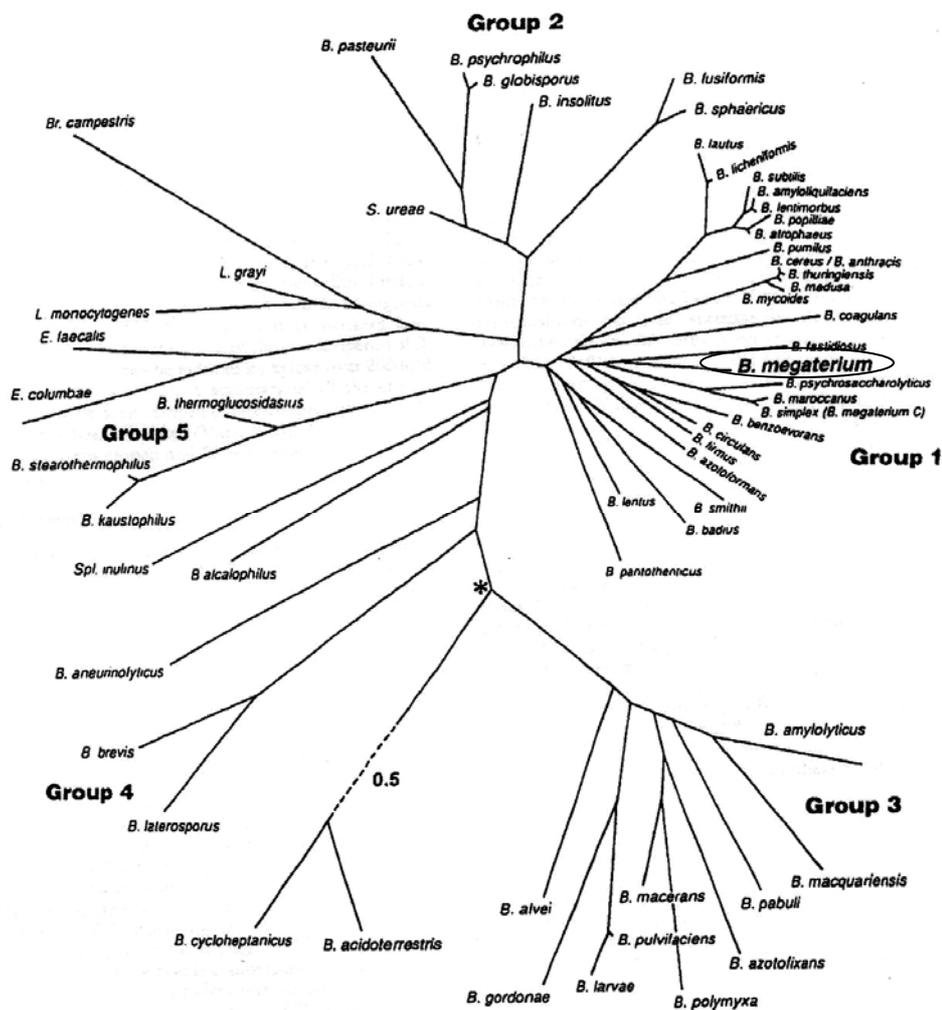


Abb. 2-26: Phylogenetische Einteilung der Gattung *Bacillus* aufgrund 16 S rRNA-Sequenzanalysen. Die Länge der gesamten Linie zwischen zwei Spezies entspricht der evolutionären Verwandtschaft (Vary 1994)

2.4.2 *Bacillus megaterium* als Biokatalysator in der industriellen Biotechnologie

Das Bakterium *Bacillus megaterium* erlangte insbesondere auch industrielles Interesse aufgrund seiner Fähigkeit, verschiedenartige Enzyme zu produzieren. Von Bedeutung ist die ausgeprägte Fähigkeit zum Export von Proteinen, die sich z.B. in der Gewinnung von α - und β -Amylase (Hebeda et al. 1988, Vihinen et al. 1989) sowie der Penicillinamidase aus den Kulturüberständen von *Bacillus megaterium* widerspiegelt (Suga et al. 1990). Durch das Fehlen alkalischer Proteasen wird bei der Produktion heterologer Pro

teine kaum eine Degradation beobachtet. Weitere Anwendung findet *B. megaterium* bei der aeroben Produktion von Vitamin B₁₂, das über den Häm-Biosyntheseweg synthetisiert wird (Wolf und Brey 1986, Robin et al. 1991). Ein sehr großer Vorteil dieses Bakteriums ist, dass es vollkommen apathogen ist und keine Toxine produziert. Da es sich um einen GRAS (Generally Regarded As Safe)-Organismus handelt, steht seinem Einsatz in der Lebensmittel- und Kosmetikproduktion sowie der pharmazeutischen Industrie nichts im Wege.

Aufgrund seiner breiten Substratazeptanz und seines natürlichen Vorkommens als Bodenkeim findet *Bacillus megaterium* auch Anwendung als Bodendüngemittel zum Abbau organischer Phosphorverbindungen und Herbizide (Saxena et al. 1987, Quinn et al. 1989, Selvanayagam und Vijaya 1989). Von großem Vorteil für wissenschaftliche Untersuchungen und industrielle Anwendungen erweist sich auch die hohe Stabilität transformierter Plasmide in *Bacillus megaterium* sowie eine sehr weit fortgeschrittene Genetik, die innerhalb des *Bacillus*-Genus nur von *Bacillus subtilis* übertroffen wird (Gronnes und Turna 1995).

2.5 Formaldehyd-Analytik

Formaldehyd mengenmäßig zu bestimmen ist schwierig. Die Gründe hierfür liegen vor allem in der hohen Flüchtigkeit und der Tatsache, dass dieser Aldehyd mit organischem Lösungsmitteln aus wässrigen Lösungen nur schwer zu extrahieren ist. Hinzu kommt, dass Formaldehyd als Paraformaldehyd auftreten oder polymere Formen bilden kann (Hayashi et al. 1985). *In vivo* wird Formaldehyd weiter zu Ameisensäure und letztlich zu Kohlenstoffdioxid metabolisiert (Savenije-Chapel und Hordhoek 1980).

Generell beruhen die meisten Methoden zur Formaldehyd-Analytik auf einer Derivatisierung von Formaldehyd zu chromophoren Verbindungen, die dann entweder photometrisch oder fluorimetrisch bzw. mittels UV-Detektor und HPLC analysiert werden (Sawicki und Sawicki 1975). Derivatisierungsreagenzien sind vor allem 2,4-Pentandion, Dimedon und 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Formaldehyd durch eine chemische Reaktion in eine Verbindung zu überführen, die im Vergleich zu den oben genannten Derivaten noch flüchtig genug ist, um sie gaschromato-

graphisch-massenspektrometrisch erfassen zu können. Im Folgenden werden die Möglichkeiten der Formaldehyd-Analytik mit ihren entsprechenden Vorteilen und Grenzen aufgezeigt.

Eine über 50 Jahre alte Methode zur Formaldehyd-Quantifizierung stellt die sogenannte Hantzsch-Reaktion dar, bei der Formaldehyd mit dem „Nash-Reagenz“ reagiert, um die farbige und fluoreszierende Verbindung Diacetyldihydrolutidin zu bilden, die dann photometrisch bzw. fluorimetrisch vermessen und quantifiziert wird (Nash 1953). Die früher beschriebenen Methoden zur Formaldehyd-Analytik verlangen sehr harsche Reaktionsbedingungen, die mit einem Erhalt von biologischem Material nicht vereinbar sind. Beispiele für solche Reaktionen mit sehr harten Reaktionsbedingungen stellt die Reaktion von Formaldehyd mit Chromotropsäure in heißer, konzentrierter Schwefelsäure dar, wodurch sich eine violette Färbung zeigt (Eegriwe 1937), oder die Reaktion von Formaldehyd mit Phenylhydrazin und Eisencyanid in konzentrierter Salzsäure (Kersey et al. 1940). Bei der Methode nach Nash (Nash 1953) sind die Reaktionsbedingungen wesentlich milder, weshalb die Formaldehydbestimmung auch an lebendem Material durchgeführt wurde, ohne dass dabei Artefakte durch Zerstörung des organischen Materials durch konzentrierte Mineralsäuren erhalten wurden. Entdeckt hat man die Methode bei der Neutralisation von Formaldehyd in lebenden Bakterienzellen durch Zugabe von Acetylaceton (2,4-Pentandion) und Ammoniumsalz, wodurch sich eine gelbe Färbung, das Diacetyldihydrolutidin (3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin, DDL), bildete (Nash, 1952). In Abb. 2.27 ist die Reaktion des β -Diketons mit Formaldehyd zu sehen. Die Nash-Methode zur Formaldehyd-Analytik beruht auf der Hantzsch-Pyridinsynthese, weswegen die Bestimmung auch Formaldehyd-Bestimmung nach der Hantzsch-Methode genannt wird (Hantzsch 1884).

Die Kondensationsreaktion läuft bei einem pH-Wert von ungefähr 6.3 ab, also unter weniger drastischen Reaktionsbedingungen. Das Reagenz reagiert nicht mit Ketonen, sondern nur mit den Aldehyden Formaldehyd und Acetaldehyd, wodurch eine gewisse Selektivität gegeben ist. Sowohl die kolorimetrische als auch die fluorimetrische Bestimmung nach Nash ist unempfindlich, arbeitsaufwendig und neigt zu Störungen und Wechselwirkungen, wodurch das Ergebnis der Quantifizierung verfälscht werden kann (Rapoport et al. 1994, Rodrigues 1994).

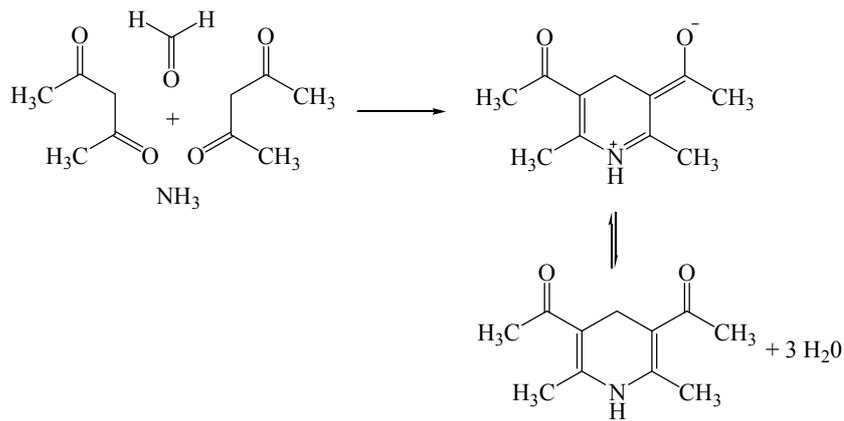


Abb. 2-27: Kondensationsreaktion von Ammoniak und 2,4-Pentadion mit Formaldehyd. Dabei bildet sich das 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin (Jones et al. 1999)

Die Gruppe um Kobayashi (2000) entwickelte ein HPLC-Verfahren für die Formaldehyd-Bestimmung. Nach der chromatographischen Auftrennung auf einer C_{18} -Säule findet eine Derivatisierung von Formaldehyd mit dem „Nash-Reagenz“ in einem Nachsäulenreaktor bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt; der Nachweis erfolgt mittels Fluoreszenz-Detektion. Durch diese Methode wurde eine 80-fache Sensitivitätssteigerung gegenüber der kolorimetrischen erreicht.

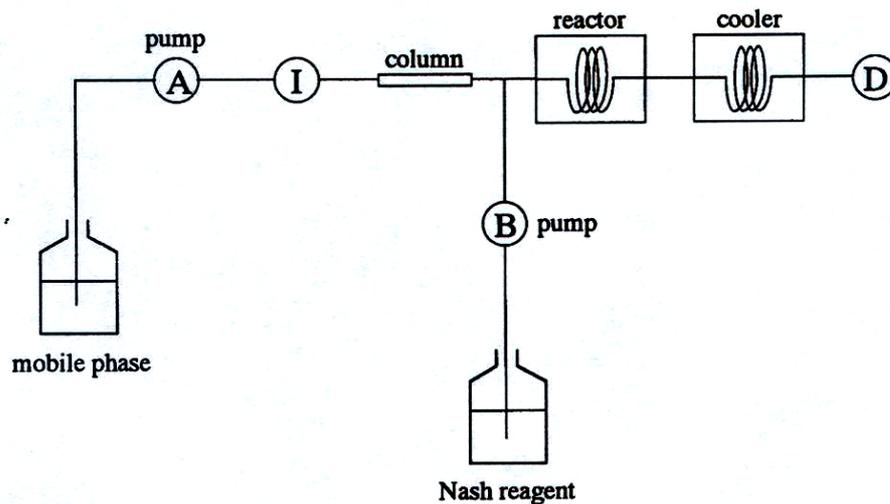


Abb. 2-28: Schematische Darstellung des HPLC-Systems mit Nachsäulen-Derivatisierung (Kobayashi 2000)

Dimedon-Addukte werden häufig verwendet, um die Quantifizierung von Formaldehyd zu erleichtern. Hierbei reagieren zwei Moleküle Dimedon mit einem Molekül Formaldehyd zu Formaldehyd-Dimedon (Abb. 2-29).

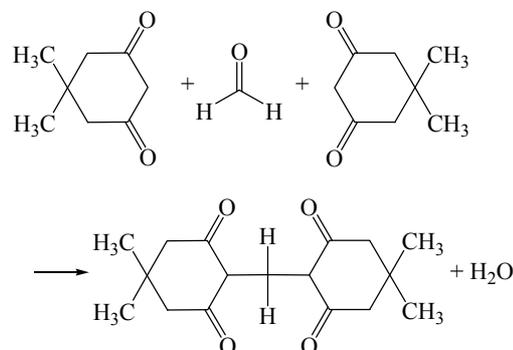


Abb. 2-29: Reaktion zwischen Dimedon und Formaldehyd zum Formaldehyd-Dimedon (Rozvlo 1998)

Diese Art der Formaldehyd-Analytik wird vor allem dünnschichtchromatographisch angewandt; aufgrund der noch ausreichenden Flüchtigkeit dieser Dimedon-Addukte kann auch gaschromatographisch-massenspektrometrische Analytik erfolgen. Im Gegensatz zur Derivatisierung mit dem „Nash-Reagenz“ reagieren auch höhere Aldehyde mit Dimedon. Janos et al. (1980) identifizierte Dimedon-Derivate von verschiedenen Aldehyden wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd und Butyraldehyd mittels GC-MS. Häufig wird die Flüssigchromatographie, Dünnschichtchromatographie und auch HPLC-Analytik zur Identifizierung der Dimedon-Addukte eingesetzt. Das gebildete Dimedon-Addukt hat eine UV-Absorption bei 254 nm. Dies ist auch der Grund, weshalb Dimedon-Addukte hauptsächlich mittels Dünnschichtchromatographie analysiert werden, da sich Kieselgelplatten F_{254} mit Fluoreszenzfarbstoff zur UV-Detektion bei 254 nm sehr gut eignen.

Vorteil bei der Dimedon-Methode ist, dass keine harten Reaktionsbedingungen gewählt werden müssen und dass für die Analytik der Dimedon-Addukte die Dünnschichtchromatographie, aber auch die HPLC und die GC-MS verwendet werden können. Mittels letzterer Methode lässt sich so das Vorhandensein von mehreren Aldehyden gleichzeitig nachweisen, und die Identifizierung kann anhand der erhaltenen Massenspektren erfolgen.

Eine häufig verwendete Methode ist auch die Reaktion von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und die nachfolgende Analyse mittels HPLC (Abb. 2-30). DNPH wird aufgrund seiner schnellen Reaktion mit Formaldehyd und der Stabilität des gebildeten Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazons, früher auch als Formaldehyd-Hydrazone bezeichnet, verwendet (Sollenberg et al. 2003). DNPH reagiert mit vielen Aldehyden und Ketonen zu den entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazonen. Hierzu zählen neben den einfachen Aldehyden und Ketonen auch solche wie z.B. Benzaldehyd, Cyclopentanon und Acetophenon (Ross 1953), so dass eine sehr breite Vielfalt an Aldehyden und Ketonen analytisch erfasst werden kann.

Nicht nur mittels HPLC, sondern auch durch GC-MS-Analytik können die Phenylhydrazone analysiert werden. Zum Nachweis von oxidativem Stress werden als Biomarker einer Lipidperoxidation häufig Malondialdehyd und Formaldehyd in Gewebe und Plasma bestimmt (Maboudou et al. 2002).

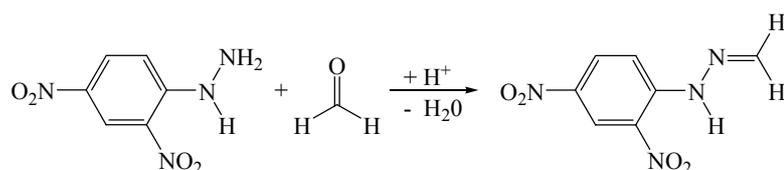


Abb. 2-30: Derivatisierung von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazone (Sollenberg et al. 2003)

Die simultane Detektion der drei aliphatischen Aldehyde Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd wurde durch die Derivatisierung mit 4-(N,N-Dimethylamino-sulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-H) durchgeführt. Die Trennung der Derivate erfolgte mittels Reversed-phase-Chromatographie (Nakashima et al. 1994, Nebbia et al. 2001). Eine indirekte Formaldehydbestimmung wurde von Lizcano et al. (2000) beschrieben. Formaldehyd hat man durch die Reduktion von NAD(+) durch die Formaldehyddehydrogenase weiter zu Ameisensäure oxidiert; entstandenes NADH wurde bei 340 nm vermessen.

Trasher et al. (1987, 1988) stellten fest, dass sich Formaldehyd kovalent an humanes Serumalbumin bindet, wodurch sich ein Formaldehyd-Serumalbumin-Addukt bildet. Formaldehyd fungiert hier als eine Art Hapten. Die Formaldehydbelastung zeigt sich

durch die humorale Immunantwort des Serums, und das anti-Formaldehyd-Serumalbumin kann titriert werden. Diese Art der Bestimmung der Formaldehydbelastung kann in großem Ausmaß in der Bevölkerung durchgeführt werden (Carraro et al. 1999).

Die Elektrochromatographie stellt eine neue Methode zur Aldehyd-Analytik dar. Die Kapillarelektrochromatographie wurde für die Auftrennung und Quantifizierung von 14 Aldehyden und Ketonen wie Formaldehyd, Acetaldehyd, Aceton, Acrolein, Butanon, Crotonaldehyd oder Benzaldehyd entwickelt. Das Trennsystem besteht aus einer mobilen Methanol-Acetonitril-Phase und einem flüchtigen Puffer; die Trennung erfolgte in einer Siliziumkapillare (Fung et al. 2001).

Flüchtige Carbonylverbindungen sind häufig für den ranzigen Geruch in verschiedenen, fettreichen Lebensmitteln verantwortlich. Sie bilden sich durch Oxidation und dem Abbau von Lipiden während der Lagerung von Lebensmitteln (Gray 1978). Im Vergleich zu anderen Derivatisierungsmethoden reagiert Formaldehyd rasch mit Cysteamin unter milden Reaktionsbedingungen (Zimmertemperatur und neutralem pH-Wert) zu Thiazolidin (Yasuhara und Shibamoto 1989). Diese stabile Verbindung kann leicht mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden und aufgrund ausreichender Flüchtigkeit mittels GC und GC-MS analysiert werden. Durch die Verwendung eines Stickstoff-Phosphor-spezifischen Detektors ist hohe Empfindlichkeit erreichbar. Cysteamin reagiert mit allen Carbonylverbindungen außer mit α,β -ungesättigten Aldehyden.

Diese Cysteamin-Derivatisierungsmethode wurde für die Analytik von Spuren-Aldehyden in Lebensmitteln und Getränken entwickelt. Die gaschromatographische Bestimmung von Formaldehyd als Thiazolidin in Kaffee hat Hayashi 1986 durchgeführt.

Eine Serie kurzkettiger, flüchtiger und gesättigter Aldehyde (C_1 bis C_9) wurde mittels der Cysteamin-Derivatisierungsmethode in Wein, Brandy und Sherry identifiziert (Lau et al. 1999). Neben den schon erwähnten Einsatzmöglichkeiten im Bereich der Lebensmittelchemie wurden weitere Untersuchungen in diesem Fachbereich durchgeführt (Yasuhara und Shibamoto 1989, 1991), die Cysteamin-Methode wurde aber auch eingesetzt, um Aldehyde im Zigarettenrauch (Miyake und Shibamoto 1995) und Autoabgasen nachzuweisen (Yasuhara und Shibamoto 1994).

Bei einem pH-Wert von 7.2 existiert Cysteamin vorwiegend als Zwitterion. Der Stickstoff der Aminogruppe des Cysteamins greift die Carbonylgruppe des Aldehyden an.

Durch Protonierung der entstandenen Hydroxylgruppe entsteht die sehr gute Abgangsgruppe Wasser. Der nucleophile Angriff des Thiolates auf das entstandene Carbokation führt schließlich zum entsprechenden Thiazolidin. Pufferlösungen beeinflussen die Thiazolidin-Bildung zwischen Formaldehyd und Cysteamin. Der verwendete Phosphat-Buffer neigt dazu, das primär gebildete Carbokation zu stabilisieren und die Cyclisierung durch den Angriff des Aminostickstoff des Cysteamins auf den aktivierten Kohlenstoff zu erleichtern. Protische Lösungsmittel, wie z.B. Ethanol, erhöhen die Thiazolidin-Bildung, in dem sie das entstehende Wasser abführen. Phosphat-Ionen sind auch für die Umwandlung der Thiazolidine in die entsprechenden Thiazoline verantwortlich; dieser Hydrid-Transfer wird durch Phosphat-Ionen katalysiert (Huang et al. 1998). Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus zwischen Cysteamin und Aldehyden zum entsprechenden Thiazolidin ist in Abb. 2-31 zu sehen.

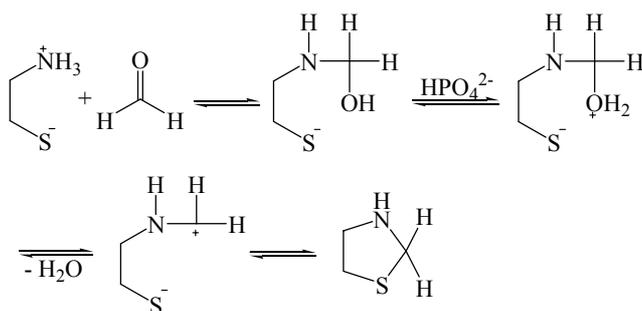


Abb. 2-31: Mechanismus der Bildung von Thiazolidin aus Formaldehyd und Cysteamin (Huang et al. 1998)

Die neueste Anwendung der Reaktion von Cysteamin mit Formaldehyd ist die Reinigung von medizinischen Lösungen, die mit Formaldehyd kontaminiert sind (Bird et al. 2004). Dies betrifft peritoneale Dialyselösungen und Lösungen, die zur intravenösen, parenteralen Ernährung bestimmt sind. Diese auf einer Salzlösung als Basis beruhenden Lösungen enthalten meist größere Mengen an Glucose, aber auch Arzneistoffe und Aminosäuren. In diesen Lösungen hat man verschiedene Aldehyde identifiziert, die durch den Abbau von Glucose durch Hitzesterilisation beim Herstellungsprozess entstehen (Henderson 1989, Nilsson-Thorell et al. 1993). Obwohl die Sterilfiltration eine Alternative darstellt, bleibt das Autoklavieren die bevorzugte Methode der Wahl aufgrund

ihrer verlässlichen Wirksamkeit und den relativ geringen Kosten. Auf zellulärer Ebene betrachtet stören Aldehyde die Zellkommunikation, schädigen die Lipidmembranen, zelluläre Proteine, RNA und DNA und die Funktion von Mitochondrien (Conaway et al. 1996). Durch Cysteamin wird die durch die Hitzesterilisation gebildete destruktive Carbonylgruppe des Formaldehyds maskiert, und es wird Thiazolidin, das zusätzlich noch antioxidative Eigenschaften aufweist, gebildet (Roberts et al. 1995).

Die direkte Bestimmung von Formaldehyd ohne Derivatisierung ist mittels Headspace-Gaschromatographie möglich. Die Headspace-Analyse wird auch als Kopf- oder Dampfraumanalyse bezeichnet, da hier die Gasphase über einem geschlossenen System analysiert wird. Unterschieden werden zwei Methoden, die statische und die dynamische Headspace-Analytik. Bei der statischen Methode wird mit einer gasdichten Spritze aus der Gasphase eine Probe entnommen und mittels GC und GC-MS analysiert. Wichtige Spurenbestandteile können mit dieser Methode allerdings meist nicht erfasst werden. Hierfür bietet sich die dynamische Headspace-GC an, bei der ein Gasstrom durch die Probe geleitet wird und die flüchtigen Verbindungen an einem Träger angereichert werden, die dort meist thermisch desorbiert und dann analysiert werden (Snow und Slack 2002). Da sich Formaldehyd aus wässrigen Lösungen oder anderen Proben nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahieren lässt, sich aber durch seine Flüchtigkeit durch Erhitzen der zu untersuchenden Proben heraustreiben lässt, stellt die Headspace-Gaschromatographie eine interessante Alternative zu den bereits aufgeführten Analysemöglichkeiten dar; nötige Derivatisierungen können entfallen und eine Probenaufarbeitung ist nicht notwendig. Die ersten Arbeiten zur Headspace-Analytik wurden von Kettrup et al. (1980) durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 1 ppm. Modifiziert wurde diese Methode 1987, da Bedarf bestand, die Formaldehyd-Belastung in Lebensmitteln und biologischen Medien direkt, schnell und ohne anfällige Störungen zu erfassen (Tashkov und Benchev 1987, Tashkov 1996).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Isolierung geeigneter Mikroorganismen zur Biotransformation

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde in einem Screening-Verfahren aus einer Bodenprobe ein Bodenmikroorganismus isoliert, der zur Biotransformation von N,N-Dialkylarylaminen fähig ist. 1 g Bodenmaterial kann bis zu 10^8 Mikroorganismen enthalten; aus diesem Grund stellt dieses Material eine sehr gute natürliche Quelle zur Gewinnung von Mikroorganismen dar (Blaine Metting jr. 2000). Ein Großteil dieser Mikroorganismen ist, bedingt durch spezifische Nährstoffbedingungen, im Labor nicht kultivierbar. Neueste Erkenntnis belegen, dass mehr als 99% der Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht als Biokatalysatoren eingesetzt werden können (Schloss und Handelsmann 2003, Cowan et al. 2005). Dennoch stellt der Boden ein Habitat dar, das von hoher biokatalytischer Aktivität geprägt und somit bestens geeignet ist, Biotransformationen zu katalysieren (Kirk et al. 2004).

Die Durchführung des Screenings - wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben - wurde durch bestimmte Inkubationsbedingungen in eine gezielte Richtung gelenkt. Hierzu wurden verschiedenen Wachstumsmedien verwendet, um von vorneherein eine Selektion zu treffen. Verwendet wurde ein Minimalmedium, das mit verschiedenen Mengen an N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) versetzt wurde. Das Anilin-Derivat sollte hier als einzig verwertbare Kohlenstoffquelle dienen. Ebenso wurden Agarplatten hergestellt, denen noch Glucose als zusätzliche Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Durch die Zugabe von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) in den Agar wurde versucht, Mikroorganismen auszuschließen, die in Gegenwart des später zu testenden Substrates toxische Effekte zeigen und somit nicht für weitere Untersuchungen geeignet sind. Hierdurch wurde auch die Anzahl der zu prüfenden Keime von vorneherein auf ein bestimmtes Maß limitiert. Weiterhin wurde die aus der Bodenprobe erhaltene Probelösung auf Agarplatten mit Vollmedium ausplattiert und inkubiert. Diese Inkubation verlief solange, bis ein deutliches Wachstum und klar ausgeprägte Kolonien ersichtlich waren. Es wurde darauf geachtet, dass die Kolonien nicht zu groß wurden, damit sich verschiedene Kolonien nicht mit anderen vermischen konnten. Durch kurze Inkubationszeiten wurde versucht, das Wachstum von

fungalen Mikroorganismen zu verhindern. Durch eine flächenausbreitende Mycelbildung können Bakterien verdeckt oder am Wachstum gehindert werden. Desweiteren sollten Pilze, bedingt durch ihr meist nur langsames Wachstum und ihre aufwendigere Handhabung im Labor, für das Screening keine Anwendung finden. Deutlich voneinander abgetrennte Kolonien wurden ausgewählt und davon im sogenannten Pick-Verfahren Reinkulturen entnommen. Diese Reinkulturen wurden durch Verdünnungsausstriche auf Reinheit überprüft und von nun ab auf Vollmedium-Agarplatten kultiviert. Auf diese Weise wurden 107 Kulturen isoliert, die nicht näher phäno- und genotypisch untersucht wurden. Aufgrund der spezifischen Wachstumsbedingungen von Bodenmikroorganismen ließen sich allerdings nicht alle Mikroorganismen dauerhaft kultivieren (Riesenfeld et al. 2004), so dass letztendlich für das Screening nur noch 96 Kulturen zur Verfügung standen. In Abbildung 3-1 ist das durchgeführte Screening-Verfahren schematisch dargestellt.

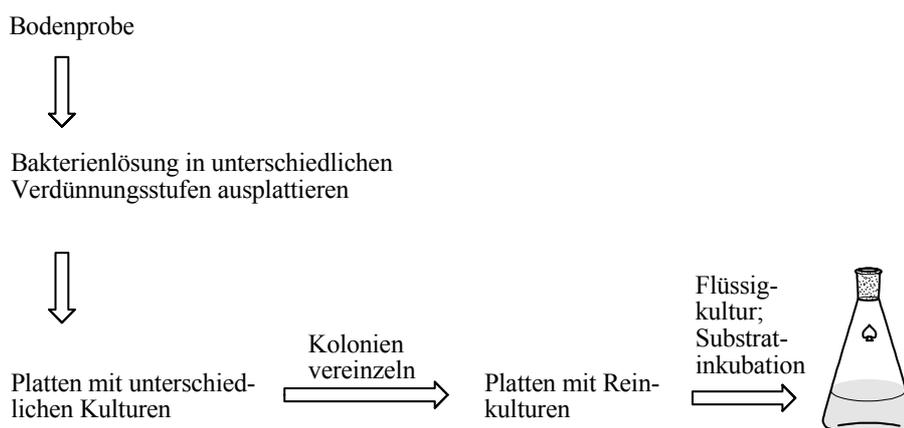


Abb. 3-1: Schematischer Ablauf des Screening-Verfahrens zur Selektion und Isolierung von Bodenmikroorganismen

Diese 96 Kulturen wurden, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, im Flüssigmedium mit dem Standardsubstrat N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) inkubiert. Nach Extraktion der eventuell gebildeten Metabolite mit organischen Lösungsmitteln wurde der Extrakt gaschromatographisch untersucht. Bei diesem Screening wurden 3 Stämme isoliert, die Biotransformationsprodukte herstellten. Von diesen 3 Isolaten wurde das Bodenisolat

Nr. 21 für weitere Arbeiten verwendet und die drei gebildeten Metabolite, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, analysiert und identifiziert. Dieses Isolat wurde auch deswegen weiter verwendet, weil es von den Metaboliten wesentlich größere Mengen als die anderen bildete und in dem verwendeten Standardmedium ein sehr gutes Wachstum zeigte.

3.2 Charakterisierung des isolierten Bakterienstammes

Das Bodenisolat Nr. 21 wurde phänotypisch als auch genotypisch charakterisiert. Hierbei wurden sowohl Methoden der klassischen Bakterienidentifizierung als auch die 16S rDNA-Analytik sowie eine DNA/DNA-Hybridisierung durchgeführt.

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung

Eine phänotypische Charakterisierung beinhaltet neben der Gestalt und dem Färbeverhalten des Bakteriums verschiedene Enzymaktivitäten und Stoffwechseleigenschaften. Anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen wurde festgestellt, dass es sich um ein stäbchenförmiges Bakterium handelt. Auffallend war die bemerkenswerte Größe. Die durchschnittliche Breite lag zwischen 1.1 und 1.3 μm ; die Länge betrug zwischen 2.7 μm und 3.3 μm , teilweise wurden aber auch bis zu 3.8 μm große Bakterien entdeckt. Bei der Beobachtung der bakteriellen Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop auch stark lichtbrechende Körper erkannt. Anhand einer durchgeführten Sporenfärbung wurden die lichtbrechenden Körper als Sporen identifiziert (vgl. Kapitel 4.3.13).

Die Färbung nach Gram erlaubt, aufgrund von Unterschieden im Aufbau der Zellwand, eine Differenzierung in Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Bei der Gram-Färbung wird ein hitzefixierter Bakterienausstrich mit einem Triphenylmethanfarbstoff und Jod gefärbt. Anschließend wird mit einem organischen Lösungsmittel entfärbt: Bei den Gram-negativen Bakterien wird der Jod-Farbstoffkomplex leichter extrahiert als bei den Gram-positiven. Es stellte sich heraus, dass es sich bei dem Bodenisolat um einen Gram-positiven Keim handelt (Süßmuth et al. 1999).

Zusätzlich wurde ein Nachweis auf das Vorhandensein von L-Alanin-Aminopeptidase durchgeführt. Dieses Enzym hat man in Gram-negativen Bakterien gefunden. Zum Nachweis steht ein industriell hergestellter Teststreifen zur Verfügung, der in seiner Reaktionszone L-Alanin-4-nitroanilid enthält. Dieses Substrat wird von der L-Alanin-Aminopeptidase in L-Alanin und 4-Nitroanilin gespalten. Eine Gelbfärbung des Reaktionsansatzes weist auf das Vorhandensein der Aminopeptidase und somit auf ein Gram-negatives Bakterium hin (Süßmuth et al. 1999). Das Ergebnis der Gram-Färbung wurde durch einen negativen Aminopeptidase-Test abgesichert, da dieses Enzym eben nur in der Zellwand Gram-negativer Bakterien in relevanten Mengen nachweisbar ist.

