

3-(*R*)-Hydroxysäuren als Produkte selektiven Fettsäureabbaus

Studien zur β -Oxidation in *Stenotrophomonas maltophilia*

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

vorgelegt von
Kerstin Weil
aus
Friedberg / Hessen

Würzburg 2001

Eingereicht am :
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Januar 1998 bis Juni 2001 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier. Sie war Bestandteil der Arbeiten des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie im Sonderforschungsbereich 347 („Selektive Reaktionen Metall-aktivierter Moleküle“).

Prof. Dr. Peter Schreier als meinem Doktorvater gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, 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. In und außerhalb der Universität habe ich in Würzburg viele schöne Stunden erlebt; in schwierigen Situationen habe ich vielfältige Unterstützung erfahren. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Wilfried Schwab; von seinem Erfahrungsschatz und seinen Anregungen konnte ich sehr profitieren. Für die Hilfe bei Fragen zur CD-Spektroskopie danke ich PD Dr. Hans-Ulrich Humpf.

Dr. Dag Harmsen und PD Dr. Ulrich Vogel sowie ihren Mitarbeitern am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg danke ich für die Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums bedanke ich mich bei Patrick Gruber, Frank Heckel und Tobias Gulder.

Elfi Ruckdeschel und Matthias Grüne (Institut für Organische Chemie) sowie Walli Seefelder und Tobias Hauck danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren. Ein herzliches Dankeschön gilt auch der LC-MS-Crew Dr. Stefanie Diem, Dominique Kavvadias und Diana Kemmer für ihre Hilfsbereitschaft. Für Unterstützung bei den Arbeiten im GC-Labor bedanke ich mich bei Bernhard Weckerle und Frank Heckel.

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

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Andreas, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Erläuterungen

- Der vorliegenden Arbeit ist eine Zusammenfassung vorangestellt, in der die Verbindungen abweichend vom weiteren Text nummeriert sind. Daher wurden römische Ziffern zur Nummerierung verwendet.
- Verbindungen, auf die im Text Bezug genommen wird, sind mit einer Zahl in einer eckigen Klammer gekennzeichnet, die sich auf die Eintragsnummer in der zum Text gehörigen Tabelle oder Abbildung bezieht. Auf eine durchgehende Nummerierung aller Verbindungen wurde verzichtet.
- Die Benennung von Verbindungen orientiert sich an der in „Chemical Abstracts“ verwendeten Nomenklatur. Die im Text auftretenden Fettsäuren werden mit ihren Trivialnamen, z.B. 9Z,12Z-Octadecadiensäure als Linolsäure bezeichnet.
- Die abgebildeten Chromatogramme und Spektren wurden von den Originalvorlagen abgescannt oder unter Verwendung der Originaldaten erstellt.
- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen wurden im Text durch den Zusatz „®“ gekennzeichnet.

Abkürzungen

<i>A</i>	Amplitude
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
ADAM	Anthryldiazomethan
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
CDA	<i>Chiral Derivatizing Agent</i> (chirales Derivatisierungsreagenz)
CDCl ₃	Deutero-Chloroform
CE	Cotton-Effekt
CYP	Cytochrom P-450 Enzym
δ	chemische Verschiebung
d	Duplett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en

DC	Dünnschichtchromatographie
d_f	Filmdicke der Trennphasen
DMF	Dimethylformamid
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Enzym-Klassifizierungsnummer)
ee	<i>Enantiomeric Excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> (Verdampfungslichtstreu-Detektor)
ESI	Electrospray-Ionisierung
et al.	et alii (und andere)
Et ₂ O	Diethylether
eV	Elektronenvolt
Ext.	Extinktion
Fa.	Firma
FID	Flammenionisations-Detektor
FM	Fließmittel
GC	Gaschromatographie
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Kapillar-Gaschromatographie)
Hz	Hertz
i.d.	innerer Durchmesser
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
K_m	Michaelis-Konstante
λ	Wellenlänge
l	Liter
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LOX-1	Lipoxygenase Isoenzym 1
m	Multipllett
M	molar, mol/l
MDGC	multidimensionale Gaschromatographie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mol	Mol
<i>m/z</i>	Masse – Ladungsverhältnis
n	Stoffmenge
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Magnetische Kernresonanzspektroskopie)
NP	Normal Phase
p.a.	pro analysi
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDC	Pyridiniumdichromat
ppm	parts per million
R_f	Retentionsfaktor
RIC	<i>Reconstructed Ion-Chromatogram</i> (Totalionen-Chromatogramm)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RP-18	Umkehrphase mit C-18-Alkylketten
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
s	Singulett
s br	breites Singulett
Std.	Stunden
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>Total Ion-Current</i> (Totalionen-Chromatogramm)
U/min, upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbare Wellenlängen
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
v/v	Volumenverhältnis

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	3
2.1 Die Verwendung von Biokatalysatoren	3
2.1.1 Enzyme	3
2.1.2 Mikroorganismen	4
2.1.2.1 Einsatz von Mikroorganismen zur Stoffproduktion	5
2.1.2.2 Aromastoffe	5
2.1.2.3 Aminosäuren	7
2.1.2.4 Weitere biotechnologische Verfahren	8
2.2 Darstellung und Bedeutung optisch aktiver 3-Hydroxysäuren	10
2.2.1 Chemische Methoden zur Darstellung	10
2.2.2 Enzymatische Methoden zur Darstellung	11
2.2.3 Optisch aktive 3-Hydroxysäuren in der organischen Synthese	12
2.3 Der Abbau von Fettsäuren	13
2.3.1 Die β -Oxidation	13
2.3.1.1 Aktivierung der Fettsäuren und Transport durch die Mitochondrienmembran	15
2.3.1.2 Die erste Reaktion der β -Oxidation: Acyl-CoA-Dehydrogenasen	17
2.3.1.3 Die zweite Reaktion der β -Oxidation: Enoyl-CoA-Hydratasen	18
2.3.1.4 Die dritte Reaktion der β -Oxidation: 3-(<i>L</i>)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen	19
2.3.1.5 Die vierte Reaktion der β -Oxidation: 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen	20
2.3.1.6 Die Organisation der β -Oxidation in den mitochondrialen Zellen	21
2.3.1.7 Die Regulation der mitochondrialen β -Oxidation	23
2.3.1.8 Die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren	23

2.3.1.9 Die peroxisomale β -Oxidation	25
2.3.1.10 Die β -Oxidation in Mikroorganismen	29
2.3.2 Die α -Oxidation	31
2.3.2.1 Die α -Oxidation in Pflanzen	32
2.3.2.2 Die α -Oxidation in Säugern	34
2.3.2.3 Die α -Oxidation in Algen	35
2.3.2.4 Die α -Oxidation in Bakterien	35
2.3.2.5 Substrate der α -Oxidation	36
2.3.2.6 Die Selektivität der α -Oxidation	37
2.3.2.7 Die Bedeutung der α -Oxidation	38
2.3.3 ω -Oxidation	39
2.4 Fettsäuren als Substrate für Biotransformationen	41
2.4.1 <i>Bacillus megaterium</i>	41
2.4.2 <i>Nocardia cholesterolicum</i> und <i>Flavobacterium</i> sp.	43
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
2.4.4 <i>Dipodascopsis uninucleata</i>	47
2.4.5 Weitere Mikroorganismen für die Biotransformation von Fettsäuren	49
2.5 Hydroxylierte Fettsäuren in der Natur	53
2.5.1 Vorkommen und Funktion hydroxylierter Fettsäuren	53
2.5.2 Hydroxylierte Fettsäuren in Lebensmitteln	56
2.6 Problemstellung	58
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	59
3.1 Isolierung und Charakterisierung geeigneter Mikroorganismen	59
3.1.1 Selektion von Mikroorganismen	59
3.1.2 Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen	61
3.1.2.1 Phänotypische Charakterisierung	62
3.1.2.2 Genotypische Charakterisierung	65
3.1.2.3 Ergebnis der Charakterisierung des Stammes BP3-16	68
3.1.3 Das Bakterium <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	69
3.1.3.1 Entwicklung des Keimes <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	69
3.1.3.2 Klinische Aspekte des Bakteriums <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	72
<i>maltophilia</i>	73
3.1.3.3 Biotransformationen durch <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	

3.2 Umsetzung von Linolsäure mit <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	74
3.2.1 Bakterielle Umsetzungen von Linolsäure	74
3.2.2 Strukturaufklärung des Umsetzungsproduktes U1	76
3.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen	76
3.2.2.2 NMR-Spektroskopie	80
3.2.2.3 Vergleich mit einer synthetischen Referenzsubstanz	82
3.2.3 Strukturaufklärung der Umsetzungsprodukte U2 und U3	84
3.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Stammes <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	85
3.3.1 Variation der Doppelbindungen bei gleichbleibender Kettenlänge	85
3.3.1.1 Anzahl und Stellung von <i>cis</i> -Doppelbindungen	85
3.3.1.2 Verbindungen mit <i>trans</i> -Doppelbindungen	88
3.3.2 Variation der Kettenlänge	89
3.3.2.1 Verlängerung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von <i>cis</i> -konfigurierten Doppelbindungen	89
3.3.2.2 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von <i>cis</i> -konfigurierten Doppelbindungen	91
3.3.2.3 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von <i>trans</i> -konfigurierten Doppelbindungen	93
3.3.2.4 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei Verbindungen ohne Doppelbindungen	94
3.3.3 Umsetzung von Fettsäuren mit blockierter Carboxylfunktion	94
3.3.4 Umsetzung von Fettsäuren, die bereits funktionelle Gruppen aufweisen	96
3.3.4.1 Umsetzung von Ricinolsäure	96
3.3.4.2 Umsetzung weiterer Hydroxyfettsäuren	97
3.3.5 Versuche zur Quantifizierung der Umsetzungsrate	101
3.4 Stereoanalytik von chiralen 3-Hydroxysäuren	104
3.4.1 Enantiomerencharakterisierung	104
3.4.1.1 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses	105
3.4.1.2 Zuordnung der Konfiguration	106
3.4.2 Enantiomerencharakterisierung mittels GC-Analytik	106
3.4.2.1 Multidimensionale Gaschromatographie an chiralen stationären Phasen	106
3.4.2.2 Chirale Derivatisierungsreagenzien	109
3.4.2.3 Enantiomerenverteilung der Biotransformationsprodukte	109
3.4.2.4 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses im Verlauf der Biotransformation	110

3.4.2.5 Bestimmung der Absolutkonfiguration durch MDGC-Analytik von Dodecan-1,3-diolen	112
3.4.2.6 Untersuchungen zur Selektivität der Biotransformation	112
3.4.3 Enantiomerencharakterisierung mittels CD-Spektroskopie	118
3.4.3.1 CD-Spektroskopie	118
3.4.3.2 Absolute Konfiguration der chiralen 3-Hydroxysäuren	124
3.5 Untersuchungen zur Reaktionskinetik der 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren	127
3.5.1 Das Enzym Lipoxygenase (LOX)	127
3.5.1.1 Die Lipoxygenase-Katalyse	127
3.5.1.2 Substrate für Lipoxygenasen	127
3.5.1.3 Lipoxygenase-Inhibitoren	129
3.5.2 Kinetik der Umsetzung von 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren mit LOX	131
3.5.2.1 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren als Substrate für LOX	131
3.5.2.2 Methoden zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Lipoxygenase-Katalyse	131
3.5.2.3 Kinetik nach Michaelis-Menten	133
3.5.2.4 Kinetische Parameter der 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren	134
3.5.2.5 Mechanismen der Enzyminhibierung	135
3.5.2.6 Inhibierung von LOX durch 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren als Substrat-analoga	137
3.6 Charakterisierung weiterer Mikroorganismen	139
3.6.1 Phänotypische Charakterisierung	139
3.6.2 Genotypische Charakterisierung	141
3.6.3 Untersuchungen zur Selektivität	141
3.7 Diskussion der Ergebnisse	144
4 EXPERIMENTALTEIL	150
4.1 Material	150
4.1.1 Chemikalien	150
4.1.2 Enzyme	151
4.1.3 Mikroorganismen	152
4.1.4 Adsorptionsmaterial	152
4.1.5 Dünnschichtchromatographie	152

4.2 Geräte	153
4.2.1 Schüttelinkubator	153
4.2.2 Autoklav	153
4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	153
4.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)	154
4.2.5 Kapillarchromatographie (HRGC)	155
4.2.6 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	156
4.2.7 Multidimensionale Gaschromatographie mit Moving-capillary-stream-switching-System (MDGC-MCSS)	157
4.2.8 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	158
4.2.9 Infrarot-Spektrometer (IR-Spektrometer)	158
4.2.10 UV-Vis-Spektralphotometer	158
4.2.11 Circular dichroismus (CD)	159
4.2.12 Geräte zur Radioaktivitätsbestimmung	159
4.2.12.1 HPLC mit Radiodetektion	159
4.2.12.2 Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting, LSC)	159
4.2.13 Sonstige Geräte	160
4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften	161
4.3.1 Pufferherstellung	161
4.3.2 Methylierung der Säurederivate mit Diazomethan	161
4.3.3 Methylierung der Säurederivate mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)	161
4.3.4 Derivatisierung mit Mosher-Säurechlorid	162
4.3.5 Herstellung der Wachstumsmedie	162
4.3.6 Weitere Nährmedien	163
4.3.6.1 Mc Conkey-Agar	163
4.3.6.2 Cetrimid-Agar	163
4.3.7 Isolierung von Mikroorganismen aus Bodenproben	164
4.3.7.1 Direkte Aufarbeitung	164
4.3.7.2 Aufarbeitung nach Anzucht im Minimalmedium	164
4.3.7.3 Aufarbeitung nach Anzucht im Minimalmedium unter Zusatz von Linolsäure	165
4.3.8 Phänotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen	165
4.3.8.1 Die Gram-Färbung	165
4.3.8.2 Nachweis von Aminopeptidase	165
4.3.8.3 Der O (Oxidations-) / F (Fermentations-) Test nach Hugh und Leifson	166

4.3.8.4 Nachweis von DNase	166
4.3.8.5 Nachweis von Katalase	166
4.3.8.6 Nachweis von Oxidase	166
4.3.8.7 APIZYM 20-NE Test	167
4.3.8.8 Erstellung eines Antibiotogramms	167
4.3.9 Genotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen	168
4.3.9.1 Vorbereitung der Bakterienzellen	168
4.3.9.2 Amplifizierung der ribosomalen RNA	168
4.3.9.3 Sequenzierung der ribosomalen RNA	169
4.3.10 Allgemeine Vorschrift zur Biotransformation von Fettsäuren	169
4.3.10.1 Vorinkubationsphase	169
4.3.10.2 Substratzugabe und Inkubationsphase	169
4.3.10.3 Aufarbeitung der Umsetzungen	170
4.3.10.4 Extraktion der Bakterienpellets	170
4.3.11 Kontrollexperimente	170
4.3.11.1 „Bakterienblindwert“	170
4.3.11.2 „Reagentienblindwert“	171
4.3.12 Isolierung und Aufreinigung gebildeter Umsetzungsprodukte	171
4.3.13 Kinetische Untersuchungen an 3-(<i>R</i>)-Hydroxysäuren	171
4.4 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure	173
4.4.1 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäuremethylester	173
4.4.2 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure	174
4.5 Oxidationen mit Pyridiniumdichromat (PDC)	175
4.5.1 Allgemeine Vorbemerkungen	175
4.5.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Oxidationen mit Pyridiniumdichromat (PDC)	176
4.5.3 Z7-Decensäure	176
4.5.4 Z5-Octensäure	177
4.5.5 Z3-Octensäure	177
4.6 Darstellung von (<i>S</i>)-13-Hydroxy-Z9,E11-octadecadiensäure	178
4.6.1 Darstellung von (<i>S</i>)-13-Hydroperoxy-Z9,E11-octadecadiensäure	178
4.6.2 Darstellung von (<i>S</i>)-13-Hydroxy-Z9,E11-octadecadiensäure	180
4.7 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z11-eicosensäure	181
4.7.1 Darstellung von Ölsäurechlorid	181
4.7.2 Darstellung von Monomethylmalonsäure	182
4.7.3 Darstellung von 3-Keto-Z11-eicosensäuremethylester	183

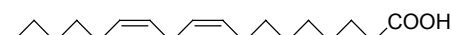
4.7.4 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z11-eicosensäuremethylester	184
4.7.5 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-Z11-eicosensäure	185
4.8 Darstellung von Dodecan-1,3-diolen	186
4.8.1 Darstellung von (<i>R</i>)-3-Hydroxy-dodecansäure	186
4.8.2 Darstellung von (<i>R</i>)-Dodecan-1,3-diol	187
4.8.3 Darstellung von (<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-dodecansäuremethylester	188
4.8.4 Darstellung von (<i>R,S</i>)-Dodecan-1,3-diol	189
4.8.5 Darstellung von (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-Epoxy-dodecan-1-ol	190
4.8.6 Darstellung von (<i>S</i>)-Dodecan-1,3-diol	191
4.9 CD-Spektroskopie der (<i>R</i>)-3-Hydroxysäuren	192
4.9.1 Darstellung von 9-Anthryldiazomethan (ADAM)	192
4.9.2 Derivatisierung der 3-Hydroxysäuren in bichromophore Derivate	193
4.9.2.1 Derivatisierung der Carboxylfunktion mit 9-Anthryldiazomethan	193
4.9.2.2 Derivatisierung der Hydroxyfunktion mit 2-Naphthoylimidazol	194
4.9.3 Aufnahme der CD-Spektren	195
ANHANG	200
LITERATURVERZEICHNIS	221
Publikationsliste	
Erklärung	
Lebenslauf	

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Studien zur selektiven bakteriellen Hydroxylierung von Fettsäuren vorgestellt.

1. Erstes Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von Bodenbakterien zur Darstellung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren. In einem Screening unter Verwendung von Linolsäure als Substrat wurden aus Bodenproben verschiedene Mikroorganismen isoliert und auf ihr Potential zur Bildung von polaren Produkten geprüft. Einer der isolierten Stämme setzte die exogen zugeführte Linolsäure effizient und reproduzierbar zu drei Hauptprodukten um. Die phänotypische und genotypische Charakterisierung dieses Stammes führte zu dessen Identifizierung ist *Stenotrophomonas maltophilia*.
2. Die Strukturaufklärung der drei Hauptreaktionsprodukte erfolgte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) sowie ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{13}\text{C-DEPT}$, H/H-COSY, HMQC, HMBC). Linolsäure (**I**) wurde von *Stenotrophomonas maltophilia* zu kettenverkürzten 3-Hydroxysäuren umgesetzt, d.h. 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (**Ia**), 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (**Ib**) und 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure (**Ic**). Die Identität von (**Ia**) wurde zusätzlich durch die Synthese einer Referenzsubstanz gesichert.

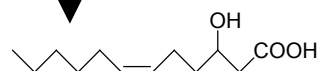
Edukt: Linolsäure (**I**)



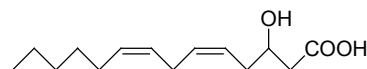
↓
Stenotrophomonas maltophilia

Produkte:

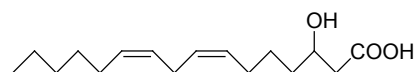
3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (**Ia**)



3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (**Ib**)

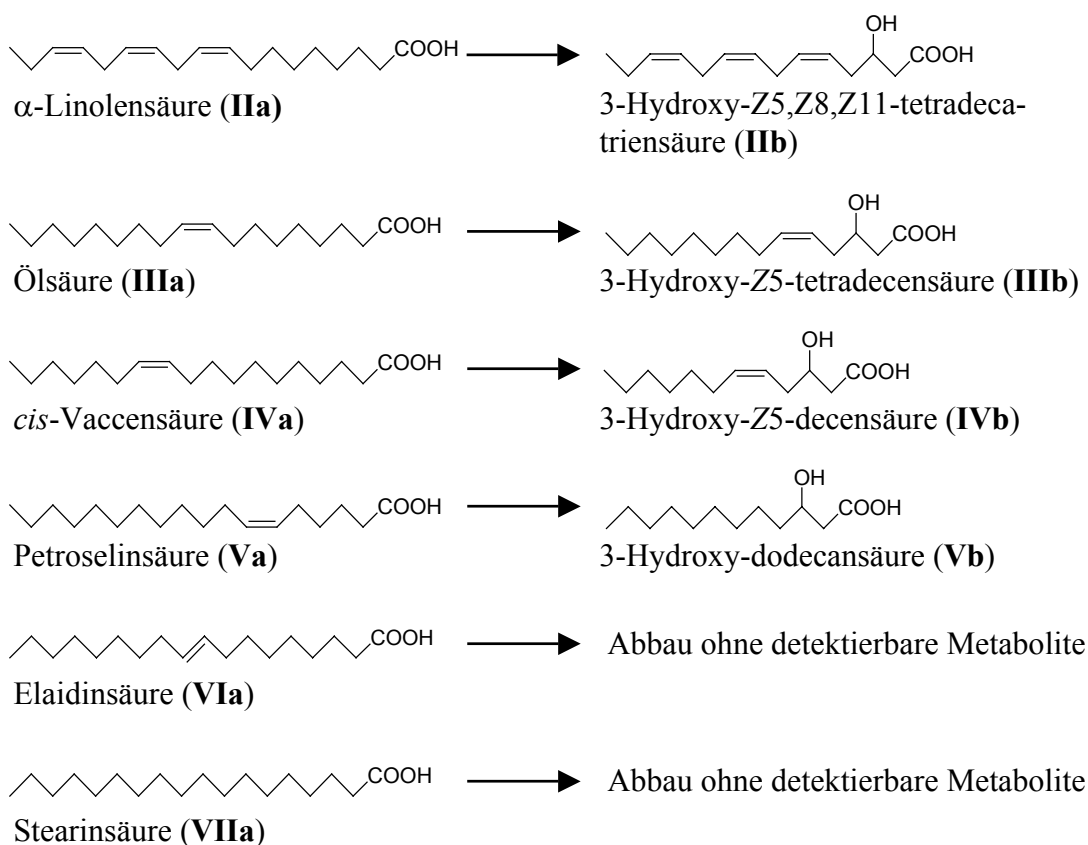


3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure (**Ic**)



Bereits diese Resultate ließen auf einen β -Oxidationsmechanismus als Abbauweg der zugesetzten Fettsäure schließen. Durch die sukzessive Abspaltung von C2-Einheiten, ausgehend von der Carboxylgruppe des Moleküls, entstanden in Position 3 hydroxylierte Produkte mit einer geraden Anzahl an C-Atomen.

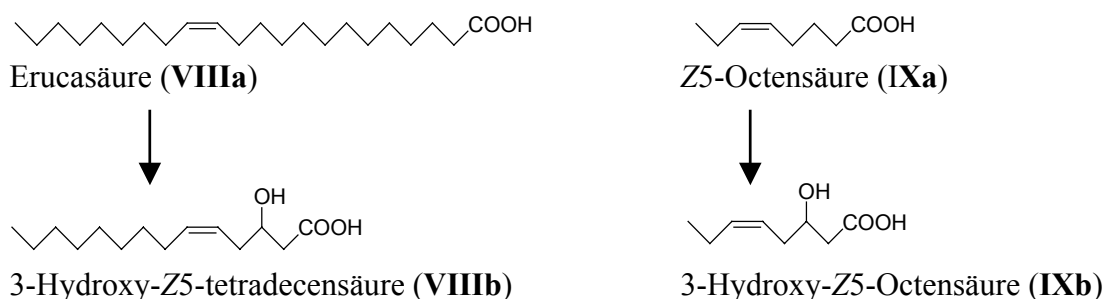
3. In einem anschließenden Substratscreening wurden 32 Verbindungen als Edukte für die Biotransformation eingesetzt und so die strukturellen Voraussetzungen ermittelt, die für eine effiziente Umsetzung von Fettsäuren durch *Stenotrophomonas maltophilia* notwendig sind. Auf der Grundlage der mit Linolsäure erhaltenen Ergebnisse wurden zunächst Fettsäuren mit 18 C-Atomen umgesetzt, die sich in Anzahl, Position und Konfiguration vorhandener Doppelbindungen unterschieden. Im folgenden Schema sind beispielhaft die Edukte sowie die Hauptprodukte der Biotransformationen von α -Linolensäure (**IIa**), Ölsäure (**IIIa**), *cis*-Vaccensäure (**IVa**), Petroselin-säure (**Va**), Elaidinsäure (**VIa**) und Stearinsäure (**VIIa**) zusammengefasst.



Substrate mit einer *cis*-Doppelbindung an einem ungeradzahligen C-Atom wurden zu 3-Hydroxysäuren abgebaut, in denen sich diese Doppelbindung zwischen C5 und C6 befand. Bei Fettsäuren, die eine *cis*-Doppelbindung an einem geradzahligen C-Atom

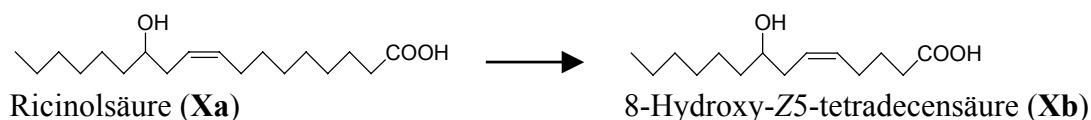
aufwiesen, konnte diese von *Stenotrophomonas maltophilia* innerhalb des Abbauvorgangs überwunden werden. Es kam zur Bildung von gesättigten Metaboliten, die in Position 3 hydroxyliert waren. Ungesättigte Fettsäuren mit einer *trans*-Doppelbindung sind unabhängig von deren Stellung innerhalb des Moleküls genau wie gesättigte Fettsäuren ohne detektierbare Zwischenprodukte abgebaut worden.

Unter Variation der Kettenlänge der eingesetzten Fettsäuren durchgeführte Studien ergaben, dass *Stenotrophomonas maltophilia* geradzahlige Fettsäuren mit 8 bis 22 C-Atomen als Substrate akzeptierte und (unter Kettenverkürzung) zu Metaboliten mit einer *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 sowie einer Hydroxyfunktion an C3 umsetzte. Nachfolgend sind exemplarisch die Biotransformationen von Erucasäure (**VIIIa**) und Z5-Octensäure (**IXa**) gezeigt.



Stenotrophomonas maltophilia war in der Lage, den Methyl- bzw. Ethylester von Linolsäure analog zur freien Säure umzusetzen. War die Carboxylfunktion dagegen durch eine Amidierung, d.h. direkt oder eine Hydroxygruppe in α -Position, d.h. indirekt blockiert, erfolgte kein Abbau.

Bei der Umsetzung von Substraten, die wie Ricinolsäure (12-(*R*)-Hydroxy-Z9-octadecensäure, **Xa**) innerhalb des Moleküls bereits eine Hydroxygruppe enthalten, entstanden keine zweifach hydroxylierten Produkte. Analog zur bisher gezeigten Reaktivität des Stammes wurden unter Kettenverkürzung Produkte gebildet, in denen sich die *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 befand. Die weiteren Reaktionen im Verlauf des β -Oxidationszyklus – die Einführung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 und die anschließende Hydratisierung unter Einführung der sekundären Hydroxygruppe an C3 – fanden dagegen nicht statt.



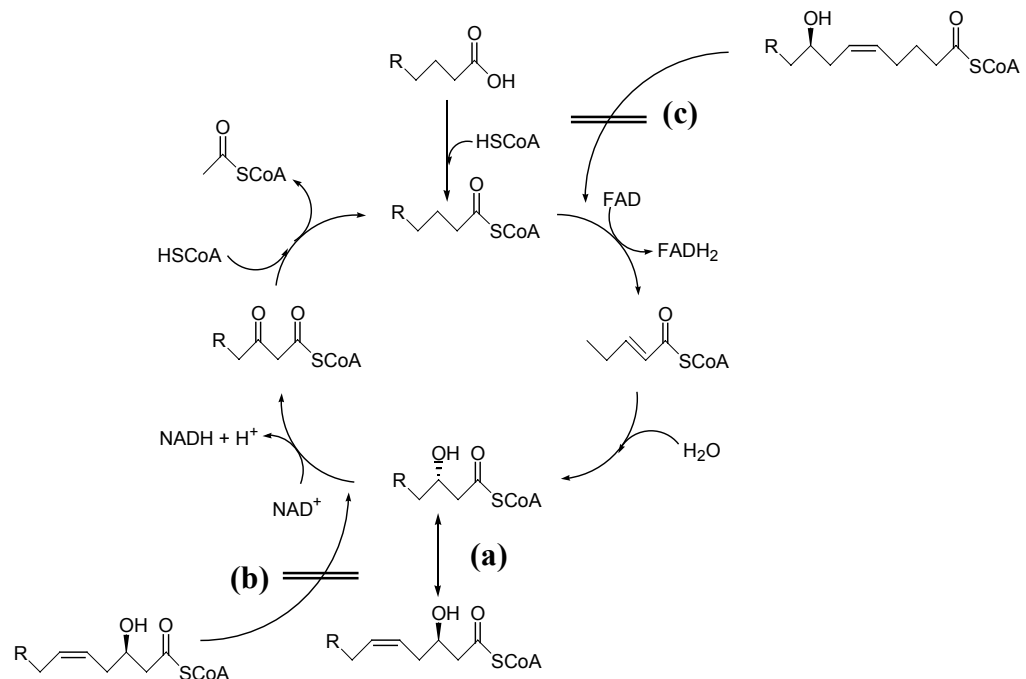
Die Umsetzung von [U-¹⁴C]-Ölsäure zur Quantifizierung der Umsetzungsrate ergab, dass rund 13 % der exogen zugesetzten Fettsäure zu 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure metabolisiert worden sind.

- Die Bestimmung der Enantiomerenverteilung der bakteriell gebildeten 3-Hydroxysäuren mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) ergab einen deutlichen Enantiomerenüberschuss (*ee* 84 – 98 %). Zur Aufklärung der Absolutkonfiguration der aus Linolsäure gebildeten 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (**1a**) wurde diese in einer zweistufigen Reaktion unter Erhalt der Konfiguration zu Dodecan-1,3-diol umgesetzt. Ausgehend von Z4-Decenal wurde (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol als racemische Referenzsubstanz synthetisiert. Unter Verwendung von *E2*-Dodecen-1-ol als Edukt wurde im Rahmen einer Sharpless-Epoxidierung (*2S,3S*)-2,3-Epoxy-dodecan-1-ol dargestellt, dessen regioselektive Reduktion zur Bildung von (*S*)-Dodecan-1,3-diol als enantiomerenreiner Referenz führte. Die synthetisierten Diole wurden mittels MDGC analysiert. Der Vergleich der Elutionsreihenfolge der Referenzsubstanzen ergab, dass das (*S*)-Enantiomer der Dodecan-1,3-diole unter den verwendeten Bedingungen vor dem (*R*)-Enantiomer eluierte. Für das bakteriell gebildete Produkte ließ sich auf dieser Grundlage ein Überschuss des (*R*)-Enantiomers festlegen.

Die Konfiguration ausgewählter optisch aktiver 3-Hydroxysäuren mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen wie Anzahl und Position vorhandener Doppelbindungen wurde darüber hinaus mit Hilfe der CD Exciton Chirality-Methode bestimmt. Hierzu wurden die optisch aktiven 3-Hydroxysäuren in einer zweistufigen Derivatisierung in die entsprechenden bichromophoren Derivate überführt. Die Kombination aus chromophorer 9-Methylanthryl- und 2-Naphthoylgruppe führte bei 3-Hydroxysäuren zu starken gegensätzlichen Split CD-Kurven der Enantiomere. Die (*R*)-konfigurierten 3-Hydroxysäuren besaßen ein positives Vorzeichen, so dass aus der CD-Kurve direkt auf die Konfiguration geschlossen werden konnte.

Um weitere Aussagen zur Selektivität des Mechanismus zu erhalten, wurde 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure als Substrat für die Umsetzung durch *Stenotrophomonas maltophilia* eingesetzt. Diese racemische 3-Hydroxysäure wurde ausgehend von Ölsäure synthetisiert. Als bakterielles Umsetzungsprodukt wurde 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure identifiziert. Analog zu den übrigen Biotransformationsprodukten lag ein Enantiomerenüberschuss von 88 % zugunsten des (*R*)-Enantiomers vor. Für das nicht umgesetzte Substrat 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure lag ein Enantiomerenverhältnis von 29 % : 71 % bezüglich des (*S*)-Enantiomers vor. Es wurde also bevorzugt das (*R*)-Enantiomer der eingesetzten 3-Hydroxysäure verstoffwechselt. Diese Ergebnisse ließen auf das Vorliegen eines (*R*)-selektiven β -oxidativen Abbauweges für exogen zugeführte Fettsäuren in *Stenotrophomonas maltophilia* schließen.

5. Bei der Umsetzung von Linolsäure und α -Linolensäure durch *Stenotrophomonas maltophilia* entstehen Produkte, die über ein 1,4-*Z,Z*-Pentadiensystem verfügen und somit eine wichtige strukturelle Voraussetzung von Lipoxygenase-Substraten erfüllen. Kinetische Studien unter Verwendung von Lipoxygenase L-1 aus Sojabohnen ergaben jedoch, dass aus den bakteriellen Produkten keine Hydroperoxide gebildet wurden. Inhibitorstudien zeigten weiterhin, dass die 3-Hydroxysäuren trotz struktureller Ähnlichkeiten auch nicht als kompetitive Hemmer wirken.
6. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden weitere Bodenbakterien isoliert und charakterisiert, die exogen zugeführte Fettsäuren analog zu *Stenotrophomonas maltophilia* zu kettenverkürzten 3-Hydroxysäuren abbauen. Während *Alcaligenes denitrificans* dabei ebenfalls (*R*)-konfigurierte Produkte bildete, zeigte *Pseudomonas fluorescens* umgekehrte Selektivität. Hier kam es im Verlauf des Abbaus von Linolsäure zu einer Anreicherung von 3-(*S*)-Hydroxysäuren.
7. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Darstellung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren belegen das Potential des Bodenbakteriums *Stenotrophomonas maltophilia*, exogen zugeführte Fettsäuren im Rahmen der β -Oxidation zu kettenverkürzten, an Position 3 hydroxylierten Metaboliten abzubauen. Dabei liegen deutliche Abweichungen zur β -Oxidation in anderen Organismen vor, die auf Unterschieden in der Enzymausstattung bzw. deren Aktivität beruhen. Folgendes Schema fasst diese Ergebnisse zusammen. Wichtige Punkte sind mit Buchstaben gekennzeichnet und werden im Anschluss erläutert.



- a) Die während der Umsetzung von Fettsäuren durch *Stenotrophomonas maltophilia* entstehenden Hydroxysäuren sind (*R*)-konfiguriert, während in anderen Organismen wie Säugern, Pflanzen und anderen Mikroorganismen Intermediate gebildet werden, die (*S*)-Konfiguration aufweisen.
- b) Im Verlauf der β -Oxidation werden intermediär gebildete 3-Hydroxysäuren durch das Enzym 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zu den entsprechenden 3-Ketoverbindungen oxidiert. Beim Abbau von Fettsäuren, in denen wie in Linolsäure (*Z*9,*Z*12-Octadecadiensäure) innerhalb des Moleküls eine *cis*-Doppelbindung an einem ungeradzahligen C-Atom vorliegt, kommt es durch *Stenotrophomonas maltophilia* zur Bildung von Intermediaten mit einer *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6. Dadurch wird die nachfolgende Oxidation blockiert; es kommt so zur Akkumulation der 3-Hydroxysäuren.
- c) Die erste Reaktion innerhalb des β -Oxidationszyklus ist die Einführung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3, katalysiert durch das Enzym Acyl-CoA-Dehydrogenase. Im zweiten Schritt erfolgt die selektive Hydratisierung dieser Doppelbindung unter Bildung einer sekundären Hydroxyfunktion. Beim Vorhandensein einer Hydroxygruppe benachbart zu der im Verlauf des Metabolismus entstehenden *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 laufen diese Schritte in *Stenotrophomonas maltophilia* nicht ab. Dies ist beispielsweise bei dem aus Ricinolsäure (12-(*R*)-Hydroxy-*Z*9-octadecensäure) gebildeten Produkt 8-Hydroxy-*Z*5-tetradecensäure der Fall. Die polare funktionelle Gruppe des Substrates kann eine Signalfunktion ausüben und so dessen Bindung an das Enzym verhindern.

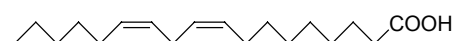
Durch die gewonnenen Erkenntnisse zum β -Oxidationsmechanismus in *Stenotrophomonas maltophilia* kann diese Aktivität durch geeignete Substratauswahl gezielt zur Synthese von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren eingesetzt werden, deren chemische Synthese gegenüber dieser Biotransformation deutlich schwieriger zu realisieren ist. Für solche Verbindungen besteht in der organischen Synthese von Naturstoffen wie Pheromonen, Vitaminen und Antibiotika Bedarf.

Summary

The available work presents studies on the selective bacterial hydroxylation of fatty acids.

1. First goal of this work was the isolation and characterisation of soil bacteria for the synthesis of optically active 3-hydroxy acids. In a screening procedure using linoleic acid as substrate different microorganisms were isolated from soil samples and tested for their ability to form polar products. One of the isolated strains transformed exogenously supplied linoleic acid efficiently and reproducibly to three main products. The phenotypic and genotypic characterisation of this strain led to its identification as *Stenotrophomonas maltophilia*.
2. Structure elucidation of the three major reaction products was carried out by high performance liquid chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry as well as one and two-dimensional NMR experiments ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{13}\text{C-DEPT}$, H/H COSY, HMQC, HMBC). Linoleic acid (**I**) was converted by *Stenotrophomonas maltophilia* to chain-shortened 3-hydroxy acids, i.e. 3-hydroxy-Z6-dodecenoic acid (**Ia**), 3-hydroxy-Z5,Z8-tetradecadienoic acid (**Ib**) and 3-hydroxy-Z7,Z10-hexadecadienoic acid (**Ic**). The identity of (**Ia**) was confirmed by synthesis of a reference substance.

Substrate: linoleic acid (**I**)



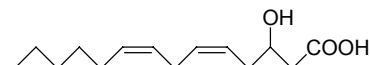
*Stenotrophomonas
maltophilia*

Products:

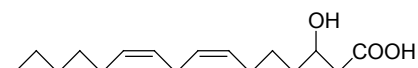
3-hydroxy-Z6-dodecenoic acid (**Ia**)



3-hydroxy-Z5,Z8-tetradecadienoic acid (**Ib**)

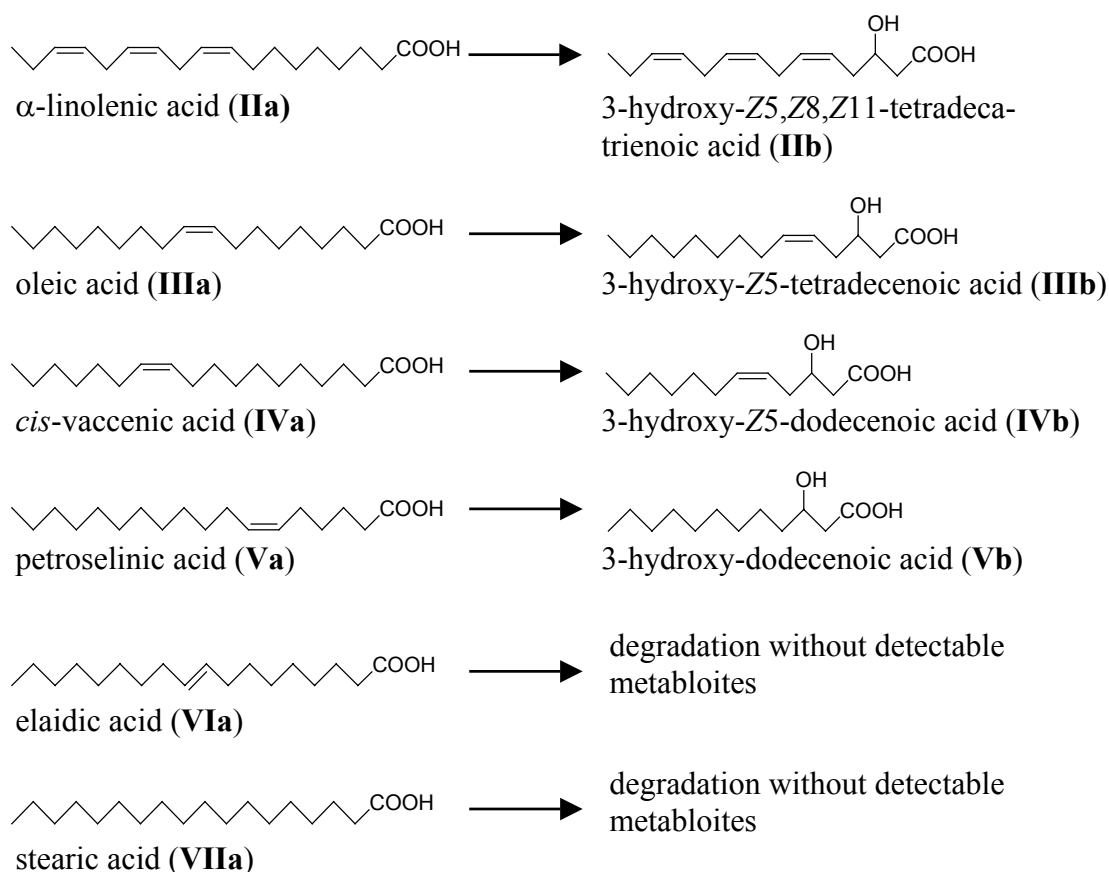


3-hydroxy-Z7,Z10-hexadecadienoic acid (**Ic**)



These results already suggested degradation of added fatty acids by β -oxidation. By subsequent secession of acetate-units starting at the carboxyl group of the molecule 3-hydroxylated products with an even number of carbon atoms are formed.

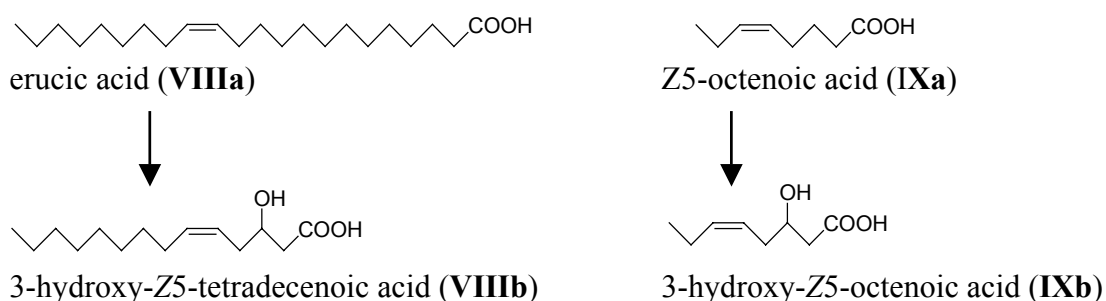
3. In a following screening 32 compounds were used as substrates for the biotransformation to determine the structural prerequisites, which are necessary for an efficient conversion of fatty acids by *Stenotrophomonas maltophilia*. On the basis of the results obtained with linoleic acid further fatty acids with 18 carbon atoms differing in number, position and configuration of available double bonds were used. The following scheme summarizes exemplarily the substrates as well as the main products of the biotransformations of α -linolenic acid (**IIa**), oleic acid (**IIIa**), *cis*-vaccenic acid (**IVa**), petroselinic acid (**Va**), elaidic acid (**VIa**) and stearic acid (**VIIa**).



Substrates containing a *cis* double bond at an odd-numbered carbon atom were degraded to 3-hydroxy acids with the double bond between C5 and C6. The transformation of fatty acids containing a *cis* double bond at an even-numbered carbon atom resulted in the accumulation of saturated metabolites hydroxylated in

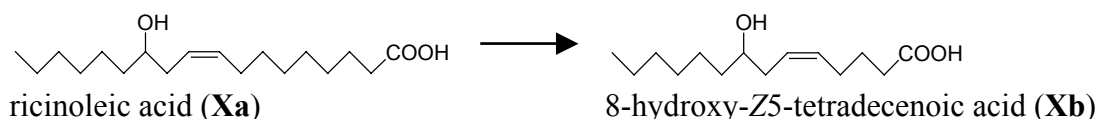
position 3. The existing double bond could be overcome by *Stenotrophomonas maltophilia*. Unsaturated fatty acids with a *trans* double bond were decomposed without detectable intermediates independently of their position within the molecule in the same way as saturated fatty acids.

Studies performed with fatty acids displaying different chain length led to the conclusion that *Stenotrophomonas maltophilia* accepted even-numbered fatty acids with 8 to 22 carbon atoms as substrates. The compounds were transformed to metabolites with a *cis* double bond between C5 and C6 as well as one hydroxy group at C3. In the following scheme the biotransformations of erucic acid (**VIIIa**) and Z5-octenoic acid (**IXa**) are shown exemplarily.



Stenotrophomonas maltophilia transformed the methyl or ethyl ester of linoleic acid in the same way as the free acid. If the carboxyl group was directly blocked by an amide function or indirectly blocked by a hydroxy group in α -position, degradation was not observed.

During the conversion of substrates such as ricinoleic acid (12-(*R*)-hydroxy-Z9-octadecenoic acid, **Xa**), already containing a hydroxy group within the molecule, no doubly hydroxylated products were formed. In accordance to the previous reactions a product was formed by chain-shortening exhibiting the *cis* double bond between C5 and C6. The further reactions of the β -oxidation cycle, i.e. the introduction of a *trans* double bond between C2 and C3 and the following hydration under introduction of the hydroxy group at C3, did not take place.



[U-¹⁴C] oleic acid was used as substrate for the biotransformation by *Stenotrophomonas maltophilia* to quantify the conversion rate. Approximately 13 % of the exogenously applied fatty acid were metabolized to 3-hydroxy-*Z*5-tetradecenoic acid.

4. Determination of the enantiomeric composition of the bacterially formed 3-hydroxyacids by multidimensional gas chromatography (MDGC) resulted in a clear dominance of one of the enantiomers (*ee* 84 - 98 %). In order to assign the absolute configuration, 3-hydroxy-*Z*6-dodecenoic acid (**1a**), formed from linoleic acid, was converted to dodecan-1,3-diol in a two-step reaction without loss of the stereochemical information. A racemic reference was synthesized from *Z*4-decenal. The enantioselective synthesis of (*S*)-dodecane-1,3-diol was carried out by asymmetric epoxidation of *E*2-dodecen-1-ol under Sharpless conditions and following reduction. Analysis of the synthesized diols by means of MDGC and comparison of their elution sequence revealed that the bacterial product showed (*R*)-configuration.

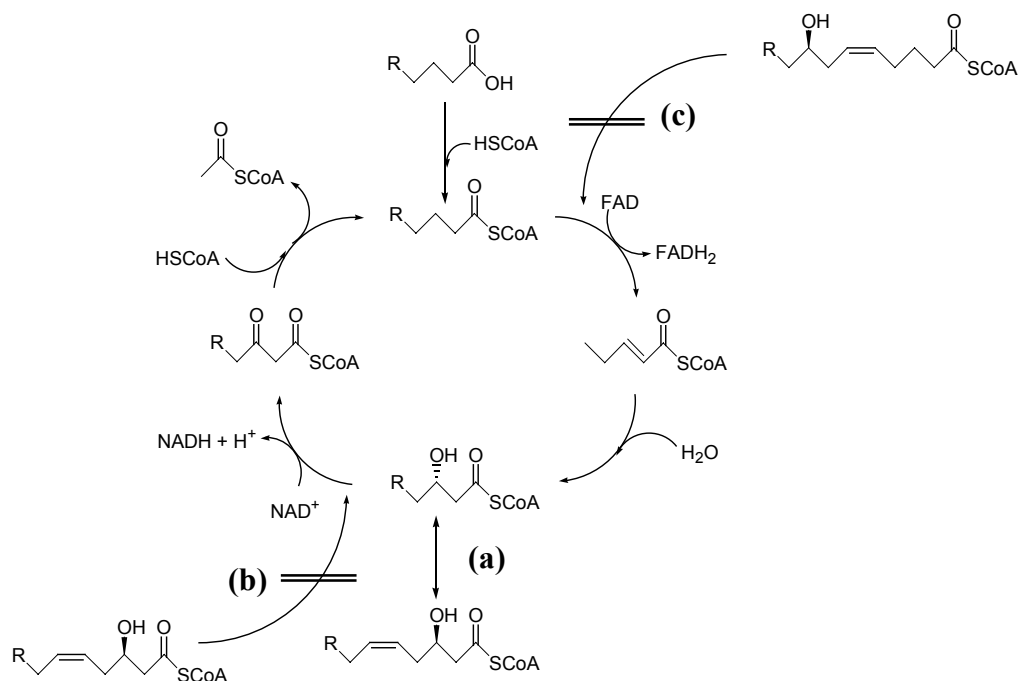
In addition, the CD exciton chirality method was applied to determine the absolute configuration of eight biotransformation products with different structural properties such as number and position of available double bonds. Derivatization with 9-anthryldiazomethane and 2-naphthoylimidazole led to the required bichromophoric structures. The combination of the introduced chromophores resulted in strong opposite split CD curves for the enantiomers. The CD spectra of the bacterial products displayed a positive first Cotton effect and a negative second Cotton effect which confirmed their (*R*)-configuration.

To get further information concerning the selectivity of the mechanism, racemic 3-hydroxy-*Z*11-eicosenoic acid was synthesized from oleic acid and used as substrate for the bioconversion by *Stenotrophomonas maltophilia*. As bacterial conversion product 3-hydroxy-*Z*5-tetradecenoic acid was identified. In accordance to the previous biotransformation products an enantiomeric excess of 88 % in favor of the (*R*)-enantiomer was found. For the remaining substrate 3-hydroxy-*Z*11-eicosenoic acid a ratio of 29 % (*R*) to 71 % (*S*) was detected. Therefore, the (*R*)-enantiomer of the applied hydroxy fatty acid was degraded preferably. These results led to the conclusion that a (*R*)-selective metabolic pathway for the degradation of fatty acids is present in *Stenotrophomonas maltophilia*.

5. Products containing a 1,4-*Z,Z*-pentadienoic system were formed during the conversion of linoleic acid and α -linolenic acid by *Stenotrophomonas maltophilia*. Thus, they fulfill an important structural prerequisite of lipoxygenase substrates. However kinetic studies using lipoxygenase L-1 from soy beans showed that the bacterial

products were not converted to hydroperoxides. Despite their structural similarities, inhibitor studies revealed that the 3-hydroxy acids are no competitive inhibitors.

6. Further soil bacteria transforming exogenously supplied fatty acids to chain-shortened 3-hydroxy acids similar to *Stenotrophomonas maltophilia*, were isolated and characterized during the available work. Studies concerning their selectivity revealed that *Alcaligenes denitrificans* formed (*R*)-configured products analogously to *S. maltophilia* whereas *Pseudomonas fluorescens* showed reverse selectivity. In this case 3-(*S*)-hydroxy acids accumulated during the degradation of linoleic acid.
7. The studies regarding the synthesis of optically active 3-hydroxy acids, executed in the context of this work, demonstrated the potential of the soil bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, to degrade exogenously supplied fatty acids to chain-shortened hydroxylated metabolites by β -oxidation. Clear deviations to the β -oxidation in other organisms are present, which are based on differences in the enzyme equipment or their activity. The following scheme summarizes these results. Important features are marked by letters and explained subsequently.



- a) Hydroxy acids which are formed during the bioconversion of fatty acids by *Stenotrophomonas maltophilia* possess (*R*)-configuration. In other organisms such as

mammals, plants and other microorganisms these intermediate are (*S*)-configured.

- b) 3-Hydroxy acids temporarily formed during β -oxidation are further oxidized to the corresponding 3-keto acids by the enzyme 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. The degradation of fatty acids such as linoleic acid (*Z*9,*Z*12-octadecadienoic acid) containing a *cis* double bond at an odd-numbered carbon atom within the molecule led to the formation of intermediates with a *cis* double bond between C5 and C6. Thus the following oxidation is blocked and results in the accumulation of the 3-hydroxy acids.
- c) The first reaction within the β -oxidation cycle, catalyzed by the enzyme acyl-CoA dehydrogenase, is the introduction of a *trans* double bond between C2 and C3. In the second step the selective hydration of this double bond takes place under formation of a secondary hydroxy function. The presence of a hydroxy group adjacent to a *cis* double bond between C5 and C6, inhibits these reactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. E.g., the product 8-hydroxy-*Z*5-tetradecenoic acid formed from ricinoleic acid (12-(*R*)-Hydroxy-*Z*9-octadecenoic acid) is not further degraded. The polar functional group of the substrate can exercise a signal function and prevent its linkage to the enzyme.

Based on the achieved results concerning the mechanism of β -oxidation in *Stenotrophomonas maltophilia* this activity can be used for the synthesis of optically active 3-hydroxy acids whose chemical synthesis is more difficult in relation to this biotransformation. For such compounds requirement exists in the organic synthesis of natural substances such as pheromones, vitamins and antibiotics.

1 Einleitung

Enzymatische und mikrobielle Biotransformationen gewinnen in der organischen Synthese zunehmend an Bedeutung (Roberts et al., 1992; Poppe und Novak, 1992; Drauz und Waldmann, 1995; Faber, 1997; Schreier, 1997; Roberts, 1998). Bis vor 15 Jahren beschränkte sich der Einsatz dieser Biokatalysatoren für synthetische Zwecke zumeist auf wenige, biotechnologisch orientierte Arbeitsgruppen. Gegenwärtig werden jedoch die Vorteile der Verwendung natürlicher Katalysatoren in der asymmetrischen Synthese verstärkt genutzt. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur regio-, diastereo- und enantioselektiven Katalyse bieten Enzyme und Mikroorganismen unübertroffene Möglichkeiten zur gezielten Synthese, vor allem im Bereich der Naturstoffe.

Für die chemische Industrie stellen Biokatalysatoren eine attraktive Alternative zu etablierten Katalysatoren dar (Liese et al., 2000). Effizientere, selektivere und kostengünstigere biokatalytische Verfahren können hier zahlreiche aufwendige Reaktionen ersetzen. Auch die pharmazeutische Industrie, deren Bedarf an enantiomerenreinen Verbindungen für Pharmazeutika in den nächsten Jahren deutlich ansteigen wird, sowie die Lebensmittelindustrie profitieren von den Fortschritten im Bereich der Biokatalyse (Krings und Berger, 1998; Liese und Filho, 1999; Schulze und Wubbolts, 1999).