Die phänotypische Charakterisierung lieferte erste Hinweise dafür, dass es sich bei dem Bodenisolat um einen Gram-positiven Mikroorganismus handelt, der außerdem zur Sporulation fähig ist. Generell sind alle Bakterien, die zur Sporenbildung befähigt sind, auch Gram-positiv (Stephenson und Lewis 2005). Desweiteren wurde erkannt, dass es sich um ein sehr großes und stäbchenförmiges Bakterium handelt, wie Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop ergaben. Aufgrund dieser Aussagen ist der isolierte Keim wohl in der Gattung *Bacillus* anzusiedeln, da andere sporenbildende Gattungen wie z.B. *Clostridium*, streng anaerob fermentative Arten enthalten (Turton et al. 2002).

Da anhand dieser Aussagen selbstverständlich keine eindeutige Identifizierung stattfinden kann, wurde die weitere Identifizierung auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt.

3.2.2 Genotypische Charakterisierung

Eine genotypische Charakterisierung wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Münster auf Basis der partiellen Sequenzierung der ribosomalen 16S rDNA durchgeführt (Kap. 4.3.14.1). Ein direkter Vergleich der partiellen Sequenz der 16S rDNA zeigte, dass das Isolat Nr. 21 zur Species *Bacillus megaterium* gehört. Im Vergleich zum *Bacillus megaterium* – Type strain (ATCC 14581, DSM 32^T) zeigte sich eine Übereinstimmung von 456 Basenpaaren und somit von 99.6%. Diese ersten genotypischen Charakterisierungsergebnisse sind in Übereinstimmung mit der phänotypischen Charakterisierung, da hier festgestellt wurde, dass es sich um einen sporenbildenden Gram-positiven Mikroorganismus handelt, der zusätzlich noch durch seine enormen

Größenausmaße ins Auge sticht. Diese Aussagen passen treffend zu *Bacillus megaterium* (vgl. Kap. 2.4.1).

Zusätzlich zur 16S rDNA-Analytik wurde zur Absicherung noch eine DNA/DNA-Hybridisierung durchgeführt (Kap. 4.3.14.2). Diese Methode wird zur Verwandtschaftsanalytik von Mikroorganismen durchgeführt. Hierbei zählen Mikroorganismen mit 25% Übereinstimmung zur gleichen Gattung, bei einer Übereinstimmung von 75% spricht man von einer gleichen Art und eine Übereinstimmung von 100% bedeutet, dass es sich um den gleichen Stamm handelt (Wayne et al. 1987). Das Ergebnis der DNA/DNA-Hybridisierung lieferte gegenüber dem *Bacillus megaterium* – Type strain (ATCC 14581, DSM 32^T) eine mittlere Übereinstimmung von 83.2%. Dieses Resultat bestätigte das Ergebnis der 16S rDNA-Analytik.

Aufgrund der erhaltenen Informationen der genotypischen Charakterisierung war das Bodenisolat Nr. 21 eindeutig als *Bacillus megaterium* zu bezeichnen. Die zusätzlich durchgeführten klassischen Färbeversuche lieferten zusätzlich wichtige Hinweise.

3.3 Identifizierung der Biotransformationsprodukte von N-Ethyl-N-methylanilin

Das Bodenisolat Nr. 21 bildete aus dem Substrat N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) insgesamt drei Biotransformationsprodukte. Diese wurden durch verschiedene Methoden identifiziert, die vor allem die Auswertung von Massenspektren, aber auch die Synthese von Referenzsubstanzen beinhaltete. Diese Identifizierungsschritte sollen nun im Folgenden erläutert und im Detail dargelegt werden. In Abb. 3-2 ist ein typisches GC-MS-Chromatogram der Biotransformation von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) durch das Isolat Nr. 21 dargestellt. Zu erkennen ist das nicht umgesetzte Substrat ($R_t=20.98$ min), ein großer Peak ($R_t=24.75$ min) sowie zwei wesentlich kleinere Peaks ($R_t=22.73$ min; 43.95 min), welche die drei Biotransformationsprodukte darstellen. In Abb. 3-2 sind auch noch kleinere Peaks zu erkennen; diese stellen Gärungsstoffwechselprodukte (organische Säuren) dar und werden auch ohne Substratzugabe gebildet (Schallmey et al. 2004).

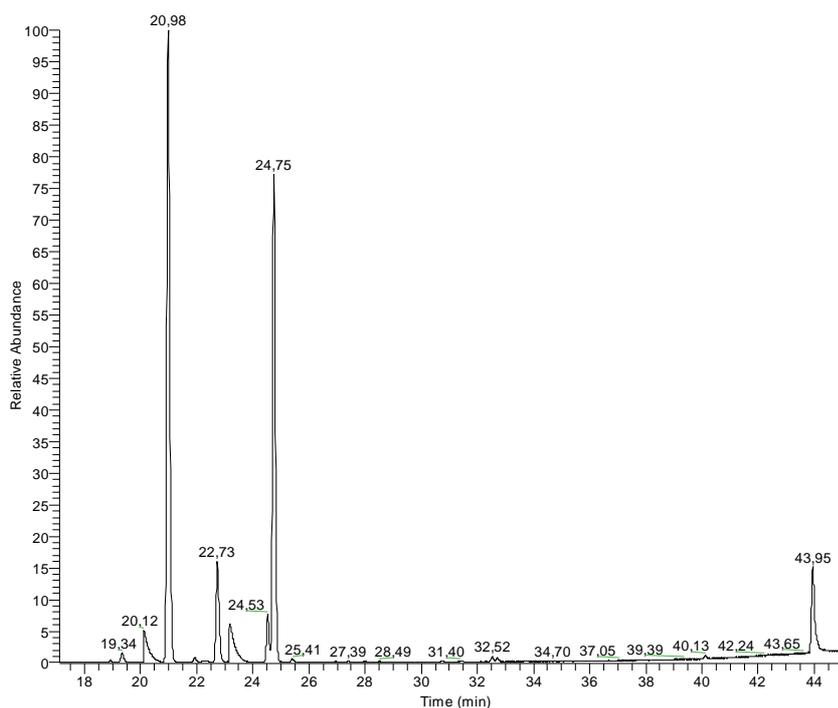


Abb. 3-2: Typisches GC-MS-Totalionenchromatogram (TIC) der Umsetzung von N-Ethyl-N-methyl-anilin (**1**) durch das Isolat Nr. 21 ($R_t=20.98$ min: N-Ethyl-N-methylanilin (**1**); unbekannte Biotransformationsprodukte: $R_t=22.73$; $R_t=24.75$; $R_t=43.95$)

Die Identifizierung des Peaks bei $R_t=24.75$ min gestaltete sich einfach, da anhand des Massenspektrums durch einen Vergleich mit der laboreigenen MS-Spektrenbibliothek die Identifizierung als N-Ethylanilin möglich war. Im Vergleich mit kommerziell erhältlichem N-Ethylanilin als Referenz waren sowohl Retentionszeit als auch Fragmentierungsmuster mit denen der unbekanntem Verbindung übereinstimmend. Dieses Biotransformationsprodukt stellt also das N-Demethylierungsprodukt von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) dar.

Die beiden anderen Metabolite konnten anhand von Massenspektren nicht identifiziert werden, da keine Referenzen mit den entsprechenden Massenspektren zur Verfügung standen. Im Folgenden wird die Verbindung mit $R_t=22.70$ min als Metabolit A und die Verbindung mit $R_t=43.95$ min als Metabolit B bezeichnet. Angefügt werden muss, dass Metabolit B im eigentlichen Standardscreening, d.h. bei Extraktion im Alkalischen,

nicht nachzuweisen war. Eine im Neutralen durchgeführte Extraktion mit Diethylether lieferte dagegen beide Metabolite, so wie es in Abb. 3-2 zu erkennen ist. In Tabelle 3-1 sind die charakteristischen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der beiden Metabolite gegenüber dem Substrat dargestellt.

Tab. 3-1: Charakteristika der gebildeten Metabolite A und B

	Substrat	Metabolit A	Metabolit B
Retentionszeit	20.98 min	22.70 min	43.95 min
Alkalische Aufarbeitung	+	+	-
Neutrale Aufarbeitung	+	+	+
Massenzunahme gegenüber dem Substrat		16	16
Fragmentierungsmuster		annähernd identisch	

Aufgrund dieser Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten wurden erste Schlüsse auf mögliche strukturelle Eigenschaften gezogen. Ein Unterschied von über 20 min in der Retentionszeit ließ für Metabolit B auf eine polare Verbindung schließen. Aufgrund der verwendeten GC-Säule eluierten polarere Substanzen mit wesentlich längerer Retentionszeit. Da aber beide Metabolite eine Massenzunahme von 16 Masseneinheiten aufwiesen, war mit einer wesentlichen Veränderung des Substrates nicht zu rechnen. Eine Massenzunahme von 16 ließ den Schluss auf eine Insertion von Sauerstoff im Sinne einer Hydroxylfunktion zu. Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens in alkalischen und neutralen Medium wurde ebenfalls auf eine Hydroxylgruppe geschlossen. Die Massenspektren der Metabolite A und B (im Vergleich mit dem Massenspektrum des Ausgangssubstrats) lieferte weitere wichtige strukturelle Informationen (Abb. 3-3).

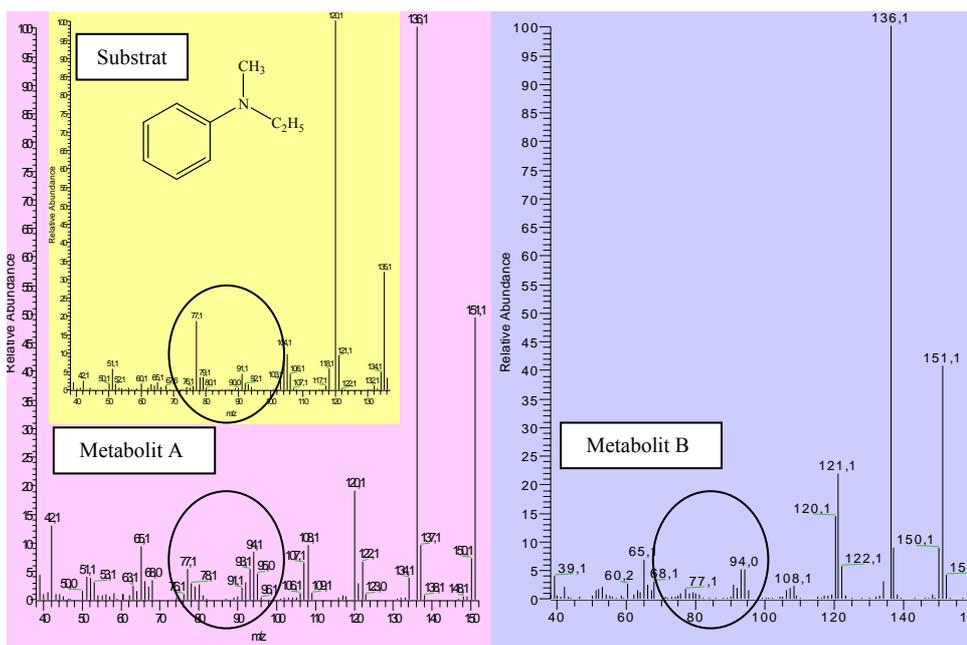


Abb. 3-3: Fragmentierungsmuster von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) (gelb) sowie von den Metaboliten A (rosa) und B (blau)

Das Massenspektrum von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) (Abb. 3-3, gelb) stellt ein typisches Fragmentierungsmuster für die Gruppe der N,N-Dialkylarylamine dar (Cowan et al. 1982). Besonders wichtig sind die typischen Massenfragmente $m/z = 77$ und 91 . Das Erstere steht für den reinen Aromaten, während das Zweite eine Massenerhöhung um 14 Einheiten aufweist, was typisch für einen Stickstoff-substituierten Aromaten ist. Ersichtlich ist auch der Molekülpeak mit einer Masse von 135. Betrachtet man nun die Fragmentierungsmuster der Metabolite A (Abb. 3-3, rosa) und B (Abb. 3-3, blau), ist der Molekülpeak mit einer Masse von 151 sehr gut zu erkennen. Bei näherer Betrachtung der beiden Massenspektren fällt im Vergleich zum Fragmentierungsmuster des Substrates auf, dass deutliche Unterschiede in Bezug auf das typische Fragmentierungsmuster der N,N-Dialkylarylamine zu erkennen sind. Die sonst typischen Massen 77 und 91 treten deutlich in den Hintergrund, während jetzt bei Metabolit A und auch bei Metabolit B ein Massenfragment von $m/z = 93/94$ in Erscheinung tritt, das beim Substrat nicht vorhanden ist. Da gleichzeitig noch Massenfragmente mit einer Masse von 91 vorhanden waren, lag es nahe, dass es sich bei der Metabolisierung um eine arylische Hydroxylierung handelt. Aus früheren Metabolisierungsversuchen mit Leber-

mikrosomen und dem Substrat N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) wurde ein Metabolit, das N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (**1-4***) nachgewiesen und mittels GC-MS identifiziert (Gorrod und Patterson 1980). Das damals erhaltene Fragmentierungsmuster zeigt deutliche Übereinstimmungen mit den beiden Fragmentierungsmustern aus Abbildung 3-3. Die typischen Massenfragmente $m/z = 151$, 136 und 122 wurden auch dort in vergleichbaren Intensitäten gefunden. Dies verstärkte die Vermutung, dass es sich bei den Metaboliten A und B um arylische Hydroxylierungsprodukte handeln musste. Da in der Spektren-Bibliothek keine arylisch-hydroxylierten N,N-Dialkylarylamine zur Identifizierung vorhanden waren, wurden diese Verbindungen als Referenzsubstanzen, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, synthetisiert und mittels GC-MS als auch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 4.4.3 und 4.4.4) identifiziert. Durch die Synthese der Hydroxylierungsprodukte N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol (**1-2***) und N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (**1-4***) wurden die beiden Metabolite A und B anhand ihrer übereinstimmenden Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster als arylische 2- und 4-Hydroxylierungsprodukte des Substrats N-Ethyl-N-Methylanilin (**1**) identifiziert (Abb. 3-4).

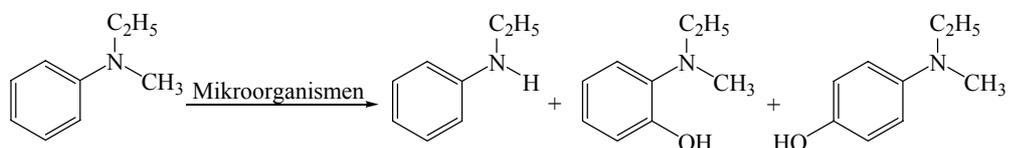


Abb. 3-4: Biotransformation von N-Ethyl-N-Methylanilin (**1**) durch das Bodenisolat zu N-Ethylanilin, N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol (**1-2***) und N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (**1-4***)

Die durchgeführten Versuche zur Detektion von N-Oxiden blieben negativ. Die verwendete TiCl_3 -Methode zur Reduktion eventuell gebildeter N-Oxide (vgl. Kapitel 4.3.5) führte im gesamten durchgeführten Substrat-Screening zu keinem erfolgreichen Nachweis.

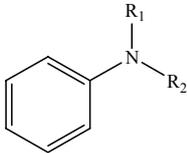
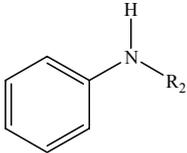
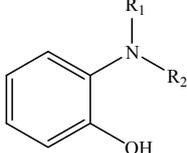
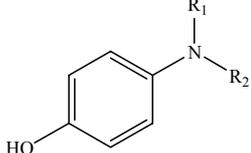
3.4 Diverse N- und P-Alkylverbindungen als Substrate

3.4.1 Substratscreening mit einfach strukturierten Aminen

Nachdem die Metabolite der Umsetzung mit N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) erfolgreich als N-Demethylierungs- bzw. arylische Hydroxylierungsprodukte identifiziert worden waren, wurden weitere N-Alkylarylverbindungen mit dem isolierten *Bacillus megaterium* umgesetzt. Es wurden die erforderlichen strukturellen Voraussetzungen der Substrate ermittelt, die zur Biotransformation vorhanden sein müssen. Zuerst sind weitere einfach-strukturierte tertiäre N,N-Dialkylarylamine (**2-8**), sekundäre N-Alkylarylamine (**10-12**) sowie Anilin (**9**) untersucht worden. Darauf folgend wurde die Grundstruktur dieser Substratklasse weitgehend variiert und auch der Einfluss von Substituenten am Aromaten untersucht.

Die einfach-strukturierten N,N-Dialkylarylamine (**2-8**), die mit *Bacillus megaterium* umgesetzt wurden, waren alle symmetrisch substituiert und unterschieden sich nur in der Anzahl der Kohlenstoffatome der Seitenkette. Der einfachste Vertreter stellte N,N-Dimethylanilin (**2**) dar, gefolgt von N,N-Diethylanilin (**3**). Die Kettenverlängerung wurde sukzessiv bis zum N,N-Dihexylanilin (**7**) fortgesetzt. Ebenso wurde ein Alkylketten-verzweigtes Substrat, N,N-Diisopropylanilin (**8**) inkubiert. Von den N-Alkylverbindungen wurden N-Methylanilin (**10**) bis zu N-Propylanilin (**12**) als Substrate verwendet. Die Ergebnisse der Biotransformationen mit *Bacillus megaterium* sind in Tabelle 3-2 dargestellt; sie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Es wurden Substrate mit Alkylgruppen von Methyl- bis Propylkettenlänge von *B. megaterium* sowohl hydroxyliert als auch N-dealkyliert. Dabei stieg die Umsetzung von N,N-Di-methyl- (**2**) über N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) bis zu N,N-Diethylanilin (**3**) an, um dort ein Maximum zu erreichen. Bei N,N-Dipropylresten (**4**) allerdings sank die Umsetzung sehr deutlich ab; längere Reste verhinderten eine Umsetzung (sowohl Hydroxylierung als auch N-Dealkylierung) gänzlich. Auch das sperrige N,N-Diisopropylanilin (**8**) wurde von *B. megaterium* nicht umgesetzt, da hier wohl sterische Effekte durch die Isopropylgruppe zum Tragen kamen.

Tab. 3-2: Übersicht über die eingesetzten Substrate und die daraus gebildeten Biotransformationsprodukte

							
-R ₁	-R ₂		N-Dealkylierung ^a	<i>ortho</i> -Hydroxylierung ^a	<i>para</i> -Hydroxylierung ^a		
-CH ₃	-C ₂ H ₅	(1)	23	7	5		
-CH ₃	-CH ₃	(2)	17	4	4		
-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	(3)	23	11	9		
-C ₃ H ₇	-C ₃ H ₇	(4)	10	5	3		
-C ₄ H ₉	-C ₄ H ₉	(5)	/	/	/		
-C ₅ H ₁₁	-C ₅ H ₁₁	(6)	/	/	/		
-C ₆ H ₁₃	-C ₆ H ₁₃	(7)	/	/	/		
-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	(8)	/	/	/		
-H	-H	(9)	/	/	/		
-CH ₃	-H	(10)	/	/	/		
-C ₂ H ₅	-H	(11)	/	/	/		
-C ₃ H ₇	-H	(12)	/	/	/		

^a berechnet als GC-detektierbare Mengen in Prozent

Bei den durchgeführten Biotransformationen war ein deutlicher Einfluss der Substratstruktur auf das Biotransformationsverhalten von *B. megaterium* festzustellen. Mit steigender Lipophilität der verwendeten Substrate war ein gleichzeitiger Anstieg der Menge an gebildeten Biotransformationsprodukten verbunden. Nur wenn das Substrat mit dem entsprechenden mikrobiellen Enzym einen sog. Enzym-Substrat-Komplex eingehen kann, wird eine erfolgreiche Umsetzung stattfinden. Die durch eine Seitenkettenverlängerung verursachte Steigerung der Lipophilie schien eine wesentliche Rolle bei der Umsetzung zu spielen. Eine eventuelle Ausrichtung des Substrates im aktiven Zentrum des mikrobiellen Enzyms wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit entsprechenden Aminosäuren wie z.B. Alanin oder Phenylalanin erleichtert. Substrate wie z.B. N,N-Dibutylanilin (**5**) oder N,N-Dihexylanilin, die noch wesentlich lipophiler sind,

wurden jedoch nicht als Substrate akzeptiert. Folglich spielen nicht nur hydrophobe Effekte eine wesentliche Rolle für eine Umsetzung, sondern die Molekülgeometrie und daraus abzuleitende sterische Hinderungen sind offenbar ebenfalls wichtig. Sterische Gründe zeichnen sich auch verantwortlich bei dem Substrat N,N-Diisopropylanilin (**8**). N,N-Diethylanilin (**3**) scheint, sowohl bei der Hydroxylierung als auch bei der N-Dealkylierung, ein Substrat mit sehr guten strukturellen Eigenschaften für die Biotransformationsfähigkeit von *B. megaterium* darzustellen. Dieses Substrat erfüllt sowohl die Anforderungen an eine offenbar notwendige Lipophilie als auch eine passende strukturelle Grundstruktur. Bei den N-Alkylverbindungen (**10-12**) wurde keines der angebotenen Substrate hydroxyliert oder N-dealkyliert. Offensichtlich ist die tertiäre Grundstruktur der N,N-Dialkylarylamine für eine Biotransformation eine wichtige Voraussetzung, auch hier macht sich die Abhängigkeit der Lipophilie der Substrate von einer erfolgreichen Umsetzung bemerkbar. Sekundäre N-Alkylarylverbindungen wurden generell wesentlich langsamer biokatalysiert (Pandey et al. 1989), so dass eine Verlängerung der Inkubationsdauer eventuell zu einer Bildung von Metaboliten geführt hätte. Da allerdings sämtliche eingesetzten Substrate toxische Eigenschaften aufwiesen, wurde eine Verlängerung der Inkubationszeit als nicht sinnvoll erachtet.

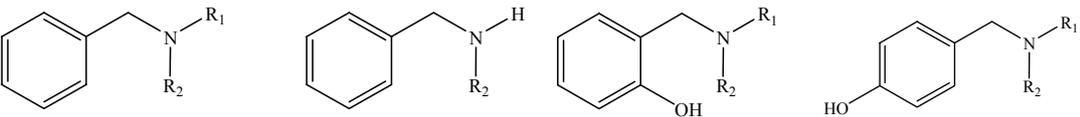
Da das für diese Reaktionen verantwortliche Enzym nicht isoliert und charakterisiert wurde, kann nur hypothetisch davon ausgegangen werden, dass es sich um eine mikrobielle Cytochrom P-450 Monooxygenase handelt. Weitere Versuche so wie Ergebnisse zu einer eventuellen Beteiligung von CYP an den Hydroxylierungs- und N-Dealkylierungsreaktionen werden in Kapitel 3.6.1 und 3.6.2 aufgezeigt. Dabei wurde durch Einsatz verschiedener Induktoren und Repressoren eine Beeinflussung der CYP-Aktivität untersucht.

Zusätzlich muss bei den durchgeführten Versuchen angemerkt werden, dass mit einem lebendigem System gearbeitet wurde, so dass eventuell toxische Effekte des Substrats auf den Mikroorganismus zum Tragen kommen konnten, die von vorneherein eine Umsetzung ausschließen.

3.4.2 Benzylische und aliphatische zyklische N,N-Dialkylverbindungen

Fügt man zwischen dem Stickstoffatom und dem Aromaten eine $-\text{CH}_2$ -Gruppe ein, dann erhält man benzylische N,N-Dialkylverbindungen, die N,N-Dialkyl-benzylamine (**13-15**). Bei der Umsetzung von N,N-Dimethyl- (**13**), N-Ethyl-N-methyl-benzyl- (**14**) und N,N-Diethylbenzylamin (**15**) mit *Bacillus megaterium* wurden keine Biotransformationsprodukte gefunden (Tab. 3-3). Sowohl Hydroxylierung als auch N-Dealkylierung fanden nicht statt. Eine Biotransformation mit *B. megaterium* ist somit nur möglich, wenn sich der Stickstoff direkt am Aromaten befindet. Auch hier liefert das Enzym-Substrat-Modell eventuelle Erklärungsansätze für das Ausbleiben der Katalyse. Die eingeführte $-\text{CH}_2$ -Gruppe und das daraus resultierende benzylische Molekül mit seinem Knick verhindert somit eine erfolgreiche Umsetzung. Bei einem Blick in die Literatur stellt man fest, dass *Aeromonas hydrophila*, ein aus mit N,N-Dimethylbenzylamin (**13**) kontaminiertem Boden isolierter Mikroorganismus, dagegen eine N-Demethylierung von (**13**) durchführen kann (Patrauchan und Oriel 2003).

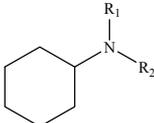
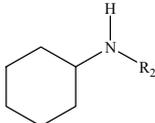
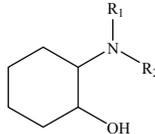
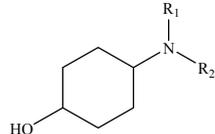
Tab. 3-3: Übersicht über die eingesetzten Substrate und die daraus gebildeten Biotransformationsprodukte

					
$-\text{R}_1$	$-\text{R}_2$		N-Dealkylierung ^a	ortho-Hydroxylierung ^a	para-Hydroxylierung ^a
$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$ (13)		/	/	/
$-\text{CH}_3$	$-\text{C}_2\text{H}_5$ (14)		/	/	/
$-\text{C}_2\text{H}_5$	$-\text{C}_2\text{H}_5$ (15)		/	/	/

^a berechnet als GC-detektierbare Mengen in Prozent

Das gleiche Bild bietet sich, wenn der Aromat durch einen aliphatischen Cyclohexylring ersetzt wird. Auch hier wurde die Gruppe der N,N-Dialkylcyclohexylaminverbindungen (**16-18**) nicht von *Bacillus megaterium* umgesetzt. Es fand weder N-Dealkylierung noch Hydroxylierung statt.

Tab. 3-4: Übersicht über die eingesetzten Substrate und die daraus gebildeten Bio-transformationsprodukte

							
-R ₁	-R ₂	N-Dealkylierung ^a	<i>ortho</i> -Hydroxylierung ^a	<i>para</i> -Hydroxylierung ^a			
-CH ₃	-CH ₃ (16)	/	/	/			
-CH ₃	-C ₂ H ₅ (17)	/	/	/			
-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅ (18)	/	/	/			

^a berechnet als GC-detektierbare Mengen in Prozent

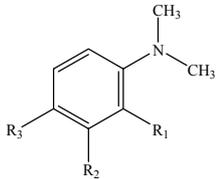
Das elektronenreiche aromatische Ringsystem ist demzufolge essentiell für die Bio-transformation durch *Bacillus megaterium*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für eine erfolgreiche Umsetzung folgende strukturelle Voraussetzungen erfüllt sein müssen: das Stickstoffatom muss sich direkt am Aromaten befinden und die aromatische Grundstruktur muss vorhanden sein.

3.4.3 Substituierte N,N-Dialkylarylverbindungen

Da, wie bereits ausführlich dargestellt, nur N,N-Dialkylarylamine von *B. megaterium* umgesetzt worden sind, wurde diese Grundstruktur beibehalten und für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Kontrolle von Substituenten-Einflüssen verwendet. Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit wurden hierzu substituierte N,N-Dimethylanilinderivate (**19-23**) verwendet. Die Substituenten befanden sich hauptsächlich in *para*-Position zur N,N-Dimethylaminogruppe. Nachfolgende Tabelle 3-5 gibt einen Überblick über die eingesetzten Substrate und die jeweils bei den Umsetzungen mit *Bacillus megaterium* erhaltenen Ergebnissen.

Tab. 3-5: Abhängigkeit von Substituenteneffekten auf N-Demethylierung und arylische Hydroxylierung

			N-Demethylierung ^a	arylische Hydroxylierung ^a
-R ₁	-R ₂	-R ₃		
-CH ₃	-H	-H	(19) 12	/
-H	-CH ₃	-H	(20) 14	/
-H	-H	-CH ₃	(21) 24	/
-H	-H	-Br	(22) 47 23 ^b	/
-H	-H	-NO ₂	(23) 1	/

^a berechnet in Prozent als GC-detektierbare Mengen

^b N,N-Di-demethylierung

Die Zusammenstellung in Tabelle 3-5 zeigt Substituenteneinflüsse in Bezug auf N-Demethylierung und Hydroxylierung. Während eine aromatische Substitution eine Hydroxylierung in der noch freien *ortho*-Position gänzlich zum Erliegen bringt, so ist eine Beeinflussung der N-Demethylierung deutlich sichtbar. Ein Methylgruppen-Substituent beeinflusst die Demethylierung, indem er in *ortho*- (**19**) und *meta*-Position (**20**) eine Verringerung der N-Demethylierungsrate verursacht. Statt 17 % N-Demethylierungsprodukt ohne Substituenten (**2**) (vgl. Tab. 3-2) reduzierte ein Substituent in *ortho*- bzw. *meta*-Position die Werte auf 12 bzw. 14 %. Eine Methylgruppe in *para*-Position (**21**) dagegen erhöhte die N-Demethylierungsrate auf 24 %. Es wurde demnach folgende Tendenz festgestellt: Je weiter der Methylgruppensubstituent sich von der N,N-Dialkylgruppe entfernt befindet, desto höher ist die prozentuale N-Demethylierungsrate. Offenbar sind auch noch sterische Gründe für diese Abhängigkeit verantwortlich.

Ein Brom-Substituent in *para*-Position (**22**) hat einen sehr starken Einfluss auf die Demethylierung. Dieser Substituent erhöht die N-Demethylierungsrate auf 47 % und somit fast um das 3-fache gegenüber der Umsetzung von reinem N,N-Dimethylanilin (**2**). Zu-

sätzlich zur N-Demethylierung findet eine N,N-Di-demethylierung zum *para*-Bromanilin (23 %) statt. Hier zeigt sich, wie stark die Demethylierung von Substituenteneinflüssen geprägt ist. Normalerweise läuft eine N,N-Di-demethylierung sehr verlangsamt ab, so dass sie bei den normalen Inkubationszeiten nie beobachtet wurde. Der Brom-Substituent jedoch kann aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften diese N,N-Di-demethylierung bewirken (Pandey et al. 1989, Nanbo und Nanbo 2002).

Eine Nitro-Gruppe in *para*-Position (**23**) brachte im Gegensatz dazu die N-Demethylierung annähernd zum Erliegen. Die Demethylierungsrate lag hier bei knapp einem Prozent. Bei Versuchen mit Lebermikrosomen wurde allerdings schon 1973 festgestellt, dass eine N-Demethylierung von N,N-Dimethyl-4-nitroanilin im Gegensatz zu den isomeren N,N-Dimethyl-2-nitroanilin und N,N-Dimethyl-4-nitroanilin wesentlich langsamer und erschwerter abläuft (Schmidt et al. 1973).

3.4.4 N,N,N',N'-Tetramethyl-*p,p'*-benzidin und N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-benzidin

Als komplexere Moleküle für das Substratscreening wurden im Folgenden die Substrate N,N,N',N'-Tetramethyl-*p,p'*-benzidin (**24**) und N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-benzidin (**25**) zur Biokatalyse mit *Bacillus megaterium* eingesetzt.

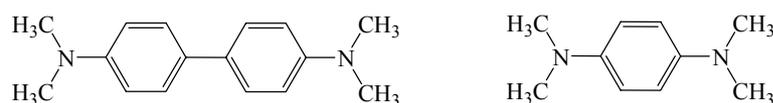


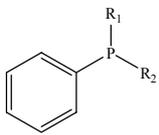
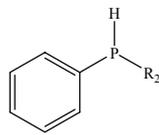
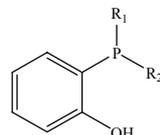
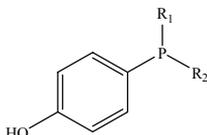
Abb. 3-5: Strukturformeln von N,N,N',N'-Tetramethyl-*p,p'*-benzidin (**24**) und N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-benzidin (**25**)

Bei der Umsetzung dieser Substrate wurde ebenso keine Hydroxylierung beobachtet. Allerdings ließen sich N-Demethylierungsprodukte identifizieren. Hierbei wurde festgestellt, dass N,N,N',N'-Tetramethyl-*p,p'*-benzidin (**24**) mit 12 % N-Demethylierung im Vergleich zu N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-benzidin (**25**) (8 %) stärker umgesetzt wurde.

3.4.5 Umsetzungen von Phenylphosphinen

Substitution des Stickstoffatoms gegen Phosphor führt zur Gruppe der Alkylgruppen-substituierten Phenylphosphine (**26-29**). Bei dieser Substratklasse wurde untersucht, ob der Austausch des Stickstoffatoms gegen ein Phosphoratom einen Einfluss auf das Biotransformationsverhalten von *B. megaterium* hat. Wie aus Tab. 3-6 zu erkennen ist, wurde keines der Phenylphosphine als Substrat einer Biotransformation akzeptiert. Dies kann an der hohen Toxizität der verwendeten Substrate liegen.

Tab. 3-6: Umsetzung von Phenylphosphinen mit *Bacillus megaterium*

							
-R ₁	-R ₂	P-Dealkylierung ^a	<i>ortho</i> -Hydroxylierung ^a	<i>para</i> -Hydroxylierung ^a			
-CH ₃	-CH ₃ (26)	/	/	/			
-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅ (27)	/	/	/			
-CH ₃	-C ₆ H ₆ (28)	/	/	/			
-C ₆ H ₆	-C ₆ H ₆ (29)	/	/	/			

^aberechnet in Prozent als GC-detektierbare Mengen

Hinzuweisen ist auf die Tatsache, dass diese Substrate, vor allem das Dimethylphenylphosphin (**26**) sowie das Diethylphenylphosphin (**27**), sehr stark anfällig gegenüber Luftoxidation sind. Die beiden Substrate wurden durch Luftoxidation nahezu vollständig in die entsprechenden P-Oxide umgewandelt. Dieser Effekt verhinderte schon bei früheren Metabolismusstudien das Ziel, erfolgreiche Biotransformationen mit dieser Substratklasse durchzuführen (Holland et al. 1993).

3.4.6 Biotransformation von N-Methyl-methylantranilat zu Methylantranilat

Das etablierte System der N-Demethylierung durch *Bacillus megaterium* bot sich an, die N-Demethylierung des Aromastoffes N-Methyl-methylantranilat (**30**) zu Methylantranilat zu untersuchen. Diese Testumsetzungen ergaben, dass das isolierte Bodenbakterium im der Lage ist, das angebotene Substrat N-Methyl-methylantranilat zu Methylantranilat zu demethylieren (Abb. 3-6).

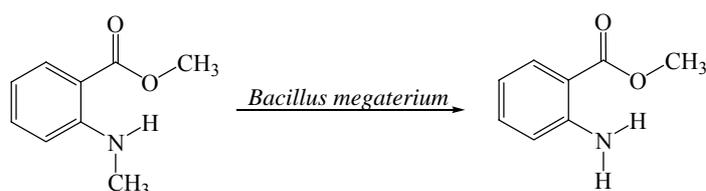


Abb. 3-6: N-Demethylierung von N-Methyl-methylantranilat (**30**) zu Methylantranilat durch *Bacillus megaterium*

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, wurden von dem isolierten *Bacillus megaterium* nur tertiäre N,N-Dialkylarylamine (**1-4**) umgesetzt. Bei N-Methyl-methylantranilat (**30**) handelt es sich jedoch um ein sekundäres aromatisches Amin, das innerhalb der Standardinkubationsdauer trotzdem zuverlässig, schnell und in einer Ausbeute von 25 % N-demethyliert wurde. Da in dieser anwendungsbezogenen N-Demethylierung noch viele andere Arbeiten durchgeführt wurden, wird diesem Biotransformationsprozess nachfolgend ein eigener Abschnitt (siehe Kapitel 3.7) gewidmet. Vorab wird noch über das Auftreten von Formaldehyd bei der oxidativen N-Demethylierung berichtet.

3.5 Oxidative N-Demethylierung: Analytik und Quantifizierung von Formaldehyd

Wie im Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, erfolgt bei der oxidativen N-Demethylierung durch CYP oder Peroxidasen die Abspaltung von Formaldehyd. Dieser wird dann meist durch Dehydrogenasen zur Ameisensäure und letztlich zu Kohlendioxid oxidiert. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Identifizierung und Quantifizierung von Formaldehyd bei der von uns untersuchten Biokatalyse durch *Bacillus megaterium* beschrieben. Als Substrate für die Umsetzungen dienten N,N-Dimethyl-anilin (**2**) und N-Ethyl-N-

methylanilin (**1**). Formaldehyd wurde mittels Headspace-Analytik, Derivatisierung mit Dimedon, Phenylhydrazin und Cysteamin analysiert. Die Vor- und Nachteile dieser Methoden sind ausführlich im Kenntnisstand (Kapitel 2.5) behandelt worden; die experimentellen Bedingungen zu den Techniken finden sich im Experimententeil (Kapitel 4.3.8).

3.5.1 Headspace-Analytik

Die Headspace-Analytik eignet sich sehr gut für die Analytik von Aromastoffen und anderen flüchtigen Verbindungen. Vorteilhaft ist, dass eine aufwendige Probenvorbereitung entfällt und somit viele Proben in kürzester Zeit analysiert werden können. Nach 18-stündiger Inkubation mit N,N-Dimethylanilin (**2**) wurde ein Aliquot der Bakteriensuspensionslösung entnommen, in ein Headspace-Gläschen gegeben und dieses gasdicht verschlossen. Die Analytik auf Formaldehyd wurde mittels Headspace-GC durchgeführt. Allerdings ließ sich mit dieser Methode kein Formaldehyd in den Bakteriensuspensionen nachweisen.

Um das Problem der hohen Flüchtigkeit von Formaldehyd zu umgehen, wurde eine Umsetzung von N,N-Dimethylanilin (**2**) mit *Bacillus megaterium* direkt in einem gasdicht verschlossenen Headspace-Gläschen durchgeführt. Allerdings war auch hier der Nachweis von Formaldehyd negativ.

3.5.2 Derivatisierung von Formaldehyd mit Dimedon

Nach Inkubation mit N,N-Dimethylanilin (**2**) wurde nach Dimedon-Derivatisierung Formaldehyd mittels GC-MS analysiert; diese Studien verliefen ebenfalls negativ. Als Ursache kam die hohe Flüchtigkeit in Frage, aber auch die Vermutung der Metabolisierung durch die Mikroorganismen lag nahe. Deswegen wurde versucht, durch gleichzeitige Zugabe von N,N-Dimethylanilin (**2**) und Dimedon zur Bakteriensuspension den durch N-Demethylierung entstehenden Formaldehyd direkt als Addukt abzufangen. Allerdings ergaben sich mit dieser Methode einige Probleme. Dimedon ist schlecht wasserlöslich und damit für Anwendungen in wässrigen Medien schlecht geeignet. Lö-

semittel wie Dimethylsulfoxid oder Methanol sollten nicht zur Anwendung kommen, da diese die Reaktionsbedingungen verändern würden und eventuell toxisch gegenüber dem Biokatalysator *Bacillus megaterium* wirken könnten. Desweiteren zeigte sich, dass die Anwesenheit von Dimedon im Medium Einwirkungen auf die Bakterien sowie deren Metabolismus hatte. Die Bakterien starben zum Teil ab, was sich durch Zusammenklumpen von Zellmaterial zeigte. Außerdem wurde die Umsatzrate an N-Demethylierungs- als auch Hydroxylierungsprodukten wesentlich verringert.

3.5.3 Derivatisierung von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Nach Inkubation mit N,N-Dimethylanilin (**2**) wurde die Formaldehyd-Analytik mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin durchgeführt. Auch mit dieser Methode war kein Nachweis von Formaldehyd möglich.

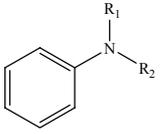
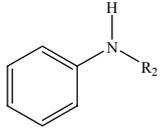
3.5.4 Derivatisierung von Formaldehyd mit Cysteamin

Derivatisierung mit Cysteamin eignet sich gut zur Aldehyd-Analytik in wässrigen Medien. Aufgrund der ausreichenden Flüchtigkeit des gebildeten Thiazolidins kann dieses gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden. Das gebildete Thiazolidin lässt sich gut mit organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Chloroform, extrahieren (Yasuhara et al. 1998). Nach 18-stündiger Inkubation mit N,N-Dimethylanilin (**2**) wurde Cysteamin hinzugefügt und nach Extraktion mit Chloroform auf eventuell gebildetes Thiazolidin mittels GC-MS untersucht. Hierbei wurde eine geringe Menge an Thiazolidin festgestellt, die allerdings mit der rein rechnerischen Formaldehyd-Menge (1 Mol N-Methylanilin entspricht 1 Mol Formaldehyd) nicht korrelierte. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, Cysteamin zusammen mit dem Substrat N,N-Dimethylanilin (**2**) gleichzeitig zuzugeben. Dadurch sollte der durch die N-Demethylierung entstehende Formaldehyd direkt von den Cysteamin-Molekülen abgefangen werden. Nach vorgegebener Inkubationszeit wurde mit Chloroform extrahiert; die Metabolite wurden quantifiziert.

In gleicher Weise ist die N-Demethylierung von N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) untersucht worden, da auch hier durch *Bacillus megaterium* ein N-Demethylierungsprodukt, das

N-Ethylanilin, gebildet wurde. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Unterschieden werden hier die Ergebnisse einer Cysteaminzugabe nach 18 stündiger Inkubation und einer direkten Zugabe von Cysteamin zeitgleich mit Substratzugabe.

Tab.3-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Formaldehyd-Analytik mittels Cysteamin-Derivatisierung

Substrat [100 µmol]	N-demethyliertes Produkt	N-demethyliertes Produkt [µmol] ^a	Formaldehyd[µmol] ^{a,b}	
			Cysteamin- zugabe nach 18 h Inkubation	Cysteamin- zugabe gleich- zeitig mit Sub- stratzugabe
				
R ₁ =R ₂ =CH ₃ (2)	R ₂ =CH ₃	8.8	0.73	7.4
R ₁ =CH ₃ R ₂ =C ₂ H ₅ (1)	R ₂ =C ₂ H ₅	7.3	0.57	6.6

^aProdukte quantifiziert mittels Kalibriergerade, Mittelwerte aus vier Versuchsansätzen

^bFormaldehyd-Bestimmung indirekt über gebildetes Thiazolidin

In Tabelle 3-7 sind die Vorzüge und die Eignung der verwendeten Cysteamin-Methode zu erkennen. Betrachtet man zunächst die Mengen an gebildeten N-Demethylierungsprodukten, so ist festzustellen, dass N,N-Dimethylanilin (**2**) stärker N-demethyliert wurde als das asymmetrisch-substituierte N-Ethyl-N-methylanilin (**1**). Darauf hinzuweisen ist, dass die Quantifizierungen (vgl. Tabelle 3-7) anhand von Kalibriergeraden durchgeführt wurden. Die im Kapitel 3-4 genannten Berechnungen wurden dagegen, mit Ausnahme der Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat (**30**), als prozentuale Mengen aller GC-flüchtigen Verbindungen berechnet.

Die bei der Formaldehyd-Quantifizierung erhaltenen Daten bestätigten die schon in den vorherigen Versuchen beschriebenen Vermutungen, dass sich der gebildete Formaldehyd entweder verflüchtigte oder weiter metabolisiert wurde. Da 1 Mol Substrat 1 Mol Formaldehyd ergibt, sollte man rein rechnerisch für Werte von 8.8 µmol N-Methylanilin und 7.3 µmol N-Ethylanilin auch Mengen an Formaldehyd von 8.8 µmol bzw. 7.3 µmol (bzw. entsprechend als Thiazolidin) erwarten. Eine Zugabe von Cysteamin nach beendeter 18-stündiger Inkubationsdauer lieferte aber nur Werte an Formaldehyd von 0.73

bzw. 0.57 μmol . Erfolgte allerdings die Cysteaminzugabe zeitgleich mit der Substratzugabe, so lagen die Werte an Formaldehyd signifikant höher, d.h. bei 7.4 bzw. 6.6 μmol . Diese Werte kommen den theoretisch errechneten Mengen nahe.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die entwickelte Methode der Formaldehyd-Quantifizierung eine sehr milde Methode ist; die Zugabe von Cysteamin in das Medium hatte keinerlei Einfluss auf die metabolische Aktivität von *Bacillus megaterium*; die Metabolite wurden in der gleichen Menge gebildet wie dies auch ohne Cysteaminzugabe der Fall war. Im Hinblick auf das Wachstum zeigten sich auch keinerlei negative Effekte; der Keim wuchs in der gleichen Geschwindigkeit und mit der gleichen Zelldichte wie in einem als Blindwert durchgeführten Experiment.

3.5.6 Inkubation stabil isotoopen-markierter Substrate

Mittels Cysteamin-Derivatisierung wurde gezeigt, dass bei der oxidativen N-Demethylierung Formaldehyd entsteht. Dieser wurde direkt nach Abspaltung von Cysteamin abgefangen und zu Thiazolidin derivatisiert. Um sicherzustellen, dass der Formaldehyd wirklich aus den abgespaltenen Methylgruppen resultiert, wurden isotoopenmarkierte Substrate synthetisiert (siehe Kapitel 4.4.5-4.4.8). Bei diesen Verbindungen handelte es sich um N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) und N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin (**32**) sowie um N,N-Di-[methyl- ^{13}C]-anilin (**33**) und N-Ethyl-N-[methyl- ^{13}C]-anilin (**34**). Diese markierten Substanzen wurden mit *Bacillus megaterium* inkubiert, zeitgleich zur Substratzugabe erfolgte auch die Cysteaminzugabe. Durch die mikrobielle N-Demethylierung bildete sich nun entsprechend markierter Formaldehyd, der dann vom zugefügten Cysteamin abgefangen und zu markiertem Thiazolidin reagierte. Diese Deuterium- oder ^{13}C -markierten Thiazolidine wurden extrahiert und mittels GC-MS analysiert. Anhand der Fragmentierungsmuster wurde untersucht, ob das entsprechend markierte Thiazolidin entstanden war.

In Abb. 3-7 ist schematisch der theoretische Wege der N-Demethylierung der isotopenmarkierten Verbindung N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) dargestellt.

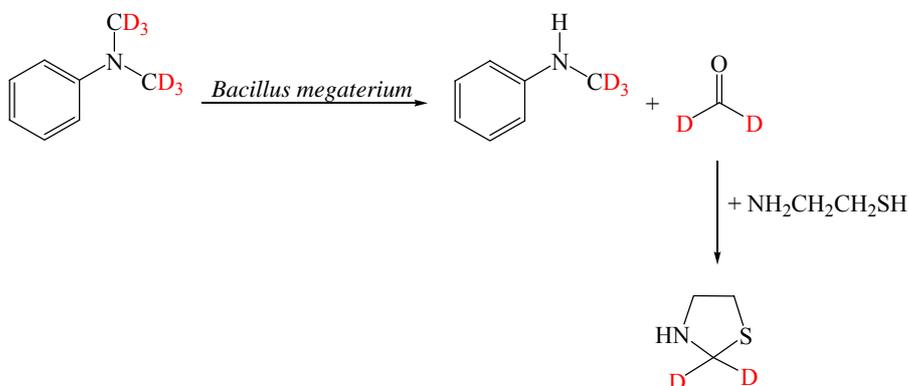


Abb. 3-7: N-Demethylierung von N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) durch *Bacillus megaterium*, gefolgt von einem Abfangen des markierten Formaldehyds durch zugesetztes Cysteamin.

N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) sollte theoretisch genauso wie das unmarkierte N,N-Dimethylanilin (**2**) N-demethyliert werden. Im Gegensatz zur unmarkierten Verbindung wurde beim Deutero-markierten N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) die Bildung eines Di-Deutero-Formaldehyds erwartet (Guengerich 2001). Die Reaktion dieses markierten Formaldehyds sollte nun in einem Deutero-markierten Thiazolidin resultieren, was anhand der Information aus den Massenspektren abgesichert werden sollte. Das zu erwartende Deutero-markierte Thiazolidin sollte einen um 2 Masseinheiten schwereren Molekülpeak aufweisen.

In Abb. 3-8 ist schematisch der theoretische Wege der N-Demethylierung der isotopenmarkierten Verbindung N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) dargestellt. Für diesen Typ von markierter Verbindung wurde ein ¹³C-markierter Formaldehyd erwartet, hervorgegangen aus der Abspaltung einer ¹³C-markierten N-Methylgruppe. Das durch Reaktion mit Cysteamin entstandene ¹³C-markierte Thiazolidin sollte ebenso durch eine um 1 Masseinheit erhöhten Molekülpeak eindeutig identifiziert werden.

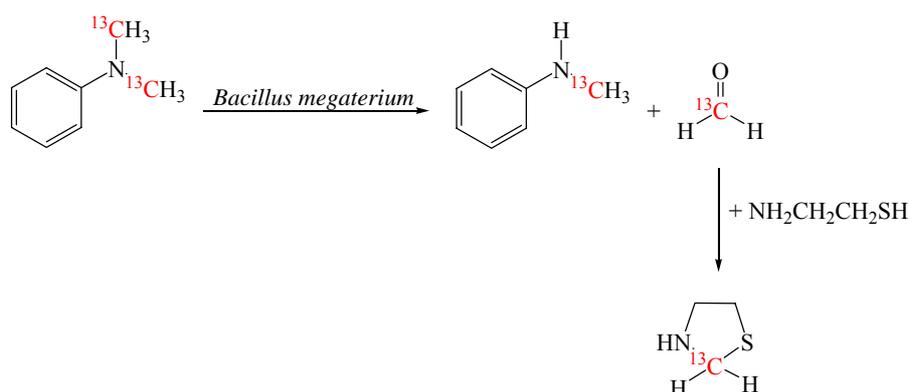


Abb. 3-8: N-Demethylierung von N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) durch *Bacillus megaterium*, gefolgt von einem Abfangen des markierten Formaldehyds durch zugesetztes Cysteamin.

Die Ergebnisse der Umsetzungen mit den markierten Substraten von N,N-Dimethylanilin (**31**, **33**) sind in Tabelle 3-8, die aus den Umsetzungen der markierten Verbindungen von N-Ethyl-N-methylanilin (**32**, **34**) erhaltenen Resultate finden sich in Tab. 3-9. Anhand der Massenspektren ist zu erkennen, dass der detektierte Formaldehyd tatsächlich aus den abgespaltenen Methylgruppen resultiert.

Aus den in Tabelle 3-8 zusammengefassten Ergebnissen erkennt man die Massenzunahmen der markierten Substrate im Vergleich zum unmarkierten Substrat N,N-Dimethylanilin (**2**). N,N-Di-(trideutero-methyl)-anilin (**31**) hat eine Massenzunahme von 6 Masseinheiten, was anhand eines Molekülpeaks von 127 Masseinheiten ersichtlich ist. N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) dagegen sollte nur eine Zunahme um 2 Masseinheiten verzeichnen, was anhand des Molekülpeaks von 123 bestätigt wurde. Die Inkubation dieser beiden Substrate führte zu N-Demethylierungsprodukten und zu den markierten Formaldehyd-Molekülen.

Tab. 3-8: Fragmentierungsmuster der Substrate N,N-Dimethylanilin (**2**), N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) sowie N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) und die daraus resultierenden Produkte der Formaldehyd-Analytik

Verbindungen	Retentionszeit (min)	m/z (relative Intensität)
N,N-Dimethylanilin (2)	18.91	121 (76), 120 (100), 105 (13), 104 (14), 77 (20)
N-Methylanilin	24.06	107 (80), 106 (100), 79 (14), 77 (22)
Thiazolidin	16.99	89 (100), 88 (40), 60 (13), 59 (16), 45 (12), 43 (45), 42 (25)
N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (31)	18.95	127 (71), 126 (15), 125 (100), 107 (12), 105 (9), 77(10)
N-(trideuteromethyl)-anilin	24.05	110 (83), 109 (18), 108 (100), 81 (8), 77 (12)
(2,2-dideutero)-Thiazolidin	18.95	91 (100), 90 (15), 89 (16), 60 (11), 59 (13), 45 (59), 44 (22)
N,N-Di-[methyl- ¹³ C]-anilin (33)	18.90	123 (74), 122 (100), 106 (13), 105 (16), 77 (15)
N-[methyl- ¹³ C]-anilin	24.10	108 (79), 107 (100), 80 (8), 78 (10), 77 (19)
Thiazolidine-2- ¹³ C	16.99	90 (100), 89 (43), 61 (12), 60 (13), 59 (15), 45 (12), 44 (54), 43 (27)

Anhand der daraus gebildeten markierten Thiazolidine wurde die Herkunft des Formaldehyds aus den Methylgruppen bestätigt. Aus N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) entstand ein 2-fach Deutero-markiertes Thiazolidin; anhand des Massenspektrums im Vergleich zum unmarkierten Thiazolidin ist die Zunahme um zwei Masseinheiten auf 91 zu erkennen. Auch die Inkubation von N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) lieferte das gleiche Ergebnis. Durch die oxidative N-Demethylierung entstand daraus ein ¹³C-markiertes Formaldehyd, das von Cysteamin abgefangen wurde und damit zu Thiazolidin reagierte. Das Massenspektrum des markierten Thiazolidins ergab eine Massenzunahme von einer Masseneinheit gegenüber dem unmarkierten Thiazolidin. Auch aus den Fragmentierungsmustern der Substrate N-Ethyl-N-methylanilin (**1**), N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin (**32**) sowie N-Ethyl-N-[methyl-¹³C]-anilin (**34**) wurde eindeutig nachgewiesen, dass der nachgewiesene Formaldehyd aus der entsprechend markierten N-Methylgruppe resultiert (Tab. 3-9). Die entstandenen Thiazolidine, das Thiazolidin-

2-¹³C sowie das (2,2-dideutero)-Thiazolidin, wurden eindeutig anhand ihrer Massenfragmente identifiziert.

Tab. 3-9: Fragmentierungsmuster der Substrate N-Ethyl-N-methylanilin (**1**), N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin (**32**) sowie N-Ethyl-N-[methyl-¹³C]-anilin (**34**) und die daraus resultierenden Produkte der Formaldehyd-Analytik

Verbindungen		Retentionszeit (min)	m/z (relative Intensität)
N-Ethyl-N-methylanilin	(1)	20.49	135 (37), 121 (12), 120 (100), 105 (12), 104 (13), 77 (20)
N-Ethylanilin		24.24	121 (41), 107 (8), 106 (100), 77 (18)
Thiazolidin		16.99	89 (100), 88 (40), 60 (13), 59 (16), 45 (12), 43 (45), 42 (25)
N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin	(32)	20.48	138 (34), 124 (10), 123 (100), 105 (11), 104 (10), 77 (14)
N-Ethylanilin		24.24	121 (41), 107 (8), 106 (100), 77 (17)
(2,2-dideutero)-Thiazolidin		16.99	91 (100), 90 (15), 89 (17), 60 (11), 59 (14), 45 (56), 44 (22)
N-Ethyl-N-[methyl- ¹³ C]-anilin	(34)	20.49	136 (35), 122 (10), 121 (100), 105 (12), 104 (12), 77 (18)
N-Ethylanilin		24.24	121 (42), 107 (9), 106 (100), 77 (18)
Thiazolidine-2- ¹³ C		16.99	90 (100), 89 (43), 61 (11), 60 (14), 59 (15), 45 (12), 44 (54), 43 (27)

Durch die Inkubation von Isotopen-markierten Substraten wurde somit eindeutig nachgewiesen, dass die Methylgruppe als Formaldehyd abgespalten wird. Anhand der Massenspektren wurden die an den entsprechenden Stellen markierten Thiazolidine nachgewiesen und identifiziert.

3.6 Induktion und Inhibierung von Cytochrom P-450

Die von dem isolierten Bodenbakterium durchgeführten Biotransformationen von N,N-Dialkylarylaminen wurden in Kapitel 3.4 dargestellt und beschrieben. In weiteren Experimenten wurde versucht, Hinweise auf die Enzymsysteme zu erlangen, die für diese Reaktionen verantwortlich sein könnten. *Bacillus megaterium* enthält, wie in Kapitel 2.2.1.2 erläutert, mehrere CYP. Bedingt durch die mannigfaltigen Reaktionen, die durch CYP katalysiert werden (siehe Kapitel 2.2.1.3), lag die Vermutung nahe, dass auch die hier beobachteten Biotransformationen, wie die N-Dealkylierung und die aryli-sche Hydroxylierung, durch CYP katalysiert werden. Durch für CYP spezifische Induk-tions- und Inhibierungsversuche wurde überprüft, ob sich eine Beeinflussung der Bio-transformationsaktivität von *Bacillus megaterium* zeigt.

Für diese Umsetzungen wurde N,N-Diethylanilin (**3**) gewählt, da dieses als Substrat sowohl bei der N-Dealkylierung als auch bei der aromatischen Hydroxylierung vom isolierten Bodenbakterium am Besten akzeptiert und mit den höchsten Ausbeuten meta-bolisiert wurde. Die Umsetzungen wurden, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, durchge-führt.

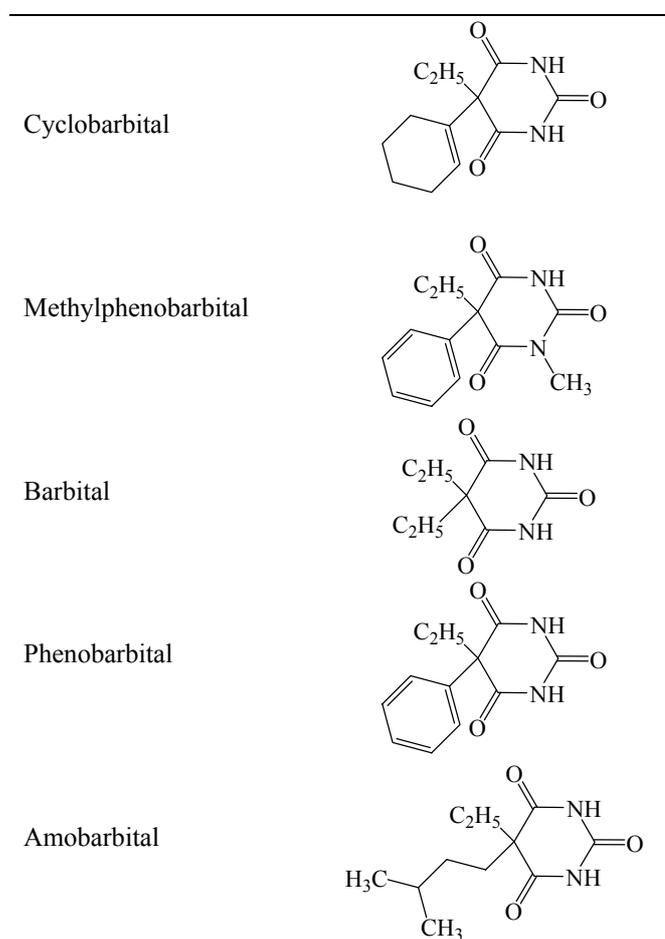
3.6.1 Induktion von Cytochrom-P-450 durch Barbiturate

Verschiedene Barbiturate wurden getestet, um einen Einfluss auf das Biotransforma-tionsverhalten von *Bacillus megaterium* festzustellen. Problematisch erwies sich hierbei die Tatsache, dass die Barbiturate dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen und somit die Untersuchungen auf die am Institut für Pharmazie der Universität Würzburg zur Verfügung stehenden Barbiturate begrenzt war. Einige literaturbekannte, wirkungsvolle Barbiturate für die Induktion von CYP konnten somit für Inkubationsversuche nicht verwendet werden (Kim und Fulco 1983). Geprüft wurden folgende Verbindungen: Cyclobarbitol-Calcium, Methylphenobarbital, Barbital, Barbital-Natrium, Amobarbital und Phenobarbital (Tab. 3-10).

Alle verwendeten Barbiturate wurden zwei Stunden vor Substratzugabe dem Bakterien-medium zugesetzt. Danach wurde für eine Dauer von 18 Stunden inkubiert; es folgten die Aufarbeitung und die Quantifizierung der gebildeten Metabolite. Das bakterielle

Wachstum wurde durch Messungen der optischen Dichte verfolgt, um eventuelle Beeinflussungen der Barbiturate auf den mikrobiellen Organismus zu erfassen. Zusätzlich wurden Kontrollversuche unternommen, d.h. es wurde nur Substrat zugesetzt, aber kein Barbiturat. Anhand der Mengen der Metabolite wurde ein eventuell vorhandener Einfluss der Barbiturate untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt und werden nachfolgend erläutert und diskutiert.

Tab. 3-10: Übersicht über die für die Inkubationsversuche verwendeten Barbiturate



Bei den Umsetzungen mit dem Barbiturat Cyclobarbital-Calcium (Abb. 3-9) war zu erkennen, dass das N-Deethylierungsprodukt N-Ethylanilin mit steigender Barbituratkonzentration zunahm. Allerdings waren hierfür Barbituratmengen von 200 μmol nötig, um eine höhere N-Deethylierung als bei der Kontrolle ohne Barbiturat zu erreichen.

Geringere Mengen an Barbiturat erniedrigten die N-Deethylierung. Auch die Hydroxylierung blieb bei niedrigeren Barbituratmengen unbeeinflusst.

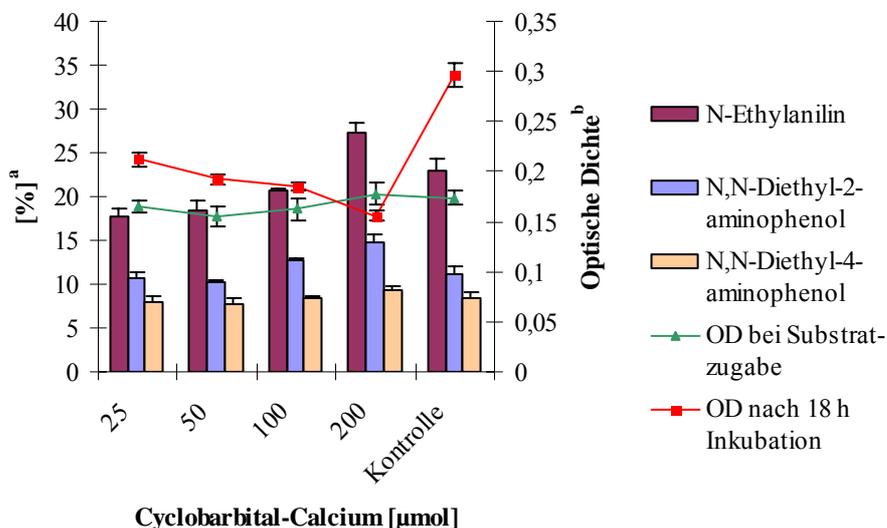


Abb. 3-9: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Cyclobarbital-Calcium (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Erst bei höheren Mengen wurde die Hydroxylierung aktiviert, allerdings stieg nur die Menge an gebildetem N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) an, während bei N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***) keine gesteigerte Bildung festzustellen war. Auffallend war, dass mit gesteigerter Barbituratmenge ein wachstumsinhibierender Einfluss zu verzeichnen war. Besonders bei einer Menge von 200 µmol an Cyclobarbital-Calcium war dies im Vergleich zur Kontrolle ohne Barbiturat deutlich zu erkennen.

Bei der Umsetzung mit Methylphenobarbital (Abb. 3-10) war erkennbar, dass hier keine Beeinflussung durch das Barbiturat im Biotransformationsverhalten zu verzeichnen war. Zwar waren bei einer Barbiturat-Menge von 50 µmol sowohl die N-Deethylierung als auch das 2-Hydroxylierungsprodukt (**3-2***) etwas erhöht, jedoch war dies nicht signifikant. Höhere Konzentrationen an Methylphenobarbital hatten keinen Effekt in Bezug auf das Biotransformationsverhalten bzw. auf die Mengen der gebildeten Biotransfor-

mationsprodukte. Methylphenobarbital zeigte jedoch im Gegensatz zu Cyclobarbitol-Calcium keinen inhibierenden Effekt auf das Wachstum. Im Gegenteil, mit steigender Barbiturat-Konzentration war ein leichter Anstieg der optischen Dichte zu beobachten.

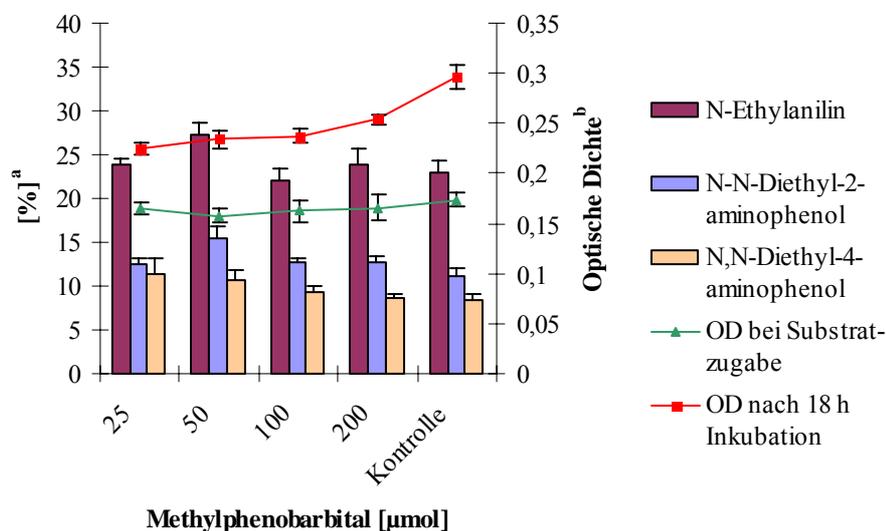


Abb. 3-10: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Methylphenobarbital (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Bei der Umsetzung mit Barbital (Abb. 3-11) zeigte sich, dass dieses Barbiturat keinen induzierenden Effekt auf das Biotransformationsverhalten aufwies. Im Vergleich zum Kontrollansatz war eine deutliche Reduzierung bei allen drei Metaboliten festzustellen. Interessant war die Tatsache, dass schon geringe Mengen an Barbital (25 µmol) für diese Abnahme an Metaboliten verantwortlich war. Größere Mengen an zugesetztem Barbital führten aber zu keiner weiteren Zurückdrängung der Umsetzungsprodukte. Es wurden bei allen Ansätzen mit Barbital annähernd die gleichen Mengen an N-Ethylanilin, N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) und N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***) gebildet.

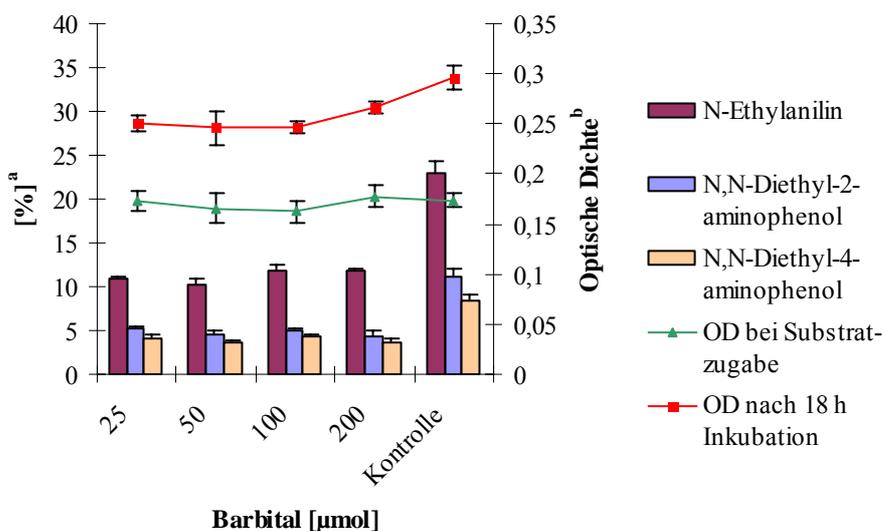


Abb. 3-11: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Barbitol (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detectierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Die Verwendung von Barbitol-Natrium zeigte, wie sein strukturelles Analogon Barbitol, keine Erhöhung der Biotransformationsaktivität von *Bacillus megaterium* (Abb. 3-12). Bei den Umsetzungen mit Barbitol-Natrium ergab sich keine Erhöhung der Umsetzungsprodukte. Vielmehr wurden sowohl das N-Deethylierungs- als auch die Hydroxylierungsprodukte (**3-2***; **3-4***) zurückgedrängt. Die Werte für das N-Deethylierungsprodukt lagen hier, wie auch bei Barbitol-Zugabe (Abb.3-11), zwischen 10 und 15 %. Vergleichbar sind auch die Werte für die beiden Hydroxylierungsprodukte, die bei Barbitol und Barbitol-Natrium bei maximal 5 % lagen. Eindeutig unterschiedlich war, dass Barbitol-Natrium, im Gegensatz zum Barbitol, in höheren Konzentrationen zu einer Verringerung des bakteriellen Wachstums führte. Offenbar hat die wesentlich bessere Wasserlöslichkeit des Natriumsalzes von Barbitol einen wachstumshemmenden Einfluss auf *Bacillus megaterium*.