Mikroorganismen enthalten eine Vielzahl selektiver Enzyme für die verschiedensten Applikationen. Neben ihrem Einsatz zum Abbau von Schadstoffen wie Pestiziden und Weichmachern (Soccol et al., 1995; Cartwright et al., 2000) werden sogenannte „*whole-cell*“-Systeme zunehmend zu synthetischen Zwecken eingesetzt. Im Gegensatz zu isolierten Enzymen stellen Mikroorganismen erneuerbare Katalysatoren dar, die jederzeit in den erforderlichen Mengen kultiviert werden können. Hierbei ist keine aufwendige Aufreinigung der Enzyme nötig, zudem entfällt der Zusatz von Cofaktoren, Hilfsenzymen und anderen Reagenzien. Bakterien, Hefen und Pilze bieten daher eine gute Basis zur Entwicklung umweltfreundlicher Verfahren zur Gewinnung enantiomerenreiner Verbindungen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Katalysatoren wie Metallkomplexen zeigen Biokatalysatoren eine wesentlich bessere Umweltverträglichkeit und ermöglichen zudem Transformationen, die mit chemischen Katalysatoren nur schwierig zu realisieren sind (Faber, 1997).

Optisch aktive 3-Hydroxysäuren unterschiedlicher Kettenlänge stellen wichtige chirale Bausteine in der asymmetrischen Synthese dar. Die Verwendung dieser Verbindungen als Zwischenstufen oder chirale Auxiliare in der bioorganischen Chemie ermöglicht die Synthese wichtiger Naturstoffe wie Aromastoffe, Vitamine, Pheromone und Antibiotika

(Fringuelli et al., 1997). Die derzeit gängigste Methode zur chemischen Darstellung von 3-Hydroxysäuren ist die Reformatski-Reaktion über chirale Enolate als Zwischenprodukte. Das seit langem bekannte Verfahren wurde in den letzten Jahren zur Steigerung der Ausbeute sowie des Enantiomerenüberschusses mehrfach modifiziert (Opara und Read, 1969; Basavaiah und Bharathi, 1989). Aufgrund der großen Bedeutung der 3-Hydroxysäuren werden allerdings zunehmend neue Synthesewege eröffnet (Huerta und Backwall, 2001).

Die β -Oxidation ist eine der wichtigsten biochemischen Grundreaktionen für den oxidativen Abbau von Fettsäuren. Sie stellt den vorherrschenden katabolischen Weg innerhalb des Fettsäuremetabolismus dar. Im Gegensatz zu anderen Abbaumechanismen wie der α -Oxidation führt sie unter Energiegewinnung zu einem vollständigen Abbau der zu verstoffwechselnden Substrate. Nach einer Aktivierung gehen die Fettsäuren in einen aus vier Teilreaktionen bestehenden, sich wiederholenden Zyklus ein. Nach Einführung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 kommt es zur Hydratisierung dieser Doppelbindung unter Bildung einer 3-Hydroxysäure. Nach der Oxidation zur entsprechenden 3-Ketoverbindung wird abschließend die Bindung zwischen C2 und C3 unter Freisetzung von Acetyl-CoA thiolytisch gespalten. Zum β -oxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren sind weitere Reaktionen nötig (Voet und Voet, 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Bakterien, die durch ein Selektionsverfahren aus Bodenproben isoliert worden sind, zur regio- und enantioselektiven Hydroxylierung von Fettsäuren eingesetzt. Ihr Potential zur Darstellung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren wurde in einem breit angelegten Substratstudium untersucht. Neben der Aufklärung der Absolutkonfiguration galt es durch die gezielte Applikation verschiedener Verbindungen Erkenntnisse zum ablaufenden Bildungsweg der 3-Hydroxysäuren zu erhalten.

2 Kenntnisstand

2.1 Die Verwendung von Biokatalysatoren

2.1.1 Enzyme

Enzyme verfügen über eine Reihe von Eigenschaften, die ihre Vorteile gegenüber chemischen Katalysatoren, vor allem gegenüber Metallkomplexen, bedingen. Vorhandene Nachteile wie eingeschränkte Substratspezifität, auftretende Enzyminhibierung, Instabilität und begrenzte Optimierungsmöglichkeiten lassen sich ausgleichen. Folgende Auflistung fasst die positiven Aspekte von Enzymen zusammen (Faber, 1997):

- *Enzyme katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen*

Katalysatoren beschleunigen eine Reaktion, haben aber keinen Einfluß auf die Position des thermodynamischen Gleichgewichts. Dies trifft auch auf Enzyme zu und bedingt, dass enzymatische Reaktionen in beide Richtungen ablaufen können. Da Enzyme zudem unter ähnlichen Bedingungen aktiv sind, können mehrere biokatalytische Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt werden, wodurch sequentielle Reaktionen ermöglicht werden.

- *Enzyme sind natürlich*

Enzyme werden in der Natur ohne Rückstände abgebaut und führen daher im Gegensatz zu Metallkomplexen nicht zu einer Belastung der Umwelt. Speziell im Lebensmittelbereich begünstigt die bestehende rechtliche Lage den Einsatz von Biokatalysatoren. Das Lebensmittelrecht erlaubt bei der Verwendung natürlicher Edukte sowie biologischer Katalysatoren die Bezeichnung „natürlich“ für die gebildeten Produkte. Diese Deklaration wird vom Verbraucher besonders geschätzt.

- *Enzyme reagieren unter milden Bedingungen*

Die Enzymkatalyse verläuft in der Regel unter milden Bedingungen wie z.B. bei pH-Werten im Bereich von 5 - 8, Raumtemperatur (ca. 20 °C) und Normdruck. Unerwünschte Nebenreaktionen können somit häufig vermieden werden.

- *Enzyme sind effiziente Katalysatoren*

Verglichen mit der nicht-enzymatischen Reaktion beschleunigen Enzyme eine Reaktion um den Faktor 10^8 bis 10^{12} . Im allgemeinen werden sie in einer Menge von 10^{-3} bis 10^{-4} mol% eingesetzt. Chemische Katalysatoren werden dagegen im Bereich von 0.1 bis 1 mol% verwendet. Damit übertreffen Biokatalysatoren ihre chemischen „Gegenstücke“ bezüglich ihrer Effizienz deutlich.

- *Enzym-katalysierte Reaktionen sind selektiv*

Viele von Enzymen katalysierten Reaktionen verlaufen regio-, diastereo- und enantioselektiv. Der Aufbau von Enzymen aus chiralen Aminosäuren gewährleistet die Asymmetrie der Katalysatoren und ermöglicht damit asymmetrische Synthesen.

Lange Zeit haben die Nachteile von Enzymen ihre Anwendung als Katalysatoren in der organischen Synthese stark eingeschränkt. Dies wurde jedoch durch verschiedene chemische und biologische Entwicklungen verändert. Neue Techniken zur Stabilisierung und Immobilisierung von Enzymen erleichtern deren Handhabbarkeit deutlich (Hartmeier, 1990; Tischler und Wedekind, 1999; Liang et al., 2000). Weiterhin ermöglichen apparative technische Neuerungen eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabes (Gatfield, 1992; Fiechter, 1995; Dingermann, 1999). Stetige Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie sowie der theoretischen Chemie ermöglichen gezielte Manipulationen von genetischem Material. Die Konstruktion von Genen für die Expression von Proteinen mit erwünschten Eigenschaften, die für bestimmte Zielsetzungen geeignet sind, ist möglich. Durch die Modifikationen werden Aktivität, Selektivität und Stabilität beeinflusst (De Santis und Jones, 1999; Jäger und Reetz, 2000). Die Technologie rekombinanter DNA erlaubt zudem die kostengünstige Produktion von Enzymen (Kohno et al., 1998; Dingermann, 1999). Weiterhin finden neue biokatalytische Systeme wie katalytische Antikörper (Smithrud und Benkovic, 1997; Golinelli-Pimpaneau, 2000; Hilvert, 2000) oder semisynthetische Enzyme (Distefano et al., 1998; Häring et al., 1999) zunehmenden Einsatz in der organischen Synthese.

2.1.2 Mikroorganismen

Mikroorganismen verfügen über eine Vielzahl an selektiven Enzymen, die für verschiedene Anwendungen einsetzbar sind. Da die genannten Eigenschaften von isolierten Enzymen auf Mikroorganismen übertragen werden können, erklärt sich auch der zunehmende Einsatz von „*whole-cell*“-Systemen als Katalysatoren im industriellen Bereich

sowie in der organischen Synthese. Weitere Vorteile wie die ständige Möglichkeit zur Erneuerung des Katalysators sowie die fehlende Notwendigkeit von Cofaktoren und Hilfsenzymen verstärken diese Entwicklung.

2.1.2.1 Einsatz von Mikroorganismen zur Stoffproduktion

Der Einsatz von Mikroorganismen für die industrielle Darstellung organischer Substanzen wurde zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts eingeleitet. Bereits während des ersten Weltkriegs wurden technisch brauchbare Gärungsprozesse zur Herstellung von Ethanol und Aceton eingesetzt. Die erste mikrobiell katalysierte Reaktion, die im technischen Maßstab durchgeführt wurde, war die Umwandlung von Sorbit zu Sorbose mit Hilfe von *Acetomonas oxydans*. Dieser Reaktion kommt im Rahmen der 1934 von Reichstein und Grüssner entwickelten Vitamin-C-Synthese eine große Bedeutung zu. Für das im Jahr 1929 von Fleming entdeckte Penicillin wurde während des zweiten Weltkrieges ein Fermentationsverfahren entwickelt. Hier tritt erstmals ein chemisch anspruchsvolles Molekül als Syntheseprodukt von Mikroorganismen auf. 1952 veröffentlichten Peterson und Murray die Umwandlung von Progesteron in 11α -Hydroxyprogesteron mit Hilfe eines Pilzstammes der Gattung *Rhizopus*. Diese Entdeckung war von großer Bedeutung, da viele wichtige Steroidhormone wie beispielsweise Cortison am Kohlenstoffatom 11 Sauerstofffunktionen besitzen, die für ihre biologische Aktivität ausschlaggebend sind. Da die mikrobiellen und somit enzymatischen Reaktionen im Gegensatz zu chemischen Verfahren stereospezifisch ablaufen, wurde hier ein weiteres wichtiges Applikationsfeld der industriellen Mikrobiologie eröffnet (Nüesch, 1969).

Die Verwendung von Mikroorganismen als Biokatalysatoren wurde in den letzten Jahren durch neue Kultivierungs- und Fermentationstechniken sowie Fortschritte im Bereich der Immobilisierung ständig verbessert (Klein und Ziehr, 1990; Cassidy et al., 1996; Dingermann, 1999). Vor allem die Entwicklungen in der Gentechnik ermöglichen die gezielte Herstellung von sog. Hochleistungsstämmen mit maßgeschneiderten Eigenschaften (Knippers, 1995; Dingermann, 1999). Heute werden Mikroorganismen in vielen Bereichen erfolgreich eingesetzt. In den folgenden Abschnitten werden einige Anwendungsgebiete dargestellt.

2.1.2.2 Aromastoffe

Besondere Bedeutung kommt biotechnologischen Verfahren im Bereich der Aromastoffe zu. Sowohl Bakterien als auch Hefen und Pilze sind zur Bildung von Aromakomponenten mittels *de novo*-Synthese oder Biotransformation in der Lage. Von diesen „whole-cell“-Systemen werden Vorläuferverbindungen wie Kohlenhydrate, Fette und

Proteine katabolisiert und dabei entstehende Abbauprodukte zu komplexen Aromastoffen umgewandelt. Dieses Prinzip macht man sich bereits seit Jahren bei der Produktion von fermentierten Lebensmitteln wie Käse, Joghurt, Bier oder Wein zunutze (Hamada et al., 1991, Imhof und Bosset, 1994). Inzwischen ist eine Vielzahl an biotechnologischen Prozessen bekannt, bei denen Mikroorganismen oder daraus isolierte Enzyme eingesetzt werden. Im Zuge der steigenden Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen auf dem Weltmarkt wurde ein großer Anteil davon patentiert.

Tab. 2-1: Aromakomponenten, die von Mikroorganismen gebildet werden können

Aromastoff	Mikroorganismus	Literatur
<u>Bakterien:</u>		
Vanillin	<i>Bacillus coagulans</i>	Karmakar et al., 2000
Diacetyl	<i>Lactobacillus lactis</i>	Cheetham, 1996
Geosmin	<i>Streptomyces citreus</i>	Pollak und Berger, 1996
Nootkaton	<i>Enterobacteriaceae</i>	Janssens et al., 1992
Borneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	Janssens et al., 1992
<u>Hefen:</u>		
γ -Decalacton	<i>Sporobolomyces odorus</i>	Haffner und Tressl, 1996
γ -Decalacton	<i>Sporidiobolus</i> sp.	Blin-Perrin et al., 2000
Geraniol	<i>Klyveromyces lactis</i>	Welsh, 1994
Linalool	<i>Klyveromyces lactis</i>	Welsh, 1994
Furaneol [®]	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Hecquet et al., 1996
<u>Pilze:</u>		
Vanillin	<i>Pycnoporous cinnabarinus</i>	Falconnier et al., 1994
Benzaldehyd	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Fabre et al., 1996
γ -Decalacton	<i>Fusarium poae</i>	Sarris und Latrasse, 1985
1-Octen-3-ol	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Assaf et al., 1995
Citronellol	<i>Mycena pura</i>	Krings et al., 1995
Linalool	<i>Wolfiporia cocos</i>	Krings et al., 1995
Coumarine	<i>Pleurotus euosmus</i>	Berger, 1995
Methylketone	<i>Aspergillus niger</i>	Hagedorn und Kaphammer, 1994
Pyrazine	<i>Aspergillus</i> sp.	Seitz, 1994
Jasmonate	<i>Botrydipoldia theobromae</i>	Miersch et al., 1993

Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über ausgewählte Aromastoffe und jeweils eine Spezies, die zur biotechnologischen Produktion dieser Verbindung befähigt ist. Wichtige Verbindungen sind vor allem Vanillin, Benzaldehyd, γ -Decalacton sowie verschiedene Monoterpene. Zahlreiche Übersichtsartikel fassen die Entwicklungen der letzten Jahre zusammen (Cheetham, 1993; Tyrrell, 1995; Feron et al., 1996; Gatfield, 1996; Krings und Berger, 1998).

2.1.2.3 Aminosäuren

Eine industriell bedeutsame Anwendung von Mikroorganismen zur Stoffsynthese ist die Produktion von Aminosäuren. Aminosäuren spielen im Lebensmittelbereich aufgrund verschiedener Aspekte eine besondere Rolle. L-Glutaminsäure, deren jährliche Produktion ca. 500000 t beträgt, wird in Form des Natriumsalzes als Geschmacksverstärker eingesetzt. L-Phenylalanin wird zur Synthese des Süßstoffes Aspartam benötigt. Die essentiellen Aminosäuren L-Lysin, L-Threonin, L-Tryptophan und L-Isoleucin werden zur Supplementierung von Nahrungs- und Futtermitteln verwendet, deren natürlicher Gehalt an diesen Verbindungen gering ist.

Heute stehen in der Regel genetisch modifizierte Mikroorganismen zur gezielten Überproduktion der gewünschten Aminosäuren zur Verfügung. Verschiedene Zielorganismen wurden durch einen Eingriff in die Biosynthesewege derart verändert, dass eine deutliche Zunahme der Zielkomponenten im Vergleich zum Wildtyp festzustellen ist. Dabei kann es sich neben der Überexpression bestimmter Schlüsselenzyme auch um die Inaktivierung von konkurrierenden Enzymen oder das Unterdrücken einer „Feedback“-Inaktivierung handeln (Krämer, 1996; Stewart, 1997). Tabelle 2-2 fasst einige Beispiele an modifizierten Mikroorganismen zur Synthese von Aminosäuren zusammen. Es wird deutlich, dass als Zielorganismen nur eine geringe Anzahl an Stämmen eingesetzt wird, die sich durch ihre gute Handhabbarkeit und fehlende Pathogenität auszeichnen. Die ablaufenden metabolischen Vorgänge in diesen Stämmen sind gut untersucht. Daher ist eine gezielte Modifikation deutlich erleichtert.

Tab. 2-2: Produktion von Aminosäuren durch genetisch modifizierte Mikroorganismen

Aminosäure	Mikroorganismus	Literatur
L-Glutaminsäure	<i>Escherichia coli</i>	Patnaik et al., 1995
	<i>Brevibacterium flavum</i>	Demain, 2000

Fortsetzung von **Tabelle 2-2:**

Aminosäure	Mikroorganismus	Literatur
L-Phenylalanin	<i>Corynebacterium lactofermentum</i>	Ito et al., 1990
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda et al., 1993
L-Tryptophan	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda und Katsumata, 1999
	<i>Escherichia coli</i>	Kawasaki et al., 1995
L-Lysin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Kelle et al., 1996
L-Threonin	<i>Serratia marcescens</i>	Komatsubara, 1994
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Farfan et al., 1996
L-Isoleucin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Morbach et al., 1995
	<i>Corynebacterium lactofermentum</i>	Colon et al., 1995
L-Prolin	<i>Escherichia coli</i>	Yoshinaga, 1986
	<i>Serratia marcescens</i>	Komatsubara, 1994
L-Arginin	<i>Serratia marcescens</i>	Komatsubara, 1994
L-Serin	<i>Methylobacterium</i> sp. NM43	Hagishita et al., 1996
L-Cystein	<i>Pseudomonas putida</i>	Tamura et al., 1998

2.1.2.4 Weitere biotechnologische Verfahren

Im folgenden Abschnitt (Tab. 2-3) sind weitere biotechnologische Verfahren zusammengefasst, bei denen verschiedene Mikroorganismen zur Produktion von Stoffen aus unterschiedlichen Bereichen der Lebensmittelindustrie und Pharmazie erfolgreich eingesetzt werden. Die heute verwendeten Stämme sind in der Regel genetisch derart verändert, dass eine optimale Ausbeute der Zielsubstanz erreicht wird.

Tab. 2-3: Zusammenfassung weiterer biotechnologischer Verfahren

Verbindung	Mikroorganismus	Literatur
<u>Organische Säuren:</u>		
Äpelsäure	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nakayama und Ushijima, 1993
Citronensäure	<i>Aspergillus niger</i>	Demain, 2000
Essigsäure	<i>Gluconobacter</i> sp.	Beppu, 1994
Milchsäure	<i>Lactobacillus</i> sp.	Guyot et al., 2000
Weinsäure	<i>Nocardia tataricans</i>	Rosenberg et al., 1999

Fortsetzung von **Tabelle 2-3**:

Verbindung	Mikroorganismus	Literatur
<u>Carotinoide:</u>		
β-Carotin	<i>Dunaliella</i> sp. (Algen)	Ventosa und Nieto, 1995
Canthaxanthin	<i>Halobacterium</i> sp.	Asker und Ohta, 1999
Astaxanthin	<i>Candida utilis</i> (rekomb.)	Miura et al., 1998
Lycopin	<i>Candida utilis</i> (rekomb.)	Miura et al., 1998
<u>Vitamine:</u>		
Cyanocobalamin	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Demain, 2000
Biotin	<i>Serratia marcescens</i>	Demain, 2000
Riboflavin	<i>Bacillus subtilis</i> (rekomb.)	Perkins et al., 1999
	<i>Ashbya gossipii</i>	Demain, 2000
<u>Ribonukleotide:</u>		
GMP	<i>Escherichia coli</i>	Fuijo et al., 1995
IMP	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Mori et al., 1997
XMP	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Hashimoto und Ozaki, 1999
<u>Antibiotika:</u>		
Tetrazykline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Ross und Schügerl, 1988
Aminoglykoside	<i>Spirillospora</i> sp.	Hacene et al., 2000
β-Lactame	<i>Streptomyces griseus</i>	Berwick, 1988
Glycopeptide	<i>Amiclatopsis</i> sp.	Nadkarni et al., 1994

2.2 Darstellung und Bedeutung optisch aktiver 3-Hydroxysäuren

2.2.1 Chemische Methoden zur Darstellung

Bei der Reformatski-Synthese von β -Hydroxysäuren oder deren Estern sowie von α,β -ungesättigten Carbonsäuren entstehen im ersten Schritt aus α -Halogenestern und Zink mesomeriestabilisierte Alkylzinkhalogenide. Diese addieren nukleophil an Aldehyde oder Ketone. Im Gegensatz zu Grignard-Verbindungen greifen die Alkylzinkhalogenide dabei nicht am Ester-Kohlenstoff, sondern am α -Kohlenstoff an. Die Hydrolyse des Primärproduktes führt zunächst zur Bildung von β -Hydroxysäuren, aus denen durch alkalische Hydrolyse die entsprechende Säure freigesetzt werden kann. Ist ein α -Wasserstoffatom vorhanden, können durch Dehydratisierung auch α,β -ungesättigte Ester gebildet werden (Abb. 2-1) (Breitmeier und Jung, 1983).

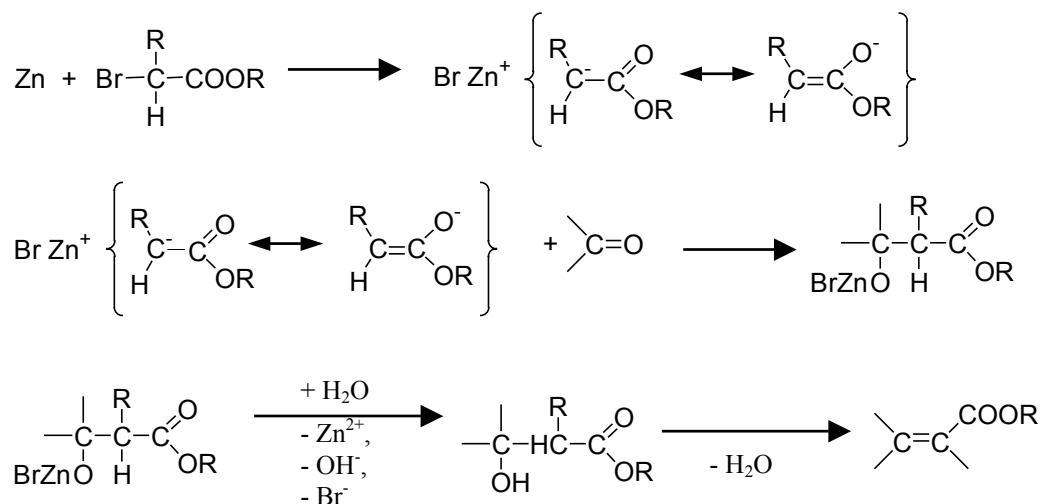


Abb. 2-1: Mechanismus der Reformatski-Synthese (nach Breitmeier und Jung, 1983)

In einer Variante der Reformatski-Reaktion wird das Enolat-Anion mit Lithium-diisopropylamid (LDA) bei tiefen Temperaturen erzeugt. Nach Zugabe der Carbonyl-Verbindung entstehen β -Hydroxyester in guten Ausbeuten (Breitmeier und Jung, 1983).

Die Darstellung optisch aktiver 3-Hydroxysäuren ist auch durch asymmetrische Reduktion von β -Ketoestern möglich (Abb. 2-2). Dazu stehen verschiedene modifizierte Metallkatalysatoren, z.B. mit optisch aktivem Tartrat modifiziertes Nickel, zur Verfügung. Die auf diesem Weg gebildeten Produkte zeichnen sich durch hohe Enantiomerenüberschüsse aus (Harada et al., 1981).

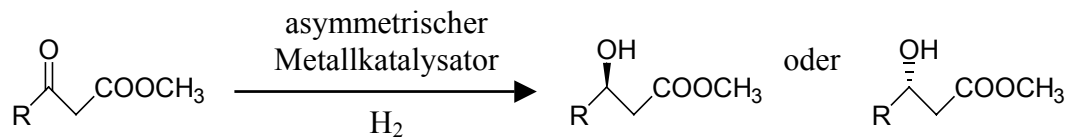


Abb. 2-2: Darstellung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren mit asymmetrischen Metallkatalysatoren

2.2.2 Enzymatische Methoden zur Darstellung

Im Rahmen der biochemischen Darstellung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren werden Mikroorganismen oder daraus isolierte Enzyme eingesetzt.

Bakterien der Gattungen *Gluconobacter* und *Arthrobacter* sowie Hefestämme der Gattung *Hansenula* sind in der Lage, aliphatische Glykole durch die Oxidation von Alkoholfunktionen zu den entsprechenden hydroxylierten Carbonsäuren umzusetzen (Cho et al., 1990).

Die erste Bioreduktion von β -Ketosäuren wurde bereits 1951 mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Seither wurden verschiedene Studien mit unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt. Ausgehend von β -Ketovaleriansäure kann beispielsweise durch Reduktion mit *Thermoaerobium Brockii* 3-(*R*)-Hydroxyvaleriansäure (*ee* 84 %) erhalten werden (Seebach et al., 1984). Die Reduktion von Acetessigsäureethylester durch *Saccaromyces cerevisiae* oder *S. bailli* liefert 3-(*S*)-Hydroxybuttersäureethylester in hoher optischer Reinheit (*ee* 99 %). Durch kontinuierliche Zugabe des Substrates und Ethanol als Kohlenstoffquelle kann zusätzlich die Ausbeute der Biotransformation gesteigert werden (Hasegawa und Nagashima, 2000). Die Konfiguration der durch Reduktion einer Ketogruppe gebildeten 3-Hydroxysäure hängt vom verwendeten Mikroorganismus ab. Häufig liegen antistereospezifische Reduktasen mit unterschiedlicher Dominanz vor (Hasegawa und Nagashima, 2000).

Auch die direkte β -Hydroxylierung von Carbonsäuren ist ein möglicher Weg zur Darstellung von 3-Hydroxysäuren. Die Reaktion läuft in zwei Stufen ab. Im ersten Schritt kommt es unter Dehydrogenierung zur Bildung einer α,β -ungesättigten Verbindung. Im zweiten Schritt, einer Hydratation, wird die Hydroxygruppe gebildet. Für diese Biotransformation werden in der Regel isolierte β -Oxidationsenzyme aus Mikroorganismen wie *Fusarium* sp., *Pseudomonas* sp. oder *Mucor* sp. eingesetzt (Hasegawa und Nagashima, 2000).

2.2.3 Optisch aktive 3-Hydroxysäuren in der organischen Synthese

Aufgrund ihrer Bifunktionalität stellen chirale Hydroxysäuren wichtige Bausteine in der organischen Synthese dar. Neben typischen Reaktionen der Carboxy- oder Hydroxygruppe wie Veresterung oder Dehydratisierung zeigen sie charakteristische ambidente Reaktionen wie die Lactonbildung, die auf die gleichzeitige Anwesenheit der beiden funktionellen Gruppen zurückzuführen sind (Breitmeier und Jung, 1983). 3-Hydroxysäuren werden daher häufig als Ausgangsmaterialien zur Darstellung von Pheromonen, Antibiotika und anderen Substanzen biologischen Ursprungs eingesetzt. Tabelle 2-4 fasst einige Produkte zusammen, die ausgehend von 3-Hydroxysäuren synthetisiert werden können.