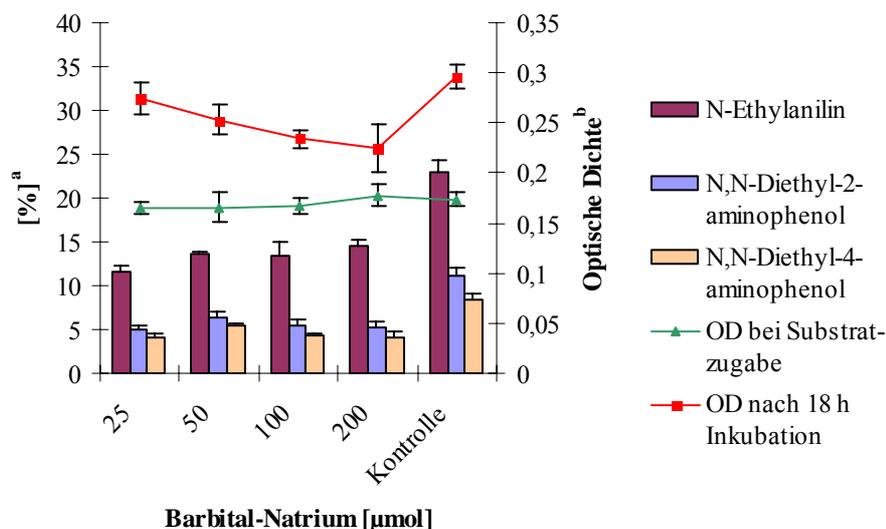


Abb. 3-12: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Barbitol-Natrium (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Das Barbiturat Amobarbital zeigte deutliche Einflüsse auf das Biotransformationsverhalten von *Bacillus megaterium* gegenüber dem Substrat N,N-Diethyl-anilin (**3**) (Abb. 3-13). Diese Effekte wurden ab Konzentrationen von 100 µmol Amobarbital sichtbar. Ab 100 µmol stieg die N-Deethylierung sprunghaft an und auch die Hydroxylierungsprodukte N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) sowie N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***) wurden im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen deutlich vermehrt gebildet. Bei 200 µmol entstanden alle drei Biotransformationsprodukte in signifikant höheren Anteilen, wobei N-Ethylanilin sowie N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) deutlich stärker gebildet wurden. Mit erhöhter Barbituratgabe zeigte sich auch eine Abnahme der optischen Dichte; im Vergleich zur Kontrolle allerdings nicht so deutlich wie bei den Umsetzungen mit Cyclobarbital-Calcium bzw. Barbitol-Natrium.

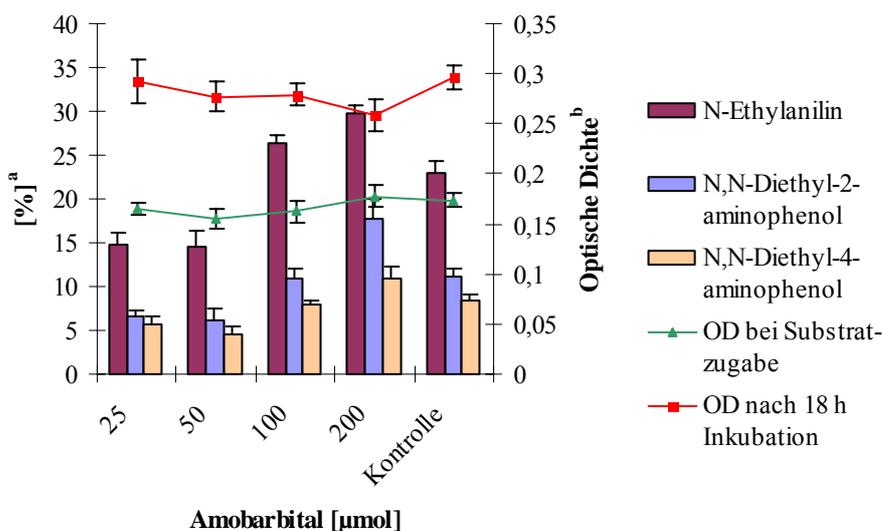


Abb. 3-13: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Amobarbital (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Die Studien mit dem bekannten CYP-Induktor Phenobarbital wurden mit Barbiturat-Mengen bis 750 μmol durchgeführt und zeigten mehrere interessante Effekte (Abb. 3-14). Auffällig war, dass sich durch Phenobarbital keine Beeinflussung der Hydroxylierungsaktivität zeigte; sogar bei sehr hohen Dosen (bis zu 750 μmol Phenobarbital) zeigte sich kein Effekt, so dass eine durchgehende Konstanz an diesen Produkt zu verzeichnen war und die Werte für N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) (max. 8 %) sowie N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***) (max. 5 %) deutlich unter denen der Kontrollansätze lag. Die N-Deethylierung dagegen wurde durch die Gabe von Phenobarbital stark beeinflusst. Bei niedrigen Mengen an Phenobarbital (bis 100 μmol) lagen die Mengen an N-Ethylanilin unter denen der Kontrollansätze; jedoch zeigte sich mit steigender Menge an Phenobarbital ein kontinuierliches Ansteigen der N-Deethylierungsaktivität. Dieser Effekt erreichte bei Mengen von 500 μmol an Phenobarbital sein Maximum und sank bei 750 μmol wieder leicht ab. Umsetzungen mit noch höheren Mengen an Phenobarbital wurden aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit nicht durchgeführt.

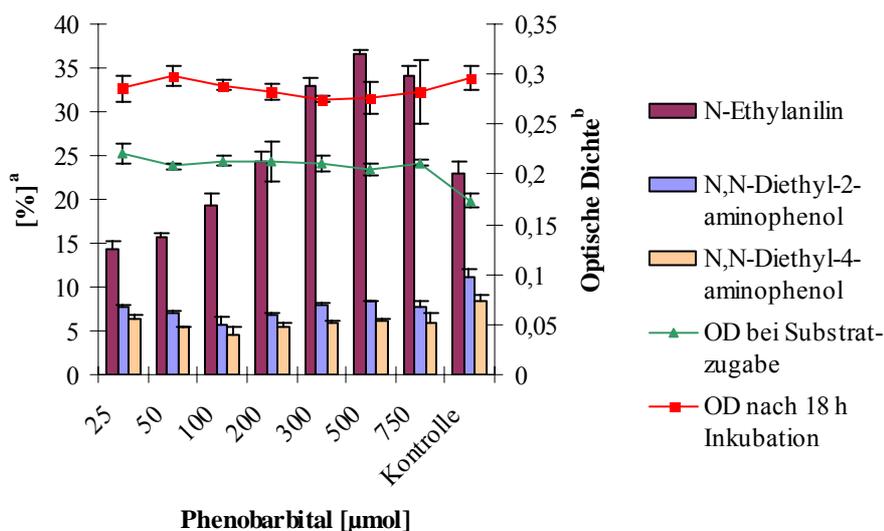


Abb. 3-14: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Phenobarbital (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Anhand der optischen Dichte wurde festgestellt, dass dieses Barbiturat keine signifikanten toxischen oder wachstumshemmenden Wirkungen gegenüber *Bacillus megaterium* aufweist; direkt nach Substratzugabe lag die optische Dichte sogar höher als in den Kontrollansätzen, so dass eine leichte wachstumsfördernde Wirkung resultierte (Abb. 3-14, grüne Linie). Auch die Werte der optischen Dichte am Ende der Inkubationsdauer lagen nahe bei denen der Kontrollansätze, so dass keine hemmenden Einflüsse von Phenobarbital ausgingen.

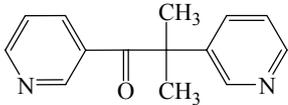
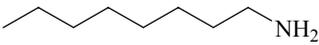
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich das Biotransformationsverhalten von *Bacillus megaterium* gegenüber dem Substrat N,N-Diethylanilin durch die Zugabe von Barbituraten zur Bakteriensuspension beeinflussen ließ. Es wurde gezeigt, dass sich sowohl das N-Demethylierungs- (durch die Barbiturate Cyclobarbitol-Calcium, Methylphenobarbital, Amobarbital und Phenobarbital) als auch das Hydroxylierungsverhalten (durch die Barbiturate Methylphenobarbital und Amobarbital) durch Barbituratzugabe positiv, d.h. im Sinne gesteigerter Anteile an Metaboliten beeinflussen ließen. Vor allem die starke Beeinflussung von Phenobarbital auf das N-Deethylierungsverhalten ist her-

vorzuheben. Bei 500 μmol an Phenobarbital wurden Mengen von annähernd 38 % an N-Ethylanilin gebildet. Die Induktion von P-450 BM-3 durch das Barbiturat Phenobarbital ist ein bekanntes Phänomen, und eine Phenobarbital-induzierte mRNA-Anhäufung das Ergebnis eines Anstiegs der Transkriptionsrate (Pike et al. 1985, Gonzalez 1989). Durch Zugabe von Phenobarbital in das Wachstumsmedium wurde eine ungefähr 28-fache Induktion von P-450 BM-3 bewirkt.

3.6.2 Inhibierung von Cytochrom-P450 durch spezifische Inhibitoren

Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren wurde untersucht, ob sich dadurch die Biotransformationsaktivität von *Bacillus megaterium* gegenüber N,N-Diethylanilin (**3**) beeinflussen lässt. Die Vorgehensweise der Umsetzungen ist im Experimenterteil (Kapitel 4.3.7) beschrieben und ähnelt den Umsetzungen mit Barbituratzusatz. Auch hier wurde zwei Stunden vor Substratzugabe der entsprechende Inhibitor zugesetzt. Ebenso wurde anhand der optischen Dichte das Wachstum der Bakterien verfolgt, um auszuschließen, dass der Inhibitor auch wachstumshemmende Effekte gegenüber den Bakterienzellen aufweist. Dies würde folglich auch zu einer verringerten Menge an Biotransformationsprodukten führen.

Tab. 3-11: Übersicht über die für die Inkubationsversuche verwendeten Inhibitoren

Metyrapon	
n-Octylamin	
Pyridin	
Imidazol	

Bei der Umsetzung mit Metyrapon als Inhibitor (Abb. 3-15) wurde bei allen drei Biotransformationsprodukten eine verringerte Entstehung beobachtet. Vor allem bei höheren Mengen an Metyrapon wurde eine starke Abnahme der Hydroxylierungsprodukte N,N-Diethyl-2-aminophenol (**3-2***) sowie N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***) festgestellt. Der Anteil an N-Ethylanilin blieb jedoch, auch bei höheren Konzentrationen an Metyrapon, annähernd konstant. Im Vergleich zu den Kontrollwerten war jedoch auch hier eine deutliche Verringerung festzustellen. Das bakterielle Wachstum wurde durch den Inhibitor nicht beeinflusst. Dadurch kann mit Sicherheit ausgesagt werden, dass die Inhibierung nicht durch eine Verringerung des Zellwachstums verursacht wurde. Der Inhibitor Metyrapon ist ein sehr oft verwendeter und sehr effektiver CYP-Inhibitor. Er bindet an lipophile Stellen des Proteins und gleichzeitig an das Häm-Eisen (Nagamine et al. 1997).

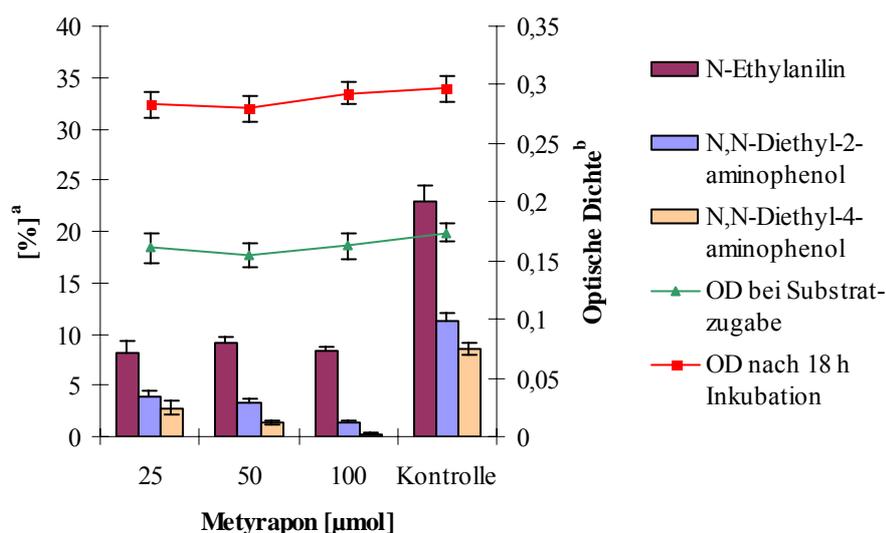


Abb. 3-15: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Metyrapon (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

n-Octylamin als Inhibitor dagegen wies eine nicht so starke Wirkung wie Metyrapon auf (Abb. 3-16). Der Amin gilt auch als starker Inhibitor von CYP, jedoch wirkt es erst nach Oxidation zum entsprechenden N-Oxid, das dann an das Häm-Eisen koordiniert

(Grothusen et al. 1997). Mit steigender n-Octylamin-Konzentration war eine Abnahme der Biotransformationsprodukte festzustellen. Betroffen waren hier sowohl das N-Deethylierungs- als auch die Hydroxylierungsprodukte (**3-2***; **3-4***). Wurden in den Versuchen allerdings höhere Werte als 100 μmol eingesetzt, dann waren deutliche toxische Effekte gegenüber den Bakterien feststellbar. Die optische Dichte ging hier wesentlich zurück, und auch das Zusammenklumpen von Zellmasse war ein deutliches Zeichen für ein Absterben der Mikroorganismen.

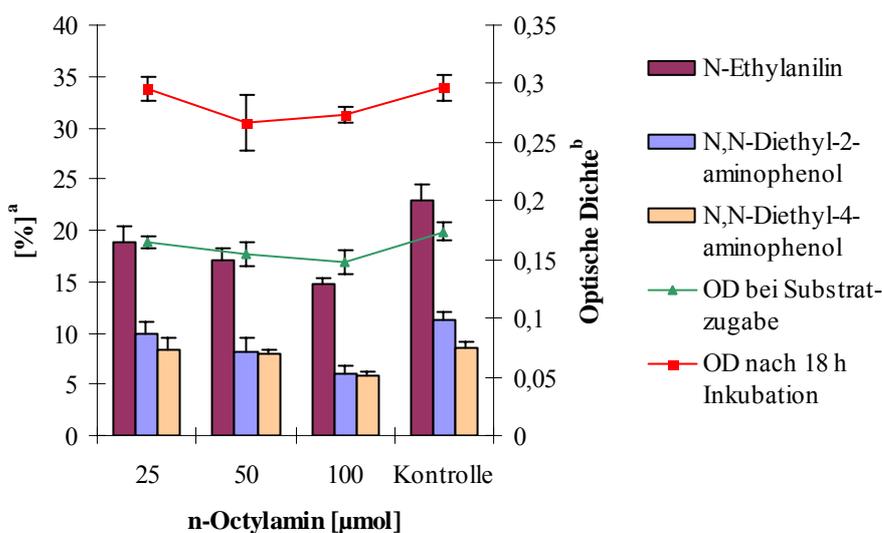


Abb. 3-16: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* unter Zugabe von n-Octylamin (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detektierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Pyridin ist in seiner Funktionsweise dem Metyrapon ähnlich, indem es an lipophile Stellen des Proteins und des Häm-Eisens bindet (Gaudineau und Auclai 2004). Wie aus Abb. 3-17 hervorgeht, war im Vergleich zur Kontrolle war zwar eine deutliche Inhibierung festzustellen, allerdings zeigte sich, dass eine Erhöhung der Inhibitor-Menge mit einem Ansteigen der Biotransformationsprodukte verbunden war. Vor allem die Menge am N-Deethylierungsprodukt N-Ethylanilin stieg deutlich mit höheren Pyridin-Mengen an. Bei näherer Betrachtung der beiden Hydroxylierungsprodukte fiel auf, dass bei Pyridinzugabe das Hydroxylierungsverhältnis verändert wurde. Während sonst bei allen bisher durchgeführten Umsetzungen das 2-Hydroxylierungsprodukt (**3-2***) deutlich fa-

vorisiert gebildet wurde, war hier ein leichter Überschuss an N,N-Diethyl-4-aminophenols (**3-2***) zu erkennen. Pyridin unterdrückt offenbar das Enzymsystem für die 2-Hydroxylierung (**3-2***) stärker als das für die 4-Hydroxylierung (**3-4***). Im Vergleich zu den Kontrollansätzen zeigte sich auch eine Beeinflussung des Wachstums.

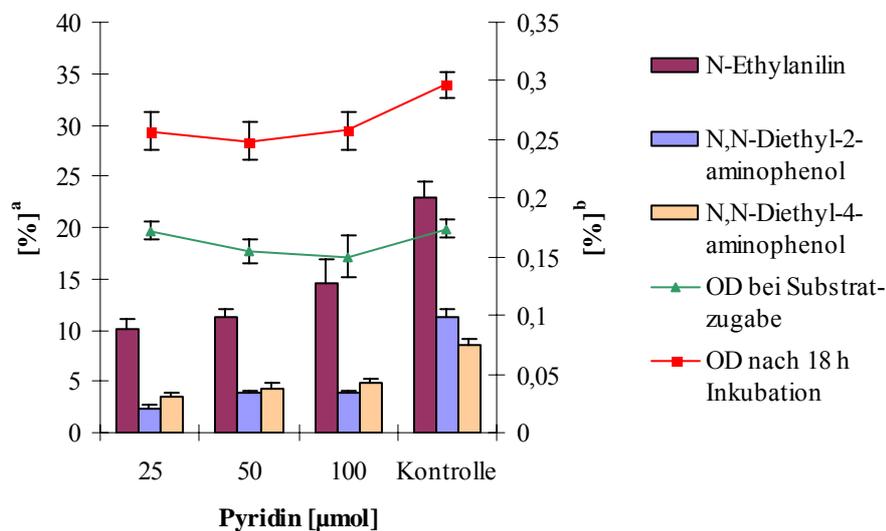


Abb. 3-17: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Pyridin (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detectierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Imidazol bindet ebenso an lipophile Proteinbereiche (Ballard et al. 1988). Schon bei einer Menge von 25 µmol an Imidazol wurde eine deutliche Verringerung an Biotransformationsprodukten festgestellt. Eine weitere Erhöhung der Inhibitormenge führte zu keiner weiteren Verringerung der Metabolite. Die höheren Imidazolgaben resultieren jedoch in einer leichten Erniedrigung der Zellzahl. Die Umsetzung mit Imidazol als Inhibitor zeigte auch deutliche Effekte in Bezug auf die Mengen der Biotransformationsprodukte (Abb. 3-18).

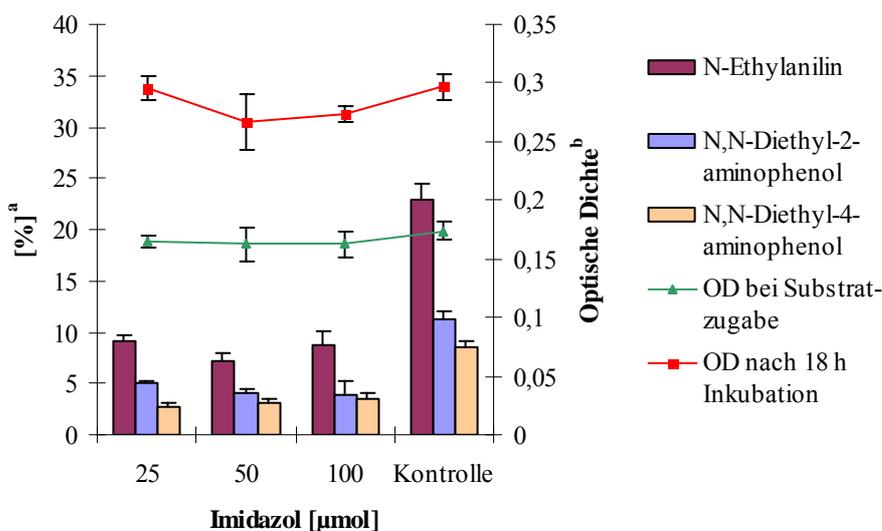


Abb. 3-18: Umsetzung von N,N-Diethylanilin (**3**) durch *Bacillus megaterium* bei Zugabe von Imidazol (^agebildete Biotransformationsprodukte, berechnet als GC-detectierbare Mengen; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sich das Biotransformationsverhalten von *Bacillus megaterium* gegenüber N,N-Diethylanilin (**3**) durch Zusatz der Verbindungen Metyrapon, n-Octylamin, Pyridin sowie Imidazol beeinflussen ließ. Da die Konzentrationen so gewählt wurden, dass keine toxischen und wachstumshemmenden Einflüsse feststellbar waren, kann von inhibierenden Effekten dieser Substanzen auf das mikrobielle Enzymsystem ausgegangen werden. Aufgrund der Tatsache, dass *Bacillus megaterium* mehrere CYP aufweist (vgl. Kapitel 2.2.1.2), lag der Schluss nahe, durch Induktoren bzw. Repressoren die Hydroxylierungs- und N-Dealkylierungsaktivität des Bodeisolates zu untersuchen. Die am besten untersuchten Substrate für CYP aus *Bacillus megaterium* stellen Fettsäuren als auch Steroide dar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Biotransformation von N-Alkyl- als auch N,N-Dialkylarylaminen stellen keine Standard-Substrate für *Bacillus megaterium* dar. Berg und Rafter (1981) haben eine 4-Hydroxylierungsaktivität von CYP-450meg aus *B. megaterium* ATCC 13368 gegenüber Anilin (**9**) nachgewiesen. Da in den Untersuchungen keine Biotransformati-

onsprodukte von Anilin (**9**) nachgewiesen wurden (vgl. Kapitel 3.4), wurde ausgeschlossen, dass CYP-450_{meg} für die beobachteten Hydroxylierungsaktivität verantwortlich ist. In mit Lebermikrosomen durchgeführten Inkuabationsversuchen mit N,N-Dialkylarylaminen (**1-3**) wurden dieselben Biotransformationsprodukte wie bei unseren Studien gefunden (vgl. Kapitel 2.2.1.3). Im Säugerorganismus besitzt die Leber den höchsten Gehalt und die höchste Aktivität an CYP (Villeneuve und Pichette 2004). Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass die Hydroxylierung und N-Dealkylierung von N,N-Dialkylarylaminen von CYP aus *Bacillus megaterium* durchgeführt wird. Da sich CYP durch Barbiturate induzieren lässt (Pike et al. 1985, Gonzalez 1989), und sich bei Umsetzungen von N,N-Diethylanilin mit gleichzeitiger Barbituratgabe eine gesteigerte Hydroxylierungs- als auch N-Dealkylierungsaktivität ergab, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der von *B. megaterium* durchgeführten Biotransformationen auch um CYP-abhängige Reaktionen handelt. Durch Inhibierungsversuche mit teilweise sehr spezifischen und potenten CYP-Inhibitoren wurde diese These untermauert.

3.7 N-Demethylierung von N-Methyl-methylantranilat

3.7.1 Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat mit *Bacillus megaterium*

Aus dem erweiterten Substratscreening war hervorgegangen, dass *Bacillus megaterium* die Fähigkeit besitzt, das sekundäre aromatische Amin N-Methyl-methylantranilat (**30**) zu N-demethylieren (Abb. 3-19). Aufgrund dieser Fähigkeit zur biotechnologischen Herstellung von Methylantranilat, ein Abgleich mit schon bekannten Methoden zur Herstellung von natürlichem MA aus der Literatur ist vorab bereits erfolgt (siehe Kapitel 2.3.3.2), wurden mit diesem Biotransformationsprozess verschiedene Variationen durchgeführt. Hauptaugenmerk wurde auf eine im Vergleich zu Literaturdaten erhöhte Ausbeute gelegt.

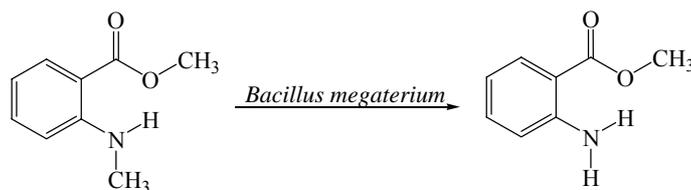


Abb. 3-19: N-Demethylierung von N-Methyl-methylantranilat (NMMA) (**30**) zu Methylantranilat (MA) durch *Bacillus megaterium*

3.7.2 Optimierung der Umsetzung zur Erhöhung der Ausbeute an Methylantranilat

3.7.2.1 Substratkonzentration und Inkubationsdauer

Zur Untersuchung der Akzeptanz von *Bacillus megaterium* gegenüber verschiedenen Mengen an NMMA wurde eine Substratkonzentrationsstudie in Schüttelkultur (75 mL) durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien bis zu einer definierten optischen Dichte herangezüchtet, dann erfolgte die Zugabe einer bestimmten Menge an Substrat. Nach beendeter Inkubation wurden die Metabolite extrahiert und mittels GC-MS analysiert. In nachfolgender Abbildung 3-20 sind die Ergebnisse dieser Studie zu sehen.

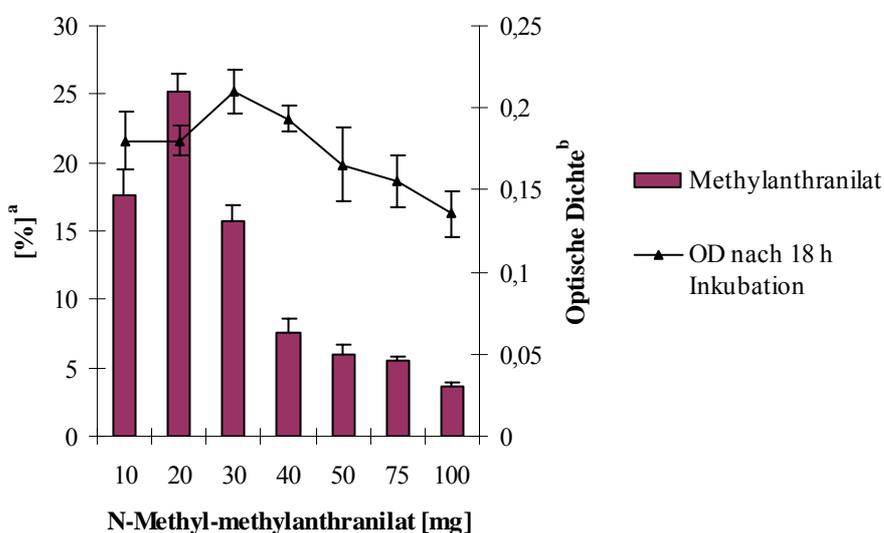


Abb. 3-20: Substratkonzentrationsstudie zur Umsetzung von NMMA (**30**) zu MA durch *B. megaterium* (^agebildetes Methylantranilat, quantifiziert durch eine Kalibriergerade; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm)

Das Maximum der Ausbeute an MA war bei einer Substratmenge von 20 mg zu erzielen. Bei dieser Menge wurde eine Ausbeute an MA von 25 % erreicht. Je höher die eingesetzte Substratmenge gewählt wurde, desto niedrigere Ausbeuten erzielte man. Eine Betrachtung der optischen Dichte erweckte den Eindruck, dass entweder NMMA (**30**) oder MA einen inhibierenden Einfluß auf das Wachstum der bakteriellen Zellen haben. Je höher die Menge an NMMA (**30**) im Medium war, desto geringer war die optische Dichte am Ende der Inkubationszeit. Das Absinken der optischen Dichte kann auch im Zusammenhang mit geringeren Ausbeuten bei höheren Substratkonzentrationen stehen. Im Vergleich zum Wachstum der Bakterien in der Kontrolle war zu erkennen, dass durch das Substrat oder das Produkt ein deutliche Erniedrigung des Wachstums festzustellen war. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer bei diesen Versuchen führte nicht zu einer Erhöhung der Ausbeuten. Vielmehr sank die optische Dichte, so dass durch das Absterben der Mikroorganismen die biokatalytische Aktivität nicht völlig zur Verfügung stand. Dieses Absterben der Bakterien bestätigte die auch schon in anderen mit NMMA (**30**) durchgeführten Versuchen festgestellte antimikrobielle Eigenschaft (Page und Farbood 1989).

3.7.2.2 Inkubationstemperatur

Die Abhängigkeit der N-Demethylierungsaktivität von *Bacillus megaterium* gegenüber NMMA (**30**) wurde in einer Inkubationstemperaturstudie überprüft. Hierbei wurden bei Temperaturen zwischen 24 °C und 45 °C Inkubationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 3-20 grafisch dargestellt. Temperaturen zwischen 28 °C und 31 °C erwiesen sich optimal zur Umsetzung von NMMA (**30**) durch *Bacillus megaterium*. Mit steigender Temperatur verringerte sich sowohl die Ausbeute an MA als auch die Anzahl der Bakterien. Ab 40 °C sank die Anzahl der Zellen deutlich ab, was sich auch in einer wesentlich geringeren Ausbeute bemerkbar machte. Bei 37 °C war wiederum ein geringer Anstieg sowohl in der Zellzahl als auch in der Ausbeute an MA zu verzeichnen. Eine Verringerung der Temperatur bis 24 °C führte ebenso zu einem Absinken der Ausbeute als auch der Zellzahl.

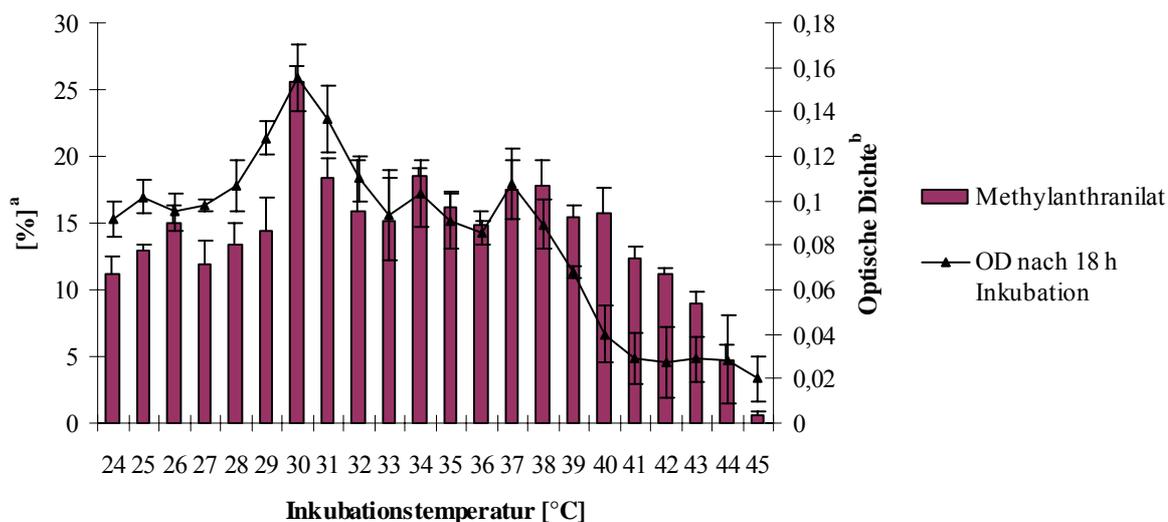


Abb. 3-21: Ergebnisse der Inkubationstemperatur-Studie und die damit verbundenen Änderungen der Ausbeute an MA (^agebildetes Methylanthranilat, quantifiziert durch eine Kalibriergerade; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm; zugesetzte Substratmenge: 20 mg NMMA)

Bei diesen Umsetzungen machte sich auch die Mesophilie von *Bacillus megaterium* deutlich bemerkbar (vgl. Kapitel 2.4.1). Aus Abbildung 3-21 wird deutlich sichtbar, dass um den Temperaturbereich von 30 °C sowohl die katalytische Aktivität als auch das Wachstum ein Optimum bildeten. Besonders ab einer Temperatur von 40 °C wurden ein starker Rückgang des Wachstums sowie eine damit verbundene Verringerung der Ausbeute an MA festgestellt.

3.7.2.3 pH-Wert des Mediums

Um die Beeinflussung der katalytischen Aktivität von *Bacillus megaterium* gegenüber NMMA zu überprüfen, wurde eine pH-Wert-Studie durchgeführt. Dabei wurde der pH-Wert jeweils auf Werte zwischen pH 2 bis pH 13 in Ein-Stufen-Schritten eingestellt. Nach Vorinkubation von 18 Stunden wurde das Substrat zugesetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb 3-22 grafisch dargestellt.

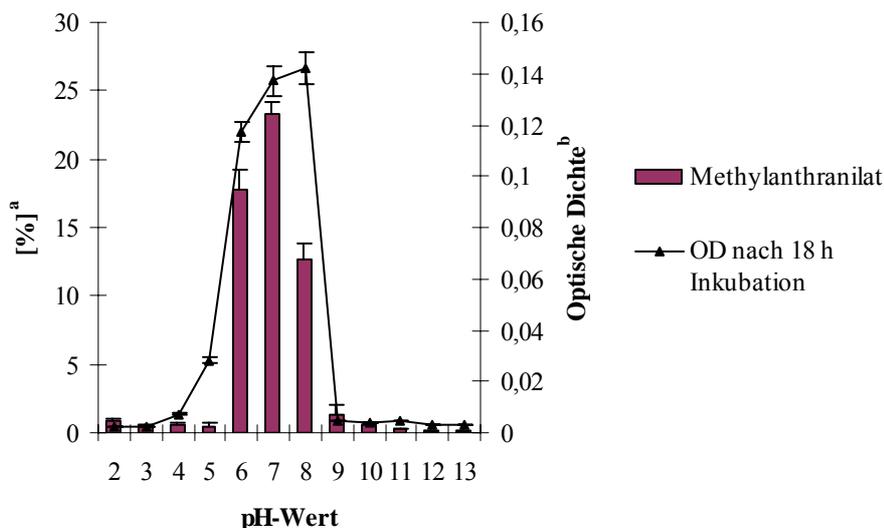


Abb. 3-22: Abhängigkeit der N-Demethylierung von NMMA (**30**) vom pH-Wert des Inkubationsmediums (^agebildetes Methylantranilat, quantifiziert durch eine Kalibriergerade; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm; zugesetzte Substratmenge: 20 mg NMMA)

In Abb. 3-22 sieht man deutlich, dass die N-Demethylierung von NMMA (**30**) durch *Bacillus megaterium* vom pH-Wert des Inkubationsmediums abhängig ist. Aber nicht nur die Ausbeute, sondern auch das Wachstum der Bakterien war mit dem pH-Wert verknüpft. Ein bakterielles Wachstum war nur in einem pH-Bereich zwischen pH 5 und pH 8 zu erkennen. Darüber und darunter war kein Wachstum feststellbar. Hohes Wachstum war bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 zu verzeichnen. Bei pH 8 war das Wachstum am höchsten, die Ausbeute an MA sank dafür aber rapide ab. Die besten Umsetzungsergebnisse wurden bei einem neutralen pH-Wert erreicht (23 % an MA). Dies entspricht in etwa der Ausbeute bei den Umsetzungen im Standardansatz. Die Reaktionsbedingungen brauchten daher in Bezug auf den pH-Wert nicht variiert werden, da sich der pH-Wert des Standardmediums (pH 6,8) als optimal erwiesen hat.

3.7.2.4 Einfluss des Inkubationsmediums

Viele mikrobielle Biotransformationen zeigen unterschiedliche Reaktionsverläufe, wenn das Wachstumsmedium variiert wird. Aus diesem Grund wurde für die Biotransformation von NMMA (**30**) zu MA durch *Bacillus megaterium* eine Medium-Variationsstudie durchgeführt. Hierbei wurden Wachstums-Medien gewählt, die speziell für *Bacillus megaterium* zusammengesetzt oder aber allgemein für die Species *Bacillus* geeignet sind (vgl. Kapitel 4.3.4). Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 3-23 zu sehen. In dieser Abbildung ist gut zu erkennen, dass die N-Demethylierung nicht nur von der Zellzahl, sondern auch von der Zusammensetzung des Medium abhängig war.

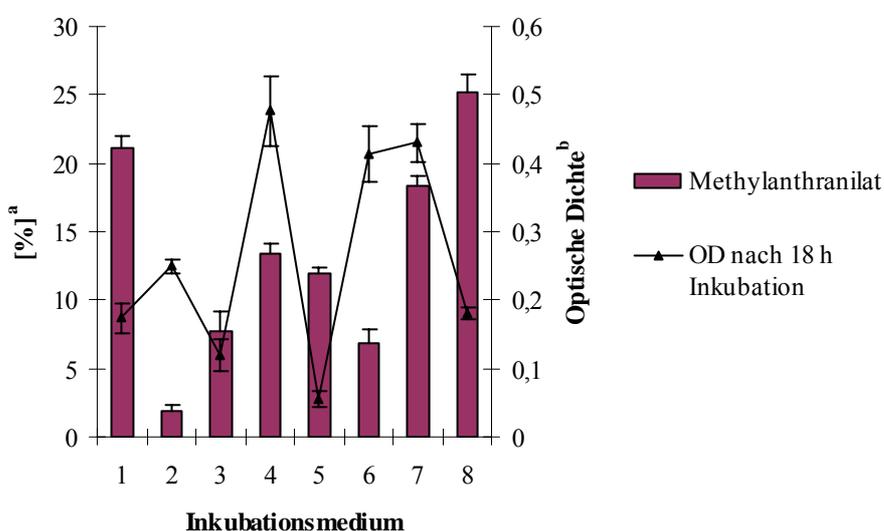


Abb. 3-23: Abhängigkeit der N-Demethylierung von NMMA vom Inkubationsmedium (1=Bacillus Broth ¼ Strength; 2=Beef Extract with NaCl; 3=Di-aminopimelic Acid Medium; 4=Bacillus Medium 1; 5=Bacillus Medium 2; 6=Bacillus Medium 3; 7=DSMZ-Medium Nr.1; 8=Standardinkubationsmedium) (^agebildetes Methylantranilat, quantifiziert durch eine Kalibriergerade; ^boptische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm; zugesetzte Substratmenge: 20 mg NMMA (**30**))

Auffallend waren vor allem die enormen Schwankungen bei der optischen Dichte. Hier fielen vor allem „Bacillus Medium 1“, „Bacillus Medium 3“ sowie das „DSMZ-Medium“ auf. Diese Medien müssen aufgrund ihrer Nährstoff-Zusammensetzung essentielle Substanzen enthalten, die für ein schnelles Wachstum und somit eine rasche Vermehrung verantwortlich sind. Dagegen zeigte das „Diaminopimelic Acid Medium“ sowie das „Bacillus Medium 2“ anhand der optischen Dichte, dass hier für das Wachstum des isolierten Bodenkeims wohl essentielle Spurenelemente fehlen. Bei dem angebotenen „Bacillus Medium 2“ war sogar ein Absterben zu verzeichnen.

Ein Vergleich der Ausbeuten an MA führt zur interessanten Feststellung, dass es nicht unbedingt einer großen Zellzahl bedurfte, um eine hohe Ausbeute an MA zu erzielen. Verwendete man als Medium „Bacillus Broth ¼ Strength“, so sah man, dass sich auch mit einer geringen Zellzahl eine sehr hohe Ausbeute erzielen ließ. Im Gegensatz dazu stand das „Bacillus Medium 1“, mit dem *Bacillus megaterium* zwar sehr gut wuchs, aber sich dennoch nur eine Ausbeute an MA von knapp 13 % erreichen ließ. Das Medium „Bacillus Broth ¼ Strength“ wies allerdings den Nachteil auf, dass sich die Phasentrennung während der Extraktion mit Diethylether als sehr schwierig und langwierig gestaltete. Außerdem neigte es sehr zum Schäumen, so dass es für den Einsatz in Bioreaktoren ohne den Einsatz von Anti-Schaummitteln nicht geeignet ist.

3.7.3 Antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *B. megaterium*

Da bei der Substratkonzentrationsstudie gezeigt wurde, dass offenbar toxische Einflüsse von NMMA (**30**) und MA gegenüber *Bacillus megaterium* vorhanden sind, wurde durch verschiedene Tests nach diesen eventuell vorhandenen Eigenschaften gesucht. Hierbei kamen Inhibierungsversuche im Flüssigmedium, aber auch sogenannte Hemmhof-Versuche zum Einsatz.

3.7.3.1 Inhibierungsversuche im Flüssigmedium

Bei den Inhibierungsversuchen im Flüssigmedium wurden verschiedenen Mengen an NMMA und MA zum Standardinkubationsmedium (75 mL) hinzugegeben. Als nächstes wurden 1000 μL einer *Bacillus megaterium*-Übernachtskultur hinzugefügt und inkubiert. Nach 24 h Inkubationsdauer wurde die optische Dichte als ein Maß für die Zellzahl gemessen. Die Ergebnisse sind, im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne NMMA (**30**) oder MA, in Abb. 3-24 grafisch dargestellt.

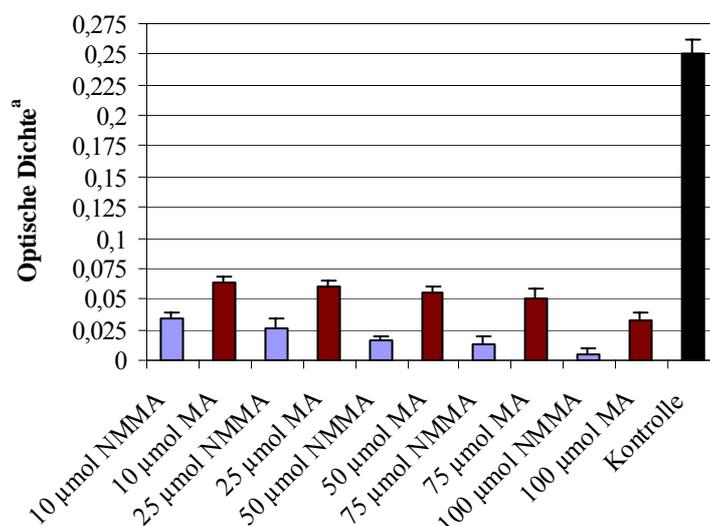


Abb. 3-24: Inhibierung des Wachstums von *B. megaterium* durch NMMA (**30**) bzw. MA im Flüssigmedium

Aus der Grafik lassen sich die antimikrobiellen Eigenschaften von NMMA (**30**) und MA gut erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle war eine erhebliche Verringerung des Wachstums festzustellen. Je höher die Konzentration an NMMA (**30**) bzw. MA war, desto geringer wurde die optische Dichte und somit die Zellzahl. Im direkten Vergleich war allerdings das Substrat NMMA (**30**) wesentlich toxischer als das Produkt. MA dagegen zeigte auch in höheren Konzentrationen einen nicht so stark inhibierenden Effekt, wie dies bei den hohen Konzentrationen an NMMA (**30**) der Fall war.

Für Umsetzungen sollte also gelten, dass man die Anfangskonzentration an Substrat möglichst gering halten muss, um nicht ein Absterben des Biokatalysators zu verursachen.

3.7.3.2 Inhibierungsversuche auf Agarplatten

Als weiterer Test zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität kam der sogenannte Hemmhof-Test zur Anwendung. Anhand von Inhibierungszonen, also Zonen ohne sichtbares Wachstum, wird auf antimikrobielle Aktivität geschlossen. Durch Messen des Durchmessers dieser Inhibierungszonen erhält man zusätzlich eine halbquantitative Aussage über die Stärke der Hemmung. Verschiedene Mengen an NMMA (**30**) bzw. MA wurden auf standardisierte 6 mm große Papierblättchen pipettiert und auf vorher mit *Bacillus megaterium* ausplattierten Agarplatten gelegt und inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-25 zu sehen. Auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass auch mit dieser Methode sowohl die antimikrobielle Eigenschaft von NMMA (**30**) als auch von MA nachgewiesen wurde.

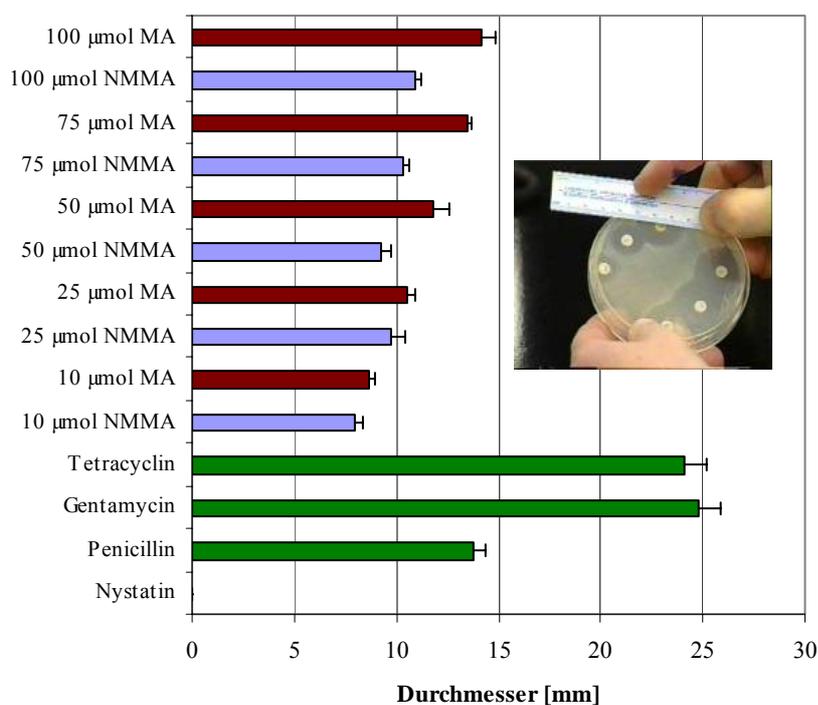


Abb. 3-25: Inhibierung des Wachstums von *B. megaterium* durch NMMA (**30**) bzw. MA auf Agarplatten und Messen des Hemmhofes als Zeichen der Stärke des Inhibitors

Es zeigten sich nach Inkubation bei 30 °C deutlich sichtbare Hemmhöfe, während um diese Hemmhöfe herum Wachstum von *Bacillus megaterium* festzustellen war. Betracht-

tet man die Durchmesser der Hemmhöfe im Detail, so fällt auf, dass die Ergebnisse im Vergleich zu den Inhibierungsversuchen im Flüssigmedium genau umgekehrt zu interpretieren sind. Auf der Agarplatte war nämlich nicht NMMA (30), sondern MA die Substanz mit der größeren antimikrobiellen Aktivität. Da aber bei diesem Test der antimikrobiellen Aktivität andere Versuchsbedingungen herrschen, muss man sich hier mit den unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der beiden Verbindungen auseinandersetzen.

Bei der Entstehung der Hemmhöfe spielen hauptsächlich Diffusionsvorgänge der zu testenden Substanzen durch Agar eine Rolle. Hierbei diffundieren polarere Verbindungen wesentlich einfacher durch die polare und wasserhaltige Matrix des Agars. Da bei MA durch das Fehlen einer Methylgruppe eine höhere Polarität vorhanden ist, kann dadurch eine Diffusion durch den Agar erleichtert sein und folglich eine stärkere antimikrobielle Wirkung hervorrufen.

3.7.4 Immobilisierung von *Bacillus megaterium* in Natrium-Alginatkapseln

Aufgrund der in Kapitel 3.7.3 festgestellten antimikrobiellen Eigenschaften von MA und NMMA (30) wurde versucht, die bakteriellen Zellen in Natrium-Alginatkapseln zu immobilisieren. Dadurch sollte eine erhöhte Stabilität der Zellen erreicht werden und die toxischen Wirkungen von NMMA (30) und MA gegenüber *Bacillus megaterium* wesentlich reduziert werden. Die Vorgehensweise der Immobilisierung und Umsetzung ist im Experimenterteil unter 4.3.10 beschreiben. Die immobilisierten Bakterienzellen wurden zur N-Demethylierung verwendet. In Abb. 3-26 finden sich Bilder dieser Alginat-Kügelchen.



Abb. 3-26: Immobilisierte Bakterienzellen von *Bacillus megaterium* in Natrium-Alginatkapseln

Diese Kügelchen mit dem eingeschlossen Biokatalysator wurden für die N-De-methylierung von NMMA (**30**) eingesetzt. Hierzu wurden 20 μL NMMA (**30**) zu der Kügelchen-Medium-Suspension gegeben und bei 120 rpm und 30 °C inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Ansätze aufgearbeitet. Als Ergebnis wurde eine Ausbeute von knapp 8 % an MA sowohl bei dem 24 h als auch bei dem 48 h-Ansatz festgestellt. Durch die Immobilisierung kam das Substrat bei diesen Umsetzungen offenbar nicht so gut in Kontakt mit dem mikrobiellen Enzymsystem. Variationen der Immobilisierung wurden aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

3.7.5 Up-scaling im Bioreaktor

Aufgrund bei den Schüttelkultur-Umsetzungen mit NMMA (**30**) gewonnen Kenntnissen wurden Versuche in einem Bioreaktor gestartet. Die Vergrößerung der Versuchsansätze ist in der Biotechnologie eine große Herausforderung, da eine direkte Proportionalität der Ansätze aufgrund wesentlich komplexerer Bedingungen im Fermenter selten einfach durchführbar ist.

Bei den Umsetzungen wurde eine Ansatzvergrößerung von 75 mL in der Schüttelkultur auf ein Inkubationsvolumen von 2000 mL im Bioreaktor durchgeführt. Hierbei wurden alle Parameter, wie im Experimenterteil unter 4.3.11 beschrieben, direkt proportional um den Faktor 26.66 vergrößert. Als Medium wurde das Standardmedium verwendet, da die anderen Medien sich als nicht besser geeignet herausstellten. Ebenso sollte durch das Nicht-Verwenden eines proteinhaltigen Mediums die damit verbundene Schaumbildung im Bioreaktor und der somit notwendige Einsatz von Anti-Schaummitteln vermieden werden. Schaummittel können eventuell Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterien als auch auf deren metabolische Aktivität haben. Zusätzlich erschweren diese Mittel das Extrahieren des Inkubationsmediums mit organischen Lösungsmitteln, da eine Phasentrennung erschwert wird. Auch wurde die Inkubationstemperatur von 30 °C beibehalten sowie keine Änderung des pH-Wertes des Mediums durchgeführt. Dies ergab sich aus den Versuchen in der Schüttelkultur (Kap. 3.7.1). Neben den direkt proportionalen Ansätzen wurden die Substratkonzentrationen, die Zufuhr von Luft in das Inkubationsmedium und die Geschwindigkeit des Rührmotors variiert.

Als erstes wurde die Beeinflussung der Luftzufuhr auf die Aktivität der N-Demethylierung der bakteriellen Zellen getestet. Da die Luftzufuhr sich in der Schüttelkultur sehr schlecht steuern und beeinflussen lässt, bot sich hier eine gute Möglichkeit, diesen Parameter zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3-12 zusammengefasst.

Tab. 3-12: Abhängigkeit der N-Demethylierung von NMMA (**30**) von der Luftzufuhr im Bioreaktor

Inkubations- temperatur [°C]	Inkubations- volumen [mL]	Luftzu- fuhr [L/min]	Rührwerk [rpm]	NMMA [μL]	MA [%]
30	2000	0.1	500	500	14.1
30	2000	0.2	500	500	24.6
30	2000	0.5	500	500	18.6
30	2000	1.0	500	500	16.3
30	2000	0.0	500	500	0

Aus Tab. 3-12 erkennt man, dass die N-Demethylierung von NMMA (**30**) durch *Bacillus megaterium* auch vom Sauerstoffgehalt im Inkubationsmedium abhängig war. Für die Belüftung wurden Werte für die Luftzufuhr von 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 L/min sowie keine Luftzufuhr gewählt. Das beste Ergebnis mit einer Ausbeute von 24.6 % an MA erzielte man, wenn die Luftzufuhr 0.2 L/min betrug. Durch Messungen des Sauerstoffgehaltes des Mediums mit einer Sauerstoffelektrode wurde festgestellt, dass sich die Sauerstoffsättigung gerade am Minimum befand. Eine Belüftung von 0.1 L/min war nicht mehr ausreichend, um den Sauerstoffbedarf der Zellen zu stillen. Die Messwerte der Sauerstoffelektroden zeigten an, dass sich fast kein Sauerstoff mehr im Medium befand. Steigerte man allerdings die Luftzufuhr auf Werte von 0.5 L/min oder sogar 1.0 L/min, so war zu erkennen, dass die Ausbeute auf Werte von 18.6 % bzw. 16.3 % an MA abfielen. Ein Überangebot an Sauerstoff im Medium führte also zu einem Absinken der Ausbeute an MA; möglicherweise wurden bei Sauerstoffüberschuss ganz andere metabolische Wege eingeschlagen.

Erhöhter Lufteintrag in das Medium führte aber auch zu einer erhöhten Schaumbildung, die sich jedoch noch in Grenzen hielt, so dass kein Anti-Schaummittel zur Anwendung kommen musste. Durch starkes Einblasen von Luft in das Medium wurde auch teilweise Substrat zu kleinen Anteilen aus dem Medium ausgetrieben und entwich in die Umgebungsluft, was durch den Aromaeindruck im Labor bestätigt wurde. Somit war ein erhöhter Lufteintrag auch kontraproduktiv, da sowohl Substrat als auch Produkt, wenn auch nur in kleinen Mengen, in die Umgebungsluft ausgetragen wurden.

Neben der Variation des Lufteintrages in das Medium wurden noch die Rührgeschwindigkeit sowie Substratkonzentration verändert. Nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse dieser Umsetzungen zusammen. Bei der Variation der Substratkonzentration zeigten sich dieselben Ergebnisse wie bei den Umsetzungen in Kleinansatz in der Schüttelkultur. Bei einer geringeren Substratmenge, anstatt 500 μL nur 100 μL an MA, ergab sich, dass eine gewisse Menge an Substrat im Medium vorhanden sein muss, damit die Biotransformationsaktivität der Bakterien induziert wird. Höhere Konzentrationen dagegen bewirkten ein Absinken der Ausbeute an MA. Die toxischen Wirkungen von NMMA (**30**) und MA wurden bereits ausführlich in Kapitel 3.7.3 dargelegt und bestätigt.

Tab. 3-13: Abhängigkeit der N-Demethylierung von NMMA (**30**) von der Rührgeschwindigkeit bzw. Substratkonzentration im Bioreaktor

Inkubations- temperatur [°C]	Inkubations- volumen [mL]	Luftzu- fuhr [L/min]	Rührwerk [rpm]	NMMA [μL]	MA [%]
30	2000	0.2	500	100	7.3
30	2000	0.2	500	1000	2.7
30	2000	0.2	250	500	14.4
30	2000	0.2	750	500	18.0
30	2000	0.2	1000	500	15.9

Die Variation der Rührgeschwindigkeit zeigte ebenso einen Einfluss auf die Ausbeute an MA. Niedrigere (250 rpm) als auch höhere Umdrehungszahlen (1000 rpm) des Rühr-

motors bewirkten ein Absinken der Ausbeute an MA. Bei niedrigen Umdrehungszahlen war die Durchmischung des Mediums mit dem eingeblasenen Sauerstoff als auch mit dem umzusetzenden Substrat nicht optimal. Wurde die Umdrehungszahl allerdings zu hoch gewählt, dann trat starke Schaumbildung auf, mit der Folge, dass sich vermehrt Bakterien im Schaum befanden und nicht mehr im Fermentationsmedium befanden.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Produktion von MA durch *Bacillus megaterium* gegenüber den bisher bekannten Methoden der fungalen N-Demethylierung deutlich überlegen ist. Der isolierte Bodenkeim ist ein schnell wachsender apathogener Mikroorganismus, der MA zuverlässig und in Ausbeuten um 25 % produziert. Zusätzlich wurden bei dieser Biotransformation keine weiteren, störenden Nebenprodukte gebildet wie dies der Fall bei der fungalen N-Demethylierung von NMMA (**30**) der Fall ist (Page und Farbood 1989, Lomascolo et al. 1999). Nachteilig ist allerdings die durch die Verbindungen NMMA (**30**) und MA verursachte antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *Bacillus megaterium*. Eventuell könnte mit einem geeignetem Immobilisierungsverfahren dieses Problem umgangen werden. Weitere Aufmerksamkeit sollte der Tatsache gewidmet werden, dass verschiedene Wachstumsmedien, auch bei geringer Zellzahl, eine relativ hohe Ausbeute an MA hervorbrachten. Hier könnten weitere Versuche durchgeführt werden, um gezielt nach Substanzen zu suchen, die sich positiv auf das Biotransformationsverhalten von *Bacillus megaterium* gegenüber NMMA (**30**) auswirken.

Hervorzuheben ist zusätzlich, dass die Übertragung der gesammelten Informationen aus den Schüttelkulturversuchen in direkt proportionaler Ansatzvergrößerung ohne größere Probleme möglich war. Meistens ist die Ansatzvergrößerung von solchen Prozessen mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft, da in Bioreaktoren gänzlich andere Verhältnisse herrschen und wesentlich mehr Variationen im Inkubationsprozess durchgeführt werden können. Diese Fülle an möglichen Variationen lässt auf jeden Fall die Möglichkeit offen, die vorgestellte N-Demethylierung weiter optimieren und Ausbeutesteigerungen an MA erzielen zu können.

4 Experimentalteil

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Die für das Substratscreening und die Biotransformation 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. Das deuterierte sowie das ^{13}C -markierte Methyljodid wurden von Aldrich bezogen. Der Standard Methods Agar stammt von der Firma Bio Mérieux (bioMérieux, Nürtingen, Germany). Die anderen Wachstumsmedien (Flüssig- und Festmedien) wurden von Fluka bezogen. 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.

4.1.2 Mikroorganismen

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismus stammt aus einer Bodenprobe, die im Sommer 2002 aus dem elterlichen Garten in Karlstadt entnommen wurde. Nach Isolierung, Reinzucht und phänotypischer Charakterisierung wurde eine genotypische Charakterisierung am Institut für Hygiene des Universitätskrankenhauses Münster sowie an der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland, durchgeführt. Zum direkten Vergleich wurde von der DSMZ der Referenzstamm DSM 32 (*Bacillus megaterium*, Type-Strain, ATCC 14581¹) verwendet. Das Bodenisolat wurde in der „BCCMTM/LMG, Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie“, Universiteit Gent (RUG), B-9000 Gent, Belgium unter der LM G-Nummer 23147 deponiert.

4.1.3 Dünnschichtchromatographie

Träger: DC-Alufolien-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland). Detektion: UV bei 254 nm

4.1.4 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.032 mm – 0.063 mm; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet; Glassäulen: 3 x 50 cm bzw. 2 x 70 cm.

4.2 Geräte

4.2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

GC 1: 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 µm)
Temperaturprogramm:	60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm
Trägergas:	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*.

GC 2: HP 5890 Series II GC-System

Injektor:	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 220 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250 °C
Trennsäule:	J&W DB-Wax (30 m x 0.32 mm, d _f = 0.25 µm)

Temperaturprogramm: 50 °C, 10 °C/min, 240 °C
Trägergas: 95 kPa constant flow
Make-up Gas: 30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergase: 30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min Luft
Autosampler: HP 7673 GC/SCF Injektor

4.2.2 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
Trägergas: 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
Multipliiert: 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

Trägergas: 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

Multiplizier: 1300 V

Massenbereich: 38-450 u

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

4.2.3 Headspace-Gaschromatograph (HS-GC)

GC 5: HRGC MEGA 2 series, Fisons Instruments

Injektor: Split-Splitless-Injektor

Temperatur: -120 °C auf 180 °C in 25 sec

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)

Autosampler: Fisons Instruments HS 850

Gasdichte, beheizte Spritze (70 °C; 2.5 mL)

Trennsäule: J&W DB-WAX Kapillarsäule (30 m x 0.53 mm, $d_f = 1.00 \mu\text{m}$)

Temperaturprogramm: 60 °C (3 min isotherm), 5 °C/min, 200 °C (2 min isotherm)

Trägergas: 90 kPa Stickstoff, constant pressure

Datenaufnahme: Chrom-Card for Windows, Version 1.21

4.2.4 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 = Multiplett. Die Kopplungskonstante J wird in Hertz angegeben.

4.2.5 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, Nuaire, 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

4.2.6 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, Göttin- gen, 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

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.3.1 Herstellung von Agarplatten

5.875 g Agar wurden auf einem Filterpapier abgewogen und in eine Schraubglasflasche gefüllt. Nach der Zugabe von 250 mL demineralisiertem Wasser wird die Flasche kräftig geschwenkt, um den Agar zu suspendieren. Diese Suspension wird anschließend autoklaviert. Danach lässt man die dem Autoklaven entnommene Flasche unter der sterilen Werkbank auf 40 °C abkühlen. Nach vorsichtigem Umschwenken der Agarlösung wird diese möglichst blasenfrei in Petrischalen gegossen. Dabei wird die Abdeckung der Petrischale nur zum Einfüllen der Agarlösung und so wenig und kurzzeitig wie nötig angehoben. Nach dem Erstarren des Agars werden die Platten bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Tab. 4-1: 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.

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 blasenfrei in Petrischalen gegossen.

4.3.2 Umimpfen der Bakterien

In monatlichem Abstand ist ein Umimpfen der Bakterien auf neue Nährböden notwendig, da die Nährstoffe durch die Bakterien aufgebraucht werden. Mit einer Impföse aus Platin, die zuvor in der Bunsenbrennerflamme sterilisiert wurde, entnimmt man eine Stecknadelkopf große Menge Bakterienmaterial und streicht dieses auf einer neuen Agarplatte aus. Die frisch beimpften Platten wurden sodann im Brutschrank bei 30 °C inkubiert bis ein Wachstum deutlich erkennbar ist (nach etwa 1–3 Tagen). Dann wurden die Agarplatten am Rand mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert.

4.3.3 Isolierung von Mikroorganismen aus einer Bodenprobe

Die verwendeten Stämme wurden aus Bodenproben isoliert und in Reinkultur gezüchtet. Zu diesem Zweck wurden zwei Bodenproben aus dem elterlichen Garten in Karlstadt entnommen. Zur Isolierung der Bakterien wurde je 1 g Erde mit 50 mL sterilem Wasser versetzt und 30 Minuten lang gerührt. Von dieser Suspension wurden Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} hergestellt. Je 100 μL dieser Verdünnungen wurden auf Nähragarplatten ausplattiert. Diese Platten bestanden aus Minimalmedium, Vollme-

dium und Minimalmedium mit Substrat. Das Minimalmedium mit Substrat enthielt außerdem 3 verschiedene Mengen an Glucoselösung (0.5 mL, 1 mL und 2.5 mL; 50%ig).

Die Nähragarplatten haben folgende Zusammensetzung:

- I: Minimalagar mit verschiedenen Konzentrationen N-Ethyl-N-methylanilin als Substrat (einzige Kohlenstoffquelle)
- II: Minimalagar mit verschiedenen Konzentrationen Glucose als Kohlenstoffquelle und N-Ethyl-N-methylanilin (1)
- III: Standard Methods Agar (Vollmedium)

Je nach Wachstum und Kolonienzahl wurden die Platten 18 bis 120 h bei 30 °C inkubiert. Stark wachsende Kolonien werden auf Vollmediumplatten übertragen und durch Verdünnungsausstriche als Einzelkolonien kultiviert. Durch das sog. „Pick“-Verfahren wurden die einzelnen Kolonien vom Agar abgenommen, auf Vollmediumplatten übertragen und inkubiert. So wurden 107 Stämme erhalten, von denen 96 auf Vollmediumplatten weiter kultivierbar waren. Die so erhaltenen Reinkulturen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und alle vier Wochen auf frische Standard Methods Agarplatten übergeimpft. Von diesen Platten wurde dann Bakterienmaterial für das Substratscreening im Flüssigmedium genommen.

4.3.4 Herstellung der Wachstumsmedien

Für das Substratscreening wurde ein Dworkin-Medium in Kombination mit einer *Pseudomonas*-Spurenelementlösung verwendet. Als Kohlenstoffquelle diente eine sterile, 50%ige Glucoselösung.

Vier Erlenmeyerkolben (300 mL-Enghals) wurden mit je 75 mL Dworkin-Medium und 375 µL *Pseudomonas*-Spurenelementlösung gefüllt, mit 100 mL-Bechergläsern verschlossen und bei 120 °C für 16 min autoklaviert. Um Bräunungs- und Zersetzungs-

reaktionen im Rahmen der Maillard-Reaktion zu vermeiden, wird erst nach dem Autoklavieren 750 μL einer sterilen 50%igen Glucoselösung als Kohlenstoffquelle hinzugefügt.

Dworkin-Medium:

- 2.0 g Ammoniumsulfat
- 4.0 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 6.0 g Dinatriumhydrogenphosphat
- 0.2 g Magnesiumphosphat-Hexahydrat

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen

Pseudomonas-Spurenelementlösung:

- 0.058 g Borsäure
- 0.0435 g Zinksulfat-Hexahydrat
- 0.045 g Eisen(II)sulfat-Hexahydrat
- 0.024 g Cobalt(II)sulfat-Heptahydrat
- 0.0055 g Ammoniummolybdat
- 0.002 g Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat
- 0.002 g Mangan(II)sulfat-Tetrahydrat

in 250 mL demineralisiertem Wasser lösen,
steril filtrieren und im Kühlschrank
aufbewahren

Für die Optimierung der Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat zu Methylantranilat durch *Bacillus megaterium* wurde Medien speziell für das Wachstum und die Kultivierung von *Bacillus*-Species bzw. *Bacillus megaterium* ausgewählt. Die verschiedenen Medien decken unterschiedliche Nährstoffanforderungen von ab.

Medium 1:

Bacillus Broth, ¼ Strength: 2.5 g Hefeextrakt
1.0 g Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und für
16 min bei 121 °C autoklavieren

Medium 2:

Bacillus Medium: 1.0 g (NH₄)₂SO₄HPO₄
0.2 g MgCl-Heptahydrat
0.2 g KCl
0.2 g Hefeextrakt

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und 20 min
bei 121 °C autoklavieren.

10%ige Glucoselösung
10 g Glucose in 100 mL demineralisiertem Wasser
lösen und steril filtrieren

zu je 9.5 mL des autoklavierten *Bacillus* Mediums
werden 0.5 mL der sterilfiltrierten Glucoselösung
hinzugefügt

Medium 3:

Bacillus Medium: 6.0 g Pepton
3.0 g Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut
3.0 g Hefeextrakt
1.5 g Rinderextrakt
1.0 µg MnSO₄-Tetrahydrat

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und 16 min
bei 121 °C autoklavieren

Medium 4:

Bacillus Medium: 10.0 g Pepton
5.0 g Lactose
5.0 g NaCl
3.0 g Beef-Extrakt
2.0 g K₂HPO₄

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und für
16 min bei 121 °C autoklavieren

Medium 5:

Beef-Extrakt mit NaCl: 10.0 g Beef-Extrakt
5.0 g NaCl

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und für
16 min bei 121° C autoklavieren

Medium 6:

Diaminopimelinsäure-Medium: 5.0 g Pepton aus Gelatine, pankreatisch verdaut
3.0 g Beef-Extrakt
0.050 g Diaminopimelinsäure

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und für
16 min bei 121 °C autoklavieren

Medium 7:

DSMZ-Medium Nr. 1: 5.0 g Pepton
3.0 g Fleischextrakt

in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und für
16 min bei 121 °C autoklavieren

4.3.5 Substratscreening mit N-Ethyl-N-methylanilin (Standardaufarbeitung)

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Flüssigmediums erfolgte das Animpfen mit Bakterienmaterial unter sterilen Bedingungen (sterile Werkbank). Dabei wurde mithilfe einer zuvor in der Bunsenbrennerflamme ausgeglühten Impföse (Platindraht) jeweils eine ungefähr gleich große Menge des entsprechenden Bakterienmaterials in drei der vier Nährlösungen übertragen. Der vierte Kolben wurde als Blindwert verwendet, um eventuell auftretende Instabilitäten der Substrate, z.B. durch Luftoxidation, zu erkennen. Die vier Kolben wurden dann im Schüttelinkubator für 24 Stunden bei 120 Umdrehungen pro Minute und 30 °C geschüttelt, um eine gewisse Zellzahl zu erreichen.