Tabelle 2-4: Substanzen, die ausgehend von 3-Hydroxysäuren synthetisiert werden können

Verbindung	Literatur
(2 <i>R</i> ,4' <i>R</i> ,8' <i>R</i>)- α -Tocopherol (Vitamin)	Cohen et al., 1976
Sulcatol (Pheromon)	Afonso et al., 1989
Grandisol (Pheromon)	Mori und Nagano, 1991
Captopiril (ACE-Hemmer)	Chirumamilla et al., 2001
Lasalocid A (Antibiotikum)	Nakata et al., 1978
Colletodiol (Antibiotikum)	Keck et al., 1989
Vermiculin (Antibiotikum)	Noda et al., 1994
Ägyptinon A und B (Antibiotika)	Danheiser et al., 1994
Cryptophycin A und C (Antibiotika)	Barrow et al., 1995
Grahamimycin A (Antibiotikum)	Kobayashi und Matsuumi, 2000

2.3 Der Abbau von Fettsäuren

Zur Metabolisierung von Fettsäuren existieren biochemisch verschiedene oxidative Abbauwege. Neben der dominierenden β -Oxidation, bei der die Substrate im Rahmen einer zyklischen Reaktionsfolge in C2-Einheiten zerlegt werden, kommen die α - und die ω -Oxidation vor.

2.3.1 Die β -Oxidation

Der biochemische Ablauf des Fettsäureabbaus bei der β -Oxidation ist schon seit langem bekannt. Die Grundreaktionen wurden bereits aufgeklärt, bevor moderne biochemische Methoden zur Reinigung von Enzymen oder die Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen im Rahmen von Biogenesestudien entwickelt wurden. Im Jahre 1904 erhielt Franz Knoop im Rahmen von Verfütterungsstudien an Hunden erste Hinweise darauf, dass beim Fettsäureabbau das Kohlenstoffatom in β -Stellung zur Carboxylgruppe oxidiert wird. Zur Verfolgung des Stoffwechselweges setzte er eine chemische Markierung ein. Er verwendete Fettsäuren, die am ω -Ende einen Benzolring trugen und isolierte anschließend die phenylhaltigen Stoffwechselprodukte aus dem Urin. Hunde, an die markierte Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen verfüttert wurden, schieden Hippursäure, das Glycinamid der Benzoesäure, aus, während im Urin der Hunde, die geradzahlige Fettsäuren erhalten hatten, Phenylacetursäure, das Glycinamid der Phenylessigsäure, nachweisbar war. Aus der Tatsache, dass die gebildete Phenylessigsäure nicht weiter zur Benzoesäure oxidiert wurde, schloss Knoop auf eine Beteiligung des β -Kohlenstoffatoms an der Reaktion und leitete daraus den Namen „ β -Oxidation“ ab.

Erst ab dem Jahre 1950, im Anschluss an die Entdeckung von Coenzym A, wurden die Enzyme der β -Oxidation isoliert und ihre Reaktionsmechanismen aufgeklärt. Knoops Hypothese wurde durch Nachfolgearbeiten bestätigt (Voet und Voet, 1994).

Der β -oxidative Abbau gesättigter Fettsäuren umfasst nach der Aktivierung zu den entsprechenden Fettsäure-Acyl-CoA-Derivaten vier Grundreaktionen:

- 1) Bildung einer *trans*- α,β -Doppelbindung in einer Dehydrierungsreaktion, die das Flavoenzym Acyl-CoA-Dehydrogenase katalysiert.
- 2) Hydratisierung der Doppelbindung durch Enoyl-CoA-Hydratase unter Bildung von 3-(*L*)-Hydroxyacyl-CoA.

- 3) Dehydrierung von Hydroxyacyl-CoA durch 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, wobei die entsprechende β -Ketoacyl-CoA-Verbindung entsteht.
- 4) Spaltung der $C_\alpha - C_\beta$ -Bindung in einer Thiolysereaktion, die von β -Ketoacyl-CoA-Thiolase katalysiert wird; dabei werden Acetyl-CoA und ein neues Acyl-CoA-Molekül frei, das zwei C-Atome kürzer ist als die Ausgangsverbindung.

Abbildung 21 fasst die Grundreaktionen der β -Oxidation schematisch zusammen. Die verwendeten Nummerierungen nehmen Bezug auf obige Auflistung.

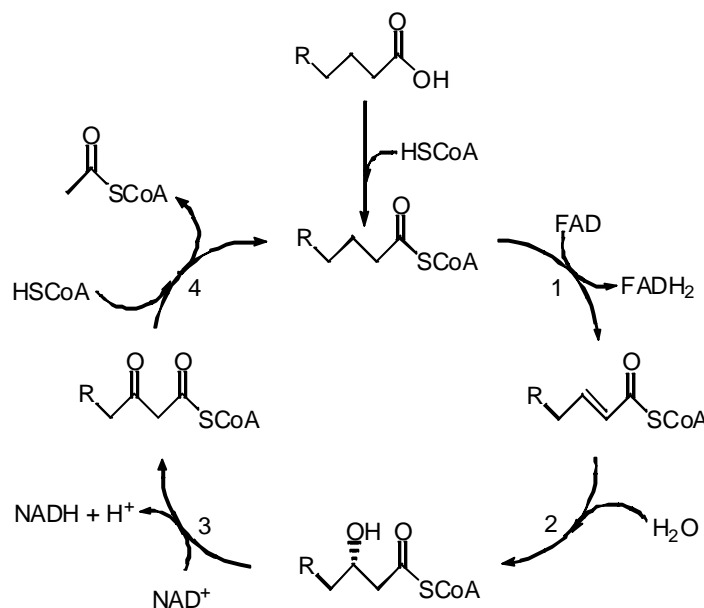


Abb. 2-1: Grundreaktionen der β -Oxidation (nach de Waard et al., 1993)

Erste mechanistische Studien zu den einzelnen Stufen der β -Oxidation sowie eine partielle Charakterisierung der beteiligten Enzyme wurden bereits in den 50er und 60er Jahren durchgeführt. Man hat gezeigt, dass am Abbau ungesättigter Fettsäuren weitere Enzyme beteiligt sind und dass die β -Oxidation in tierischen Organismen in den Mitochondrien lokalisiert ist. In den letzten zwei Jahrzehnten hat das Interesse an der β -Oxidation wieder deutlich zugenommen. Dies führte zur Entdeckung eines zweiten β -Oxidationssystems in den Peroxisomen, das deutliche Unterschiede zum mitochondrialen Abbau aufweist. Weitere Abweichungen treten bei der β -Oxidation in Mikroorganismen auf (Kunau et al., 1995).

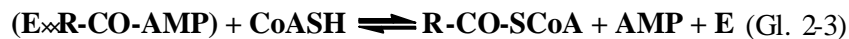
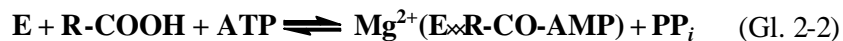
In den folgenden Abschnitten werden die Grundreaktionen der mitochondrialen β -Oxidation im Einzelnen erläutert. Weiterhin werden Unterschiede bei der β -Oxidation in den Peroxisomen sowie in Mikroorganismen verdeutlicht.

2.3.1.1 Aktivierung der Fettsäuren und Transport durch die Mitochondrienmembran

Bevor Fettsäuren β -oxidativ abgebaut werden können, müssen sie durch eine ATP-abhängige Acetylierungsreaktion zum entsprechenden Fettsäure-Acyl-CoA-Ester umgewandelt werden. Dieser Aktivierungsvorgang wird von einer Familie aus mindestens drei **Acyl-CoA-Synthetasen**, auch als **Thiokinase**n bezeichnet, katalysiert, die sich durch ihre Spezifität für verschiedene Kettenlängen unterscheiden. Folgende Reaktion wird von den Acyl-CoA-Synthetasen katalysiert (Gl. 2-1):



Die Gleichungen 2-2 und 2-3 beschreiben den zweistufigen Ablauf der Reaktion, in deren Verlauf ein enzymgebundenes Acyl-AMP-Molekül als Intermediat auftritt (Berg, 1956).



Dieser Ablauf wurde durch Versuche mit markierten Substraten bestätigt. Nach der Aktivierung von ^{18}O -markierter Palmitinsäure durch eine Acyl-CoA-Synthetase, die für langkettige Fettsäuren spezifisch ist, tragen sowohl das Acyl-CoA als auch AMP eine ^{18}O -Markierung. Diese Beobachtung zeigt, dass während der Reaktion ein gemischtes Acyladenylatanhydrid als Zwischenprodukt auftritt, welches dann von der Sulfhydrylgruppe des CoA angegriffen wird. Als Endprodukt entsteht der Thioester (Stryer, 1996).

Bei den Acyl-CoA-Synthetasen mit Spezifität für kurzkettige Substrate wie Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA handelt es sich um lösliche Proteine, die in der mitochondrialen Matrix fast aller Gewebe vorkommen. Auch Acyl-CoA-Synthetasen, die Fettsäuren mit einer mittleren Kohlenstoffkette von 4 bis 12 C-Atomen umsetzen, sind in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Octanoyl-CoA stellt das bevorzugte Substrat dar, aber auch verzweigte, ungesättigte, hydroxylierte oder aromatische Carbonsäuren werden aktiviert. Acyl-CoA-Synthetasen mit Präferenz für gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit 10 bis 20 C-Atomen als Substrate sind membrangebundene Enzyme, die mit der

äußeren Mitochondrienmembran und dem Endoplasmatischen Reticulum assoziiert sind (Groot et al., 1976).

Die Aktivierung der Fettsäuren findet im Cytoplasma statt, der eigentliche Abbau jedoch in den Mitochondrien. Da ein direkter Transport langkettiger Fettsäure-Acyl-CoA-Ester durch die innere Mitochondrienmembran nicht möglich ist, wird der Acyl-CoA-Rest auf Carnitin übertragen. Diese Verbindung kommt sowohl in pflanzlichen als auch tierischen Geweben vor. Die am Transportmechanismus beteiligten Carnitin-Palmitoyl-Transferasen (CTP) I und II, die für die Übertragung einer Reihe von Acylgruppen verantwortlich sind, befinden sich an der äußeren bzw. inneren Mitochondrienmembran. Der Translokationsprozess wird durch ein spezifisches Carrierprotein bewerkstelligt, welches Acylcarnitin in die Mitochondrien hinein und freies Carnitin heraus transportiert. Die Acylgruppe wird in den Mitochondrien auf dort vorhandene CoA-Moleküle übertragen (Abb. 2-2). Die so gebildeten Acyl-CoA-Moleküle stellen die Substrate für die β -Oxidation dar (Fritz und Marquis, 1965; Pande und Parvin, 1976).

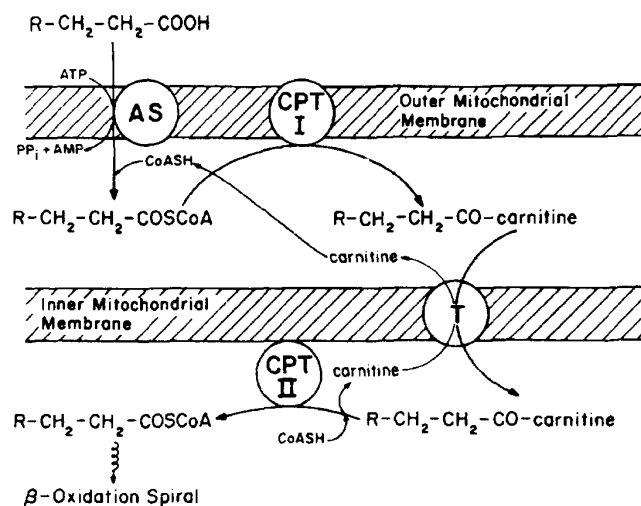


Abb. 2-2: Carnitin-abhängiger Transport der aktivierten Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran (nach Kunau et al., 1995)

verwendete Abkürzungen: AS: Acyl-CoA-Synthetase

CTP I: Carnitin-Palmitoyltransferase I

CTP II: Carnitin-Palmitoyltransferase II

T: Carnitin : Acylcarnitin-Translokase

2.3.1.2 Die erste Reaktion der *b*-Oxidation: Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Die erste Reaktion jedes Abbauzyklus ist die Oxidation von Acyl-CoA durch eine **Acyl-CoA-Dehydrogenase** unter Bildung eines Enoyl-CoA mit einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3. Wie bei der Dehydrogenierung von Succinat im Rahmen des Citronensäurezyklus fungiert bei der Reaktion dieser Enzyme FAD, nicht NAD⁺, als Elektronenakzeptor. Entsprechend der folgenden Gleichung (Gl. 24) wird ein Proton am C_α-Atom abstrahiert und ein Hydridion vom C_β-Atom auf FAD übertragen (Ghisla et al., 1984; Lau et al., 1988; Powell und Thorpe, 1988).



Das gebildete FADH₂ wird in der Elektronentransportkette der Mitochondrien mit Hilfe einer Reihe von Elektronentransferreaktionen reoxidiert. Das elektronenübertragende Flavoprotein (ETF; engl.: *electron-transferflavoprotein*) gibt ein Elektronenpaar von FADH₂ an das Flavin-Eisen-Schwefel-Protein ETF:Ubichinon-Oxidoreduktase weiter. Dieses überträgt wiederum ein Elektronenpaar auf die mitochondriale Elektronentransportkette, indem es Ubichinon (Coenzym Q; CoQ) zu Ubichinol (CoQH₂) reduziert. Für jedes übertragene Elektronenpaar werden zwei Moleküle ATP gebildet, da die Reduktion von O₂ zu H₂O durch die Elektronentransportkette auf der Stufe von CoQ beginnt (Voet und Voet, 1994).

Mitochondrien enthalten vier verschiedene Acyl-CoA-Dehydrogenasen [EC 1.3.99.2 und 1.3.99.3] mit unterschiedlicher, aber überlappender Kettenlängenspezifität für kurze, mittlere, lange und sehr lange Kohlenstoffketten. Diese Spezifität der Enzyme variiert innerhalb verschiedener Spezies nur geringfügig. Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die kurzkettige Verbindungen bevorzugen, setzen Butyryl-CoA mit der höchsten Aktivität um. Das Substratspektrum der Enzyme mit Präferenz für mittlere Kettenlängen reicht von Hexanoyl-CoA bis Myristoyl- oder Palmitoyl-CoA, wobei die maximale Umsatzrate für Octanoyl-CoA beobachtet wurde. Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Spezifität für lange Kohlenstoffketten akzeptieren Moleküle mit acht (Octanoyl-CoA) bis 20 C-Atomen (Arachidoyl-CoA) als Substrate. Das Aktivitätsmaximum liegt hier bei Lauryl-CoA (Ikeda et al., 1985; Finocchiaro et al., 1987). Fettsäuren mit bis zu 24 C-Atomen werden schließlich von den Enzymen umgesetzt, die sehr lange Kohlenstoffketten bevorzugen (Izai et al., 1992). Die K_m-Werte liegen jeweils im Bereich von 1–20 μM.

Bei den Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Präferenz für kurze bis lange Kohlenstoffketten handelt es sich um lösliche Matrixproteine mit einer Molekularmasse zwischen 160 und 180 kDa. Sie bestehen aus vier identischen Untereinheiten mit Molekularmasse von 42 bis 45 kDa. Ein FAD-Molekül ist jeweils nicht-kovalent an das aktive Zentrum asso-

ziiert (Ikeda et al., 1985; Indo et al., 1991). Bei den Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die bevorzugt sehr langkettige Substrate umsetzen, handelt es sich um membrangebundene Enzyme mit einer nativen Molekularmasse von etwa 150 kDa. Pro Mol Enzym enthalten sie zwei Mol FAD.

Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen werden im Cytosol der Zellen synthetisiert. Es wurde eine 2-4 kDa große „Führungssequenz“ nachgewiesen, die für den Import in die Mitochondrien verantwortlich ist. Dort erfolgt dann proteolytisch deren Abspaltung unter Freisetzung des eigentlichen Enzyms (Ikeda et al., 1987).

2.3.1.3 Die zweite Reaktion der β -Oxidation: *Enoyl-CoA-Hydratasen*

Im zweiten Schritt des β -Oxidationszyklus erfolgt die Hydratisierung der Doppelbindung der *2-trans*-Enoyl-CoA-Verbindung unter Bildung einer sekundären Hydroxygruppe am C_{β} -Atom. Katalysiert wird diese Reaktion durch **Enoyl-CoA-Hydratasen**. Die Wasseranlagerung (Gl. 2-5) erfolgt wie bei Fumarat stereospezifisch. Wird eine *trans*-Doppelbindung hydratisiert, entsteht bei der Reaktion ausschließlich das *L*-(*S*)-Isomer des 3-Hydroxyacyl-CoA. Das gleiche Enzym kann auch *cis*-Doppelbindungen hydratisieren, allerdings unter Bildung des *D*-(*R*)-Isomers. Auch Substratanaloga, die an oder in der Nähe der Doppelbindung substituiert sind, werden umgesetzt (Li et al., 1990; Karlson, 1994; Voet und Voet, 1994).



Das erste bekannte Enzym dieser Gruppe, die sog. Crotonase [EC 4.2.1.17], wurde 1961 aus Rinderleber isoliert, gereinigt und partiell charakterisiert. Es besteht aus sechs identischen Untereinheiten und weist eine Molekularmasse von 160 kDa auf. In den folgenden Jahren wurden weitere Crotonasen aus Rattenleber und humanem Gewebe isoliert (Fong und Schulz, 1977). Die Enzyme werden im Cytosol der Zellen synthetisiert und verfügen analog zu den Acyl-CoA-Dehydrogenasen über eine Vorsequenz, die für die Einschleusung in die Mitochondrien verantwortlich ist und dort abgespalten wird (Ozasa et al., 1984).

Crotonase setzt mit abnehmender Aktivität Enoyl-CoA-Verbindungen von Crotonyl-CoA bis *2-trans*-Hexadecenoyl-CoA um. Die K_m -Werte liegen bei etwa 30 μ M (Fong und Schulz, 1977; He et al., 1992). Durch langkettige Produkte wie 3(*L*)-Hydroxyhexadecanoyl-CoA tritt eine deutliche Produktinhibierung des Enzyms auf. 3-Ketoacyl-CoA-Verbindungen wie Acetoacetyl-CoA binden in ihrer Enolform an das Enzym und wirken so ebenfalls inhibierend (Waterson und Hill, 1972; He et al., 1992).

Inzwischen wurde die Existenz einer weiteren Enoyl-CoA-Hydratase [EC 4.2.1.74] mit Spezifität für langkettige Verbindungen nachgewiesen (Schulz, 1974). Sie ist Bestandteil eines trifunktionalen Enzymkomplexes, der als Enoyl-CoA-Hydratase, als 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und als 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase mit Substratspezifität für langkettige Verbindungen fungiert. Der Enzymkomplex ist an die innere Membran der Mitochondrien gebunden und besteht aus zwei Typen von Untereinheiten, die in äquimolaren Mengen vorliegen. Er weist eine quaternäre Struktur ($\alpha_4\beta_4$ oder $\alpha_2\beta_2$) auf. Die Molekularmasse der großen Untereinheit beträgt 80 kDa, während die kleine Untereinheit eine Molekularmasse zwischen 45 und 50 kDa aufweist. Aus Sequenzhomologien und der Expression von klonierten DNA-Abschnitten wurde abgeleitet, dass die Enoyl-CoA-Hydrataseaktivität und die 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität mit der terminalen Amino- bzw. der Carboxylregion der großen Untereinheit assoziiert sind, während die kleine Untereinheit 3-Ketoacyl-CoA-Thiolaseaktivität aufweist (Uchida et al., 1992; Luo et al., 1993).

2.3.1.4 Die dritte Reaktion der β -Oxidation : 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen

Im dritten Schritt der β -Oxidation kommt es zu einer weiteren Oxidationsreaktion. Katalysiert von **3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen** [EC 1.1.1.35] wird die Hydroxygruppe am C3 unter NADH-Bildung zur Ketogruppe umgewandelt (Gl. 2-6; Voet und Voet, 1994).



Die enantioselektiven 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen katalysieren den Transfer eines Hydridions vom C3 des Substrates auf NAD^+ . Das Enzym ist dabei hoch spezifisch für NAD^+ als Wasserstoffakzeptor. Mit $NADP^+$ als H-Akzeptor liegt die Umsatzungsrate nur bei ca. 2 % (Marcus et al., 1958).

In mitochondrialen Zellen liegt eine 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase vor, die kurz- und mittelkettige Substrate umsetzt. Das native Enzym weist eine Molekularmasse von 65 kDa auf und besteht aus zwei identischen Untereinheiten. Die Bindungseinheit für NAD befindet sich in der N-terminalen Domäne. Die C-terminale Region ist für die Interaktion der beiden Untereinheiten verantwortlich. Die Acylkette der Substrate ist während der Umsetzung in einer Spalte zwischen den beiden Domänen gebunden. Auch dieses Protein wird im Cytosol der Zellen synthetisiert. Es verfügt über eine etwa 3 kDa große Vorsequenz, die für den Import in die Mitochondrien notwendig ist (Osumi und Hashimoto, 1980; Ozasa et al., 1984; Hartmann et al., 1991).

Eine zweite 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase ist Bestandteil des membrangebundenen trifunktionalen β -Oxidationskomplexes. Sie setzt bevorzugt mittel- und langkettige Fettsäuren um (Uchida et al., 1992; Luo et al., 1993).

2.3.1.5 Die vierte Reaktion der β -Oxidation: 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen

Im vierten und letzten Schritt der β -Oxidation erfolgt die Spaltung des 3-Ketoacyl-CoA durch die Thiolgruppe eines zweiten CoA-Moleküls. Dabei entstehen Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA. Diese thiolytische Spaltung (Gl. 2-7) wird von **3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen** oder kurz **β -Ketothiolasen** katalysiert (Voet und Voet, 1994).



In den Mitochondrien liegen zwei Typen von Thiolasen vor, nämlich 3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen (EC 2.3.1.16; Thiolase I), die Substrate verschiedener Kettenlängen umsetzen, sowie Acetoacetyl-CoA-Thiolasen (EC 2.3.1.9; Thiolase II), die ausschließlich die Umsetzung der namensgebenden Verbindung katalysieren (Middleton, 1973). Beide Enzyme können *in vivo* durch CoASH modifiziert werden, welches kovalent und reversibel über eine Disulfidbrücke an das Protein binden und es so inaktivieren kann (Huth und Alves, 1985; Schwerdt und Huth, 1993).

Es handelt sich jeweils um Homotetramere, deren Untereinheit eine Molekularmasse von 40 bis 46 kDa aufweist. Beide Enzyme werden im Cytosol synthetisiert. Im Gegensatz zu den anderen an der β -Oxidation beteiligten Enzymen besitzen sie eine Signalsequenz für den Import in die Mitochondrien, die nicht abgespalten wird (Miyazawa et al., 1981; Amaya et al., 1988).

Die Beobachtung, dass die Sulfhydrylgruppen der Thiolasen für die Spaltung essentiell sind, führte zu der Annahme, dass der in den Gleichungen 2-8 und 2-9 aufgeführte Zweistufenmechanismus über einen Acyl-S-Enzym-Komplex (R-CO-S-E) als Intermediat abläuft.



Kinetische Studien bestätigten diesen vorgeschlagenen zweistufigen Reaktionsweg und ergaben weiterhin, dass ein sog. „Ping-Pong“-Mechanismus vorliegt (Miyazawa et al., 1981).

Im Rahmen weiterer Mechanismusstudien mit isolierten Thiolasen wurde gezeigt, dass eine Alkylierung der reaktiven Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum, z.B. durch Iodacetamid oder 2-Bromacetyl-CoA zu einer irreversiblen Inaktivierung der Enzyme führt. Diese Inhibitoren sind allerdings *in vivo* nicht spezifisch genug und deshalb nicht effektiv. Dort erfolgt eine Inhibierung durch kurz- oder mittelkettige Carbonsäuren, die in den Mitochondrien zunächst zu ihren CoA-Thioestern aktiviert und anschließend über die β -Oxidation zu den korrespondierenden 3-Ketoderivaten metabolisiert werden. In dieser Form binden sie an die Thiolasen und hemmen deren Aktivität (Li und Schulz, 1988).

Obwohl beide Enzyme in der mitochondrialen Matrix vorliegen, wird nur die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase im Rahmen der β -Oxidation benötigt, während die Acetoacetyl-CoA-Thiolase eine Funktion im Rahmen des Ketonkörper- und Isoleucin-Metabolismus ausübt (Middleton, 1973).

Weiterhin konnte eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase identifiziert werden, die langkettige Substrate umsetzt. Ihre Aktivität steigt mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäuren. Diese Thiolase ist Bestandteil des trifunktionalen Enzymkomplexes, der an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist (Uchida et al., 1992; Luo et al., 1993).

2.3.1.6 Die Organisation der β -Oxidation in den mitochondrialen Zellen

In den Mitochondrien werden nur sehr geringe Konzentrationen an Intermediaten der β -Oxidation nachgewiesen. Dies führte bereits früh zu der Annahme, dass die beteiligten Enzyme in der Mitochondrienmatrix in Form eines multifunktionalen Enzymkomplexes organisiert sind (Greville und Tubbs, 1968). Die Charakterisierung eines trifunktionalen β -Oxidationskomplexes, der die Aktivitäten von Enoyl-CoA-Hydratase, 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase vereint, bestätigte dies (Uchida et al., 1992; Luo et al., 1993). In Verbindung mit der Charakterisierung einer Acyl-CoA-Dehydrogenase, die sehr langkettige Fettsäure-CoA-Ester umsetzt (Izai et al., 1992), wurde das in Abbildung 23 gezeigte Modell für die Organisation der mitochondrialen β -Oxidation entwickelt.

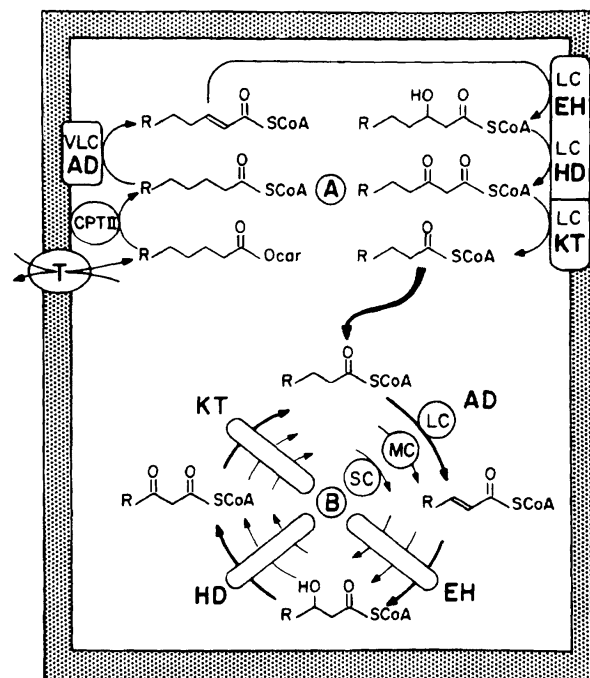


Abb. 2-3: Modell der funktionalen Organisation der β -Oxidationsenzyme in den mitochondrialen Zellen (nach Kunau et al., 1995)

A: β -Oxidationssystem zur Umsetzung langkettiger Fettsäure-Acyl-CoA-Moleküle

B: β -Oxidationssystem zur Umsetzung lang-, mittel- und kurzkettiger Fettsäure-Acyl-CoA-Moleküle

verwendete Abkürzungen: **T:** Carnitin:Acylcarnitin-Translokase

CPT II: Carnitin-Palmitoyltransferase II

AD: Acyl-CoA-Dehydrogenase

EH: Enoyl-CoA-Hydratase

HD: 3-(L)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase

KT: 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase

VLC: sehr langkettig (*very long chain*)

LC: langkettig (*long chain*)

MC: mittlere Kettenlänge (*medium chain*)

SC: kurzkettig (*short chain*)

Nach diesem Modell werden langkettige Acylcarnitine, die die Mitochondrienmembran passiert haben, durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase CPT II zu den langkettigen Acyl-CoA-Verbindungen umgesetzt. Diese durchlaufen einen oder mehrere Abbauzyklen, katalysiert durch den membrangebundenen trifunktionalen Enzymkomplex. Dabei kommt es nicht zu einer Akkumulation von Intermediaten, da diese sofort weiter umgesetzt werden. Kettenverkürzte Acyl-CoAs werden anschließend durch das β -Oxi-

dationssystem in der Mitochondrienmatrix metabolisiert. Auch diese Enzyme können als multifunktionaler Komplex vorliegen (Eaton et al., 1996).