Nach Abschluss der Vorinkubation wurden die Erlenmeyerkolben dem Schüttelinkubator entnommen und in die sterile Werkbank gestellt. Dort erfolgt die Zugabe von Substrat (jeweils 100 µmol des entsprechenden Substrats) mithilfe einer Eppendorfpipette und sterilen Spitzen. Nach der Substratzugabe wurden die Kolben wieder mit den Bechergläsern verschlossen und erneut unter den gleichen Bedingungen für weitere 18 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert.

Nach der 18 stündigen Inkubationszeit wurden die Erlenmeyerkolben dem Inkubator entnommen, die Bechergläser entfernt und die Kolben mit Parafilm verschlossen. Anschließend wurden die Kolben nacheinander für 10 min in ein Ultraschallbad gehängt, damit durch Zerstörung der Bakterienzellwände sich das Cytoplasma in die Lösung ergießt und die Bakterien abgetötet werden, wodurch auch intrazellulär gebildete Metabolite erfasst werden und die folgende Aufarbeitung leichter zu handhaben ist. Die entstandenen Suspensionen und die Blindlösung wurden sodann jeweils in einen 500 mL fassenden Zentrifugenbecher umgefüllt, wobei die Kolben mit demineralisiertem Wasser nachgespült und dieses ebenfalls in die Zentrifugenbecher überführt wurden. Nach dem Austarieren der Becher wurden diese bei 9000 Umdrehungen pro Minute für 25 min zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden dann je in einen 250 mL-Scheidetrichter überführt und die Zentrifugenbecher mit demineralisiertem Wasser nachgespült, welches ebenfalls in den jeweiligen Scheidetrichter gegeben wurde. Die wässrigen Lösungen wurden je mit 2.5 mL 4 N Natronlauge alkalisiert und anschließend viermal mit je 40 mL destilliertem Diethylether extrahiert. Die vereinigten Extrak-

te einer jeden Lösung wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, durch Filtration in 250 mL-Rundkolben überführt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 30 °C und 530 mbar entfernt.

Die extrahierten wässrigen Lösungen wurden jeweils mit 3 mL 6 N Salzsäure angesäuert. Um eventuell bakteriell gebildetes EMA-N-Oxid zum Ausgangsanilin EMA (**1**) zu reduzieren, wurden den angesäuerten wässrigen Lösungen je 4 mL TiCl₃-Lösung zugefügt. Diese Reduktion ist nötig, da das EMA-N-Oxid aufgrund seiner Thermolabilität nicht direkt mittels GC-MS-Analytik nachweisbar ist.

Nach einer Stunde Reaktionszeit wurden die lila gefärbten Lösungen mit jeweils 10 mL 4 N Natronlauge alkalisiert und erneut extrahiert (drei mal mit je 40 mL Diethylether). Die vereinigten organischen Phasen jeder Lösung wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, in 250 mL-Rundkolben filtriert und am Rotationsverdampfer der Diethylethers unter oben genannten Bedingungen entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Diethylether gelöst und in ein 1.5 mL fassendes GC-Gläschen überführt. Analog wurde mit den Rückständen aus der Extraktion vor der Reduktion verfahren. Auf diese Weise wurden insgesamt acht Proben zur GC-MS-Analytik erhalten, die im Kühlschrank gelagert wurden. Quantifiziert wurden die Metabolite mittels GC-MS; hierbei wurden alle GC-gängigen Metabolite zusammengefasst und daraus die prozentualen Anteile errechnet.

Um sicherzustellen, dass bei den bakteriellen Umsetzungen die eingesetzten Substrate 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 30 °C und einem Druck von 530 mbar abgezogen. Der Rückstand wurde in wenig Ether aufgenommen, in ein GC-Probengläschen überführt und mittels GC-MS analysiert.

4.3.6 Erweitertes Substratscreening

Das erweiterte Substratscreening ist dem unter 4.3.5 ausführlich beschriebenen Substratscreening vergleichbar. Es wurden jeweils 100 μmol des entsprechenden Substrates zugesetzt. Allerdings wurde auf den Schritt der TiCl_3 -Reduktion von eventuell gebildeten N-Oxiden verzichtet, da mit den einfach strukturierten N,N-Dialkylarylaminen der Nachweis von N-Oxiden negativ war. Quantifiziert wurden die Metabolite mittels GC-MS; hierbei wurden alle GC-gängigen Metabolite zusammengefasst und daraus die prozentualen Anteile errechnet.

4.3.7 Induktion und Inhibierung von CYP

Sowohl für die Induktions- als auch für die Inhibierungsversuche wurden Übernachtskulturen von *Bacillus megaterium* angesetzt und im Standardmedium für 24 h inkubiert. Aus dieser Übernachtskultur wurden 1000 μL herauspipettiert und in neue, mit sterilem Standardmedium versetzte Kolben, gegeben. Diese wurden dann für 24 h inkubiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass in allen Kolben eine gleiche Zellzahl vorhanden war. Anschließend wurde der Induktor (Cyclobarbital-Calcium, Methylphenobarbital, Barbital, Barbital-Natrium, Amobarbital, Phenobarbital) bzw. Inhibitor (Metyrapon, n-Octylamin, Pyridin, Imidazol) in verschiedenen Mengen (25, 50, 100, 200 μmol ; bei Phenobarbital auch: 300, 500 und 750 μmol) zur Bakteriensuspension gegeben und für weitere 2 Stunden bei 120 rpm und 30 °C inkubiert. Danach folgte die Zugabe des Substrate N,N-Diethylanilin (**3**) (100 μmol) sowie eine weitere Inkubation für 24 h. Die Extraktion sowie die Quantifizierung der Metabolite ist identisch mit der Standardaufarbeitung und in Kapitel 4.3.5 im Detail beschrieben.

4.3.8 Formaldehyd-Analytik

4.3.8.1 Head-Space-Analytik

Das Zentrifugat des Standardansatzes von *Bacillus megaterium* mit N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) wird zur Formaldehydbestimmung verwendet sowie zwei wässrige Formaldehydlösungen der Konzentrationen 5 µg/mL und 50 µg/mL. Jeweils 2.0 mL dieser Lösungen werden in Headspace-Gläschen gegeben. Diese Proben werden zur Headspace-GC-Analytik verwendet (Tashkov, 1996).

Ebenso wurde eine Inkubation direkt im gasdicht verschlossenen Head-Space-Gläschen durchgeführt. Hierzu wurden 3 mL einer Übernachtskultur von *Bacillus megaterium* in das Gläschen gegeben, dann wurden 10 µmol an N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) zugegeben, das Gläschen gasdicht verschlossen, bei 30 °C und 120 rpm für 24 h inkubiert und dann der Headspace-GC-Analytik zugeführt.

4.3.8.2 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

310 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 100 mL 2 M HCl gelöst. 25 mL dieser Lösung wurden nach Beendigung der Inkubation der Bakterienlösung hinzugefügt und für 30 min gerührt. Anschließend erfolgte eine Pentan-Extraktion mit je viermal 40 mL an Pentan. Die vereinigten Pentan-Extrakte wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in Chloroform angelöst, in einen 2 mL großen Messkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt und in ein GC-Gläschen überführt. Anschließend erfolgte die GC-MS-Analytik auf einer DB-1-Säule.

4.3.8.3 Derivatisierung mit Dimedon

100 mg Dimedon wurden in 100 mL Methanol gelöst. 25 mL dieser Lösung wurden nach Beendigung der Inkubation der Bakterienlösung hinzugefügt und für 30 min gerührt. Anschließend erfolgte eine Pentan-Extraktion mit je viermal 40 mL an Pentan. Die vereinigten Pentan-Extrakte wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in Chloroform angelöst, in einen 2 mL großen Messkolben überführt, bis zur Marke aufge-

füllt und in ein GC-Gläschen überführt. Anschließend erfolgte die GC-MS-Analytik auf einer DB-5-Säule.

Bei der direkten Inkubationsmethode wurden 25 mg Dimedon zeitgleich mit dem Substrat der Bakteriensuspension hinzugefügt und für 18 h bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Danach erfolgte eine Pentan-Extraktion.

4.3.8.4 Derivatisierung mit Cysteamin

Nach der Standardumsetzung von *Bacillus megaterium* mit N-Ethyl-N-methylanilin (**1**) wurden die erhaltenen Zentrifugate, einschließlich des Blindwerts, jeweils mit 250 µmol Cysteamin versetzt und eine Stunde lang gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit Chloroform, wobei viermal mit je 40 mL Lösemittel im 250 mL-Scheidetrichter geschüttelt wird. Die vereinigten organischen Phasen einer jeden Lösung wurden nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat bei 40 °C und 474 mbar am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde jeweils in wenig Chloroform gelöst, in 2 mL Messkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt und in GC-Gläschen überführt.

Bei der direkten Derivatisierung wurde das Cysteamin zeitgleich mit dem Substrat zur Bakterienlösung hinzugegeben und zusammen für 18 h inkubiert. Die erhaltenen Zentrifugate, einschließlich des Blindwerts, wurden anschließend mit Chloroform extrahiert, wobei viermal mit je 40 mL Lösemittel im 250 mL-Scheidetrichter geschüttelt wird. Die vereinigten organischen Phasen einer jeden Lösung wurden nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat bei 40 °C und 474 mbar am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde jeweils in wenig Chloroform gelöst, in 2 mL Messkolben überführt, bis zur Marke aufgefüllt und in GC-Gläschen überführt.

4.3.9 Umsetzung von N-Methyl-methylantranilat

Auch die Umsetzungen von N-Methyl-methylantranilat (**30**), inklusive den Variationsstudien (Substratkonzentration, pH-Wert, Temperatur) fanden im Standard-Dworkin-Medium statt. Die Umsetzungen mit den verschiedenen *Bacillus*-Medien (Kapitel 4.3.4) wurden ebenso im 75 mL-Ansatz durchgeführt; die Aufarbeitung und Extraktion der

Biotransformationsprodukte wurden analog der Standardaufarbeitung (Kapitel 4.3.5) durchgeführt.

4.3.10 Immobilisierung von *Bacillus megaterium*

Eine Übernachtskultur im Standard-Flüssigmedium (75 mL) wurde bis zur mittleren log-Phase angezogen und dann vorsichtig abzentrifugiert (ca. 3000 g). Das Bakterienpellet wurde in 2 mL einer isotonischen NaCl/MgSO₄-Lösung resuspendiert und 3 mL einer Natriumalginat-Lösung (3% w/v) zugemischt. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in ein neues Medium, bestehend aus 0.1 M CaCl₂, 5 g/L Glucose und 5 mL/L der *Pseudomonas*-Spurenelementlösung gegeben. Die entstandenen Gelkugeln härteten eine Stunde ohne Bewegung aus und wurden nach einer weiteren halben Stunde bei 30 °C und 120 rpm mit dem Substrat versetzt. Die Aufarbeitungsbedingungen entsprechen denen in Kapitel 4.3.5, wobei die Kügelchen vorher abfiltriert wurden.

4.3.11 Einsatz des Bioreaktors

Der verwendete Bioreaktor stammt von der Firma New Brunswick und konkret handelt es sich um den New Brunswick Scientific BioFlo 3000 mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 5 L (Abb. 4-1).

Die allgemeine Vorgehensweise bei den Umsetzungen von N-Methyl-methylantranilat (**30**) wird im Folgenden beschrieben: Um eine große Bakterienzahl und ein schnelles Wachstum im Fermenter zu erreichen, wurden nicht mit einer Impföse Bakterienmaterial in den Fermenter gegeben, sondern es wurde eine Übernachtskultur im Schüttelkolben angesetzt. Mit dieser Übernachtskultur wurde dann der Fermenter angeimpft. Dies hat den Vorteil, dass Kontaminationen vermieden werden, die Bakterien sich schon vorher an das Medium adaptiert haben und ein schnelles Anwachsen gewährleistet ist. Für die Übernachtskultur wurde eine kleine Menge

Bakterienmaterial mit einer sterilen Impföse von einer Nährbodenplatte in einen Erlenmeyerkolben überführt, der 75 mL sterile Dworkinlösung, 375 µL *Pseudomonas*-Spurenelementlösung und 750 µL 50%ige Glucose enthielt. Der Kolben wurde mit einem passenden Becherglas bedeckt und im Schüttelinkubator bei 30 °C und einer Dreh-

zahl von 120 rpm für 24 h vorinkubiert; hieraus ergibt sich die sog. „Seed Culture“. Zeitgleich wurde der Bioreaktor für die Umsetzung vorbereitet.

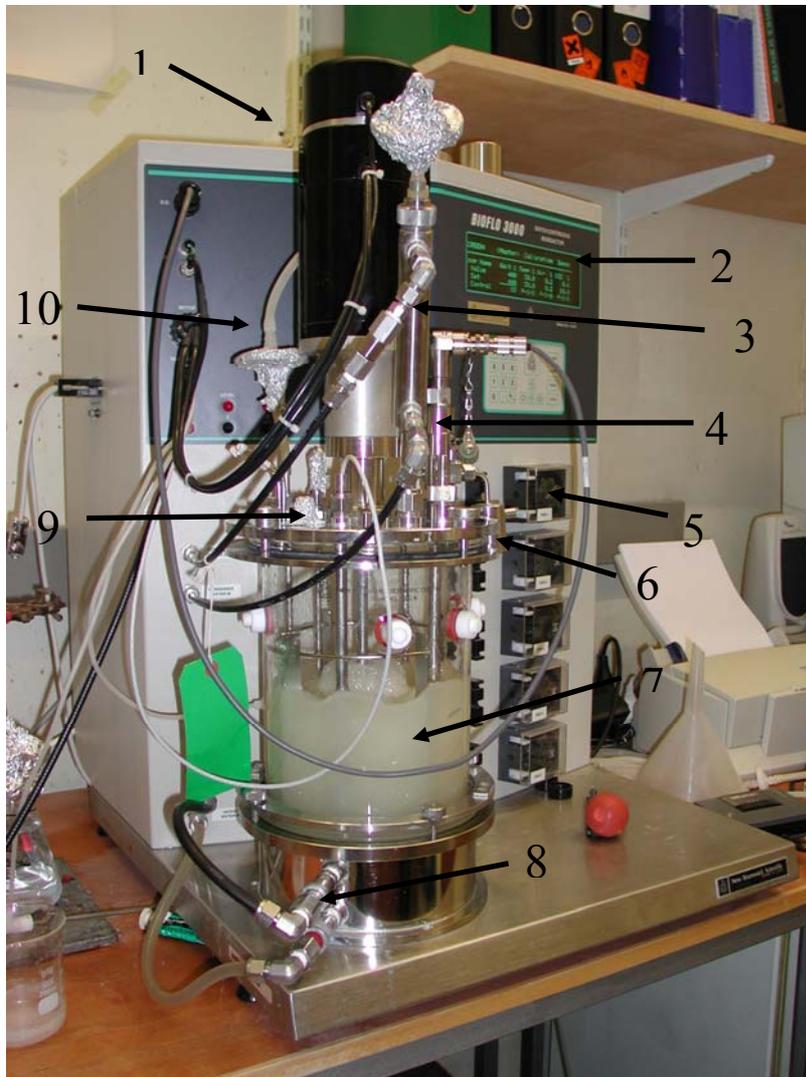


Abb. 4-2: New Brunswick Scientific BioFlo 3000 Bench-Top Fermenter (Heckel 2004) (1=Motor mit Rührwerk; 2=Steuerung und Display; 3=Rückflusskühler; 4=Sauerstoffelektrode; 5=Schlauchpumpen ; 6=sterile Entnahmestelle; 7=Fermentationsgefäß; 8=Anschluss Temperaturregelung; 9=Temperaturfühler; 10=sterile Luftzufuhr)

In das Reaktionsgefäß des Reaktors wurden 2000 mL Dworkin-Lösung sowie 10 mL der *Pseudomonas*-Spurenelementlösung gegeben. Anschließend wurde der Deckel aufgesetzt und mittels vier Schrauben fest verschlossen und fixiert. Die Aufsatzstelle des Rührermotors wurde mit der zugehörigen Metallschutzkappe bedeckt. Der abnehmbare Rückflusskühler wurde aus Platzgründen im Autoklaven entfernt und alle vorhandenen Öffnungen, mit Alufolie verschlossen, um die Sterilität nach dem Autoklavieren zu gewährleisten. 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. Das Reaktionsgefäß und der Rückflusskühler wurden im Großraumautoklav unter Druck 16 min lang bei einer Temperatur von 121 °C erhitzt.

Nach dem Autoklavieren wurde der Rückflusskühler wieder auf das Reaktionsgefäß aufgeschraubt, der Fermenter auf die Konsole aufgestellt und alle vorhandenen Leitungen sowie Messeinrichtungen angeschlossen. Durch das Öffnen der Kühlwasserzufuhr wurde das Fermentationsmedium auf die gewünschte Temperatur abgekühlt. Der Sauerstoffgehalt des Inkubationsmediums wurde mittels einer Sauerstoffelektrode verfolgt. Diese wurde vor Beginn der Fermentation kalibriert. Durch die hier durchgeführte Zweipunkt-Kalibrierung wurden die Werte für 0 und 100 % Sauerstoffsättigung der Fermentationslösung festgelegt. Die weiteren Fermentationsparameter Temperatur, steriler Luftfluss sowie die Rührgeschwindigkeit wurden programmiert. Unter sterilen Bedingungen wurden 20 mL einer 50%igen Glucose-Lösung und die „Seed Culture“ zugegeben; der Fermentationsprozess war nun eingeleitet, die Mikroorganismen setzten ihr in der „Seed Culture“ begonnenes exponentielles Wachstum im Fermentationsmedium fort. Nach 24 h Inkubationszeit, in der die Kultur im Fermentationsgefäß anwuchs, wurde das Substrat zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Durch die sterile Probeentnahmestelle wurden Aliquots aus dem Reaktionsgefäß entnommen und, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, extrahiert und analysiert.

4.3.12 Überprüfung der antimikrobiellen Eigenschaften von NMMA und MA

Inhibierung im Flüssigmedium

Für die Inhibierungsversuche im Flüssigmedium wurde eine Übernachtskultur von *Bacillus megaterium* im Standard-Medium angesetzt. Von dieser Übernachtskultur wurden 1000 µL in elf mit sterilem Medium/Glucose (Standard-Flüssigmedium) beschickten Erlenmeyer-Kolben pipettiert. Eine Trübung des Mediums durch die Mikroorganismen war mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Danach wurden in die Kolben verschiedene Mengen (10, 25, 50, 75 bzw. 100 µmol) an NMMA (**30**) oder MA hinzugegeben. Der elfte Kolben blieb als Wachstumskontrolle frei von NMMA (**30**) bzw. MA. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 30 °C und 120 rpm wurden die Inkubationslösungen auf das Wachstum untersucht. Durch Messen der optischen Dichte bei 578 nm im Spektralphotometer wurde so indirekt die Zellzahl bzw. das Wachstum untersucht. Falls die gemessenen Werte über 0.4 lagen, so wurden die Proben dementsprechend verdünnt und der Verdünnungsfaktor in die Berechnungen mit einbezogen.

Blättchentest auf Agarplatten

Bei dem Blättchentest werden auf sterile standardisierte Filterpapierscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm die zu untersuchenden Substanzen aufgebracht und dann auf die flächig mit Bakterienlösung (10^9 cfu) angeimpften Agarplatten gelegt. Nach dem Auflegen saugten sich die Scheibchen mit Wasser voll, das entsprechende Anthranilat wurde zumindest teilweise im 96% Wasser enthaltenden Agar gelöst und diffundierte entsprechend der entstandenen Konzentration und der Substanzeigenschaft in bzw. durch den Agar (Fick'sches Gesetz). Je größer der nach der Bebrütung entstandene Hemmhof war, desto empfindlicher war der geprüfte Stamm gegen die eingesetzte Substanz. Der resultierende Hemmhofdurchmesser diente zur Bemessung der Toxizität, exakte quantitative Aussagen sind mit dieser Methode allerdings nicht möglich (Süßmuth et al. 1999).

Die sterilen Blättchen wurden mit verschiedenen Mengen an MA bzw. NMMA (**30**) (10, 25, 50, 75 und 100 µmol) beschickt. Nachdem die Substanzen von den Filterpapierscheiben aufgesaugt worden waren, wurden sie mit einer Pinzette vorsichtig

auf die mit Bakterienlösung ausplattierten Platte gelegt und inkubiert. Es wurde auf genügend Abstand zum Rand der Agarplatte bzw. zu den einzelnen Papierscheiben untereinander geachtet, damit die Hemmhöfe klar ersichtlich sind bzw. sich keine Überschneidungen von Hemmhöfen ergeben.

4.3.13 Phänotypische Charakterisierung

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden Betrachtungen mit einem Mikroskop sowie eine Gram- und Sporen-Färbung durchgeführt. Das Lichtmikroskop ist bei den Geräten beschrieben und diente zur Erfassung der Bakteriengröße als auch zur Identifizierung der gebildeten Sporen und zur Betrachtung der Gram-Färbung.

Gram-Färbung

Für die Gram-Färbung wurden verschiedene Lösungen hergestellt und verwendet:

Lösung A:	2 g Kristallviolett in 20 mL 96%igem Ethanol gelöst
Lösung B:	0.8 g Ammoniumoxalat in 80 mL demin. Wasser gelöst
Lugol-Lösung:	1 g Jod, 2 g Kaliumjodid in 300 mL demin. Wasser gelöst
Safranin-Lösung:	250 mg Safranin in 10 mL 96%igem Ethanol lösen, dann 100 mL demin. Wasser dazugeben
Entfärbe-Lösung:	Ethanol (96%ig)-Aceton (1:1), Salzlösung (5 g NaCl, 0.12 g MgSO ₄ -Heptahydrat in 1 L demin Wasser gelöst)

Auf einen Objektträger wird links und rechts je einen Tropfen Salzlösung gegeben. Mit der Impföse wird wenig Zellmaterial von der Agarplatte des zu testenden Organismus im linken Tropfen und Zellmaterial von einem Gram-negativen Kontrollorganismus (*Pseudomonas frederiksbergensis*) im rechten Tropfen bis zur Homogenität verrieben. Zur Hitzefixierung wurde der Objektträger, mit den Bakterien nach oben, zweimal langsam durch die entleuchtete Bunsenbrennerflamme gezogen. Diese hitzefixierten Ausstriche werden mit Kristallviolettlösung bedeckt und eine Miunte lang einwirken gelassen. Den Farbstoff mit demin. Wasser abspülen und anschließend die Lugol-Lösung auftropfen und einwirken lassen. Die Lösung mit demin. Wasser abspülen und trocknen lassen, eventuell mit einem Papier abtupfen. Zur Entfärbung das Ethanol-Aceton-

Gemisch auftropfen und den Objektträger 30 Sekunden leicht schwenken, die Feuchtigkeit mit einem weichen Papier aufsaugen. Zur Gegenfärbung 10 Sekunden lang Safranin-Lösung einwirken lassen und den Farbstoff mit demin. Wasser abspülen. Nach anschließendem Trocknen erfolgt die Auswertung unter dem Mikroskop; Gram-positive Bakterien erscheinen dunkelviolet, gramnegative hellrot (Süßmuth et al. 1999)

Aminopeptidase-Test:

Zum Aminopeptidase-Nachweis werden Bactident-Aminpeptidase-Teststäbchen der Firma Merck (Merck Diagnostica Nr. 13301) verwendet. Von frisch bewachsenen Agarplatten werden mit einer Impföse Bakterienkolonien in 0.2 mL sterilem Wasser gut suspendiert. Das Teststäbchen in das Teströhrchen stellen, so dass die Reaktionszone vollständig in die Bakteriensuspension eintaucht. Bei einer Temperatur von 37 °C für eine Dauer von 20 min inkubieren und danach mit der mitgelieferten Farbskala vergleichen (Süßmuth et al. 1999).

4.3.14 Genotypische Charakterisierung

4.3.14.1 16S rDNA-Sequenzierung

DNA-Isolierung, DNA-Amplifizierung und DNA-Sequenzierung der 16S rDNA

Für die Extraktion von DNA wurden Bakterienzellen mit destilliertem Wasser gewaschen und in 200 µL TE-Puffer (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1mM; pH 7,0) für 30 min bei 80 °C zur Inaktivierung der Bakterien inkubiert. Die DNA wurde, entsprechend der Vorschrift von van Embden mit N-cetyl-N-,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl extrahiert (van Embden et al. 1993). Das DNA-Pellet wurde in 200 µL TE-Puffer suspendiert und bei -20 °C bis zur Durchführung der PCR eingefroren. 2 µL dieser Suspension (circa 10 ng an DNA) wurden für die PCR-Amplifizierung verwendet. Die Amplifizierung der partiellen ribosomalen DNA (rDNA) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µL, welches 200 µM Desoxynucleosid-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10 pmol jedes Primers (mittels HPLC aufgereinigt), 5 µL eines 10-fach konzentrierten PCR-Puffers (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH 8,3) sowie 1,25 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt,

Deutschland) enthält. Im Thermocycler folgten nach einer initialen Denaturierung (80 °C, 5 min) 28 Zyklen von Denaturierung (94 °C, 45 s), Anlagerung (53 °C, 1 min) und Verlängerung (72 °C, 90 s). Abgeschlossen wurde die PCR mit einer ausgedehnten Verlängerung (72 °C, 10 min). Die universellen bakteriellen Primer 16S-27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') und 16S-907r (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') wurde für die 16S rDNA-PCR verwendet (Lane 1991). Die Reaktionen fanden in einem automatisiertem DNA Thermocycler statt (T1; Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland). Negativ-Kontrollen, die nur Wasser statt DNA enthielten, wurden in Parallelansätzen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde enzymatisch mit Exonuclease I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt Hoechst, Deutschland) sowie einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (Amershan Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Dazu wurden 5 µL des PCR-Produkts mit 1 U jeden Enzyms bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Enzyme bei 80 °C für 15 min inaktiviert und die PCR-Produkte anschließend bei 4 °C gelagert (Dugan et al. 2002).

Die Amplikons wurden mit Hilfe des Prism Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sequenziert. Dazu wurden 0,5 µL aus dem Kit sowie 1,8 µL TrisHCl/MgCl₂-Puffers (400 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂), 10 pmol des Sequenzierungs-Primers und 2 µL des aufgereinigten PCR-Produktes in einem Gesamtvolumen von 10 µL verwandt. Für die 16S rDNA-Sequenzierung wurde entweder der 16S-27f-Primer oder der 16S-519r-Primer (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3') bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C bzw. 60 °C verwendet. Alle Sequenzierungen wurden wiederum in einem T1 Thermocycler (mit einer Auf- bzw. Abheizzeit von 1 °C/s) mit 25 Zyklen Denaturierung (96 °C, 10 s), Anlagerung (5 s) und Verlängerung (60 °C, 4 min) durchgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden mit MultiScreen HV Mikrotiterplatten (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), welche zuvor mit Sephadex G50 Superfine (Amershan Biosciences, Freiburg, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben (Millipore Tech Note TN053; einschließlich einer Vorspülung mit 150 µL) beladen worden waren, aufgereinigt. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung und der Nachweis der aufgereinigten Sequenzierprodukte erfolgte anschließend entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit einem ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Die Nukleotid-Sequenz für beide DNA-Stränge wurde bestimmt. Unklare Positionen wurden nochmals sequenziert und

mindestens 98 % des partiellen doppelt bestimmten 16S rDNA Bereiches kamen damit zur Auswertung.

Analyse der rDNA-Sequenz

Der Bereich von Base 54 bis 510 der 16S rDNA (entsprechend der *E. coli* 16S rDNA Nummerierung) wurde mit der Ridom TraceEditPro Software (Version 1.0, Ridom GmbH, Würzburg) untersucht. Die Sequenzen für die Primerbereiche wurden daher hierfür nicht mit untersucht. Schließlich wurde eine Sequenz-Ähnlichkeitssuche mit der RIDOM Datenbank durchgeführt (Harmsen et al. 2002).

4.3.14.2 DNA/DNA-Hybridisierung

Bei der DNA/DNA-Hybridisierung wurde das Bodenisolat, aufgrund der Ergebnisse der 16S rDNA-Analytik wiederum mit dem *Bacillus megaterium* Type-strain (DSM 32, ATCC 14581) verglichen.

Gewinnung von Zellmasse

Hierzu wurde von beiden Stämmen Übernachtskulturen angesetzt, um Bakterienmaterial für die DNA-Isolierung zur Verfügung zu haben. Dazu wurden insgesamt 24 Erlenmeyer-Kolben (300 mL) mit je 75 mL des DSMZ- Mediums Nr. 1 (ohne Zugabe von Mn^{2+}) gefüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden je 12 Kolben mit dem Type-strain und die anderen 12 mit dem Bodenisolat inkubiert für 24 h bei 30 °C und 120 rpm. Nach verstrichener Inkubationszeit wurden die Bakteriensuspension in sterilen Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert und die zurückbleibenden Bakterienzellen zweimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und abzentrifugiert. Von jedem Mikroorganismus wurde auf diese Weise circa 3 g an Zellmasse gewonnen. Die Zellmasse wurde in verschließbaren Zentrifugenröhrchen mit einer 1:1 Mischung aus sterilem Wasser und Glycerin überschichtet und konserviert.

Aufbrechen der Zellstruktur

Diese Bakterien-Pellets wurde in 10 mL MUP-Puffer (8 M Harnstoff, 0.12 M Na₂HPO₄, 0.12 M NaH₂PO₄) resuspendiert. Die Zellstruktur wurde in einer sog. „French Press“ (American Instrument Co. 19099-5) bei einem Druck von 138000 kPa zerstört. Durch die Betrachtung durch ein Phasen-Kontrastmikroskop wurde überprüft, ob noch intakte Zellen vorhanden sind. Andernfalls wurde die Suspension ein zweites Mal in der „French Press“ behandelt (Cashion et. al. 1977).

Chromatographie der Zellsuspension und Isolierung der DNA

Eine Hydroxyapatit-Suspension wurde vorbereitet (Cashion et al. 1977) und die bakterielle Suspension hinzugefügt. Diese wurde für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen und gelegentlich während der ersten halben Stunde umgerührt. Nachdem sich die Suspension abgesetzt hatte, wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert. Das Hydroxyapatit wurde in eine Säule eingefüllt und zuerst mit 30 mL des MUP-Puffers, dann mit 30 mL eines 0.014 M Natriumphosphat-Puffers (0.007 M Na₂HPO₄, 0.007 M NaH₂PO₄, pH 6.8) gewaschen. Die DNA wurde schließlich mit einem 0.4 M Natriumphosphat-Puffer (0.20 M Na₂HPO₄, 0.20 M NaH₂PO₄, pH 6.8) eluiert. Diese Lösung wurde durch einen Schnellverdampfer auf ein Volumen von circa 1 mL eingengt und auf einer Sephadex G-50-Säule entsalzt. Die DNA-enhaltenden Fraktionen wurden erneut aufkonzentriert auf eine Konzentration von ungefähr 2 mg/mL und dem enzymatischen Verdau zugeführt.

Enzymatische Verdauung der DNA

Die Aufschluss-Mischung (Gesamtvolumen: 0.5 mL), bestehend aus 1 mg DNA, 36 mM Natriumacetat (pH 6.5), 15 mM MgCl₂ und 200 µg pankreatischer DNase, wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert dieser pankreatischen Verdauung auf pH 8.5 mit einer 1%igen NH₃-Lösung eingestellt, eine aus Schlangengift gewonnene Phosphodiesterase (53 µg/mL) zugefügt und diese Mischung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde umgehend einer Eisen-Austausch-Säule unterzogen.

Bestimmung der DNA-Renaturierungsrate

Die Renaturierungsrate wurde in verschließbaren Küvetten durchgeführt, die folgende Lösungen enthalten (Huss et al. 1983): Kontrolle (SSC-Puffer: 0.15 M NaCl; 0.015 M Trinatriumcitrat; pH 7.0); DNA-Lösung A (*Bacillus megaterium* Type-strain DSM 32, ATCC 14581), DNA-Lösung B (Bodenisolat), Mischung gleicher Volumina DNA-Lösung A und DNA-Lösung B. Die DNA wurde in den Küvetten bei 100 °C für 10 min denaturiert. Die Reassoziierungsreaktion wurde durch ein schnelles Abkühlen der Lösungen erreicht. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm über einen Zeitraum von 30 min in 15 Sekunden-Intervallen gemessen und graphisch aufgetragen und entsprechend nach De Ley berechnet (De Ley et al. 1970).

4.4 Synthesen

4.4.1 Synthesen von N,N-Dialkyl-2-aminophenolen

Zur Identifizierung der bakteriellen Biotransformationsprodukte wurden mehrere N,N-Dialkyl-2-aminophenole als Referenzsubstanzen synthetisiert (Kalgutkar et al. 1998). Hierbei wurde von 2-Aminophenol als Startsubstanz ausgegangen und dann durch Alkylhalogenide die Wasserstoffatome gegen Alkylgruppen substituiert.

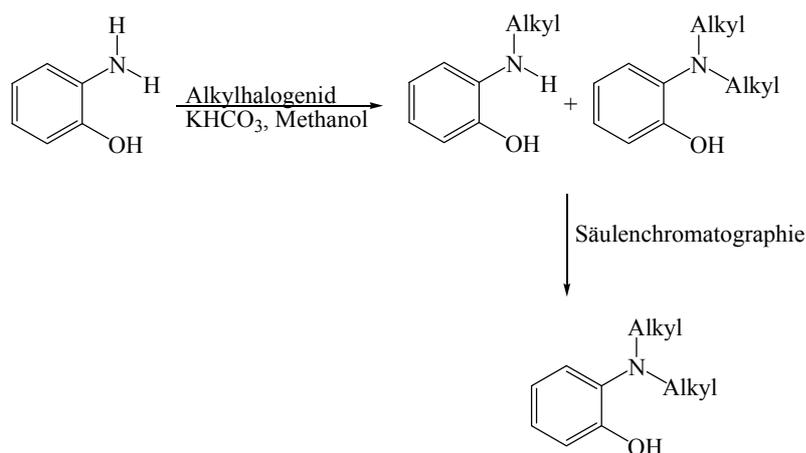


Abb. 4-2: Schematischer Verlauf der Synthesen der N,N-Dialkyl-2-aminophenole

2-Aminophenol (1.0 g, 9.16 mmol) wurde in 5 mL wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst. KHCO_3 (0.95 g, 9.5 mmol) und das entsprechende Alkylhalogenid (siehe Tabelle 5.2) wurden hinzugefügt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde nach Reaktionsende mit 100 mL dest. Wasser verdünnt und viermal mit je 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zweimal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand säulenchromatographisch auf Silicagel mit Hexan als Eluent aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels GC-MS und Dünnschichtchromatographie (FM: Diethylether) auf ihre Reinheit hin überprüft. Fraktionen, die dialkylierte Produkte enthielten, wurden vereinigt und mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und GC-MS untersucht. Tabelle 5-2 zeigt die verschiedenen Synthesen mit dem jeweils eingesetzten Alkylhalogenid sowie die Produktausbeuten nach einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie.