2.3.1.7 Die Regulation der mitochondrialen β -Oxidation

Die Rate der Fettsäureoxidation ist von der Plasmakonzentration an freien Fettsäuren abhängig. Die Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe wird durch Glucagon und andere Hormone stimuliert, durch Insulin dagegen inhibiert. Die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma spiegelt also den Ernährungs- und Hormonstatus wider (McGarry und Foster, 1980).

Die hepatische β -Oxidation wird unter anderem durch Malonyl-CoA reguliert. In physiologischen Konzentrationen wird die Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I) der Mitochondrien inhibiert (McGarry et al., 1978). Auch Coenzyme sowie verschiedene Fettsäuremetabolite haben einen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme der Fettsäureoxidation. Intramitochondriale Veränderungen im Verhältnis von CoASH zu Acetyl-CoA resultieren aus korrespondierenden Veränderungen im Cytosol der Zelle, da Acetylgruppen reversibel von CoA auf Carnitin übertragen werden können. Acetyl-CoA ist ein starker Inhibitor der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, besonders wenn niedrige Konzentrationen an CoASH vorliegen. Diese Limitierung ist in hepatischen Zellen jedoch nicht relevant, da Acetyl-CoA dort als Substrat für die Ketogenese fungiert und daher nicht akkumuliert wird (Wang et al., 1991).

2.3.1.8 Die β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren

Bei der β -Oxidation von ungesättigten Fettsäuren entsprechen die Grundreaktionen einschließlich des Aktivierungsvorganges denen, die bei der Oxidation der gesättigten Verbindungen ablaufen. Allerdings werden zum Abbau von ungesättigten Verbindungen aufgrund der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen zusätzliche Enzyme benötigt. Der Abbau ungesättigter Fettsäuren via β -Oxidation führt zur Bildung von Intermediaten mit Doppelbindungen nahe der Thioesterfunktion. Dabei handelt es sich in der Regel um *cis*-Doppelbindungen, entsprechend dem natürlichen Vorkommen von Fettsäuren.

Der erste Mechanismus für den kompletten Abbau ungesättigter Fettsäuren wurde 1965 von Stoffel und Caesar vorgeschlagen. Demgemäß werden Fettsäuren mit einer Doppelbindung an einem ungeradzahligen C-Atom wie die Z⁹-Doppelbindung in Öl- oder Linolsäure zu den entsprechenden *cis*-3-Enoyl-CoA-Derivaten abgebaut. Diese β,γ -ungesättigte Acyl-CoA-Verbindung stellt kein Substrat für die weitere β -Oxidation dar, da

das Vorhandensein einer Doppelbindung zwischen C3 und C4 die Bildung einer weiteren Doppelbindung zwischen C2 und C3 verhindert. Katalysiert durch das Enzym **Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase** [EC 5.3.3.8] erfolgt die Isomerisierung zum *trans*-2-Enoyl-CoA. Innerhalb einer Reaktion wird also gleichzeitig die Position und die Konfiguration der Z3-Doppelbindung verändert und nachfolgend der weitere Abbau ermöglicht.

Bei der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase handelt es sich um ein Homodimer, dessen Untereinheit eine Molekularmasse von 30 kDa aufweist. Die Aktivität des Enzyms nimmt mit steigender Kettenlänge der Substrate ab. Beide Konformationsisomere, sowohl das *cis*- als auch das *trans*-3-Enoyl-CoA, werden als Substrate akzeptiert und zur entsprechenden *trans*-2-Enoyl-CoA-Verbindung umgesetzt (Palosaari et al., 1990).

Liegt eine Doppelbindung an einem geradzahligen C-Atom vor wie die Z12-Doppelbindung in Linolsäure, erfolgt zunächst eine Kettenverkürzung zur entsprechenden *cis*-2-Enoyl-CoA-Verbindung. Diese wird von der 3-(*D*)-Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) unter Bildung von 3-(*D*)-Hydroxyacyl-CoA umgesetzt. Die Wasseranlagerung an diese *cis*-2-Enoyl-CoA-Struktur wird also von dem selben Enzym katalysiert, das beim Abbau der gesättigten Fettsäuren im zweiten Reaktionsschritt die *trans*-2-Doppelbindungen hydratisiert. Da hier eine *cis*-Doppelbindung vorliegt, entsteht jedoch das D-(*R*)-Isomer der 3-Hydroxy-Verbindung. Diese wird von der absolut spezifischen 3-(*L*)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase nicht als Substrat akzeptiert. Durch die **3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase** [EC 5.1.2.3] wird das Molekül unter Konfigurationsumkehr am C3 zur entsprechenden L-(*S*)-Verbindung umgelagert und kann weiter abgebaut werden (Stoffel und Caesar, 1965).

Beide Enzymaktivitäten wurden in Rattenleber nachgewiesen. Dieser Weg galt einige Jahre als einzige Möglichkeit zum vollständigen β -oxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren. Erst die Identifizierung einer NADPH-abhängigen **2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase** führte zur Entdeckung eines alternativen Abbauwegs für ungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung an einem geradzahligen C-Atom. Dieses Enzym wurde früher als 4-Enoyl-CoA-Reduktase [EC 1.3.1.34] bezeichnet. Die Fettsäuren werden im Verlauf der β -Oxidation zu einer *cis*-4-Enoyl-CoA-Verbindung verkürzt, die dann durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase zu *trans*-2-*cis*-4-Dienoyl-CoA umgesetzt wird. Die Reduktion dieses Substrates durch die NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase führt zur Bildung eines *trans*-3-Enoyl-CoA-Moleküls. Es wird also eine der beiden Doppelbindungen entfernt und gleichzeitig die andere umgelagert. Die entstehende Verbindung kann durch die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase zu *trans*-2-Enoyl-CoA umgesetzt werden und anschließend wieder in den „normalen“ β -Oxidationszyklus eingeschleust werden (Kunau und Dommes, 1978).

Die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase wurde unter anderem aus Rinderleber isoliert, gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich um ein Homotetramer mit einer Molekularmasse von 124 kDa (Dommes et al., 1982). Das Enzym katalysiert die Reduktion von *trans*-2-*trans*-4-Dienoyl-CoA sowie von *trans*-2-*cis*-4-Dienoyl-CoA. Aus beiden Isomeren entsteht das *trans*-3-Enoyl-CoA (Dommes und Kunau, 1984).

Trans-2-*cis*-4-Decadienoyl-CoA ist ein Metabolit im Verlauf des β -oxidativen Abbaus von Linolsäure. Versuche zur weiteren Metabolisierung dieser Verbindung ergaben, dass sie kein Substrat für die mitochondriale β -Oxidation darstellt, wenn kein NADPH vorhanden ist. In Anwesenheit von NADPH wird sie durch die NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase reduziert (Cuebas und Schulz, 1982). Weiterhin wurde festgestellt, dass die 3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase nur in den Peroxisomen vorhanden ist (Chu und Schulz, 1985). Daraus schloss man, dass zum Abbau von ungesättigten Fettsäuren in den Mitochondrien die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase sowie die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase zusätzlich zu den Enzymen der bereits beschriebenen Grundreaktionen nötig sind. Der Epimerase-Weg wird dagegen nur in den Peroxisomen beschriftet (Gurvitz et al., 1999).

Im Rahmen von Studien zum Metabolismus von *cis*-5-Octenoyl-CoA wurde von Luo und Mitarbeitern (1994) eine weitere Isomerase aus Rattenlebermitochondrien isoliert. Diese Arbeiten wurden aufgrund von Hinweise auf eine NADPH-abhängige Reduktion von Doppelbindungen an ungeradzahligem C-Atomen in *cis*-5-Enoyl-CoAs durchgeführt. *Cis*-5-Octenoyl-CoA wird durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase mit Spezifität für Verbindungen mit mittlerer Kettenlänge zu *trans*-2-*cis*-5-Dienoyl-CoA umgesetzt. Die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase bildet daraus *trans*-3-*cis*-5-Dienoyl-CoA. Ein als $D^{3,5}, D^{2,4}$ -**Dienoyl-CoA-Isomerase** bezeichnetes Enzym katalysiert die weitere Umsetzung zu *trans*-2-*trans*-4-Dienoyl-CoA, welches im nächsten Schritt von der NADPH-abhängigen 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase zu *trans*-3-Octenoyl CoA reduziert wird. Die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase bildet daraus *trans*-2-Octenoyl CoA. Im Verlauf mehrerer Schritte wird das Substrat derart modifiziert, dass es im Rahmen der „normalen“ β -Oxidation verstoffwechselt werden kann (Shoukry und Schulz, 1998).

2.3.1.9 Die peroxisomale β -Oxidation

Der Ausdruck „Mikrosomen“ definiert eine Klasse von Organellen, die innerhalb der Eukaryonten weit verbreitet ist. Morphologisch zeichnen sie sich durch eine einfache Membran, eine fein granuläre Matrix und das Vorkommen kristalliner Kerne aus. Ihr Erscheinungsbild sowie Größe und Anzahl variieren in Abhängigkeit von der Spezies deutlich. Diese große Vielfalt wird durch Unterschiede in der Enzymausstattung noch verstärkt (Veenhuis und Harder, 1988; Van den Bosch et al., 1992).

In früheren Arbeiten wurden diejenigen Mikrosomen, die Katalase zusammen mit mindestens einer H_2O_2 -produzierenden Oxidase aufwiesen, als Peroxisomen bezeichnet (De Duve und Baudhuin, 1966). Waren dagegen die Enzyme des Glyoxylat-Zyklus vorhanden, wurde der Begriff Glyoxysomen verwendet (Beever, 1979). Nach der erstgenannten Definition sind bis auf wenige Ausnahmen jedoch alle Glyoxysomen auch Peroxisomen, da sie ebenfalls über das Markerenzym Katalase und über H_2O_2 -produzierende Oxidasen verfügen. Daher wird heute der Begriff „Peroxisomen“ sehr häufig generell für alle Mikrosomen verwendet.

Die Existenz eines Systems zum Fettsäureabbau, der in anderen Zellorganellen als in den Mitochondrien vorliegt, wurde erstmals im Jahre 1969 in keimenden Bohnensamen nachgewiesen. Während der Keimung stieg in den Glyoxysomen neben der Aktivität der Enzyme des Glyoxylatzyklus auch die des β -Oxidationssystems an. Dies führte zur Metabolisierung von Speicherlipiden zu Kohlenhydraten und damit zum Aufbau von zellulären Bestandteilen (Cooper und Beever, 1969). 1976 stellten Lazarow und de Duve fest, dass in Rattenleberzellen neben der mitochondrialen β -Oxidation ein weiteres System für den oxidativen Abbau von Fettsäuren vorliegt, welches in den Peroxisomen lokalisiert ist. Damit wurde bewiesen, dass die peroxisomale β -Oxidation nicht auf Pflanzen beschränkt ist, sondern vielmehr einen generellen und fundamentalen Metabolisierungsweg in eukaryontischen Zellen darstellt.

Tabelle 25 gibt einen Überblick über das Vorkommen der unterschiedlichen β -Oxidationssysteme.

Tabelle 2-5: Das Vorkommen der unterschiedlichen β -Oxidationssysteme

Organismus	Mitochondrien	Peroxisomen	Cytosol
Tiere	+	+	-
Pflanzen	(+)	+	-
Pilze	-	+	-
Bakterien	-	-	+

In Pflanzen und Pilzen stellt die peroxisomale β -Oxidation den vorherrschenden bzw. sogar einzigen Abbaumechanismus für Fettsäuren dar. Die mitochondriale β -Oxidation ist dagegen auf Säuger und einige Algen beschränkt. Es gibt allerdings zunehmend Hinweise, dass auch in Pflanzen die mitochondriale β -Oxidation abläuft (Bode et al., 1999; Masterson und Wood, 2000).

Vergleicht man die mitochondriale β -Oxidation mit der peroxisomalen zeigt sich, dass beide Wege Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede aufweisen. Unabhängig von der Lokalisierung wird jeweils eine Vielzahl an gesättigten und ungesättigten Fettsäureacyl-CoA-Estern unterschiedlicher Kettenlängen in einem zyklischen Prozess aus vier sich wiederholenden Reaktionsschritten abgebaut. Die auftretenden Intermediate sind bei beiden Wegen identisch. Allerdings werden die Reaktionen von unterschiedlichen Enzymen katalysiert (Osumi und Hashimoto, 1984; Hashimoto, 2000).

Für die Aufnahme der Fettsäuren in die Peroxisomen ist kein Carnitin-Transportsystem nötig. Auch langkettige Fettsäuren können direkt in die Organellen diffundieren. Analog zur mitochondrialen β -Oxidation stellen Fettsäuren nicht in ihrer freien, sondern in ihrer aktivierten Form als Acyl-CoA-Ester Substrate für die peroxisomale β -Oxidation dar. Für die Aktivierung stehen in der Membran zwei Acyl-CoA-Synthetasen mit unterschiedlicher Spezifität bezüglich der Kettenlänge zur Verfügung (Singh und Poulos, 1988; Reddy und Mannaerts, 1994).

Die erste eigentliche Reaktion des β -Oxidationszyklus wird von einer FAD-haltigen Oxidase katalysiert, die Elektronen direkt auf Sauerstoff überträgt. Dabei wird H_2O_2 produziert, welches unter dem Einfluss der peroxisomalen Katalase disproportioniert. Im Gegensatz zur mitochondrialen β -Oxidation werden die von den Fettsäuren abstrahierten Wasserstoffatome nicht über die Elektronentransportkette mit gekoppelter oxidativer Phosphorylierung auf O_2 übertragen. In jedem Abbauzyklus entstehen folglich zwei ATP-Moleküle weniger. Durch die Oxidase werden die aktivierten Fettsäureacyl-CoA-Ester zu den entsprechenden *2-trans*-Enoyl-CoA-Estern umgesetzt. Das Vorkommen dieser Oxidasen ist auf die Peroxisomen begrenzt, in den Mitochondrien konnten sie nicht nachgewiesen werden (Aoyama et al., 1994; Voet und Voet, 1994).

In Rattenleberperoxisomen wurden drei verschiedene Acyl-CoA-Oxidasen mit unterschiedlicher Substratspezifität nachgewiesen. Palmitoyl-CoA-Oxidase setzt CoA-Ester von geradkettigen Fettsäuren mittlerer bis sehr langer Kohlenstoffkette um. Das Enzym, das nativ eine Molekularmasse von 150 kDa aufweist, besteht aus drei Untereinheiten: A (72 kDa), B (52 kDa) und C (21 kDa). Die beiden kleineren Untereinheiten werden durch posttranslationale proteolytische Spaltung der größten Untereinheit gebildet. Es existieren drei Formen des Enzyms: A_2 , ABC und B_2C_2 , die vergleichbare Aktivitäten aufweisen (Osumi und Hashimoto, 1978; Van Veldhoven et al., 1992). Weiterhin liegen Pristanoyl-CoA-Oxidase und Trihydroxycoprostanoyl-CoA-Oxidase in Peroxisomen vor (Schepers et al., 1989, Van Veldhoven et al., 1996). Die Acyl-CoA-Oxidasen kommen in verschiedenen Spezies in unterschiedlicher Verteilung vor. In humanen Peroxisomen liegen beispielsweise nur zwei Enzyme vor. Dabei handelt es sich um die oben beschriebene Palmitoyl-CoA-Oxidase und eine weitere Oxidase, die verzweigte Substrate um-

setzt (Vanhove et al., 1993). Acyl-CoA-Oxidasen wurden auch aus den Hefestämmen *Candidatropicalis* und *Yarrowialipolytica* sowie aus verschiedenen Pflanzen isoliert (Okazaki et al., 1987; Kirsch et al., 1986).

Bezüglich der zweiten und dritten Stufe des β -Oxidationszyklus bestehen deutliche Unterschiede zwischen dem mitochondrialen und dem peroxisomalen System. Während diese Reaktionen in den Mitochondrien auch von monofunktionalen Enzymen katalysiert werden, liegt in den Peroxisomen aus Rattenleber nur ein multifunktionales Protein vor, das sowohl die Aktivität von Enoyl-CoA-Hydratase als auch 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase in sich vereinigt. Es handelt sich um ein Monomer mit einer Molekularmasse von 70 - 80 kDa. Beide enzymatischen Aktivitäten sind auf dem selben Polypeptid lokalisiert (Osumi und Hashimoto, 1979). Eine eindeutige Differenzierung zwischen peroxisomaler und hitzestabiler mitochondrialer Enoyl-CoA-Hydratase ist durch den Nachweis der Hitzesensitivität möglich. Weiterhin unterscheiden sich die Enzyme in ihrer Substratspezifität (Lazarow, 1981). Auch in pflanzlichen Peroxisomen liegen derartige Multifunktionsproteine (MFP) vor. MFP I ist ein trifunktionales Enzym, das die zweite, dritte und vierte Reaktion des β -Oxidationszyklus katalysiert. MFP II, ein tetrafunktionales Protein besitzt zusätzlich eine Isomeraseaktivität zum Abbau ungesättigter Fettsäuren (Gühnemann-Schäfer et al., 1994).

Die vierte Stufe der peroxisomalen β -Oxidation wird von der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Thiolase I) katalysiert, die in allen Spezies vorhanden ist. Alle isolierten Proteine zeigen im Vergleich zum mitochondrialen Enzym analoge katalytische Eigenschaften. Im Gegensatz zu den in Mitochondrien vorliegenden Homotetrameren liegen in den Peroxisomen jedoch Homodimere vor; die Molekularmasse der Subeinheit beträgt 41 bis 45 kDa (Kunau et al., 1988).

Ungesättigte Fettsäuren werden auch in den Peroxisomen durch zusätzliche Enzyme abgebaut. Die peroxisomalen β -Oxidationsenzyme weisen gegenüber mehrfach ungesättigten Fettsäuren sogar eine höhere Aktivität auf als gegenüber einfach ungesättigten oder gesättigten Verbindungen. Vorherrschend ist der Abbauweg, der von Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase und 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase katalysiert wird. Zusätzlich liegt in den Peroxisomen die bereits 1965 von Stoffel und Caesar nachgewiesene Epimeraseaktivität vor. Inzwischen ist bekannt, dass es sich dabei um zwei separate Enoyl-CoA-Hydratasen handelt, die reversible Reaktionen mit umgekehrter Stereoselektivität katalysieren (Kindl, 1993).

Die β -Oxidation in den Mitochondrien ist eng an die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung gekoppelt. Durch den vollständigen Abbau der Fettsäuren werden Acetylgruppen zur Verfügung gestellt, durch den weiteren Abbau zu CO_2 und H_2O wird die Produktion von ATP gesichert. Liegen sowohl das mitochondriale als auch das

peroxisomale Systeme nebeneinander vor, dient die peroxisomale β -Oxidation nicht primär der Energiegewinnung. Vielmehr wird hier im ersten Reaktionsschritt H_2O_2 produziert, die Energie geht als Wärme verloren. Über die peroxisomale β -Oxidation werden häufig Verbindungen metabolisiert, die schlechte Substrate für die mitochondriale β -Oxidation darstellen. Dazu gehören u.a. Eicosanoide und Dicarbonsäuren. In Organismen, die nur über die peroxisomale β -Oxidation verfügen, ist diese mit der mitochondrialen ATP-Produktion verknüpft (Osumi und Hashimoto, 1984; Leighton et al., 1989; Shirley und Murphy, 1990; Diczfalusy, 1994).

2.3.1.10 Die β -Oxidation in Mikroorganismen

Mikrobielle β -Oxidation wurde erstmals 1967 in *Escherichia coli* (*E. coli*) nachgewiesen (Overath und Raufuss, 1967). In den folgenden Jahren wurde der β -oxidative Abbau von Fettsäuren auch in anderen Mikroorganismen wie *Acinetobacter calcoaceticus* und verschiedenen Pseudomonaden beobachtet (Kunau et al., 1995). In *E. coli* hat man acht Gene identifiziert, die verschiedene Enzyme der β -Oxidation einschließlich Aufnahme und Aktivierung der Fettsäuren kodieren (Yang et al., 1991; Black et al., 1992). Ein zusätzliches Gen kodiert einen transkriptionellen Regulator, der das Gleichgewicht zwischen Fettsäureabbau und Fettsäuresynthese aufrecht erhält (Henry und Cronan, 1991; van Aalten et al., 2001). Tabelle 2-6 fasst diese Gene sowie deren Produkte zusammen.

Tabelle 2-6: Gene für den β -oxidativen Abbau von Fettsäuren in *E. coli* (nach Kunau et al., 1995)

Gen	Genprodukt
<i>fadL</i>	Fettsäuretransporter in der äußeren Membran
<i>fadD</i>	Acyl-CoA-Synthetase
<i>fadE</i>	Elektronentransferierendes Flavoprotein
<i>fadF</i>	Acyl-CoA-Dehydrogenase (langkettige Substrate)
<i>fadG</i>	Acyl-CoA-Dehydrogenase (kurzkettige Substrate)
<i>fadB</i>	Große Untereinheit des multifunktionalen Enzymkomplexes: Enoyl-CoA-Hydratase, 3(<i>L</i>)-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und 3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase
<i>fadA</i>	Kleine Untereinheit des multifunktionalen Enzymkomplexes: 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase
<i>fadH</i>	2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase
<i>fadR</i>	Transkriptioneller Regulator der <i>fad</i> -Gene

Für die Aufnahme in Zellen müssen die Fettsäuren zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Membranen passieren. Um die äußere Zellmembran zu überwinden, wird ein selektiver Prozess unter Mitwirkung des *fadL*-Proteins, das als substratspezifischer Kanal fungiert, durchlaufen (Black, 1990). Der Transport von Fettsäuren durch die innere Zellmembran verläuft über einen Carrier-unterstützten Vorgang oder durch passive Diffusion (Black und DiRusso, 1994).

Wie in allen anderen Organismen stellen auch in Mikroorganismen nur aktivierte Fettsäuren Substrate für die β -Oxidation dar. Analog zur Aktivierung in Säugern werden exogen zugeführte Fettsäuren im Rahmen eines zweistufigen Mechanismus von einer Acyl-CoA-Synthetase zu metabolisch aktiven CoA-Thioestern umgesetzt (Rock und Jackowski, 1985). Es handelt sich um ein dimeres Protein, das aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Das aufgereinigte Enzym zeigt eine breite Substratspezifität. Es werden Fettsäuren mit 8–16 C-Atomen umgesetzt. Bevorzugt dient Laurinsäure als Substrat. Ein Sequenzvergleich des bakteriellen Enzyms mit Acyl-CoA-Synthetasen aus humanen und tierischen Zellen sowie aus anderen Mikroorganismen ergab große Homologien (Duronio et al., 1992).

E. coli verfügt über zwei Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit unterschiedlicher Substratspezifität, die den ersten Schritt des β -Oxidationszyklus katalysieren. FAD fungiert jeweils als prosthetische Gruppe. Analog zu den eukaryontischen Mitochondrien verfügen Bakterien über ein Flavoprotein, das Elektronen vom Cofaktor des Enzyms auf die Elektronentransportkette überträgt (Kunau et al., 1995).

Ende der 70er Jahre wurde die Existenz eines Multienzymkomplexes nachgewiesen, der die Aktivitäten von 2-Enoyl-CoA-Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase aufweist (O'Brian und Frerman., 1977; Beadle et al., 1979). Pramanik und Mitarbeiter (1979) zeigten, dass zusätzlich auch 3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase- sowie Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Aktivität vorhanden sind. Der Komplex, der eine Molekularmasse von 260 kDa aufweist, besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten: α -Einheit (78 kDa) und β -Einheit (42 kDa). Es handelt sich um eine quaternäre Struktur der $\alpha_2\beta_2$ -Form (Pawar und Schulz, 1981). Die enthaltenen Enzyme zeigen eine breite Substratspezifität mit unterschiedlichen Aktivitätsoptima. Daher können Fettsäuren aller Kettenlängen abgebaut werden (Binstock und Schulz, 1981). Zusätzlich zu diesen komplex organisierten Enzymen wurden in *E. coli* eine Enoyl-CoA-Hydratase, die langkettige Substrate umsetzt, sowie eine zweite Thiolase gefunden (Pawar und Schulz, 1981; Feigenbaum und Schulz, 1975).

Ein ähnlicher Multienzymkomplex wurde aus einem weiteren Gram-negativen Bakterium, *Pseudomonas fragii*, isoliert. Er ist analog aufgebaut und verfügt ebenfalls über die fünf genannten Enzymaktivitäten (Imamura et al., 1990; Ishikawa et al., 1997).

E. coli verfügt weiterhin über eine 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase zum Abbau von ungesättigten Fettsäuren. Das native Enzym, das als Monomer mit einer Molekularmasse von 70 kDa vorliegt, beinhaltet FAD als prosthetische Gruppe. Es katalysiert die Reduktion von 2,4-Dienoyl-CoA-Substraten in Anwesenheit von NADPH. Studien mit isotopenmarkierten Substraten ergaben, dass der 4S-Wasserstoff des NADPHs zunächst auf FAD übertragen, bevor die Doppelbindung am C4 über eine 1,2-Addition reduziert wird. Im Gegensatz zu der in den Mitochondrien katalysierten Reaktion, die zur Bildung einer *cis*-3-Enoyl-CoA-Verbindung führt, welche anschließend von einem weiteren Enzym isomerisiert werden muss, entsteht hier direkt eine *trans*-2-Enoyl-CoA-Verbindung (Berger et al., 1990; Liang et al., 2000).

2.3.2 Die α -Oxidation

Die α -Oxidation von Fettsäuren kommt sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen und Säugern vor. Erstmals beschrieben wurde sie 1952 von Newcomb und Stumpf in keimenden Erdnüssen. In den folgenden Jahren wurde dieser Biogeneseweg auch in anderen höheren Pflanzen wie Erbsen, Kartoffeln und Gurken beobachtet (Hitchcock und James, 1966; Laties und Hoelle, 1967; Galliard und Matthew, 1976). Kürzlich wurde die Existenz auch in Tabakblättern sowie in Reis nachgewiesen (Kawasaki et al., 1998; Koeduka et al., 2000).

In Säugern spielt die α -Oxidation beim Abbau von Fettsäuren eine Rolle, die aufgrund struktureller Merkmale wie Methylverzweigungen nicht direkt der β -Oxidation zugänglich sind. Wichtigstes Beispiel ist die Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure), deren α -oxidativer Abbau erstmals in den 70er Jahren ausführlich untersucht wurde (Avigan et al., 1966; Tsai et al., 1967; Mize et al., 1969).

Auch in einfacheren Lebensformen wie Algen tritt die α -Oxidation auf. Erstmals nachgewiesen wurde sie in der Grünalge *Ulvapertusa* (Kajiwara et al., 1988). Inzwischen hat man gezeigt, dass auch verschiedene andere Meeresalgen wie Rot- und Braunalgen in der Lage sind, Fettsäuren via α -Oxidation abzubauen (Akakabe et al., 2001).

Bakterien wie *Arthrobactersimplex* und *Sphingomonaspaucimobilis* sind ebenfalls zur α -Oxidation von Fettsäuren fähig (Yano et al., 1969 und 1971; Matsunaga et al., 1994).

2.3.2.1 Die α -Oxidation in Pflanzen

Im Jahre 1959 wurde von Martin und Stumpf erstmals ein Mechanismus für den α -oxidativen Abbau von freien Fettsäuren in Erdnüssen beschrieben (Martin und Stumpf, 1959). Es wurde ein elektrophiler Angriff eines Porphyrin-gebundenen Perferryl-Kations auf das α -Kohlenstoffatom vorgeschlagen, der unter Decarboxylierung zur Bildung des kettenverkürzten Aldehyds führt. Dieser wird bei Anwesenheit von NAD^+ durch eine Aldehyddehydrogenase zur entsprechenden Säure oxidiert und steht dann erneut als Substrat für einen weiteren α -Oxidationszyklus zur Verfügung. Im Rahmen umfangreicher Studien machten Hitchcock und James die wichtige Entdeckung, dass in Extrakten von Erbsenblättern beim Abbau von Fettsäuren durch das α -Oxidationssystem neben Kohlendioxid und dem kettenverkürzten Aldehyd als weiteres Reaktionsprodukt auch die entsprechende 2(*R*)-Hydroxysäure akkumuliert wird (Hitchcock und James, 1964; Hitchcock et al., 1968a; Hitchcock und Rose, 1971). Aufgrund der Annahme, dass bei der α -Oxidation von Palmitinsäure beide Enantiomere der 2-Hydroxypalmitinsäure gebildet werden, sowie basierend auf der Beobachtung, dass die α -Oxidation von (*R*)-[^3H]-Palmitinsäure nicht zur Bildung von Tritium-markiertem Pentadecanal führt, wurde von Hitchcock und Mitarbeitern ein getrennter Abbau der beiden Enantiomere der 2-Hydroxysäure postuliert. Während das (*R*)-Enantiomer langsam zu CO_2 und Pentadecanal abgebaut wird, zerfällt das (*S*)-Enantiomer sehr schnell in CO_2 und Penta decansäure (Hitchcock et al., 1968b; Morris und Hitchcock, 1968).

Shine und Stumpf gelang 1974 der Nachweis, dass die 2-Hydroxysäure nicht das unmittelbare Intermediat der α -Oxidation von Fettsäuren in Erbsenblättern und Erdnüssen darstellt. Aufgrund ihrer Forschungsergebnisse wurde ein α -Oxidationsmechanismus postuliert, der die Flavoprotein-katalysierte Bildung einer labilen α -Hydroperoxyfettsäure als erstes Zwischenprodukt beschreibt. Diese instabile Zwischenstufe zersetzt sich zu CO_2 und dem kettenverkürzten Aldehyd oder wird zur 2(*R*)-Hydroxysäure reduziert (Abb. 2-4). Es wird angenommen, dass ein Wasserstoffatom durch ein über eine aktive Sauerstoffspezies aktiviertes Flavoprotein vom α -Kohlenstoffatom der Fettsäure abstrahiert wird. Die Fettsäure bleibt als freies Radikal zurück. Anschließend reagiert die reduzierte und mit molekularem Sauerstoff oxygenierte Form des Flavoproteins mit dem Radikal der Fettsäure unter Bildung der intermediären α -Hydroperoxyfettsäure. Dabei wird gleichzeitig die oxidierte Form des Flavoproteins regeneriert.

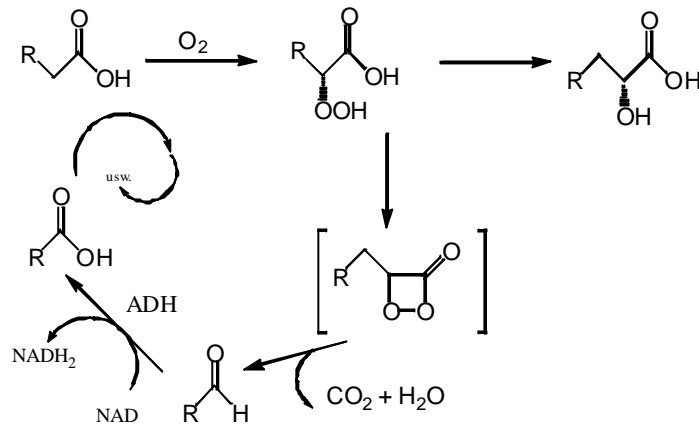


Abb. 2-4: Postulierter Mechanismus der α -Oxidation nach Shine und Stumpf (1974)

Dieser Mechanismus wurde in späteren Studien bestätigt (Salim-Hanna et al., 1987; Campa et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass ein hypothetisches α -Peroxylacton, welches durch eine intramolekulare Ringschluß-Reaktion der α -Hydroperoxysäure gebildet wird, über das Auftreten photochemischer Prozesse unter Beteiligung von Chlorophyll erklärt werden kann.

Der Nachweis der α -Hydroperoxyfettsäure als Intermediat der α -Oxidation gelang Hamberg und Mitarbeitern (1999). Nach Senkung der Temperatur von 23 °C auf 0 °C liessen sich in Umsetzungen verschiedener Fettsäuren mit einer rekombinanten Oxygenase aus Tabak sowie mit einem Extrakt aus Gurken mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie die entsprechenden 2-Hydroperoxysäuren nach Derivatisierung als Umsetzungsprodukte identifiziert werden. Saffert und Mitarbeiter (2000) konnten bei der Umsetzung von Palmitinsäure mit einer gereinigten α -Oxidase aus keimenden Erbsen ebenfalls die Bildung von α -Hydroperoxypalmitinsäure zeigen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen Untersuchungen von Andersen Borge und Mitarbeitern (1999), die die Bildung von α -Hydroperoxypalmitinsäure nach Umsetzung von [1-¹⁴C]-Palmitinsäure mit einer partiell gereinigten α -Oxidase aus Gurken nicht nachwiesen. Statt dessen wurden α -Hydroxy- und α -Oxopalmitinsäure als Intermediate beschrieben, die unter Abspaltung von Kohlendioxid bzw. Formiat zur Bildung des kettenverkürzten Pentadecanals führten. Dieser Aldehyd wurde abschließend in Anwesenheit von NAD⁺ durch eine Aldehyddehydrogenase zur entsprechenden Pentadecansäure oxidiert. Bei Anwesenheit von Fe²⁺-Ionen, α -Ketoglutarat und Ascorbat wurde eine erhöhte Enzymaktivität beobachtet, was in Analogie zur α -Oxidation in Säugern auf eine Dioxygenase-katalysierte α -Hydroxylierung schließen lässt.

2.3.2.2 Die α -Oxidation in Säugern

In Säugetieren wurde die α -Oxidation anhand des oxidativen Abbaus von Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) beschrieben. Aufgrund des Vorliegens einer Methylverzweigung am β -C-Atom ist diese Säure nicht direkt für die β -Oxidation zugänglich. Statt dessen erfolgt zunächst eine α -oxidative Decarboxylierung zur Pristan-säure (2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure). Diese Verbindung stellt ein Substrat für die peroxisomale β -Oxidation dar und wird nach Aktivierung sukzessiv zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut.

Das Substrat bedarf im Gegensatz zur α -Oxidation in Pflanzen einer Aktivierung zum entsprechenden CoA-Ester durch eine spezifische Phytanoyl-CoA-Ligase (Watkins et al., 1994). Nach dieser Reaktion kann der Transport in die Peroxisomen der Niere erfolgen, wo die eigentliche Abbaureaktion stattfindet (Jansen et al., 1999a und 2001). Dort katalysiert eine Phytanoyl-CoA-Hydroxylase die Bildung des intermediären 2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Esters. Diese Hydroxylase gehört zur Klasse der Dioxygenasen, die den molekularen Sauerstoff in die Phytansäure sowie das Cosubstrat α -Ketoglutarat einbaut (Jansen et al., 1998 und 2000a). Anschließende Abspaltung des Formyl-CoA-Esters führt zur Bildung des kettenverkürzten Aldehyds Pristanal (2,6,10,14-Tetramethylpentadecanal), der zur entsprechenden Säure oxidiert wird. Nach erneuter Aktivierung zum CoA-Ester wird die Pristansäure im Rahmen der peroxisomalen β -Oxidation abgebaut (Croes et al., 1996; Verhoeven et al., 1997a-c und 1998; Jansen et al., 1999a und 2000b).

Die Metabolisierung der Phytansäure im Rahmen der tierischen α -Oxidation läuft über 2-Hydroxyphytansäure als Zwischenstufe ab. Der genaue Vorgang der Decarboxylierung ist nicht bekannt. Als mögliche Reaktionswege werden eine Oxidation der 2-Hydroxyfettsäure zur entsprechenden 2-Ketofettsäure (Wanders und Van Roermund, 1993) oder eine erneute α -Oxidation der 2-Hydroxyfettsäure unter Mitwirkung von molekularem Sauerstoff zu einem α -Peroxylacton (Salim-Hanna et al., 1989; Huang et al., 1994) kontrovers diskutiert.

Eine Akkumulierung der Phytansäure in humanen Geweben und Körperflüssigkeiten aufgrund fehlender α -Oxidation verursacht Fehlfunktionen wie z.B. die Refsum-Krankheit oder das Zellweger-Syndrom. Verantwortlich ist das Fehlen des Enzyms, das den initialen Hydroxylierungsschritt katalysiert (Jansen et al., 1999b und 2000b; Wanders et al., 2000).

2.3.2.3 Die α -Oxidation in Algen

Ausgelöst durch den Nachweis von langkettigen Aldehyden wie 8-(Z)-Heptadecenal, 8,11-(Z,Z)-Heptadecadienal und 8,11,14-(Z,Z,Z)-Heptadecatrienal in der grünen Meeresalge *Ulva pertusa* und die Vermutung, dass die entsprechenden C18-Fettsäuren als deren Vorläufer fungieren, wurde der Mechanismus der α -Oxidation in diesen einfacheren Lebensformen nachgewiesen und genauer untersucht. Von Kajiwara und Mitarbeitern wurden 1988 Studien zur Substratspezifität der beteiligten Enzyme sowie zu Inhibitoren durchgeführt. Nach partieller Reinigung konnten weitere Parameter wie das pH-Optimum bestimmt werden (Kajiwara et al., 1989 und 1994). Dabei wurden Unterschiede zu den α -Oxidationssystemen in höheren Pflanzen deutlich.

Im Rahmen von Studien mit Homogenaten aus *Ulva pertusa* gelang kürzlich auch der erste direkte Nachweis der α -Hydroperoxyfettsäure als Intermediat der α -Oxidation. Die labile Zwischenstufe konnte durch Derivatisierung mit Anthryldiazomethan (ADAM) in den entsprechenden stabilen Anthrylester überführt und anschließend mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) durch Vergleich mit einer authentischen Referenzverbindung nachgewiesen werden (Akakabe et al., 1999).

2.3.2.4 Die α -Oxidation in Bakterien

Yano und Mitarbeiter wiesen 1969 nach, dass auch in Bakterien die α -Oxidation zur Metabolisierung langkettiger Fettsäuren genutzt werden kann. Radioaktiv markierte Palmitinsäure wurde von *Arthrobacter simplex* zunächst zu α -Hydroxypalmitinsäure umgesetzt. Im weiteren Verlauf der Reaktion entstand durch Decarboxylierung Pentadecansäure als zweites Produkt (Yano et al., 1969 und 1971). Die Bildung von α -Hydroxysäuren über den Mechanismus der α -Oxidation erklärt das im Vergleich zu anderen Stämmen erhöhte Vorkommen dieser Fettsäurederivate in den Phospholipiden des Bakteriums (Yano et al., 1970).

Gut untersucht ist die α -Oxidation im Bodenbakterium *Sphingomonas paucimobilis*. Veranlasst wurden diese Studien durch das Vorkommen von Sphingolipiden, die über hohe Anteile an 2-Hydroxysäuren, vor allem 2-Hydroxymyristinsäure, verfügen. Das aus *Sphingomonas paucimobilis* isolierte Enzym mit einer Molekularmasse von 43 kDa verfügt nicht über Decarboxylaseaktivität. Vorhandene Doppelbindungen werden nicht epoxidiert (Matsunaga et al., 1998a und 2000). Inzwischen gelang die Klonierung des Gens und dessen Expression in *E. coli*. Das rekombinante Enzym verfügt über analoge katalytische Eigenschaften. Die Aminosäuresequenz zeigt hochkonservierte Regionen aus Proteinen der Cytochrom P-450-Superfamilie. Da aber keine signifikante Homologie

zu bekannten P-450-Enzymen vorliegt, handelt es sich um ein neues Mitglied dieser Enzymgruppe (systematischer Name CYP 152B1) (Matsunaga et al., 1997).

Studien ergaben, dass das Enzym NADH sowie molekularen Sauerstoff benötigt. Bei Verwendung von $^{18}\text{O}_2$ -Gas wird ein Atom des markierten Sauerstoffs in die Hydroxygruppe des Produkts eingebaut. Es liegt eine typische Monooxygenase-Reaktion vor. Wird der Sauerstoff durch H_2O_2 oder ein H_2O_2 -generierendes System ersetzt, steigt die α -Hydroxylaseaktivität. Zugabe von Katalase inhibiert die Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration (Matsunaga et al., 1996).

Umfangreiche Substratstudien sowohl mit dem nativen als auch dem rekombinanten Enzym ergaben, dass gesättigte Fettsäuren mit mehr als 10 C-Atomen effektiv umgesetzt werden. Das Aktivitätsoptimum liegt dabei bei Myristinsäure. Daher wurden weitere Studien mit Substraten durchgeführt, die über 14 bzw. 16 C-Atome verfügen. Methylmyristat sowie 1,14-Dicarboxytetradecansäure wurden von *Sphingomonas paucimobilis* nicht umgesetzt. Auch die Fettsäureanaloge Tetradecan, 1-Tetradecanol und Tetradecanal werden nicht als Substrate akzeptiert. 16-Hydroxypalmitinsäure und Monomethylhexadecandisäure stellen wiederum Substrate für die α -Oxidation dar. Daraus kann geschlossen werden, dass die partiell negativ geladene Carboxylgruppe für eine Interaktion zwischen Substrat und Enzym unabdingbar ist. Diese Erkennungsregion muss sich in direkter Nähe zur Häm-Einheit befinden. Auch das ω -Ende der Substrate muss gewisse Voraussetzungen erfüllen. Eine weitere Carboxylfunktion am Kettenende verhindert die Substratbindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Auch ungesättigte Fettsäuren wie Palmitoleinsäure, Ölsäure und Arachidonsäure sowie Phytansäure werden als Substrate akzeptiert und zu den entsprechenden α -Hydroxyderivaten umgesetzt (Matsunaga et al., 1998a, 1998b und 2000). Die Bestimmung der Absolutkonfiguration von 2-Hydroxymyristinsäure, die mittels HPLC nach entsprechender Derivatisierung durchgeführt wurde, ergab das Vorliegen des (S)-konfigurierten Produkts (Matsunaga et al., 2000).

Bei dem aus *Sphingomonas paucimobilis* isolierten Enzym handelt es sich also um eine regio- und stereospezifische α -Hydroxylase, die zur Gruppe der Cytochrom P-450 Enzyme gehört. In Gegenwart von H_2O_2 wird die Umsetzung von Fettsäuren mit mehr als 10 C-Atomen zu den entsprechenden α -Hydroxyderivaten katalysiert.

2.3.2.5 Substrate der α -Oxidation

Freie gesättigte Fettsäuren mit 12 bis 16 C-Atomen sowie die ungesättigten C18-Fettsäuren Öl-, Linol- und Linolensäure stellen die natürlichen Substrate der α -Oxidation in verschiedenen Pflanzen dar (Shine und Stumpf, 1974; Galliard und Matthew, 1976;

Hamberg et al., 1999). Unter Verwendung eines Enzymextraktes aus Erbsenblättern wurden von Adam und Mitarbeitern umfangreiche Studien zur Substratakzeptanz der α -Oxidase durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde eine Vielzahl an gesättigten Fettsäuren mit 7 bis 16 C-Atomen, verschiedene ungesättigte Fettsäuren sowie Carbonsäuren mit Heteroatomen wie Sauerstoff und Schwefel untersucht. Die Substrate wurden mit absoluter Enantioselektivität zu den entsprechenden 2-(*R*)-Hydroxysäuren umgesetzt. War allerdings eine Doppel- bzw. Dreifachbindung oder ein Heteroatom weniger als drei Kohlenstoffatome von der Carboxylfunktion entfernt, fand keine α -Hydroxylierung statt. Substrate ohne signifikanten hydrophoben Rest wie kurzkettige Carbon- und Dicarbonsäuren wurden ebenfalls nicht umgesetzt (Adam et al., 1996 und 1998a; Lazarus, 1998). Die Umsetzung der schwefelhaltigen Verbindungen Tetracylthioessigsäure und Tetracylthiopropionsäure zu den entsprechenden kettenverkürzten Aldehyden unter Abspaltung von CO_2 gelang mit einer partiell aufgereinigten α -Oxidase aus Gurken (Andersen Borge et al., 1998).

In Säugetieren beschränken sich die Untersuchungen zur α -Oxidation auf Fettsäuren mit einer Methylverzweigung in β -Position, die aufgrund dieser strukturellen Gegebenheit nicht direkt mittels β -Oxidation metabolisiert werden können. Besonderes Augenmerk in diesem Bereich wird auf die Phytansäure gerichtet, da deren durch Enzymdefekte verursachte Anreicherung im Körper zu verschiedenen schweren Krankheitsbildern führt (vgl. 2.3.2.2).

2.3.2.6 Die Selektivität der α -Oxidation

Untersuchungen zur Stereoselektivität der α -Oxidation in Pflanzen wurden zunächst mit Enzymextrakten aus Erdnüssen und Erbsen durchgeführt. In Versuchen mit markierter (*S*)-[^3H]- und (*R*)-[^3H]-Palmitinsäure wurde gezeigt, dass das H^β -Wasserstoffatom der Palmitinsäure selektiv abstrahiert wird (Morris und Hitchcock, 1968; Salim-Hanna et al., 1987). Weiterhin wurde bisher ausschließlich die (*R*)-Enantiomere der gebildeten 2-Hydroxysäuren nachgewiesen. Daraus wird gefolgert, dass auch die Anlagerung des molekularen Sauerstoffs stereoselektiv erfolgt (Markovetz et al., 1972; Shine und Stumpf, 1974). Auch Hamberg und Mitarbeiter (1999) wiesen die enantioselektive Bildung von 2-(*R*)-Hydroperoxy- und 2-(*R*)-Hydroxysäuren nach Umsetzung verschiedener Fettsäuren mit einem Gurkenenzymextrakt sowie rekombinanten Tabak- und *Arabidopsis*-Proteinen nach. Die Zuordnung der Konfiguration konnte mittels GC-Analytik nach Derivatisierung mit (-)-Menthoxychloroformiat und anschließender Methylierung durch Vergleich mit authentischen Referenzverbindungen eindeutig getroffen werden.

Auch im Säuger verläuft die α -Oxidation stereoselektiv. Bei Phytansäure erfolgt die α -Hydroxylierung in Abhängigkeit von der Konfiguration der Methylgruppe in β -Position. Für den Angriff an der entgegengesetzten Seite der Methylgruppe sind sterische Gründe verantwortlich (Tsai et al., 1973; Croes et al., 1999).

Anhand der Umsetzung von Palmitinsäure wurde die enantioselektive Bildung der 2-(*R*)-Hydroxysäuren auch in der Grünalge *Ulva pertusa* belegt (Akakabe, 1999 und 2000).

Die α -Oxidation der Acylreste in den Lipid A-Molekülen von Gram-negativen Bakterien wie *Salmonellatyphimurium* führt zu einer stereoselektiven Bildung der entsprechenden 2-(*S*)-Hydroxyderivate (Guo et al., 1997). Auch von *Sphingomonas paucimobilis* werden mit hoher Selektivität 2-(*S*)-Hydroxysäuren gebildet (Matsunaga et al., 2000).

2.3.2.7 Die Bedeutung der α -Oxidation

Bei der Diskussion um die funktionelle Relevanz der α -Oxidation sind die Umsetzungsprodukte der natürlichen Fettsäuresubstrate von besonderem Interesse. Da die instabilen und für Pflanzen toxischen Hydroperoxyfettsäuren als intermediär auftretende Verbindungen im Zuge von Entgiftungsprozessen abgebaut werden, dürfte die physiologische Bedeutung der α -Oxidation in der Funktion von Folgeprodukten zu suchen sein.

In Pflanzen treten 2-Hydroxysäuren und ungeradzahlige Fettsäuren als Bestandteile von Glykosphingolipiden pflanzlicher Membranen auf (Galliard, 1980). Die langkettigen Aldehyde als weitere Folgeprodukte der α -Oxidation tragen vielfach zu dem für die jeweilige Pflanze typischen Geruch bei (Kemp, 1975). Weiterhin spielen sie als Fungizide und Bakterizide sowie im Rahmen der Anziehung und Abwehr von Insekten eine Rolle (Galliard, 1980). Die ungeradzahligen Fettsäuren, die als Oxidationsprodukte der Aldehyde auftreten, können schließlich durch β -Oxidation bis zum Propionyl-CoA abgebaut und anschließend in β -Alanin eingebaut werden, das einen Vorläufer von CoA darstellt (Stumpf, 1970).

Neben der Beteiligung am Fettsäuremetabolismus kommen der α -Oxidation in Pflanzen weitere Bedeutungen zu. Diskutiert wird unter anderem eine verstärkte α -Oxidationsaktivität als Reaktion auf eine Pathogeninfektion. Möglicherweise ist die α -Oxidation an der Synthese von Signalmolekülen aus Membranlipiden, den Mediatoren der pflanzlichen Immunantwort, beteiligt (Sanz et al., 1998). Es ist auch denkbar, dass entstehende Produkte direkt als Inhibitoren fremder Enzymaktivitäten wirken. Ein Zusammenhang zu anderen Prozessen, die mit einer Veränderung von Geweben einhergehen, wie Keimung und Wachstum, Seneszenz oder mechanischen Verletzungen, wird angenommen.

So wurde beispielsweise in keimenden Erbsen im Vergleich zu Samen oder Blättern eine deutlich erhöhte α -Oxidaseaktivität beobachtet (Lazarus, 1998).

In Mikroorganismen stellen 2-Hydroxysäuren einen wichtigen Bestandteil von Membranlipiden dar (Humphreys et al., 1972). Als Bausteine in Lipid A-Molekülen, einem Pathogenitätsfaktor Gram-negativer Bakterien, blockieren sie nach der Infektion eines Wirtsorganismus durch Inhibierung einer spezifischen Transferase dessen Signalübertragungskaskade und unterbinden somit die Einleitung der Immunabwehr (Paige et al., 1990). Neben dieser für das Bakterium lebenserhaltenden Funktion stellen 2-Hydroxysäuren wichtige spezifische Inhibitoren fungaler Aminoacylasen dar (Tamura et al., 2000).

Aufgrund der enantioselektiven Bildung von 2(*R*)-Hydroxysäuren weist die α -Oxidation auch synthetisches Potential auf. Optisch aktive 2-Hydroxysäuren stellen wichtige Bausteine in der asymmetrischen Synthese dar. Sie können racemisierungsfrei in 1,2-Diole, Epoxide, α -Haloester und α -Aminosäuren überführt und für die Synthese von wichtigen Naturstoffen wie Pheromonen, Sphingolipiden und Prostaglandinen eingesetzt werden (Lee und Downie, 1967; Mori et al., 1979; Sugai und Ohta, 1991).

2.3.3 Die ω -Oxidation

Mittel- und langkettige Fettsäuren können durch die ω -Oxidation in Dicarbonsäuren umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch Enzyme des Endoplasmatischen Reticulums katalysiert und beginnt mit der Hydroxylierung des endständigen C-Atomes der Fettsäure. Die Enzyme gehören zur Gruppe der Cytochrom P-450 Enzyme. Dabei handelt es sich um NADPH-abhängige Monooxygenasen, die molekularen Sauerstoff benötigen. Anschließend wird die gebildete OH-Gruppe oxidiert. Die resultierende Dicarbonsäure wird an beiden Enden mit Coenzym A derivatisiert und via β -Oxidation abgebaut (Wada und Usami, 1977).

Insgesamt gesehen ist die ω -Oxidation für die Fettsäureoxidation von untergeordneter Bedeutung. Ihr Anteil im Vergleich zur β -Oxidation beträgt unter normalen Bedingungen ca. 10 – 15 %, dieser kann jedoch durch spezielle Diäten oder Mangelerscheinungen erhöht sein (Kam et al., 1978).

Cytochrom P-450 Enzyme kommen in zahlreichen Formen in der Leber, Steroidhormon-produzierenden Drüsen und anderen Organen vor. Es handelt sich um eine sog. Enzymsuperfamilie, die aus 14 Enzymfamilien und 26 Subfamilien besteht. Derzeit sind über 1000 Mitglieder der verschiedenen Gruppen bekannt, davon sind über 400 Enzyme

sequenziert (Nelson et al., 1996; Oliw et al., 1996). Die Cytochrom P-450 Enzyme katalysieren die Oxidation körpereigener Substanzen wie Fettsäuren, Steroiden, Prostaglandinen, Leukotrienen, Retinoiden und Cytokinen. Auch xenobiotische Substrate werden im Rahmen von Detoxifikationsprozessen von Cytochrom P-450 Enzymen umgesetzt (Porter und Coon, 1991; Nelson et al., 1996; Omura, 1999).

Bei den Cytochrom P-450 Enzymen handelt sich um Monooxygenasen, die als redox-aktives Coenzym Häm enthalten. Sie katalysieren die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff. Eines der beiden Sauerstoffatome wird auf das Substrat übertragen, das zweite als Wassermolekül freigesetzt. Die notwendigen Reduktionsäquivalente werden durch ein FAD-haltiges Hilfsprotein vom Coenzym $\text{NADPH} + \text{H}^+$ auf die eigentliche Monooxygenase übertragen.

Bei gesättigten Fettsäuren als Substraten katalysieren Cytochrom P-450 Enzyme neben der ω -Oxidation die (ω -1)- und (ω -2)-Hydroxylierung. Bei ungesättigten Fettsäuren treten als weitere Reaktivitäten auf (Oliw, 1996):

- Epoxidierung von Doppelbindungen
- Hydroxylierung von allylischen oder bis-allylischen C-Atomen
- Hydroxylierung unter Migration einer Doppelbindung

Biomimetische Studien sowie Untersuchungen gut charakterisierter Cytochrom P-450 Systeme führten zur partiellen Aufklärung des Katalysemechanismus (Groves und Watanabe, 1988; Lim et al., 1999). Im Verlauf dieser Katalyse besteht die wesentliche Funktion der Häm-Gruppe darin, atomaren Sauerstoff in einer besonders reaktiven Form bereitzustellen, der für die oben beschriebenen Reaktionen essentiell ist. Im Ruhezustand ist das Häm-Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms dreiwertig. Zunächst wird das Substrat in der Nähe des Häms gebunden. Dies ermöglicht die Reduktion des Eisens zur zweiwertigen Form und die nachfolgende Bindung eines O_2 -Moleküls. Es folgen eine weitere Elektronenübertragung und ein Valenzwechsel des Eisens, die den gebundenen Sauerstoff zum Peroxid reduzieren. Von diesem Peroxointermediat wird nun ein Hydroxylion abgespalten. Dabei entstehen Wasser und die reaktive Form des Sauerstoffs. In diesem Radikalkation ist das Eisen formal vierwertig. Das aktivierte Sauerstoffatom ist in der Lage, eine CH-Bindung des Substrats zu inserieren und ein H-Atom aus dem Substrat zu abstrahieren. Im folgenden, als *oxygen rebound step* bezeichneten Schritt wird die Hydroxygruppe gebildet (Wong, 1998). Nach der Abspaltung des Produkts kehrt das Enzym in den Ausgangszustand zurück (Omura et al., 1993). Allerdings konnte der endgültige Beweis für die letzten Stufen dieses Mechanismus durch den Nachweis eindeutiger Zwischenprodukte bisher nicht erbracht werden. Derzeit werden radikalische und nicht-radikalische Katalysemechanismen kontrovers diskutiert (Jin und Lipscomb, 1999; Valentine et al., 1999).