Tab. 4-2: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Synthesen der N,N-Dialkyl-2-aminophenole

Ausgangssubstanz	Produkt	Akylhalogenid	Reaktionsdauer [h]	Ausbeute [mg; %]
2-Aminophenol	N,N-Dimethyl-2-aminophenol (2-2*)	$\text{CH}_3\text{-I}$ (15 mmol)	5	87; 8.7
2-Aminophenol	N,N-Diethyl-2-aminophenol (3-2*)	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Br}$ (20 mmol)	8	56; 5.6

HRGC-EI-MS (70 eV) von N,N-Dimethyl-2-aminophenol (**2-2***)

R_t (Carbowax) = 22.70 min

m/z (%) = 137 (100), 136 (52), 122, (34), 120 (17), 94 (24)

$^1\text{H-NMR}$: 2.66 (s,6H), 6.86 (ddd, 1H, $J=7.8$ Hz), 6.94 (dd, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.06 (ddd, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J=7.8$ Hz), 8.31 (s,1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 42.73, 115.45, 118.13, 122.10, 149.92

HRGC-EI-MS (70 eV) von N,N-Diethyl-2-aminophenol (3-2*)R_t (Carbowax) = 22.19 min

m/z (%) = 165 (37), 151 (10), 150, (100), 122 (14), 120 (18), 94 (9)

¹H-NMR: 0.89 (t, 6H), 2.82 (q, 4H), 6.85 (ddd, 1H, J=7.80 Hz), 6.94 (dd, 1H, J=7.80 Hz), 7.00 (ddd, 1H, J=7.80 Hz), 7.13 (dd, 1H, J=7.80 Hz), 8.32 (s, 1H)¹³C-NMR: 12.07, 46.76, 114.69, 118.97, 122.46, 152.51

4.4.2 Synthese von N,N-Dialkyl-4-aminophenolen

Die Synthese der N,N-Dialkyl-4-aminophenole setzte das Arbeiten mit einer als Methoxygruppe geschützten OH-Gruppe voraus, da N,N-Dialkyl-4-aminophenole relativ instabil sind. Als Edukt wurde das 4-Anisidin eingesetzt, das durch Alkylhalogenide N-alkyliert wurde (Abb. 4-3). Mittels Säulenchromatographie wurde das dialkylierte Produkt gewonnen. Durch Behandlung mit Bromwasserstoffsäure wurde die Methoxygruppe entfernt und durch Einwirkung einer milden Base wurden die N,N-Dialkyl-4-aminophenole erhalten.

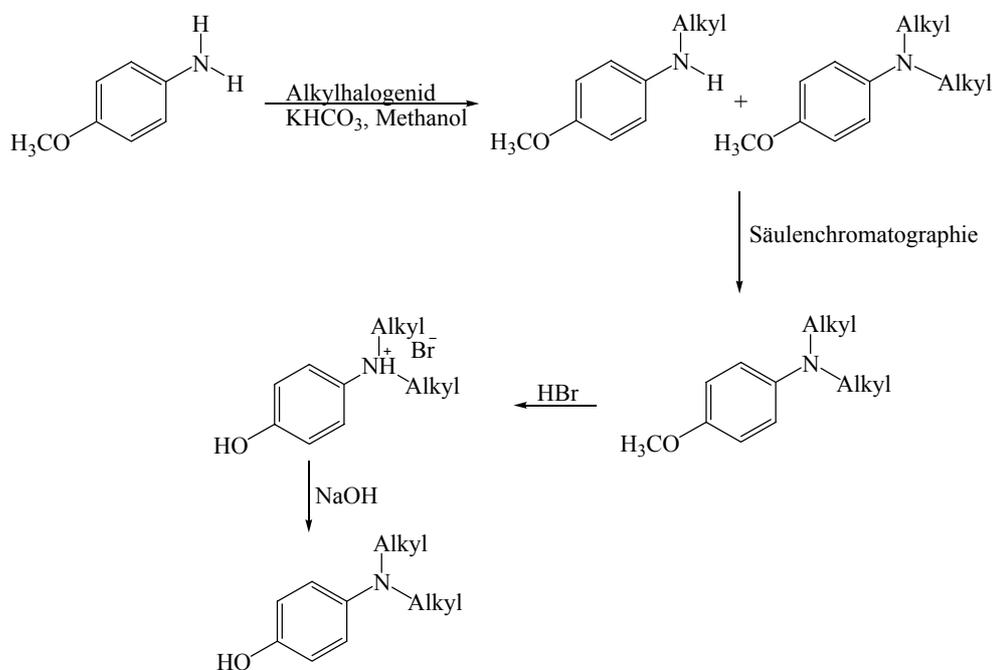


Abb. 4-3: Schematischer Verlauf der Synthese der N,N-Dialkyl-4-aminophenole

4-Anisidin (0.5 g, 4.0 mmol) wurden in 20 mL Methanol gelöst und KHCO_3 (0.47 g, 4.7 mmol) hinzugefügt. Nach Zugabe des entsprechenden Alkylhalogenids (siehe Tabelle 5-3) wurde unter Rückfluß erhitzt (Lee et al. 1998). Die Lösung wurde nach Reaktionsende mit 100 mL dest. Wasser verdünnt und viermal mit je 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden zweimal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand säulenchromatographisch auf Silicagel mit Hexan-Diethylether (99:1) als Eluent aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels GC-MS und Dünnschichtchromatographie (Hexan-Diethylether; 50:50) auf ihre Reinheit hin überprüft. Fraktionen, die die dialkylierten Anisidine enthielten, wurden vereinigt. Die so erhaltenen, reinen N,N-Dialkyl-4-methoxybenzene wurden in 48%iger Bromwasserstoffsäure unter Rückfluß und Argonatmosphäre für 5 h erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde unter erniedrigtem Druck zur Trockene eingengt. Der kristalline Rückstand wurde mit einer Mischung aus Dichlormethan-Tetrahydrofuran 1:1 solange gewaschen, bis klare Kristalle erhalten wurden. Nach Abblasen des restlichen Lösungsmittels wurden die reinen Produkte als Hydrobromid-Salze erhalten. Durch Behandlung mit einer milden Base wurden daraus die entsprechenden N,N-Dialkyl-4-aminophenole erhalten. Diese wurden umgehend mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie GC-MS charakterisiert. Tab. 4-3 zeigt die verschiedenen Synthesen mit dem jeweils eingesetzten Alkylhalogenid sowie die Produktausbeuten nach einer Aufreinigung durch Säulenchromatographie.

Tab. 4-3: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Synthesen der N,N-Dialkyl-4-aminophenolen

Ausgangssubstanz	Produkt	Alkylhalogenid [mmol]	Reaktionsdauer [h]	Ausbeute [mg; %]
4-Anisidin	N,N-Dimethyl-4-aminophenol (2-2*)	$\text{CH}_3\text{-I}$ [15]	4	38; 7.6
4-Anisidin	N,N-Diethyl-4-aminophenol (3-2*)	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Br}$ [17]	6	63; 12.6

HRGC-EI-MS (70 eV) von N,N-Dimethyl-4-aminophenol (**2-4***)

R_t (Carbowax) = 42.87 min

m/z (%) = 137 (85), 136 (100), 121, (24), 120 (14), 94 (8)

$^1\text{H-NMR}$: 3.04 (s, 6H), 6.90 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 10.14 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 45.76, 116.05, 122.03, 134.69, 157.88

HRGC-EI-MS (70 eV) von N,N-Diethyl-4-aminophenol (**3-4***)

R_t (Carbowax) = 43.86 min

m/z (%) = 165 (40), 151 (11), 150 (100), 122 (31), 121 (11), 120 (17), 94 (7)

$^1\text{H-NMR}$: 0.98 (t,6H), 2.92 (q,4H), 6.92 (d, 2H, $J=8.80$ Hz), 7.65 (d, 2H, $J=8.80$ Hz), 10.07 (s,1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 25.07, 30.67, 116.34, 123.58, 135.82, 156.83

4.4.3 Synthese von N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol

Ausgangsprodukt für die Synthese des asymmetrisch substituierten N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenols (**1-2***) war das kommerziell erhältliche N-Methyl-2-anisidin (0.54 g, 4 mmol). Die Alkylierung wurde mit Ethylbromid in methanolischer Lösung durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sowie die Durchführung dieser Synthese sind identisch mit den in Kapitel 5.4.2 beschriebenen Synthesen. Eingesetzt wurden 10 mmol an Ethylbromid.

HRGC-EI-MS (70eV) von N-Ethyl-N-methyl-2-aminophenol (**1-2***)

R_t (Carbowax) = 22.25 min

m/z (%) = 151 (50), 136 (100), 120 (20), 108 (9), 94 (8)

¹H-NMR: 1.27 (t, 3H), 2.91 (q, 2H), 3.52 (s, 3H), 6.92 (ddd, 1H, $J=7.80$), 6.98 (dd, 1H, $J=7.8$ Hz), 7.10 (dd, 1H, $J=7.80$), 7.15 (ddd, 1H, $J=7.80$), 8.35 (s, 1H)

¹³C-NMR: 13.88, 20.69, 30.13, 108.59, 115.29, 140.29, 147.94

Ausbeute: 29 mg; 5.3 %

4.4.4 Synthese von N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol

Die Synthese von N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (**1-4***) wurde, ausgehend von N-Methyl-4-anisidin (0.54 g, 4 mmol), durchgeführt. Auch hier wurde die Alkylierung mit Ethylbromid im Alkalischen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sowie die Durchführung dieser Synthese sind identisch mit den in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Synthesen. Eingesetzt wurden 10 mmol an Ethylbromid.

HRGC-EI-MS (70eV) von N-Ethyl-N-methyl-4-aminophenol (**1-4***)

R_t (Carbowax) = 43.51 min

m/z (%) = 151 (42), 136 (100), 121 (21), 120 (14), 94 (7)

¹H-NMR: 1.32 (t, 3H), 2.99 (s, 3H), 3.62 (q, 2H), 6.95 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 10.16 (s, 1H)

¹³C-NMR: 10.97, 37.41, 46.92, 114.69, 114.88, 143.78, 150.74

Ausbeute: 41 mg; 7.59 %

4.4.5 Synthese von N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin

N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) wurde entsprechend einer Methode nach Bertrand et al. synthetisiert (Bertrand et al. 2000, vgl. Abb. 4-4).

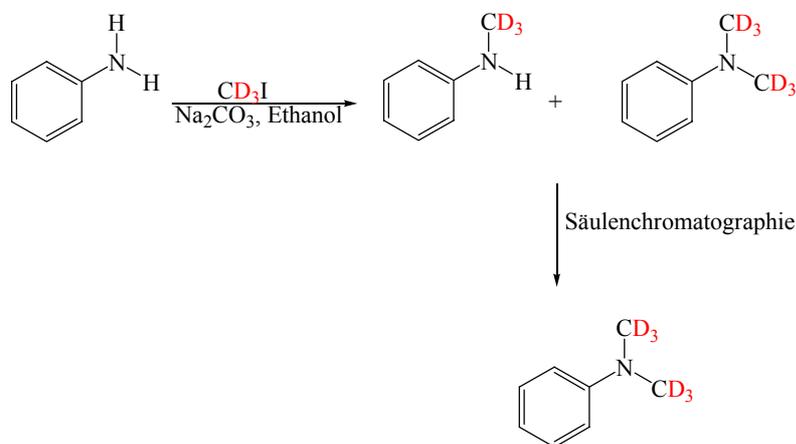


Abb. 4-4: Schematischer Verlauf der Synthese von N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**)

Trideuteriodomethan (1 g, 6.90 mmol) wurde tropfenweise zu einer Mischung aus Anilin (0.24 g, 2.58 mmol), Na₂CO₃ (0.28 g, 3.48 mmol) und Ethanol (0.5 mL) hinzugefügt. Die Mischung wurde 10 h unter Rückfluss erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine wässrige Lösung aus Dimethylamin (2.3 mL, 40%ig) wurde hinzugefügt und die Mischung für 3 h auf einem Wasserbad erhitzt. Danach wurden 0.16 mL NaOH (2 N) hinzugefügt und das Gemisch mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und der Ether unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Hexan angelöst und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan-Diethylether 9:1). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels GC-MS sowie Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit hin überprüft (Hexan-Diethylether 9:1). Fraktionen, die nur das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt. Das Reinprodukt wurde bis zur Inkubation unter Argonatmosphäre und Kühlung gelagert.

HRGC-EI-MS (70eV) von N,N-Di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**)

R_t (Carbowax) = 18.95 min

m/z (%) = 127 (71), 126 (15), 125 (100), 107 (12), 105 (9), 77 (10)

Ausbeute: 36 %; 80 mg

4.4.6 Synthese von N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin

Die Synthese von N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) wird analog der Synthese in 4.4.5 durchgeführt. Als Methylierungsreagenz wurde ¹³C-Methyljodid verwendet.

HRGC-EI-MS (70eV) von N,N-Di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**)

R_t (Carbowax) = 18.90 min

m/z (%) = 123 (74), 122 (100), 106 (13), 105 (16), 77 (10)

Ausbeute: 43 %; 100 mg

4.4.7 Synthese von N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin

Die Synthese wird nach dem gleichen Schema und mit identischen Mengen ausgeführt wie für die Synthesen von N,N-di-(trideuteromethyl)-anilin (**31**) bzw. N,N-di-[methyl-¹³C]-anilin (**33**) (vgl. Abb. 4-5). Allerdings wird als Ausgangssubstanz nicht Anilin, sondern N-Ethylanilin verwendet.

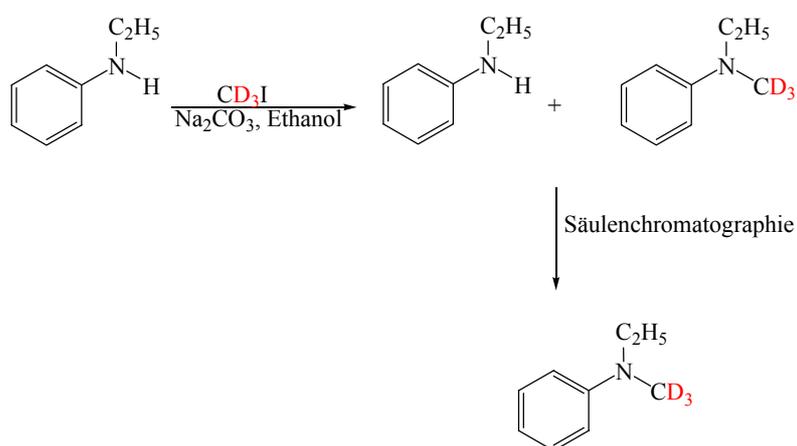


Abb. 4-5: Schematischer Verlauf der Synthese von N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin

HRGC-EI-MS (70eV) von N-Ethyl-N-(trideuteromethyl)-anilin (**32**)

R_t (Carbowax) = 20.48 min

m/z (%) = 138 (34), 124 (10), 123 (100), 105 (11), 104 (10), 77 (14)

Ausbeute: 50 mg; 24 %

4.4.8 Synthese von N-Ethyl-N-[methyl- ^{13}C]-anilin

Die Synthese von N-Ethyl-N-[methyl- ^{13}C]-anilin (**34**) wird analog der Synthese in 4.4.7 durchgeführt. Als Methylierungsreagenz wurde ^{13}C -Methyljodid verwendet.

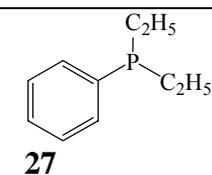
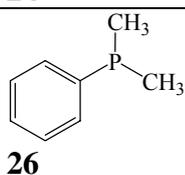
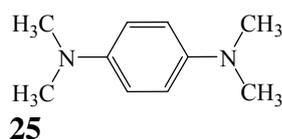
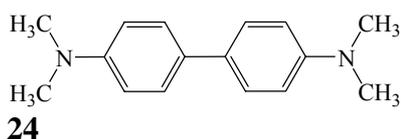
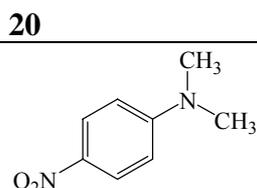
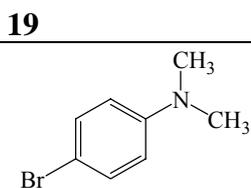
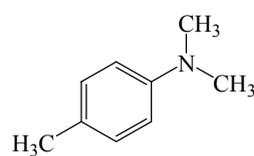
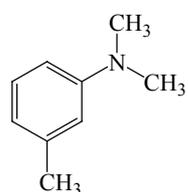
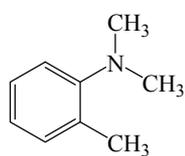
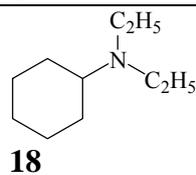
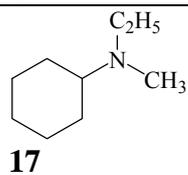
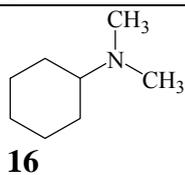
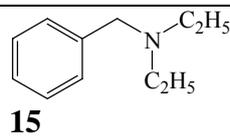
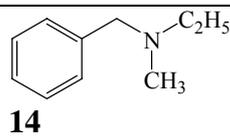
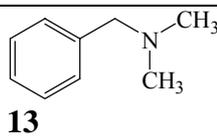
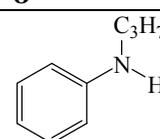
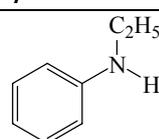
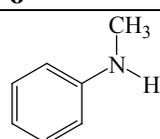
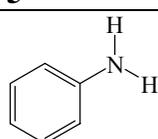
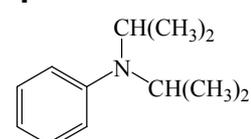
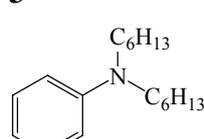
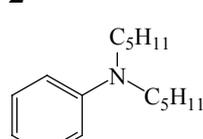
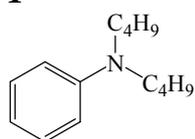
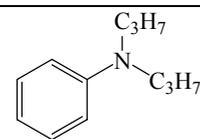
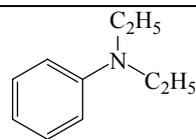
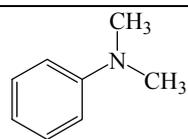
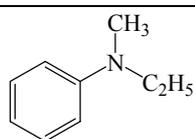
HRGC-EI-MS (70eV) von N-Ethyl-N-[methyl- ^{13}C]-anilin (**34**)

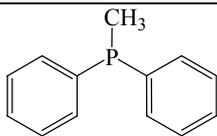
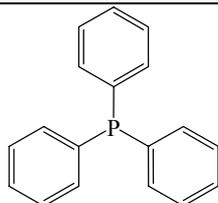
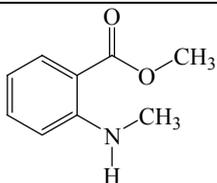
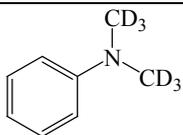
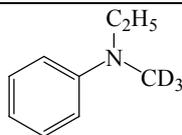
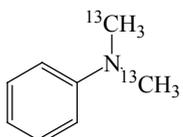
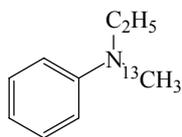
R_t (Carbowax) = 20.49 min

m/z (%) = 136 (35), 122 (10), 121 (100), 105 (12), 104 (12), 77 (18)

Ausbeute: 70 mg; 32 %

Strukturmatrix



**28****29****30****31****32****33****34**

Literaturverzeichnis

Ackland, M. J.; Correlation between site specificity and electrophilic frontier values in the metabolic hydroxylation of biphenyl, di-aromatic and CYP2D6 substrates: a molecular modelling study. *Xenobiotica* **1993**, *23*, 1135-1144.

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., Häring, D., Schreier, P.; Biotransformations with peroxidases. In T. Scheper (ed.) *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Springer Verlag, Heidelberg, **1999**.

Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Yamada, H.; Biotechnology of amino acid production. *Progress in industrial microbiology*. Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, **1986**.

Akasaka, R., Mashino, T., Hirobe, M.; Hydroxylation of benzene by horseradish peroxidase and immobilized horseradish peroxidase in an organic solvent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1861-1864.

Amann, R.; Wie kommt eigentlich die schwarze Johannisbeere in die Scheurebe? *Der Badische Winzer* **2002**, *12*, 25-30.

Appleby, C. A.; A soluble haemoprotein P-450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *147*, 399-402.

Armstrong, D. W., Yamazaki, H.; Aliphatic, aromatic, and lactone compounds. In A. Gabelman (ed.) *Bioprocess production of flavour, fragrance, and color ingredients*, Wiley, New York, **1994**.

Ash, C.; Farrow, J. A. E.; Walbanks, S.; Collins, M. D.; Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacilli* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **1991**, *13*, 202-206.

Avery, M. L., Decker, D. G., Humphrey, J. S., Aronov, E., Linscombe, S. D., Way, M. O.; Methyl anthranilate as a rice seed treatment to deter birds. *J. Wildl. Manage.* **1995**, *59*, 50-56.

Axelrod, J.; The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1956**, *117*, 322-30.

Azerad, R.; Microbial models for drug metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, *63*, 169-218.

- Baciocchi, E., Lanzalunga, O., Lapi, A., Manduchi, L.; Kinetic deuterium isotope effect profiles and substituent effects in the oxidative N-demethylation of N,N-dimethylaniline catalyzed by tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin iron (III) chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5783-5787.
- Ballard, S. A., Lodola, A., Tarbit, M. H.; A comparative study of 1-substituted imidazole and 1,2,4-triazole antifungal compounds as inhibitors of testosterone hydroxylations catalysed by mouse hepatic microsomal cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 4643-51.
- Banerjee, A., Grewer, C., Ramakrishnan, L., Jaeger, J., Hess, G. P.; Toward the development of new photolabile protecting groups that can rapidly release bioactive compounds upon photolysis with visible light. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8361-8367.
- Banerjee, A., Carpenter, B. K., Hess, G. P.; Development of new photolabile protecting groups that can rapidly release bioactive compounds on photolysis with visible light. *Polymer Preprints* **2000**, *41*, 885-886.
- Bangcharoenpaupong, O., Champion, P. M., Jollie, D., Sligar, S. G.; Resonance Raman detection of bound dioxygen in cytochrom P-450cam. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8089-8092.
- Baskin S. I., Horowitz, A. M., Nealley, E. W.; The antidotal action of sodium nitrite and sodium thiosulphate against cyanide poisoning. *J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *32*, 368-375.
- Baumert, A., Hieke, M., Gröger, D.; N-Methylation of anthanilic acid to N-methyl-anthranilic acid by cell-free extracts of *Ruta graveolens* tissue cultures. *Planta medica* **1983**, *48*, 258-262.
- Bedoukian, P. Z.; Perfumery and flavouring synthesis, 3rd ed.; Allured Publishing Corp.: Wheaton, IL, **1986**.
- Berg, A., Rafter, J. J.; Studies on the substrate specificity and inducibility of cytochrome P-450meg. *Biochem. J.* **1981**, *196*, 781-86.
- Berger, R. G., Drawert, F., Hadrich, S.; Microbial sources of flavour compounds. In: Schreier P. (ed.), Bioflavour 1987, de Gruyter, Berlin, **1987**.
- Berger, R. G.; Aroma biotechnology. Springer Verlag, Berlin, **1995**.
- Bertrand, S., Hoffmann, N., Humbel, S., Pete, J. P.; Diastereoselective tandem addition-cyclization reactions of unsaturated tertiary amines initiated by photochemical electron transfer (PET). *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8690-8703.
- Bhattacharya, R., Jeevaratnam, K., Raza, S. K., Dasgupta S.; Cyanide antagonism in a rodent model. *Arch. Toxicol.* **1991**, *14*, 231-235.

- Bhattacharya, R.; Antidotes to cyanide poisoning: present status. *Ind. J. Pharmacol.* **2000**, *32*, 94-101.
- Bickel, M. H.; The pharmacology and biochemistry of N-Oxides. *Pharmacol. Rev.* **1969**, *21*, 325-355.
- Bird, S. T., Legge, M., Walzer R. J.; Formaldehyde scavenging from peritoneal dialysis solutions using reduced aminothiols compounds. *Nephrology* **2004**, *9*, 65-72.
- Blain Metting Jr., F.; Soil microbiology ecology, Marcel Dekker Inc., New York, **2000**.
- Bluemke, W., Schrader, J.; Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavours and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomol. Eng.* **2001**, *17*, 137-142.
- Bondon, A., MacDonald, T. L., Harris, T. M., Guengerich, F. P.; Oxidation of cycloalkylamines by cytochrome P-450. Mechanism-based inactivation, adduct formation, ring expansion, and nitrene formation. *J. Biol. Chem.* **1988**, *264*, 1988-1997.
- Boland, W., Frössl, C., Lorenz, M.; Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis* **1991**, *12*, 1049-1072.
- Bonvehí, J. S., Coll, F. V.; Characterization of citrus honey (*Citrus* Spp.) produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2053-2057.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J.; Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations. Weinheim, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- Brossier, F., Weber-Levy M.; Mock, M., Sirard J. C.; Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1781-1786.
- Buchanan, J. F., Fulco, A. J.; Formation of 9, 10-epoxy palmitic acid 9, 10-dihydroxypalmitate from palmitoleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 1254-1260.
- Burka, L. T., Guengerich, F. P., Willard, R. J., Macdonald, T. L.; Mechanism of cytochrome P-450 catalysis. Mechanism of N-dealkylation and amine oxide deoxygenation. *J. Amer. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2549-2551.
- Burton, S. G., Cowan, D. A., Woodley, J. M.; The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 37-45.
- Byrne, K. M., Smith, S. K., Ondeyka, J. G.; Biosynthesis of nodulisporic acid A: precursor studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7055-7060.
- Carraro, E., Gasparini, S., Gilli, G.; Identification of a chemical marker of environmental exposure to formaldehyde. *Environ. Res.* **1999**, *80*, 132-137.

- Casella, L., Poli, S., Gullotti, M., Selvaggini, C., Beringhelli, T., Marchesini, A.; The chloroperoxidase-catalyzed oxidation of phenols. Mechanism, selectivity, and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochem.* **1994**, *33*, 6377-6386.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J., Franklin, M.; A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* **1977**, *81*, 461-466.
- Cavalieri, E.L., Rogan, E. G., Cremonesi, P., Devanesan, P. D.; Radical cations as precursors in the metabolic formation of quinones from benzo[a]pyrene and 6-fluorobenzo[a]pyrene. Fluoro substitution as a probe for one-electron oxidation in aromatic substrates. *Biochem Pharmacol.* **1988**, *37*, 2173-82.
- Cavalierli, E. L., Rogan, E. G. ; The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis – the central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol. Therap.* **1992**, *55*, 183-199.
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., Sanders, A. G.; Penicillin as chemotherapeutic agent. *Lancet* **1940**, *II*, 226-228.
- Chain, E., Florey, H. W.; Penicillin. *Endeavour* **1944**, *3*, 3-14.
- Chance, B.: The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. *Arch. Biochem.* **1952**, *41*, 416-424.
- Cherry, J. R., Fidantsef A. L; Direct evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Op. Biotechnol.* **2003**, *14*, 438-443.
- Collins, R. P.; Terpenes and odoriferous materials from microorganisms. *Lloydia* **1976**, *39*, 20-24.
- Conaway, C. C., Whysner J., Verna, L. K., Williams G. M.; Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol. Ther.* **1996**, *71*, 29-55.
- Coon, M. J., Ding, X., Pernecky, S. J., Vaz, A. D. N.; Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **1992**, *6*, 669-673
- Corbett, J. F., Sharma R. K., Dressler, W. E., Cosmetic Toxicology *In*: H. Marquart, S. G. Schäfer, R. McClellan, F. Welsch (eds.) Toxicology, Academic Press, San Diego, **1999**.
- Cowan, D. A., Patterson, L. H., Lyaquatali, A. D., Gorrod, J. W.; Metabolism of 4-substituted-N-ethyl-N-methylanilines: chromatographic and mass spectrometric identification of N-oxidation metabolic products formed *in vitro*. *Biomed. Mass Spectrometry* **1982**, *9*, 233-240.

Cowan, D. A., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., Wittwer, P.; Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 321-329.

Dawson, J. H., Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* **1988**, *240*, 433-439.

De Boer, E., van Kooyk, Y., Tromp, M. G. M., Plat, H., Wever, R.; Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *869*, 48- 53.

De Ley J., Cattoir, H., Reynaerts, A.; The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, 133-142.

Dekant, W., Vamvakas, S.; Toxikologie für Chemiker und Biologen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1995**.

Demain, A. L., Biotechnology: an environment where microbiology, genetics, chemistry and engineering meet. *Curr. Stud. Biotechnol.* **2001**, *2*, 1-11.

Dordick, J. S., Klibanov, A. M., Marletta, M. A.; Horseradish peroxidase catalyzed hydroxylations: mechanistic studies. *Biochem.* **1986**, *25*, 2946-2951.

Drawert, F., Barton, H.; Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 765-766.

Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L., Budowle, B.; An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequences analysis. *J. Forensic Sci.* **2002**, *4*, 811-818.

Eegriwe, E.; Reactions and reagents for the detection of organic compounds. *Z. Anal. Chem.* **1937**, *110*, 22-25.

Eilert, U., Wolters, B.; Elicitor induction of S-adenosyl-L-methionine: anthranilic acid N-methyltransferase activity in cell suspensions and organ cultures of *Ruta graveolens* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1989**, *18*, 1-18.

Eisenbrand, G., Schreier, P.; Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.

Elander, R. P.; Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 385-392.

Elbers, R., Eyer, P., Kampffmeyer, H., Soboll, S.; Organ toxicity and metabolic pathway of 4-Dimethylaminophenol. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1982**, *136*, 419-429.

Erman, J. E., Vitello, L. B.; Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochim Biophys Acta*. **2002**, *1597*, 193-220.

Faber, K., Kroutil, W.; New enzymes for biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 181-187.

Fabre, C. E., Blanc, P. J., Goma, G.; Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sci. Aliment.* **1996**, *16*, 61-68.

Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A.; GC-IRMS analysis of mandarin essential oils. 1. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{PDB}}$ values of methyl N-methylantranilate. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2579-2583.

Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A.; GC-IRMS analysis of mandarin essential oils. 2. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ values of characteristic flavour components. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4719-4725.

Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G., Asther, M.; Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: identification of metabolic pathways. *J. Biotechnol.* **1994**, *37*, 123-132.

Forth, W., Henschler, D. Rummel, W.; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer, München, **1996**.

Fritsche, F. S.; Über die Produkte der Einwirkung des Kali auf das Indigoblau *J. Prakt. Chemie* **1841**, *23*, 67-83.

Frizzo, C. D., Lorenzo, D., Dellacassa, E.; Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern brazil. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3036-3041.

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 glycols. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265-7270.

Fung, Y. S., Long, Y.; Determination of carbonyl compounds in air by electrochromatography. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2270-7.

Galliani, G., Rindone, B., Dagnino, G., Salmona, M.; Structure-activity relationships in the microsomal oxidation of tertiary amines. *Eur. J. Drug. Metab.* **1984**, *9*, 289-293.

Garfinkel, D.; Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal functions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *77*, 493-509.

Gaudineau, C., Auclair, K.; Inhibition of human P450 enzymes by nicotinic acid and nicotinamide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 950-56.

Gorrod, J. W., Temple, D. J., Beckett, A. H.; Metabolism of N-ethyl-N-methylaniline by rabbit liver microsomes. Measurement of metabolites by gas-liquid chromatography. *Xenobiotica* **1975**, *5*, 453-463.

Gorrod, J. W., Temple, D. J.; The formation of an N-hydroxymethyl intermediate in the N-demethylation of N-methylcarbazole *in vitro* and *in vivo*. *Xenobiotica* **1976**, *6*, 265-274.

Gorrod, J. W., Patterson, L. H.; Evidence for p-hydroxylation of N-ethyl-N-methylaniline. *Xenobiotica* **1980**, *10*, 603-610.

Gorrod, J. W., Gooderham, N. J.; The *in vitro* metabolism of N,N-dimethylaniline by guinea pig and rabbit tissue preparations. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1981**, *6*, 195-206.

Gray, J. I.; Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1978**, *55*, 539-546.

Griffin, B. W., Chloroperoxidase: A review. *In: Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B. (eds.) Peroxidases in chemistry and biology*, CRC Press: Boca Raton, FL, **1991**.

Goeptar, A. R., Scheerens H., Vermeulen, N. P. E.; Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* **1995**, *25*, 25-65.

Grones, J., Turna, J.; Transformations of microorganisms with the plasmid vector with the replication from pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *206*, 942-947.

Grothusen, A., Hardt, J., Brautigam, L., Lang, D., Bocker, R.; A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arch. Toxicol.* **1996**, *71*, 64-71.

Gross, B., Yonnet, G., Picque, D., Brunerie, P., Corrieu, G., Asther, M.; Production of methylanthranilate by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* (Karst.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 387-391.

Guengerich, F. P., Macdonald, T. L.; Chemical mechanisms of catalysis by cytochromes P-450: a unified view. *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 9-16.

Guengerich, F. P., Böcker, R. H.; Cytochrome P-450-catalyzed dehydrogenation of 1,4-dihydropyridines. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8168-8175.

Guengerich, F. P., Yun, C. H., MacDonald, T. L.; Evidence for a one-electron mechanism in N-dealkylation of N,N-dialkylanilines by cytochrome P450 2B1. Kinetic hydrogen isotope effects, linear free energy relationships with biomimetic models, comparisons with horseradish peroxidase, and studies with oxygen surrogates. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27321-27329.