2.4 Fettsäuren als Substrate für Biotransformationen

In den letzten Jahren haben Fettsäuren als Substrate für Biotransformationen eine zunehmende Bedeutung gewonnen. In der Regel werden ungesättigte C18-Verbindungen, vor allem Öl- und Linolsäure, als Substrate eingesetzt. Im Verlauf der Umsetzung kommt es dann häufig zu regioselektiven Hydroxylierungen an den Positionen 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15 und 17. Als mögliche Bildungswege der Hydroxyderivate werden die Katalyse durch Lipoxygenasen oder Dioxygenasen sowie Cytochrom P-450 vermittelte Oxidationen diskutiert (Venter et al., 1997). Im Folgenden werden bedeutende mikrobiell katalysierte Biotransformationen von Fettsäuren vorgestellt.

2.4.1 *Bacillus megaterium*

Bereits in den 70er Jahren hat man aus *Bacillus megaterium* ATCC 14851 ein lösliches Enzympräparat isoliert, das in Gegenwart von NADPH und O₂ freie Fettsäuren zu einem Isomerengemisch aus (ω -1)-, (ω -2)- und (ω -3)-Monohydroxyderivaten umsetzt. Die Produktverteilung variiert dabei in Abhängigkeit von der Kettenlänge, meist ist jedoch die (ω -2)-Position bevorzugt. Abbildung 2-7 zeigt dies am Beispiel der Palmitinsäure.

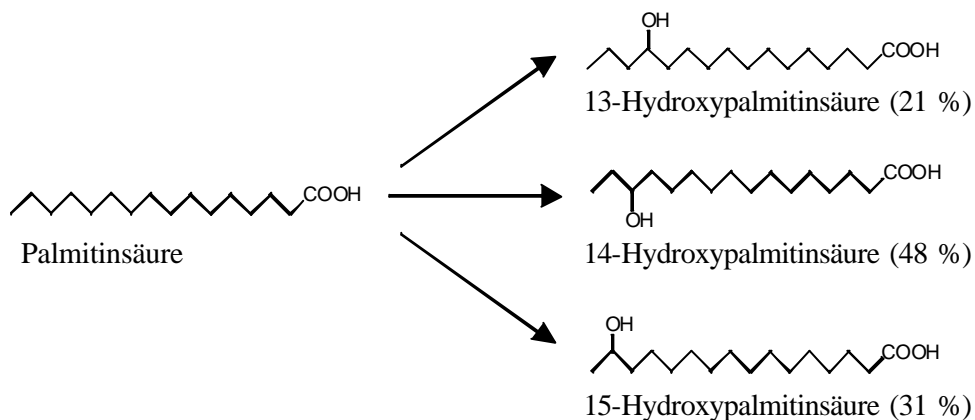


Abb. 2-7: Hydroxylierung von Palmitinsäure durch *Bacillus megaterium*: Bildung der (ω -1)-, (ω -2)- und (ω -3)-Monohydroxyderivate (nach Miura und Fulco, 1975)

Es erfolgt keine Hydroxylierung der terminalen Methylgruppe. Weiterhin ist auch keine signifikante Umsetzung der Methylengruppen hinter der (ω -3)-Position beobachtet wor-

den. Neben den freien Fettsäuren werden auch die entsprechenden primären Alkohole sowie Fettsäureamide als Substrate akzeptiert. Nicht umgesetzt werden dagegen Fettsäure-Methylester sowie reine Kohlenwasserstoffe höherer Kettenlänge (12 bis 18 C-Atome). Für jede der verschiedenen Substratklassen lassen sich Abstufungen der Hydroxylierungsaktivität in Abhängigkeit von der Kettenlänge beobachten. Während bei den gesättigten Fettsäuren eine Kettenlänge von 15 C-Atomen (Pentadecansäure) favorisiert wird, erwies sich bei den Alkoholen ein C14-Grundgerüst (1-Tetradecanol) als Substrat, für das die höchste Umsatzrate beobachtet wird. Dies ist auch bei den Fettsäureamiden der Fall (Myristinsäureamid), allerdings stand hier die entsprechende C13-Verbindung für die Studien nicht zur Verfügung. Vergleicht man die Substratklassen untereinander und betrachtet dabei jeweils das Substrat, für das die höchste Aktivität vorliegt, lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Verglichen mit den Säuren liegt die Aktivität für die Amide bereits um den Faktor 10 niedriger, für die Alkohole sogar um den Faktor 14. Einfach ungesättigte Fettsäuren, bei denen die Doppelbindung in *cis*-Konfiguration vorliegt, werden in der Regel besser umgesetzt als die entsprechenden gesättigten Verbindungen gleicher Kettenlänge. Eine Ausnahme stellt hier *cis*-5-Tetradecensäure dar, die im Vergleich zu Myristinsäure schlechter als Substrat akzeptiert wird. Bei Fettsäuren, die über eine Doppelbindung im Molekül verfügen, kann auch eine Epoxydierung eintreten (Miura und Fulco, 1974 und 1975; Matson et al., 1977; Ruettinger und Fulco, 1981).

Man ging zunächst davon aus, dass das hydroxylierende System aus mindestens zwei Proteinen besteht, die für dessen Aktivität nötig sind. Eines davon kann jedoch auch durch bakterielles Ferredoxin ersetzt werden. Heute ist bekannt, dass *Bacillus megaterium* ATCC 14581 mindestens drei lösliche Cytochrom P-450 Enzyme enthält, die als P-450_{BM-1}, P-450_{BM-2} bzw. P-450_{BM-3} bezeichnet werden (Fulco, 1991). Cytochrom P-450_{BM-3} ist eine Fettsäurehydroxylase, die bezüglich ihrer Sequenz eine stärkere Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der CYP4A-Unterfamilie aus Säugern aufweist als zu anderen prokaryontischen Monooxygenasen (Shirane et al., 1993). Inzwischen sind mehrere Induktoren, z.B. Phytansäure sowie verschiedene Barbiturate bekannt (English et al., 1994 und 1997). Durch gezielte genetische Veränderungen ist es weiterhin gelungen, die Substratspezifität des Enzyms zu beeinflussen. Während das Enzym des Wildtyps Alkyltrimethylammoniumverbindungen nicht umsetzt, kann durch Ersatz des Arginins-47 durch Glutamin eine effiziente Hydroxylierung solcher Verbindungen erreicht werden (Oliver et al., 1997). Auch die Mutation von Threonin-268 zu Alanin verändert die katalytischen Eigenschaften des Enzyms. So wird z.B. die Produktbildung deutlich verlangsamt und somit der Verbrauch an NADPH und O₂ während der Reaktion gesenkt (Yeom et al., 1995, Truan und Peterson, 1998).

Am Beispiel von Palmitinsäure wurde gezeigt, dass die gebildeten Hydroxylierungsprodukte in hoher Stereoselektivität gebildet werden. Für 15- und 14-Hydroxypalmitin-

säure wurden ein Enantiomerenüberschuss von 96 % für das (*R*)-Enantiomer bestimmt (Capdevila et al., 1996; Truan et al., 1999).

Bei den bakteriellen Cytochrom P-450 Systemen handelt es sich meist um membran-gebundene Enzymkomplexe, deren Isolierung und Aufreinigung gegenüber löslichen Enzymen deutlich erschwert ist. Neben Cytochrom P-450_{BM-3} sind daher nur wenige weitere Cytochrome isoliert und gut charakterisiert. Dazu gehören beispielsweise Cytochrom P-450_{cam} aus *Pseudomonasputida* und P-450_{lin} aus *Pseudomonasincognita*. Die Funktion des Cytochroms P-450 für Bodenbakterien ist derzeit noch unklar. Als Fettsäure-Monooxygenase ist das Enzym möglicherweise in die Biosynthese spezieller Fettsäuren involviert, die in Schutz- und Abwehrmechanismen eine Rolle spielen (English et al., 1997).

Aus den bislang ermittelten experimentellen Daten für gereinigte bakterielle Oxygenasen lassen sich weitreichende Schlüsse zum Mechanismus der Katalyse sowie zur Evolution dieser Enzymfamilie ziehen. Enzymisolierungen und die damit verbundenen Charakterisierungen sind allerdings aufwendig. Zudem werden für den Ablauf der Katalyse weitere Redoxenzyme benötigt. Daher ist die Verwendung von intakten Zellen für präparative Umsetzungen gegenüber isolierten Enzymen derzeit vorteilhaft.

2.4.2 *Nocardiacholesterolicum* und *Flavobacterium* sp.

Die ungesättigten C18-Fettsäuren Öl-, Linol und α -Linolensäure werden von *Nocardiacholesterolicum* jeweils zu 10-Hydroxyderivaten umgesetzt. Aus Ölsäure wird als Hauptprodukt die gesättigte Verbindung 10-Hydroxystearinsäure gebildet, als Nebenprodukt entsteht 10-Hydroxystearinsäure (Abb. 2-8). Werden Linol- und α -Linolensäure als Substrate verwendet, entstehen entsprechend ungesättigte Produkte. Die für die Katalyse verantwortliche Hydratase zeigt Regiospezifität (Koritala und Bagby, 1992).

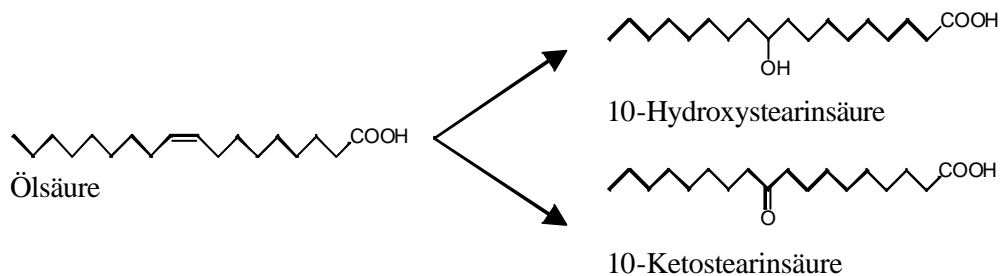


Abb. 2-8: Umsetzung von Ölsäure durch *Nocardiacholesterolicum* (nach Koritala et al., 1989)

Auch ein nicht näher beschriebener Keim der Gattung *Flavobacterium* hydroxyliert zugesetzte Fettsäuren selektiv in Position 10. In Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Bakterien entstehen aus Ölsäure 10-Hydroxy- und 10-Ketostearinsäure in unterschiedlichen Verhältnissen. Nach einer Reaktionszeit von 36 Stunden ist die maximale Produktbildung erreicht. Während eine Vielzahl von Bakterien nur in einem eng begrenzten pH-Bereich optimale Umsetzungsraten zeigt, katalysiert der hier verwendete Stamm die Umsetzung bei pH von 5.5 bis 9.0 ohne signifikante Abnahme der gebildeten Produktmenge (Hou 1994a). Untersuchungen zur Lokalisierung der Reaktion ergaben, dass die Enzyme, die die Hydratisierung der Doppelbindung und die anschließende Oxidation katalysieren, intrazellulär vorliegen. Eine entsprechende Umsetzung findet nur in Gegenwart von Zellen statt, während ein zellfreier Extrakt keine Aktivität zeigt (Hou, 1994b).

Eine zur Substratspezifität durchgeführte Studie ergab, dass der verwendete Stamm der Gattung *Flavobacterium* für Ölsäure die höchste Umsetzungsrate zeigt. Tabelle 2-7 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

Tab. 2-7: Substratspezifität des Keimes der Gattung *Flavobacterium* (nach Hou, 1994a)

Substrat		Relative Aktivität [%]
Myristoleinsäure	9Z-Tetradecensäure	16
Palmitoleinsäure	9Z-Hexadecensäure	55
Ölsäure	9Z-Octadecensäure	100
Petroselinensäure	6Z-Octadecensäure	0
Linolsäure	9Z,12Z-Octadecadiensäure	35
α -Linolensäure	9Z,12Z,15Z-Octadecatriensäure	34
γ -Linolensäure	6Z,9Z,12Z-Octadecatriensäure	31
Elaidinsäure	9E-Octadecensäure	0
Arachidonsäure	5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure	0
Erucasäure	13Z-Eicosensäure	0
Palmitinsäure	Hexadecensäure	0
Stearinsäure	Octadecensäure	0

Das aus Linolsäure entstehende Hauptprodukt ist als 10-Hydroxy-12Z-octadecensäure identifiziert worden. Als Nebenprodukte werden 10-Keto-12Z-octadecensäure und 10-Methoxy-12Z-octadecensäure gebildet (Hou, 1994b). Die Strukturaufklärung der aus

α - und γ -Linolensäure gebildeten Produkte als 10-Hydroxy-12Z,15Z-octadecadiensäure bzw. 10-Hydroxy-6Z,12Z-octadecadiensäure bestätigte das Vorliegen eines Enzyms mit Regiospezifität bezüglich C10. Diese Selektivität wurde auch für Hydratasen weiterer Mikroorganismen beobachtet. Das Vorliegen einer *cis*-Doppelbindung ist unabdingbare Voraussetzung für die Umsetzung der verschiedenen Substrate (Hou, 1994b und 1995).

Aufgrund seiner Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen an Ölsäure wurde ein weiterer Bakterienstamm, nämlich *Micrococcus luteus*, aus einer Bodenprobe isoliert, der Ölsäure effizient zu 10-Hydroxystearinsäure und 10-Ketostearinsäure umsetzte. Ausgehend von Palmitolein- und Myristoleinsäure werden die entsprechenden 10-Ketoderivate gebildet. Petroselinensäure wird dagegen nicht als Substrat akzeptiert. Das Vorhandensein einer *cis*-konfigurierten Doppelbindung zwischen C9 und C10 auch hier notwendige Voraussetzung für die Hydroxylierung durch *Micrococcus luteus* (Esaki et al., 1994).

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Die mikrobielle Umsetzung von Ölsäure wurde 1962 von Wallen und Mitarbeitern beschrieben. Mit Ausbeuten von 14 % wird als Reaktionsprodukt 10-Hydroxystearinsäure gebildet. Der eingesetzte Stamm wurde dem Genus *Pseudomonas* zugeordnet. Weitere Untersuchungen zur Umsetzung von Ölsäure mit einer *Pseudomonas* sp. wurden von Hou und seiner Arbeitsgruppe (1991) durchgeführt. Der von obigen Autoren verwendete Stamm wurde aus einer Wasserprobe isoliert und als *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert. Die Struktur des Umsetzungsprodukts wurde als 7,10-Dihydroxy-8*E*-octadecensäure (DOD) aufgeklärt. Für die Entstehung wird der in Abbildung 29 dargestellte Bildungsweg über 10-Hydroxy-8Z-octadecensäure (HOD) als Zwischenprodukt postuliert (Hou und Bagby, 1992).

Spätere Studien ergaben, dass die im Intermediat gebildete Doppelbindung zwischen C8 und C9 bereits in *trans*-Konformation vorliegt (Kim et al., 2000a). Untersuchungen zur Stereochemie von DOD zeigten, dass beide Hydroxygruppen im Molekül in (*S*)-Konfiguration gebildet werden (Gardner und Hou, 1999).

Das Bildungsmaximum der als DOD bezeichneten Verbindung tritt nach 48 Stunden auf und liegt bei 63 % bezüglich der eingesetzten Menge an Ölsäure. Danach sinkt der Gehalt im Medium wieder ab, was auf eine weiterführende Metabolisierung durch das Bakterium schließen lässt. In verschiedenen Studien wurden die optimalen Reaktionsbedingungen definiert. Die Autoren wiesen nach, dass eine Vorinkubation der Zellen mit Glucose als Kohlenstoffquelle für die anschließende Biotransformation ideal ist.

Nach zwei Tagen wurde Ölsäure als eigentliches Substrat zugegeben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gebildete Menge an DOD von der zugesetzten Substratkonzentration abhängig ist. Zunächst verhalten sich beide Parameter proportional zueinander. Ab einer bestimmten Konzentration an exogen zugeführter Ölsäure kann dagegen kein weiterer Anstieg der Produktkonzentration erreicht werden. Das Temperatur-optimum der Bildung liegt bei 30 °C. Wird die Temperatur auf 25 °C gesenkt bzw. auf 35 °C erhöht, werden bezogen auf die bei 30 °C erhaltene Menge nur 50 % bzw. 57 % an DOD gebildet. Um den Einfluss des pH-Wertes während der Umsetzung zu ermitteln, wurde eine bei pH 7.0 angewachsene Kultur vor Zugabe des Substrates auf verschiedene pH-Werte von 5.5 bis 8.5 eingestellt. Der höchste Gehalt an DOD wird bei pH 7.0 erzielt (Hou und Bagby, 1991; Hou und Bagby, 1992).

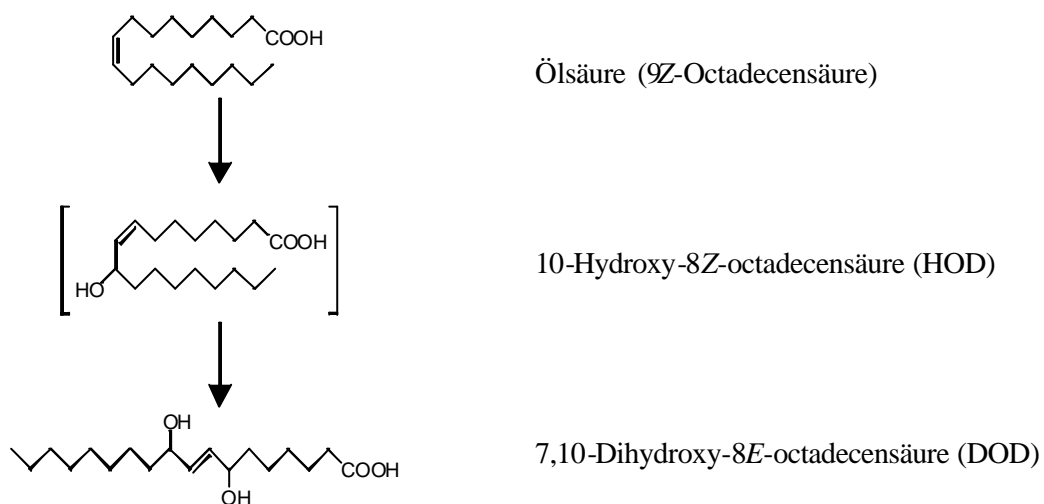


Abb. 2-9: Postulierter Bildungsweg von 7,10-Dihydroxy-8E-octadecensäure (DOD) durch *Pseudomonasaeruginosa*, ausgehend von Ölsäure (nach Hou und Bagby, 1992)

Studien zur Substratazeptanz des Stammes ergaben, dass Linolsäure nicht nach obigem Mechanismus umgesetzt wird. Aus Ricinolsäure wird dagegen in einer analogen Reaktionsfolge 7,10,12-Trihydroxy-8E-octadecensäure (TOD) gebildet. (Kuo et al., 1998; Kim et al., 2000b).

Eine weitere dreifach hydroxylierte Verbindung, nämlich 12,13,17-Trihydroxy-9Z-octadecensäure wird ausgehend von Linolsäure in einer maximalen Ausbeute von 25 % gebildet (Abb. 210). Dieses Maximum wird nach einer Reaktionszeit von 85 Stunden

bei 30 °C und pH 7.0 erreicht. Der Stamm, der diese Biotransformation katalysiert, wurde aus einer Bodenprobe isoliert und konnte der Gattung *Clavibacter* zugeordnet werden (Hou, 1996).

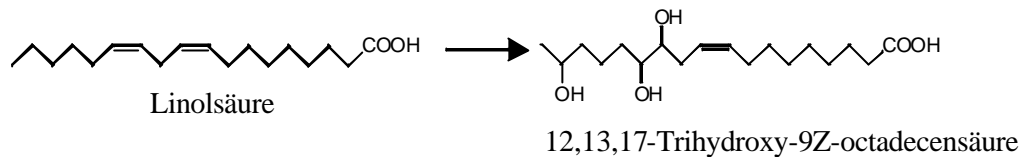


Abb. 2-10: Umsetzung von Linolsäure zu 12,13,17-Trihydroxy-9Z-octadecensäure, katalysiert von *Clavibacter* sp. (nach Hou, 1996)

2.4.4 *Dipodascopsis uninucleata*

Ein Stamm der Hefe *Dipodascopsis uninucleata* setzt Fettsäuren mit 20 C-Atomen sowie einem Z5,Z8-Diensystem, nämlich Z5,Z8,Z11-Eicosatriensäure, Z5,Z8,Z11,Z14-Eicosatetraensäure und Z5,Z8,Z11,Z14,Z17-Eicosapentaensäure zu den entsprechenden 3-Hydroxy-*all-Z*-eicosapolyensäuren um. Es tritt dabei eine direkte Hydroxylierung der Ausgangsmoleküle ohne Veränderung der Kettenlänge auf. Ausgehend von Linolsäure und Z11,Z14,Z17-Eicosatriensäure sind 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure bzw. 3-Hydroxy-Z5,Z8,Z11-tetradecatriensäure als Umsetzungsprodukte identifiziert worden (Abb. 2-11). In diesen Fällen tritt also im Verlauf der Bildung der hydroxylierten Verbindungen eine Verkürzung des Ausgangsmoleküls um 4 bzw. 6 C-Atome auf. Keine Anreicherung von hydroxylierten Metaboliten wird beobachtet, wenn Ölsäure, Linolaidinsäure, γ -Linolensäure und Eicosensäure als Substrate eingesetzt werden. Die Autoren schlossen daraus, dass das Vorhandensein eines Z5,Z8-Diensystems unabdingbare Voraussetzung für die Hydroxylierung ist. Dieses kann originär im Molekül vorliegen oder im Rahmen eines partiellen Abbaus gebildet werden. Es ist allerdings weder direkt an der Biotransformation beteiligt noch ist es für die Aktivierung der Methylengruppe am C3 nötig. Vielmehr erfüllt es eine Signalfunktion und ist in die Substraterkennung durch die entsprechenden Enzyme der Hefe involviert (Kock et al., 1997; Venter et al., 1997).

Eine Lipoxygenase- oder Dioxygenase-vermittelte Bildung der 3-Hydroxysäuren in der Hefe *D. uninucleata* kann ausgeschlossen werden, da diese eine Doppelbindung in der Nachbarschaft, d.h. an C2 und/oder C4 erfordern. Gleiches gilt für die Beteiligung der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase. Als möglichen Bildungsweg vermuteten die Au-

toren eine direkte Monooxygenierung an C3 über Cytochrom P-450-Enzyme (Venter et al., 1997).

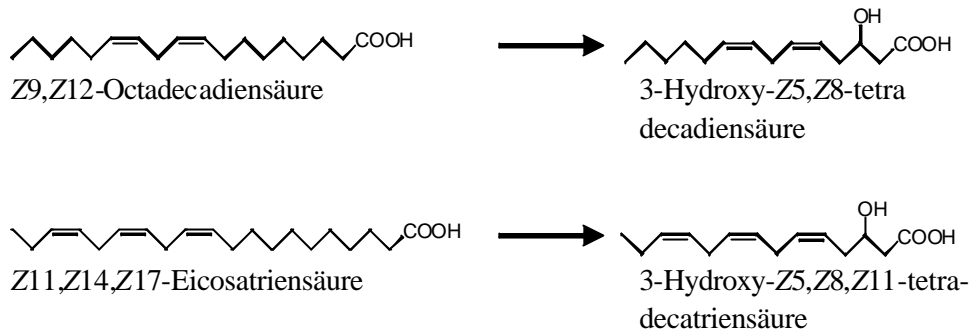


Abb. 2-11: Umsetzung von Z9,Z12-Octadecadiensäure und Z11,Z14,Z17-Eicosatriensäure zu 3-Hydroxysäuren durch *Dipodascopsis uninucleata* (nach Venter et al., 1997)

Im Rahmen von mikroskopischen Immunfluoreszenzstudien konnten die 3-Hydroxysäuren unter Verwendung eines Antikörpers, der Gruppenspezifität gegenüber 3-Oxy-lipiden zeigte, lokalisiert werden. Sie wurden selektiv in den Gametangien, in den Ascis sowie in den abgelösten Ascosporen nachgewiesen. Daraus lässt sich eine zentrale Rolle dieser Verbindungen im Rahmen des sog. „*life-cycle*“ der Hefen ableiten. Sie spielen als Wachstumsregulatoren innerhalb der sexuellen Phase des Vermehrungszyklus eine bedeutende Rolle (Kock et al., 1998).

Für 3-Hydroxy-Z5,Z8,Z11,Z14-eicosatetraensäure (3-HETE), den Metaboliten aus Arachidonsäure, wurde ein Enantiomerenüberschuss von 95 % bestimmt. Die Aufklärung der Absolutkonfiguration erfolgte nach der enantioselektiven Totalsynthese von (*R*)- und (*S*)-3-HETE. Ein Vergleich der Retentionszeiten an einer chiralen HPLC-Säule ergab das Vorliegen der (*R*)-Konfiguration (Venter et al., 1997).

Für den Bodenpilz *Mucor genevensis* wurde eine ähnliche Reaktivität nachgewiesen. Exogen zugeführte Arachidonsäure wird zu 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure umgesetzt, die zusammen mit freier Linolsäure im wässrigen Überstand, nicht aber in der fungalen Biomasse gefunden wird. Hingegen konnte der durch *D. uninucleata* gebildete Arachidonsäuremetabolit 3HETE nicht detektiert werden. Die Autoren folgerten, dass *Mucor genevensis* Arachidonsäure im Rahmen einer sog. „Retrokonversion“ zunächst in Linolsäure überführt, die dann wie bei *Dipodascopsis uninucleata* zu 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure abgebaut wird (Pohl et al., 1998).

2.4.5 Weitere Mikroorganismen für die Biotransformation von Fettsäuren

Untersuchungen zum Metabolismus essentieller Fettsäuren führten zum Nachweis verschiedener Enzymaktivitäten in dem Fungus *Gaeumannomyces graminis*, die gezielt für die fermentative Produktion von Hydroxyfettsäuren eingesetzt werden können. Linolsäure wird vorwiegend zu 8-Hydroxy-9,12-octadecadiensäure umgesetzt. Als Nebenprodukte entstehen die (ω -2)- und (ω -3)-Alkohole (Abb. 2-12). Analog wird α -Linolensäure zu 8-Hydroxy-9,12,15-octadecatriensäure metabolisiert. Hier entsteht als weiteres Reaktionsprodukt das 15,16-Diol. Aus Arachidonsäure wird dagegen kein 8-Hydroxymetabolit gebildet. Stattdessen entstehen die an C-18 und C-19 sowie in geringen Konzentrationen an C-17 hydroxylierten Verbindungen. *Gaeumannomyces graminis* verfügt über ein cytosolisches Cytochrom P-450 Enzym, das (n -6)-Fettsäuren (Linolsäure und Arachidonsäure) im Rahmen einer ω -Hydroxylierung umsetzt. Die bei (n -3)-Fettsäuren wie α -Linolensäure auftretende Bildung eines vicinalen Diols verläuft über ein Epoxid als Zwischenstufe (Brodowsky und Oliw, 1992).