- Gunsalus, I. C., Wagner, G. C.; Bacterial P-450cam methylene monooxygenase components: cytochrome m, putidaredoxin and putidaredoxin reductase. *Meth. Enzymol.* **1978**, *52*, 166-188.
- Hanna, P.; Anthrax pathogenesis and host response. *Curr. Top. Microbiol.* **1998**, *225*, 13-35.
- Hantzsch, A.; Zur Konstitution des Pyridins. *Ber. Dt. Chem. Gesell.* **1884**, *17*, 1512-1515.
- Hardmann, J. G., Libird, L. E., Matinoll P. B., Ruddon R. V.; In J. G. Hardmann, L.E. Libird, P. B. Matinoll, R. V. Ruddon (eds.) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Edition, McGraw-Hill, New York, **1995**.
- Hardy, S. P., Lund, T., Granum, P. E.; CytK toxin of *Bacillus cereus* forms spores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *197*, 47-51.
- Harmsen, D., Rothgänger, J., Frosch, M., Albert, J.; RIDOM: ribosomal differentiation of medical microorganisms database. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 416-417.
- Hayashi T, Reece CA, Shibamoto T. A new analytical method for volatile aldehydes. *ACS Symposium Series* **1985**, *289*, 61-78.
- Hayashi, T., Reece C. A., Shibamoto, T.; Gas chromatographic determination of formaldehyde in coffee via thiazolidine derivative. *J. Assoc. Off. Anal.* **1986**, *69*, 101-105.
- Hebeda, R. E., Styrlund, C. R., Teague, W. M.; Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. *J. Biol. Chem.* **1988**, *40*, 30-36.
- Heckel, F.; Biokatalytische enantioselektive Sulfoxidation. Dissertation, Universität Würzburg, **2004**.
- Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J., Demuyneck, C.; Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1357-1360.
- Heedegaard, J., Gunsalus, I. C.; Mixed function oxidation IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 4038-4043.
- Heimbrook, D. C., Murray, R. I., Egeberg, K. D., Sligar, S. G., Nee, M. W., Bruice, T. C.; Demethylation of N,N-dimethylaniline and p-cyano-N,N-dimethylaniline and their N-oxides by cytochrome P450_{LM2} and cytochrome P450_{CAM}. *J. Amer. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1514-1515.
- Henderson I. S.; Composition of peritoneal dialysis solutions: potential hazards. *Blood Purif.* **1989**, *7*, 86-94.

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

Holland, H. L.; Carey, M., Kumaresan, S.; Fungal biotransformation of organophosphines. *Xenobiotica* **1993**, *23*, 519-524.

Hollenberg, P. F., Miwa, G. T., Walsh, J. S., Dwyer, L. A., Rickert, D. E., Kedderis, G. L.; Mechanisms of N-demethylation reactions catalyzed by cytochrome P-450 and peroxidases. *Drug Metab. Dispos.* **1985**, *13*, 272-275.

Holzgrabe, U.; Development of antibiotics today and yesterday. *Chemotherapie* **2004**, *13*, 142-147.

Holzgrabe, U., Bechthold, A.; Antibiotic chemotherapeutics. *Deutsche Apotheker Zeitung* **2000**, *140*, 813-823.

Horn, F.; The fate of diethylaniline and diethylaniline oxide in the animal body. *Z. physiol. Chem.* **1937**, *249*, 82-84.

Huang, T. C., Huang, L. Z., Ho, C. T.; Mechanistic studies on thiazolidine formation in aldehyde/cysteamine model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 224-227.

Huss, V. A. R., Festl, H., Schleifer, K. H.; Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *System. Appl. Microbiol.* **1983**, *4*, 184-192.

Hutter, R., Niederberger, P., DeMoss, J. A.; Tryptophan biosynthetic genes in eukaryotic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **1986**, *40*, 55-77.

Ikeda, M., Nakagawa, S.; The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 99-109.

Ito, Y., Sugimoto, A., Kakuda, T., Kubota, K.; Identification of potent odorants in chinese jasmine green tea scented with flowers of *Jasminum sambac*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4878-4884.

Janos, E., Balla, J., Tyhiak, E., Gaborjanyi, R.; Gas-liquid chromatographic analysis of dimedone derivatives of formaldehyde and other aliphatic aldehydes on capillary columns. *J. Chromatogr.* **1980**, *191*, 239-44.

Janssens, L., Depooter, H. L., De Mey L., Vandamme E. J., Schamp, N. M.; Fusel oil as a precursor for the microbial production of fruity flavours. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, **1989**, *54*, 1387-1391.

Janssens, L., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., Vandamme E. J.; Production of flavours by microorganisms. *Proc. Biochem.* **1992**, *27*, 195-215.

- Jenkins, C. M., Waterman, M. R.; Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P-450c17 hydroxylase activities. *J. Bio. Chem.* **1994**, *269*, 27401-27408.
- Jerina, D. M., Daly, J. W., Witkop, B., Zaltzmann-Nirenburg, D., Udenfried, S.; The role of arene oxide-oxepin systems in the metabolism of aromatic substrates. 3. Formation of 1,2-naphthalene oxide from naphthalene by liver microsomes. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6525-6527.
- Jerina, D. M., Daly, J. W., Witkop, B., Zaltzmann-Nirenburg, D., Udenfried, S.; 1,2-naphthalene oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. *Biochem.* **1970**, *9*, 147-155.
- Jerina, D. M., Daly, J. W.; Arene oxides: A new aspect of drug metabolism. *Scienc* **1974**, *185*, 573-582.
- Johne, S., Waiblinger, K., Gröger, D.; Biosynthesis of the quinazoline alkaloid arborine. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *15*, 415-420.
- Jones, J. P., Rettie, A. E., Trager, W. F.; Intrinsic isotope effects suggest that the reaction coordinate symmetry for the cytochrome P-450 catalyzed hydroxylation of octane is isozyme independent. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1242-1246.
- Kalgutkar, A. S., Kozak, K. R., Crews, B. C., Hochgesang, G. P., Marnett, L. J., Hancock, A. B.; Covalent modification of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 2-acetoxyphenyl alkyl sulfides, a new class of selective COX-2 inactivators. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4800-18
- Kawamura, M., Keim, P. S., Goto, Y., Zalkin, H., Henrikson, R. L.; Anthranilate synthetase component II from *Pseudomonas putida*. Covalent structure and identification of the cysteine residue involved in catalysis. *J. Biol. Chem.* **1978**, *10*, 4659-68.
- Kedderis, G. L., Koop, D. R., Hollenberg, P. F.; N-Demethylation reactions catalyzed by chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10174-10182.
- Kedderis, G. L., Hollenberg, P. F.; Characterization of the N-demethylation reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8129-8138.
- Kenichiro, S., Akira, N., Hideaki, O.; Perfume composition for liquid bath preparations. Japanese Patent, JP 20002-246207, **2004**.
- Kenji, K., Masuda, H.; Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavour dilution technique. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5660-5663.
- Kersey, R. W.; Determination of small amounts of formaldehyde in air. *Analyst* **1940**, *65*, 203-6.

Kettrup, A., Stenner, H., Heuel, J., Lorek, W.; Determination of formaldehyde in room atmosphere by headspace gaschromatography. *In* B. Kolb (ed.) Applied HSGC, Heyden & Son, London, **1980**.

Khajehdehi, P.; Toxemic shock, hematuria, hypokalemia and hypoproteinemia in a case of cutaneous anthrax. *Mt. Sinai J. Med.* **2001**, *68*, 213-215.

Kiese, M., Renner, G.; Urinary metabolites of N,N-diethylaniline produced by dogs. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* **1974**, *283*, 143-150.

Kikue, K., Yuriko, I., Akio, S., Kadota, T.; Flavoring compositions containing (*R*)-linalool and methyl anthranilate for tea beverage. Japanese Patent, JP 2002-60867, **2003**.

Kim, B. H., Fulco, A. J.; Induction by barbiturates of a cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*: relationship between barbiturate structure and inducer activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *116*, 843-850.

Kinoshita, K., Udaka, S., Shimono, M.; Studies on the amino acid fermentation. I. Production of *L*-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1957**, *7*, 193-205.

Kirchner, O., Tauch, A.; Tools for genetic engineering in the amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **2003**, *104*, 287-299.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T.; Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *58*, 169-188.

Kittleson, J. R., Pantaleone, D. P.; Process for the synthesis of natural aromatics. United States Patent, US-5437991, **1994**.

Kiyomitsu, K.; Citrus flavouring materials. Japanese Patent, JP 2002-338193, **2004**.

Kiyomitsu, K.; Odor masking compositions containing fragrant substances for hair cosmetics. Japanese Patent, JP 2001-330894, **2003**.

Klibanov, A. M., Berman, Z., Alberti, B. N.; Preparative hydroxylation of aromatic compounds catalyzed by peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6263-6264.

Klingenberg, M.; Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *75*, 376-386.

Knaggs, A. R.; The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119-36.

Kobayashi, K., Yamamoto, T., Taguchi, M., Chiba, K.; High-performance liquid chromatography determination of N- and O-demethylase activities of chemicals in human

liver microsomes: application of postcolumn fluorescence derivatization using nash reagent. *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 342-347.

Kozlowski, M. C., Bartlett, P. A.; Synthesis of a potential transition-state analog inhibitor of isochorismate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5897-5898.

Krämer, R.; Production of amino acids: physiological and genetic approaches. *Food Biotechnol.* **2004**, *18*, 171-216.

Krings, U., Berger, R. G.; Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 1-8.

Kuehnert, M. J., Doyle, T. J., Hill H. A.; Clinical features that discriminate inhalational anthrax from other acute respiratory illnesses. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 328-336.

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., Gold, M. H.; Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* **1984**, *169*, 247-250.

Lambert, P. A., Allison, D.G., Gilbert, P.; Antibiotics that act on the cell wall and membrane. *Mol. Med. Microbiol.* **2002**, *1*, 591-598.

Lander, N., Soloway, A. H., Minton, J. P., Rawal, B. D., Gairola, C.C.; Potential metabolic mutagens of caffeine and various methylxanthines. *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 955-958.

Lane, D. J.; 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow. (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1991**.

Lau, M. N., Ebeler, J. D., Ebeler, S. E., Gas chromatographic analysis of aldehydes in alcoholic beverages using a cysteamine derivatization procedure. *Am. J. Enol. Viticult.* **1999**, *50*, 324-333.

Lee, A. R., Huang, W. H., Wang, D. P., Chang, L. C., Lee, J. D.; A very simple synthesis of 4-(N,N-dimethylamino)phenol. *J. Med. Sci.* **1995**, *15*, 417-28.

Lee, J. S., Jacobsen, N. E., Ortiz de Montellano, P. R. ; 4-Alkyl radical extrusion in the cytochrome P-450-catalyzed oxidation of 4-alkyl-1,4-dihydropyridines. *Biochem.* **1988**, *27*, 7703-7710.

Leuchtenberger, W.; Amino acids - technical production and use. Products of primary metabolism. In H. J. Rehm and G. Reed (eds.) *Biotechnology*, VCH, Weinheim, **1996**.

Lewis, D. F. V., Pratt, J. M.; The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 739-786.

Lewis, F. D., Ho, T. I.; On the selectivity of tertiary amine oxidations. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1751-1752.

Li, H., Poulos, T. L.; Crystallization of cytochromes P450 and substrate-enzyme interactions. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1789-802.

Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H.; Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, „*Brevibacterium flavum*“ DSM 20411, „*Brevibacterium lactofermentum*“ DSM 2412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distination by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 225-235.

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**.

Lindeke, B.; The non- and postenzymatic chemistry of N-oxygenated molecules. *Drug Metab. Rev.* **1982**, *13*, 71-121.

Lindenmayer, A., Smith, L.; Cytochromes and other pigments of Baker's yeast grown aerobically and anaerobically. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *93*, 445-461.

Linnel, J. L.; The role of cobalamins in cyanide detoxification. In B. Ballantyne, T. C. Marrs (eds.) *Clinical and experimental toxicology of cyanides*, Wright Pub., Bristol, **1987**.

Lizcano, J. M., Unzeta, M., Tipton, K. F.; A spectrophotometric method for determining the oxidative deamination of methylamine by the amine oxidases. *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 75-79.

Locuson, C. W., Wahlstrom, J. L.; Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of cytochromes p450: effect of incorporating higher-affinity ligands and potential new applications. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 873-78.

Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M., Lesage-Meessen, L.; Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 282-289.

Low, D. W., Winkler, J. R., Gray, H. B.; Photoinduced oxidation of microperoxidase-8: generation of ferryl and cation-radical porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 117-120.

Maboudou, P., Mathieu, D., Bachelet, J. F., Wiart, J. F., Lhermitte M.; Detection of oxidative stress. Interest of GC-MS for malondialdehyde and formaldehyde monitoring. *Biomed. Chrom.* **2002**, *16*, 199-202.

- MacDonald, T. L., Zirvi, K., Burka, L. T., Peyman, P., Guengerich, F. P.; Mechanism of cytochrome P-450 inhibition by cyclopropylamines. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2050-2052.
- MacDonald, T. L., Gutheim, W. G., Martin, R. B., Guengerich, F. P., Oxidation of substituted N,N-dimethylanilines by cytochrome P-450: Estimation of the effective oxidation-reduction potential of cytochrome P-450. *Biochem.* **1989**, *28*, 2071-2077.
- Macvanin, M., Hughes, D.; The physiological cost of antibiotic resistance. *Rec. Res. Develop. Microbiol.* **2003**, *7*, 607-629.
- Makino, S., Watarai M., Cheun H. I.; Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 227-233.
- Martinis, S. A., Ropp, J. D., Sligar, S. G., Gunsalus, I. C.; Molecular recognition by cytochrome P-450cam: substrate specificity, catalysis and electron transfer. In: K. Ruckpaul, H. Rein (eds.) Microbial and plant cytochromes P-450: Biochemical characteristics, genetic engineering and practical implications. Frontiers in biotransformation. Vol. 4, Taylor und Francis, London, **1991**.
- Mason, H. S., Onopyrenko, I, Buhler, D.; Hydroxylation; the activation of oxygen by peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1957**, *24*, 225-6.
- Mason, J. R., Avery, M. L., Glahn, J. F., Otis, D. L., Matteson, R. E., Nelms, C. O.; Evaluation of methyl anthranilate and starch-plated dimethylantranilate as bird repellent feed additives. *J. Wildl. Manage.* **1991**, *55*, 182-187.
- McEldoon, J. P., Dordick, J. S.; Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*, 555-558.
- Miyake, T., Shibamoto, T.; Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke. *J. Chromatogr. A.* **1995**, *693*, 376-381.
- Miura, Y., Fulco, A. J.; (ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 1880-1888.
- Miwa, G. T., Walsh, J. S., Kedderis, G. L., Hollenberg, P. F.; The use of intramolecular isotope effects to distinguish between deprotonation and hydrogen atom abstraction mechanism in cytochrome P-450- and peroxidase-catalyzed N-demethylation reactions. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14445-14449.
- Miyashita, K., Kanda, K., Takagi, T.; A simple and quick determination of aldehydes in autoxidized vegetable and fish oils. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1991**, *68*, 748-751.
- Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Cicero, L., Dugo, P., Dugo, G.; Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5602-5606.

Moran, S.; Aversion of the feral pigeon and the house sparrow to pellets and sprouts treated with commercial formulations of methyl anthranilate. *Pest. Manag. Sci.* **2001**, *57*, 248-252.

Munro, A. W., Lindsay, J. G., Coggins, J. R.; Alkane metabolism by cytochrome P-450 BM3. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 412.

Munro, A. W., Malarkey, K., Lindsay, J. G., Coggins, J. R., Price, N. C., Kelly, S. M., McKnight, J., Thomson, A. J., Miles, J. S.; The role of tryptophan 97 of cytochrome P-450 BM-3 from *Bacillus megaterium* in catalytic function. *Biochem. J.* **1994**, *303*, 423-428.

Munro, A. W., Lindsay, J. G.; Bacterial cytochromes P-450. *Mol. Microb.* **1996**, *20*, 1115-1125.

Nagamine, S., Horisaka, E., Fukuyama, Y., Maetani, K., Matsuzawa, R., Iwakawa, S., Asada, S.; Stereoselective reductive metabolism of metyrapone and inhibitory activity of metyrapone metabolites, metyrapol enantiomers, on steroid 11 beta-hydroxylase in the rat. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 188-92.

Nakashima, K., Hidaka, Y., Yoshida, T., Kuroda, N., Akiyama, S.; High performance liquid chromatographic determination of short-chain aliphatic aldehydes using 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescence reagent. *J. Chromatogr. B.* **1994**, *661*, 205-210.

Nanbo, A.; Nanbo, T.; Mechanistic study on N-demethylation catalyzed with P450 by quantitative structure activity relationship using electronic properties of 4-substituted N,N-dimethylaniline. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **2002**, *21*, 613-616.

Narhi, L. O., Fulco, A. J.; Characterization of a catalytically self-sufficient 1190 000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160-7169.

Narhi, L. O., Fulco, A. J.; Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450 BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6683-6690.

Narhi, L. O., Wen, L. P., Fulco, A. J.; Characterization of the protein expressed in *Escherichia coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 gene. *Mol. Cell. Biochem.* **1988**, *79*, 63-71.

Nash, T.; Colorimetric determination of formaldehyde under mild conditions. *Nature* **1952**, *170*, 976.

Nash, T.; The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 416-421.

Nebbia, C., Ceppa, L., Dacasto, M., Nachtmann, C., Carletti, M.; Oxidative monensin metabolism and cytochrome P450 3A content and functions in liver microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. *J. Vet. Pharmacol Ther.* **2001**, *24*, 399-403.

Nebert, D. W., Gonzalez, F. J.; P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 945-993.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrock, R. W., Feyereisen, R., Gonzales, F. J., Coon, m. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D. W.; The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell. Biol.* **1993**, *15*, 1-51.

Nelson, D. R.; Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *369*, 1-10.

Neu, H. C.; The penicillins. Overview of pharmacology, toxicology and clinical use. *New York state journal of medicine* **1977**, *77*, 962-967.

Nilsson-Thorell, C. G., Muscala N., Andren, A. H.G., Kjellstrand, P. T. T., Wieslander, A. P.; Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Perit. Dial. Int.* **1993**, *13*, 208-213.

Niyogi, K. K., Fink, G. R.; Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell* **1992**, *4*, 721-733.

Niyogi, K. K., Last, R. L., Fink, G. R., Keith, B.; Suppressors of trp1 fluorescence identify a new arabidopsis gene, TRP4, encoding the anthranilate synthase beta subunit. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1011-1027.

Nolte, D. L., Mason, J. R., Clark, L.; Avoidance of bird repellents by mice (*Mus musculus*). *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 427-432.

Nordblom, G. D., White, R. E., Coon, M. L.; Studies on hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 524-533.

Nozal, M. J., Bernal, J. L., Toribio, L., Jimenez, J. J., Martin, M. T.; High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 95-103.

Okazaki, O., Guengerich, F. P.; Evidence for specific base catalysis in N-dealkylation reactions catalyzed by cytochrome P450 and chloroperoxidase: differences in rates of deprotonation of aminium radicals as an explanation for high kinetic hydrogen isotopic effects observed with peroxidases. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1546-1552.

Ombui, J. N., Schmieger, H., Kagiko, M. M., Arimi, S. M.; *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *149*, 245-248.

Ortiz de Montellano, P. R., Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, *32*, 89-107.

Osman, A. M., Koerts, J., Boersma, M. G., Boeren, S., Veeger, C., Rietjens, I. M. C. M.; Microperoxidase/H₂O₂-catalyzed aromatic hydroxylation proceeds by a cytochrome P450-type oxygen transfer reaction mechanism. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 232-238.

Page, G. V., Farbood, M. I.; A method for the preparation of natural methyl anthranilate. International Patent, WO 8900203, **1998**.

Palomares, M. R., Negrete, A., Miranda, L., Flores, C., Galindo, E., Serrano-Carreón, L.; The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enz. Microb. Technol.* **2001**, *28*, 625-631.

Pandey, R. N., Armstrong, A. P., Hollenberg, P. F.; Oxidative N-demethylation of N,N-dimethylaniline by purified isozymes of cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 2181-2185.

Paukert, J. L., Henkin, J., Keeseey, J., deMoss, J. A.; Anthranilate synthase of *Neurospora crassa*: reaction and labeling with glutamine analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 443-449.

Patrauchan, M. A., Oriel, P. J.; Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 266-72.

Perrez, R. A., Sanchez-Brunete, C., Calvo, R. M., Tadeo, J. L.; Analysis of volatiles from spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2633-2637.

Piontek, K., Smith, A. T., Blodig, W.; Lignin peroxidase structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 111-116.

Policastro, P. P., Au, K. G., Walsh, C. T., Berchtold, G. A.; trans-6-Amino-5-[(1-carboxyethenyl)oxy]-1,3-cyclohexadiene-1-carboxylic acid: an intermediate in the biosynthesis of anthranilate from chorismate. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, *106*, 2443-2444.

Pollak, F. C., Berger, R. G.; Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109, 60. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1295-1299.

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J.; High resolution structure of cytochrome P-450_{cam}. *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 687-700.

Poulos, T. L., Raag, R.; Cytochrome P450_{cam}: crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *FASEB J.* **1992**, *6*, 674-679.

Precious, W. Y., Barrett, J.; Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol. Today* **1989**, *5*, 156-160.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Todd, C.; A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **1988**, *134*, 1847-1882.

Priest, F. G.; Systematics and ecology of *Bacillus*. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick (eds.) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, American Society for Microbiology, Washington, DC, **1993**.

Quinn, J. P., Pedens, J. M. M., Dick, R. E.; Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *31*, 283-287.

Raag, R., Poulos, T. L.; Crystal structures of cytochrome P-450cam complexed with camphane, thiocamphor and adamantane: factors controlling P-450 substrate hydroxylation. *Biochem.* **1991**, *30*, 2674-2684.

Ramachandra, M., Mahapatra, P. G.; Indian Patent 146359, **1988**.

Rapoport, R., Hanukoglu, I., Sklan, D.; A fluorimetric assay for hydrogen peroxide, suitable for NAD(P)H-dependent superoxide generating redox systems. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 309-313.

Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, J.; Crystal structure hemoprotein domain of P-450 BM-3, a prototype for microsomal P-450s. *Science* **1993**, *261*, 731-736.

Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., Handelsmann, J.; Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 525-552.

Roberts, J. C., Koch, K. E., Detrick, S. R., Warters R. L., Lubec G.; Thiazolidine prodrugs of cysteamine and cysteine as radioprotective agents. *Rad. Res.* **1995**, *143*, 203-213.

Roberts, M. C.; Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol. Biotech.* **2002**, *20*, 261-283.

Robin, C., Blanche, F., Cauchois, L., Cameron, B., Couder, M., Crouzet, J.; Primary structure, expression in *Escherichia coli*, and properties of S-adenosyl-L-methionine-uroporphyrinogen-III methyltransferase from *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4893-4896.

Rodrigues, A. D.; Use of *in vitro* human metabolism in drug development. An industrial perspective. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 2147-2156.

Romanczyk, L. J., McClelland, C. A., Post, L. S., Aitken, W. M.; Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from *cocoa* fermentation boxes. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 469-475.

Romero, R. M., Roberts, M. F., Phillipson J. D.; Anthranilate synthase in microorganisms and plants. *Phytochem.* **1995**, *39*, 263-276.

Ross, D., Farmer, P. B., Gescher, A., Hickman, J. A., Threadgill, M. D.; The formation and metabolism of N-hydroxymethyl compounds. I. The oxidative N-demethylation of N-dimethyl derivatives of arylamines, aryltriazenes, arylformamidines and arylureas including the herbicide monuron. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 3621-3627.

Ross, D., Farmer, P. B., Gescher, A., Hickmann, J. A., Threadgill, M. D.; The metabolism of a stable N-hydroxymethyl derivative of N-methylamide. *Life Sci.* **1983**, *32*, 597-604.

Ross, J. H.; Infrared spectra for analysis of aldehyde and ketone 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Analyt. Chem.* **1953**, *25*, 1288-1296.

Rozylo, T.K.; Quantitative TLC determination of formaldehyde in hard tissues of teeth. *Biomed. Chrom.* **1998**, *12*, 267-270.

Sakurada, J., Sekiguchi, R., Sata, K., Hosoya, T.; Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II. *Biochem.* **1990**, *29*, 4093-4098.

Savenije-Chapel E. M., Hordhoek J.; Metabolism of formaldehyde during in vitro drug demethylation. *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 2023-2029.

Sawicki, E., Sawicki, C. R.; Aldehydes - Photometric Analysis, Vol. 1, Academic Press, London, **1975**.

Saxena, A., Zhang, R. W., Bollag, J. M.; Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 390-396.

Schallmey, M., Singh, A., Ward, O. P.; Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 1-17.

Schatz, A., Bugie, E., Waksman S. A.; Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66-69.

Schloss, P. D., Handelsmann, J.; Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Op. Biotechnol.* **2003**, *14*, 303-310.

Schmid, R. D.; Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

Schmidt, H. L., Möller, M. R., Weber, N.; Über den Einfluss von Substituenten auf die mikrosomale Entalkylierung aromatischer N-, O- und S-Alkylverbindungen. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 2989-2996.

Schrader, J., Etschmann, M. M. W., Sell, D., Hilmer, J. M., Rabenhorst, J.; Applied biocatalysis for the natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Letters* **2004**, *26*, 463-472.

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

Seitz, E. W.; Fermentation production of pyrazines and terpenoids for flavours and fragrances. In: A. Gabelmann (ed.) Bioprocess production of flavour, fragrance, and color ingredients. Wiley, New York, 95-134, **1994**.

Selvanayagam, M., Vijaya, J.; Degradation of persistent insecticides by aquatic bacteria as sole source carbon. *J. Environ. Biol.* **1989**, *10*, 399-407.

Serra, S., Fuganti, C., Brenna, E.; Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 193-198.

Seto, Y., Guengerich, F. P.; Partitioning between N-dealkylation and N-oxygenation in the oxidation of N,N-dialkylarylamines by cytochrome P450 2B1. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9986-9997.

Sirisanthana, T., Navachareon N., Tharavichitkul P., Sirisanthana V., Brown A. E.; Outbreak of oral-oropharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with *Bacillus anthracis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1984**, *33*, 144-150.

Sligar, S. G.; Coupling of spin, substrate and redox equilibria in cytochrome P-450. *Biochem.* **1976**, *15*, 5399-5406.

Sligar, S. G., Filipovic, D., Stayton, P. S.; Mutagenesis of cytochromes P-450cam and b5. *Meth. Enzymol.* **1991**, *206*, 31-49.

Smith, C. J., Perfetti, T.A., Morton, M. J., Rodgman, A., Garg, R., Selassie, C. D., Hansch, C.; The relative toxicity of substituted phenols reported in sigarete mainstream smoke. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 265-278.

Snow, N. H., Slack, G. C.; Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 608-617.

Sollenberg, J., Linnerborg, M., Bodin, A., Karlberg, A. T.; Primary oxidation products affect the quantification of formaldehyde in autoxidized fatty alcohol ethoxylates when using DNPH derivatization. *Contact Dermatitis* **2003**, *48*, 12-16.

Srisilam, K., Veeresham, C.; Biotransformation of drugs by microbial cultures predicting mammalian drug metabolism. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *21*, 3-39.

Staiger, W. K., Miller, E. B.; Isatoic anhydride. IV. Reactions with various nucleophiles. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 1214.

Stephenson, K. Lewis, R. J.; Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: new technologies for an old phenomenon. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 281-301.

Stryer, L.; Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1999**.

Suga, K. I., Shiba, Y., Sorai, T., Shioya, S., Ishimura, F.; Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*. *Ann. NY Acad. Sci.* **1990**, *613*, 808-815.

Supuran, C. T., Scozzafava, A., Clare, B. W.; Bacterial protease inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 329-372.

Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.; Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.

Tashkov, W., Benchev, I.; Quick information bulletin for special users, *Bulgarian Ministry of Health*, *7*, **1987**.

Tashkov, W.; Determination of formaldehyde in foods, biological media and technological materials by headspace gas chromatography. *Chomatographia* **1996**, *43*, 625-627.

Thiem, J.; Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*, 193-211.

Thomas, J. A., Morris, D. R., Hager, L. P.; Chloroperoxidase. VIII. Formation of peroxide and halide complexes and their relation to the mechanism of the halogenation reaction. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3135-3142.

Tohyama, S., Eguchi, T., Dhakal P. A., Tomoyoshi, O., Miyuki; Kakinuma, K.; Genome-inspired search for new antibiotics. Isolation and structure determination of new 28-membered polyketide macrolactones, halstoctacosanolides A and B, from *Streptomyces halstedii* HC34. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3999-4005.

Toiguchi, S., Hayashi, K., Adachi, Y., Motoki, M., Haraguchi, K.; Purification and characterisation of soybean oxidase. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **1989**, *36*, 597-602.

Trasher, J. D., Wojdani, A., Cheung, G., Heuser, G.; Evidence for formaldehyde antibodies and altered cellular immunity in subjects exposed to formaldehyde in mobile homes. *Arch. Environ. Health* **1987**, *42*, 347-350.

Trasher, J. D., Broughton, A., Micevich, P.; Antibodies and immune profiles of individuals occupationally exposed to formaldehyde. *Am. J. Ind. Med.* **1988**, *14*, 479-488.

Turton, K., Chaddock, J. A., Acharya, K. R.; Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 552-58.

Unger, B. P., Gunsalus, I. C., Sligar, S. G.; Nucleotide sequence of the *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam gene and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1158-1163.

- Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S., Schmid, R. D.; Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 317-25.
- Van Beilen J. B., Li. Z.; Enzyme technology: an overview. *Curr. Op. Biotechnol.* **2002**, *13*, 338-344.
- Vandamme, E. J., Soetaert, W.; Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Techn. Biotechn.* **2002**, *77*, 1323-1332.
- Van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Giquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M., Small, P. M.; Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *31*, 406-409.
- Van Haandel, M. J. H., Saraber, F. C. E., Boersma, M. G., Laane, C., Fleming, Y., Weenen, H., Rietjens, I. M. C. M.; Characterization of different commercial soybean peroxidase preparations and use of the enzyme for N-demethylation of methyl N-methylantranilate to produce the food flavour methylantranilate. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1949-1954.
- Van Heijst A. N. P., Meredith, J. J.; Antidotes for cyanide poisoning. In G. N. Volanis, J. Sims, F. Sullivan, P. Turner (eds) Basic science in toxicology, Taylor & Francis, Brighton, **1990**.
- Vary, P. S.; Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*: an example of the versatility and potential of industrially important bacilli. In R. Doi, M. McGloughlin (eds) Biology of *Bacilli*: Applications to Industry, Butterworths-Heinemann, Boston, **1992**.
- Vary, P. S.; Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* **1994**, *140*, 1001-1013.
- Venisetty, R. K., Ciddi, V.; Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2003**, *4*, 153-67.
- Vihinen, M., Mantsala P.; Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, *24*, 329-389.
- Villeneuve, J. P., Pichette, V.; Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr. Drug Metab.* **2004**, *5*, 273-82.
- Walsh, C. T., Erion M. D., Walts A. E., Berchtold G. A.; Chorismate aminations: partial purification of *Escherichia coli* PABA synthase and mechanistic comparison with anthranilate synthase. *Biochem.* **1987**, *26*, 4734-45.
- Walsh, C. T., Liu J., Rusnak, F., Sakaitani, M.; Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1105-1129.
- Way, J. L.; Cyanide antagonism. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1983**, *24*, 451-481.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., Trüper, H. G.; Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. System. Bacteriol.* **1987**, *37*, 463-464.

Weger, N.; Cyanidvergiftung und Therapie. *Wehrmed. Mschr.* **1975**, *1*, 6-11.

Weger, N.; Treatment of cyanide poisoning with 4-Dimethylaminophenol (DMAP) - experimental and clinical overview. *M. E. J. Anesth.* **1990**, *10*, 389-412.

Welsh, F. W.; Overview of bioprocess flavor and fragrance production. In: A. Gabelmann (ed.) Bioprocess production of flavour, fragrance, and color ingredients. Wiley, New York, 95-134, **1994**.

Wen, L. P., Ruettinger, R. T., Fulco, A. J.; Requirements for a 1-kilobase 5'-flanking sequence for barbiturate inducible expression of the cytochrome P-450 BM-3 gene in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 10996-1003.

Weinberg, E. D.; Manganese requirement for sporulation and other secondary biosynthetic processes of *Bacillus*. *Appl. Microbiol.* **1964**, *12*, 436-441.

Wilson, C. W., Shaw, E. P.; Importance of thymol, methyl N-methylantranilate, and monoterpene hydrocarbons to the aroma flavour of mandarin cold-pressed oils. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 494-496.

Wolf, J. B., Brey, R. N.; Isolation and genetic characterizations of *Bacillus megaterium* cobalamin biosynthesis-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **1986**, *166*, 51-58.

Yamada, K., Machida, H., High-activity lipase and method for preparation thereof. US-Patent, US-3189529, **1965**.

Yasuhara A., Shibamoto, T.; Determination of physical and spectral data on thiazolidines for trace aldehyde analysis. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 2273-2274.

Yasuhara, A., Shibamoto, T.; Analysis of aldehydes and ketones in the headspace of heated pork fat. *J. Food. Sci.* **1989**, *54*, 1471-1472.

Yasuhara, A., Shibamoto, T.; Determination of volatile aliphatic aldehydes in the headspace of heated food oils by derivatisation with 2-aminoethanethiol. *J. Chromatogr.* **1991**, *547*, 291-298.

Yasuhara, A., Shibamoto, T.; Gas chromatographic determination of trace aldehydes in automobile exhaust by a cysteamine derivatization method. *J. Chromatogr.* **1994**, *672*, 261-266.

Zalkin, H.; Anthranilate synthase. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 287-292.

Lebenslauf

Name: Taupp
Vorname: Marcus Sebastian
Geburtsdatum: 31.05.1977
Geburtsort: Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Bekenntnis: römisch-katholisch
Anschrift: Würzburger Str. 14 A, 97218 Gerbunn

Vater: Rainer Taupp
Mutter: Hannelore Taupp, geb. Strobel
Geschwister: Daniela Taupp

Schulbildung: September 1984 bis Juli 1988: Grundschule Karlstadt
September 1988 bis Mai 1997: Gymnasium Karlstadt

Bundeswehr: Juli 1997 bis April 1998

Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg:

Mai 1998 bis Februar 2002: Grundstudium
April 2002: Vorprüfung für Lebensmittelchemiker
Mai 2002 bis Februar 2002: Hauptstudium
Mai 2002: Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

seit Juni 2002: Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität
Würzburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Biotransformation von N-Alkyl- und N,N-Dialkylarylaminen durch *Bacillus megaterium*“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Marcus Taupp