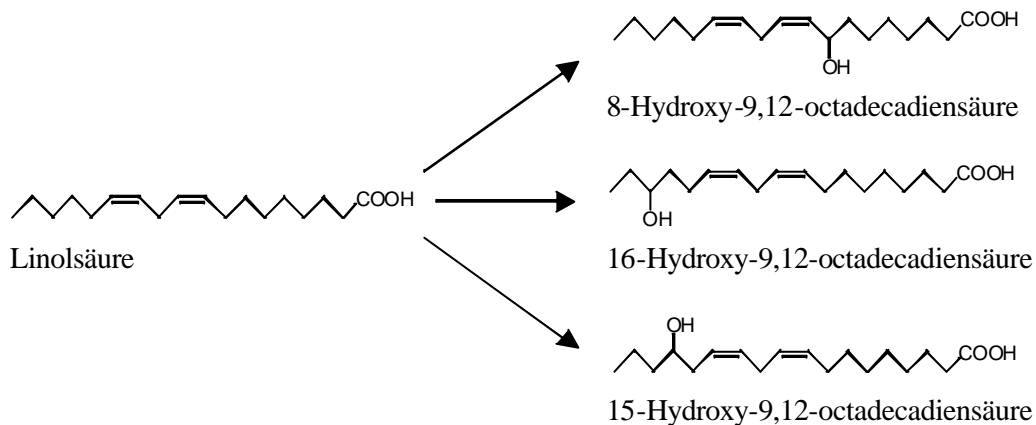


Abb. 2-12: Umsetzung von Linolsäure durch *Gaeumannomyces graminis*: Bildung von 8-Hydroxy-9,12-octadecadiensäure als Hauptprodukt sowie den (ω -2)- und (ω -3)-Alkoholen als Nebenprodukten (nach Brodowsky und Oliw, 1992)

Die Umsetzung von Linolsäure wurde von Brodowsky und Mitarbeitern (1992) genauer untersucht. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde nach Ozonolyse der

diastereomeren (-)-Menthoxycarbonylderivate mittels GC-MS-Analytik durchgeführt und ergab, dass das Produkt (*R*)-konfiguriert gebildet wird. Als Zwischenstufe im Verlauf der Bildung konnte 8-(*R*)-Hydroperoxy-9,12-octadecadiensäure identifiziert werden. Als weiteres Reaktionsprodukt wurde *threo*-(7*S*,8*S*)-Dihydroxy-9,12-octadecadiensäure nachgewiesen (Abb. 213). Dieses Diol wird, katalysiert durch eine Hydroperoxidisomerase, ausgehend vom Hydroperoxid durch intramolekulare Hydroxylierung am C7 gebildet. In geringen Mengen entstehen weitere mono- und dihydroxylierte Reaktionsprodukte, deren Strukturen nach Aufreinigung mittels GC-MS aufgeklärt wurden.

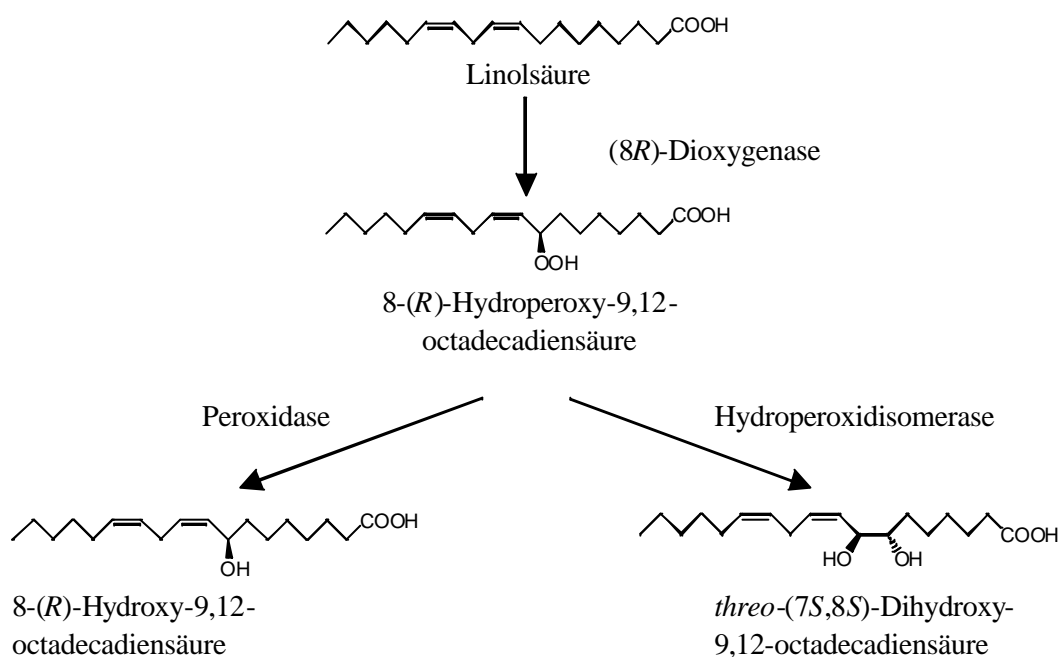


Abb. 2-13: Metabolismus von Linolsäure katalysiert durch *Gaeumannomyces graminis* (nach Brodowsky et al., 1992)

Im Rahmen einer Studie zur Substratazeptanz wurde gezeigt, dass die (*8R*)-Dioxygenase auch Ölsäure, *cis*-Vaccensäure und Ricinolsäure umsetzt. Die Position der Doppelbindung ist also nicht auf die C9-Position limitiert. Eine Hydroxygruppe benachbart zur Doppelbindung führt nicht zur Inhibierung des Enzyms. Stearin- und Elaidinsäure werden dagegen nicht als Substrate akzeptiert (Brodowsky et al., 1992).

Die (*8R*)-Dioxygenase setzt also Carbonsäuren und einer *cis*-konfigurierten Doppelbindung in Position C9 um. Das Enzym weist katalytische Ähnlichkeiten, allerdings auch

deutliche Unterschiede zu den ebenfalls Hydroperoxide bildenden Lipoxygenasen auf. Im Gegensatz zur Lipoxygenase aus Sojabohnen wird beispielsweise auch Ölsäure als Substrat akzeptiert. Beide Enzyme werden von den gleichen Verbindungen inhibiert, was auf einen analogen Oxygenierungsmechanismus schließen lässt.

Die beiden für die beschriebenen Reaktionen verantwortlichen Enzyme hat man partiell gereinigt und charakterisiert. Die (8*R*)-Dioxygenase liegt im Cytosol von *Gaeumannomyces graminis* vor. Die Hydroperoxidisomerase-Aktivität ist dagegen in den Mikrosomen des Pilzmycels lokalisiert (Su et al., 1995).

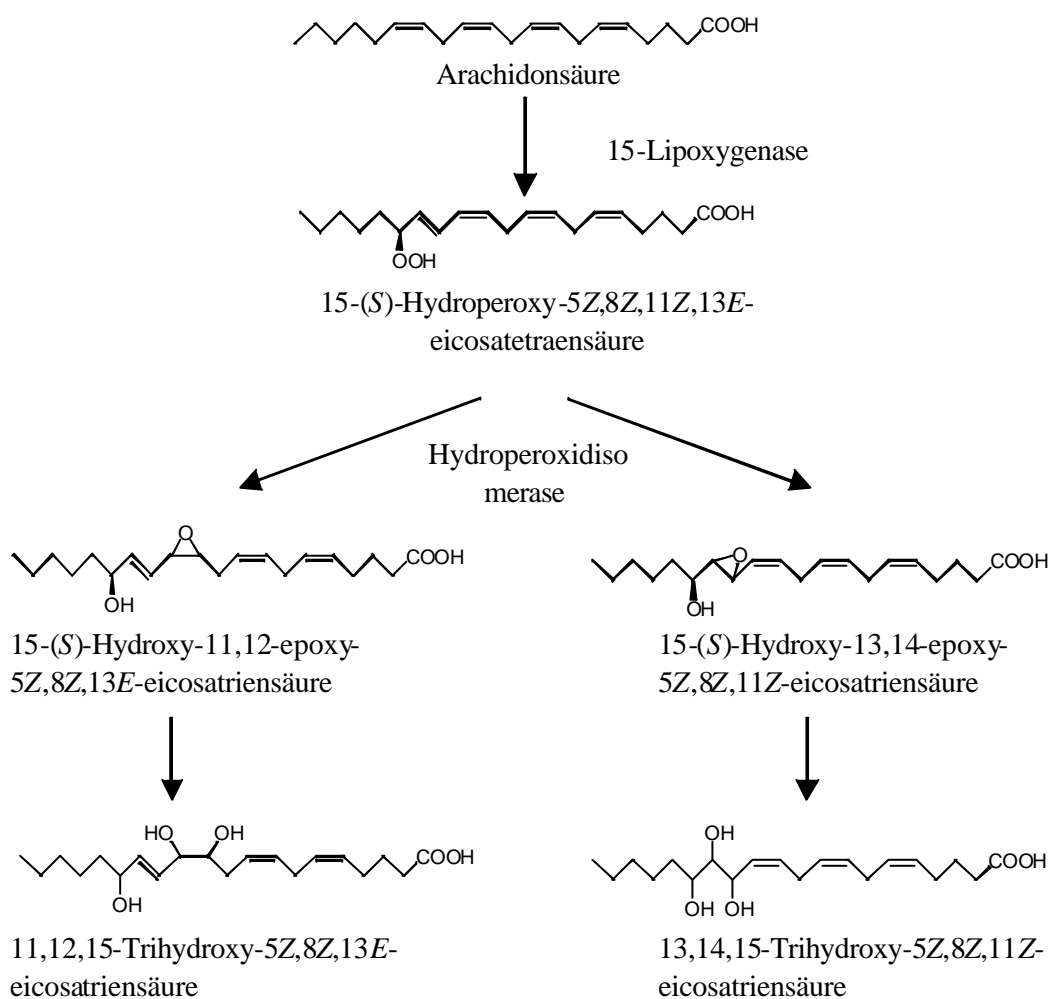


Abb. 2-14: Umsetzung von Arachidonsäure durch *Saprolegnia parasitica*: Bildung von Epoxyalkoholen und Trihydroxysäuren (nach Hamberg et al., 1986)

Hamberg und Mitarbeiter wiesen im Rahmen von Studien zum mikrobiellen Metabolismus von Arachidonsäure nach, dass der Pilz *Saprolegniaparasitica* das Substrat zunächst zu 15-(S)-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure umsetzt. Diese Reaktion wird von einer 15-Lipoxygenase katalysiert. Ausgehend von diesem Hydroperoxid werden durch das Enzym Hydroperoxidisomerase die beiden Epoxyalkohole 15-(S)-Hydroxy-11,12-epoxy-5Z,8Z,13E-eicosatriensäure und 15-(S)-Hydroxy-13,14-epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatriensäure gebildet. Die Öffnung der Epoxidfunktion führt im nächsten Schritt zur Bildung der Trihydroxysäuren 11,12,15-Trihydroxy-5Z,8Z,13E-eicosatriensäure und 13,14,15-Trihydroxy-5Z,8Z,11Z-eicosatriensäure (Abb. 2-14) (Hamberg et al., 1986).

Auch die mikrobielle Bildung von Hydroxydicarbonsäuren aus Fettsäuren wurde bereits beschrieben. So setzt die Hefe *Candidatropicalis* M25 exogen zugeführte Linolsäure zu 3-Hydroxy-Z9,Z12-octadecadiensäure und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure um (Abb. 2-15) (Fabritius et al., 1997).

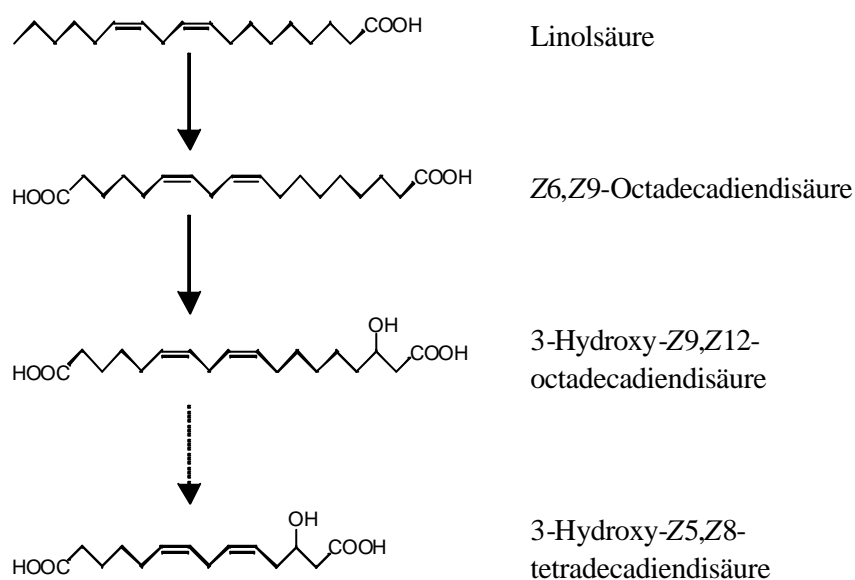


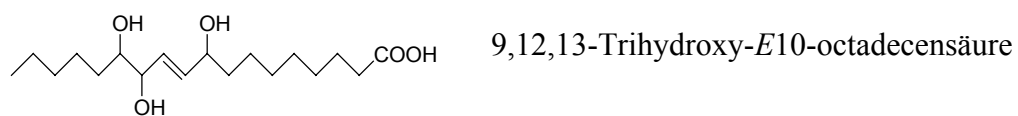
Abb. 2-15: Bildung von Hydroxydicarbonsäuren durch die Hefe *Candidatropicalis* (nach Fabritius et al., 1997)

2.5 Hydroxylierte Fettsäuren in der Natur

2.5.1 Vorkommen und Funktion hydroxylierter Fettsäuren

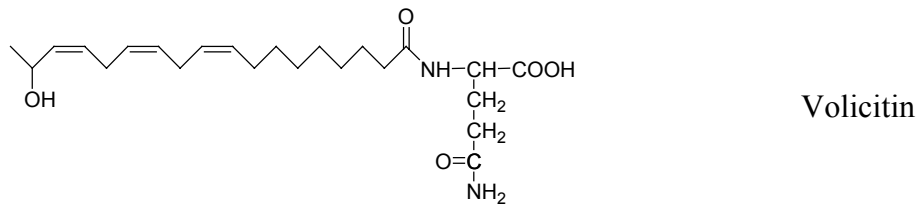
Langkettige Hydroxyfettsäuren und andere oxyfunktionalisierte Fettsäurederivate, die als Oxylipide bezeichnet werden, sind polyfunktionelle Verbindungen, die in der Natur weit verbreitet sind. Man findet sie sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich, wo sie vielfältige biologische Funktionen erfüllen (Nomura und Ogata, 1976; Gardner, 1991). Während im Säuger Arachidonsäure als wichtigster Vorläufer fungiert, geht die Biosynthese in Pflanzen meist von den mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure aus. Häufig stellen Hydroperoxide Intermediate der Bildung dar, die dann zu verschiedenen Folgeprodukten umgesetzt werden (Hamberg, 1993; Grechkin, 1998). Auch in Algen und verschiedenen Mikroorganismen wurde das Vorkommen von Hydroxyfettsäuren nachgewiesen und deren Bildungswege näher untersucht (Van Dyk et al., 1994; Gerwick, 1994). Die hydroxylierten Verbindungen treten sowohl frei als auch im Triglyceridverband, als Glycosid sowie als inner- und intermolekulare Ester auf. In den folgenden Abschnitten wird das Vorkommen einiger Hydroxyfettsäuren beschrieben sowie deren Funktionen näher erläutert.

Grosse Bedeutung kommt Hydroxyfettsäuren im Bereich der Pathogenabwehr zu. So produziert die tropische Taropflanze (*Colocasia antiquorum*) bei Befall mit Schwarzrostpilzen (*Ceratocystis fimbriata*) 9,12,13-Trihydroxy-*E*10-octadecensäure. Dieser Verbindung wird eine antifungale Wirkung zugeschrieben (Masui et al., 1989).

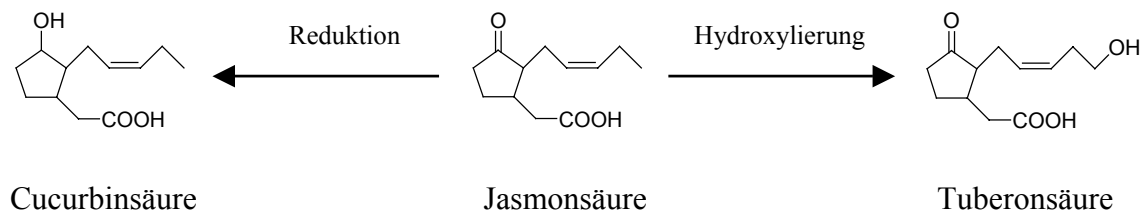


In einer weiteren Variante der gezielten Abwehr von Schädlingen bedient sich die Pflanze flüchtiger Signalstoffe zur Kommunikation. Damit lockt sie natürliche Feinde von Schadinsekten an. So konnte gezeigt werden, dass Mais auf einen Befall durch die Schmetterlingsraupe *Spodoptera exigua* mit einer systemischen Freisetzung spezifischer Lockstoffe reagiert, die Wespen der Gattung *Cotesia marginiventris* anziehen. Bei den freigesetzten Stoffen handelt es sich um eine Mischung aus Indol und verschiedenen Terpenen. Das Emissionsmaximum der für den Parasiten der Raupe attraktiven Verbindungen ist zudem noch zeitlich auf die Hauptflugzeit dieser Wespe abgestimmt. Die *de novo*-Synthese dieser Verbindungen kann nur durch den im Speichelsekret der

Raupe enthaltenen Signalstoff Volicitin ausgelöst werden. Eine einfache Verletzung des Gewebes reicht dagegen nicht aus. Bei Volicitin handelt es sich um das Hydroxyfett-säurederivat *N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-glutamin (Alborn et al., 1997; Schröder, 1998).



Eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung pflanzlicher Abwehrvorgänge spielt Jasmonsäure und ihr Methylester. Durch Reduktion der Ketofunktion bzw. Hydroxylierung am Methylende entstehen daraus die Hydroxyderivate Cucurbinsäure und Tuberonsäure. Das Vorkommen dieser Verbindungen in Pflanzen sowie ihre Beteiligung an den verschiedenen Abwehrprozessen wie der Pathogenabwehr wurde inzwischen nachgewiesen (Hamberg und Gardner, 1992; Koda, 1992; Blee, 1998).



Myrmicacin (3-(*R*)-Hydroxydecansäure) wird von südamerikanischen Blattschneideameisen (*Atta sexdens*) sezerniert. Mit dieser Substanz schützen die Ameisen ihre angelegten Pilzgärten vor mikrobiellem Befall. Desweiteren wird von Ernteameisen einge-tragenes Speichergetreide durch Myrmicacin am Auskeimen gehindert (Schildknecht und Koob, 1971; Römpf, 1995).

Hydroxyfettsäuren spielen auch als Pheromone im Tierreich eine wichtige Rolle. So ist 9-Hydroxy-*E*2-decensäure neben 2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethanol, 4-Hydroxy-benzoensäuremethylester und 9-Oxo-*E*2-decensäure Bestandteil der sog. Königinnen-substanz. Diese Mischung findet sich im Sekret der Mandibular-Drüsen von Bienen-königinnen. Sie lockt männliche Dronen zur Befruchtung junger Königinnen an. Ferner verhindert sie die Entwicklung der Ovarien von Arbeiterbienen und die Entstehung von Königinnenzellen (Slessor et al., 1990; Römpf, 1995).

Tabelle 2-8 gibt einen Überblick über weitere weit verbreitete Hydroxyfettsäuren und deren Vorkommen.

Tab. 2-8: Weit verbreitete Hydroxyfettsäuren und ihr Vorkommen (nach Hayes, 1996)

Trivialname der Verbindung	Struktur	Vorkommen
2-Hydroxylaurinsäure	12:0-OH(2)	<i>Azotobacter agilis</i>
C18- ω -Hydroxyfettsäuren	18:0-OH(18)	Epicuticuläre Wachse
3-Hydroxyölsäure	18:1(Z9)-OH(3)	<i>Alcaligenes sp.</i> (Fermentation)
Ricinolsäure	18:1(Z9)-OH(R12)	Samen von <i>Ricinus communis</i>
Densipolsäure	18:2(Z9,Z15)-OH(12)	Samen von <i>Lesquerella densipila</i>
Dimorphecolinsäure	18:2(E10,E12)-OH(9)	Samen von <i>Dimorphotheca sinatua</i>
15-(R)-Hydroxylinolsäure	18:2(Z9,Z12)-OH(R15)	Hafer ^a
α -Kamlolensäure	18:3(Z9,E11,E13)-OH(18)	Samen von <i>Mallatus philippinensis</i>
Lesquerolsäure	20:1(Z11)-OH(R14)	Samen von <i>Lesquerella fendleri</i>
15-Hydroxyeicosaensäure	20:5(Z5,Z8,Z11,E13,Z17)-OH(S15)	<i>Laminaria sp.</i> (Braunalgen)
Phellonsäure	22:0-OH(13)	Kork
Ipurolsäure	14:0-OH(3,11)	<i>Ipomoea purga</i>
Dihydroxyhexadecansäure	16:0-OH(9,16)	Cutin von Kaffee und Papaya
Ustilinsäure	16:0-OH(15,16)	<i>Ustilago zaeae</i>
(+)-Threo-9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure	18:1(Z12)-OH(9,10,18)	Samen von <i>Chamaepeuce afra</i>
Malynginsäure	18:2(E10,Z15)-OH(S9,R12,S13)	<i>Lyngya majuscula</i> (blau-grüne Meeresalge) ^b

^a Hamberg und Hamberg, 1996

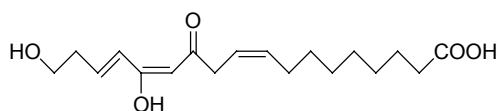
^b Cardellina und Moore, 1980

Hydroxylierte Fettsäuren und ihre Derivate stellen auch wertvolle Produkte für die Industrie dar. So werden sie als Emulgatoren in Kosmetika und Lebensmitteln verwendet. Auch als Dispersionshilfsmittel in Druckerfarben sowie als Feuchthaltemittel werden sie eingesetzt. Natürlich vorkommende enantiomerenreine Hydroxyfettsäuren sind wertvolle Edukte für Feinchemikalien und Arzneistoffe, da sie über Standardsynthesen schlecht zugänglich sind (Hayes, 1996).

2.5.2 Hydroxylierte Fettsäuren in Lebensmitteln

Hydroxylierte Fettsäuren finden sich ihrer weiten Verbreitung gemäß auch in Lebensmitteln. Man unterscheidet dabei, ob die Verbindung direkt aus der Pflanze, aus enzymatischer und mikrobiologischer Aktivität oder aus Reaktionen während der Lagerung und Zubereitung stammt. Genuine Hydroxyfettsäuren finden sich vor allem in verschiedenen Früchten und Tabak. Daraus entstehende cyclische Ester sind wichtige Aromastoffe.

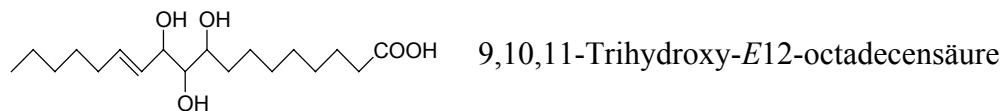
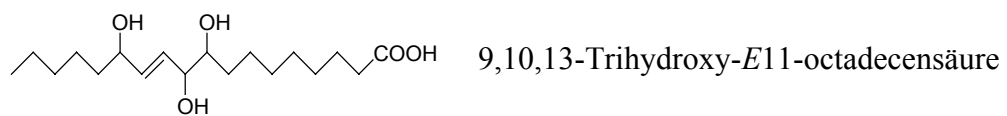
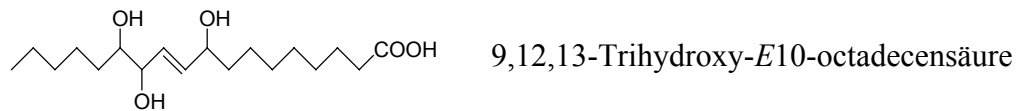
Cibarsäure (14,18-Dihydroxy-12-oxo-Z9,Z13,E15-octadecatriensäure) und 10-Hydroxy-E8-decensäure entstehen bei Verletzung des Fruchtkörpergewebes von Pfifferlingen (*Cantharellus cibarius*). Sie werden enzymatisch aus der im intakten Gewebe vorliegenden Z9,Z14-Octadecadien-12-insäure gebildet. Die Verbindungen besitzen geringe antimikrobielle und cytotoxische Eigenschaften. Während Cibarsäure im AMES-Test nicht auffällt, zeigt 10-Hydroxy-E8-decensäure eine schwach mutagene Wirkung. Cibarsäure wird beim Garen zerstört und ist daher nicht als Risikofaktor für den Konsumenten anzusehen. 10-Hydroxy-E8-decensäure wurde auch in verletzten Fruchtkörpern der essbaren Wildpilze *Agaricus campestris* (Wiesenchampignon), *Marasmius oreades* (Nelkenschwindling) und *Lepista nebularis* (Nebelgrauer Trichterling) gefunden (Pang und Sterner, 1991; Anke et al., 1996).



Cibarsäure

In Bier wurden die Trihydroxyfettsäuren 9,12,13-Trihydroxy-E10-octadecensäure, 9,10,13-Trihydroxy-E11-octadecensäure und 9,10,11-Trihydroxy-E12-octadecensäure nachgewiesen. Diese Verbindungen stammen aus der Reaktion von Lipase und anderer Enzyme des Gerstenmalzes mit endogener Linolsäure. Die Gesamtmenge der Trihydroxysäuren im Bier wird je nach Sorte mit 6-12 mg/l angegeben. Dies übersteigt deutlich die Menge an freien, nicht hydroxylierten Fettsäuren (0,5-5 mg/l). Es wird dis-

kutiert, ob durch Zersetzung dieser Verbindungen ungesättigte Aldehyde wie *E2*-Nonenal entstehen. Dieser Mechanismus könnte für den unerwünschten Alterungsgeschmack von Bier verantwortlich sein. Dem widersprechen jedoch Lagerungsversuche, bei denen keine signifikante Abnahme des Trihydroxyfettsäuregehalts beobachtet wurde. Ferner weisen die genannten Trihydroxysäuren einen deutlichen Bittergeschmack auf (Baur und Grosch, 1977; Esterbauer und Schauenstein, 1977; Hamberg, 1991).



Hydroxy-, Polyhydroxy- und Ketofettsäuren entstehen aus pflanzlichen und tierischen Fetten auch während des Bratens und Fritierens. Schwartz und Mitarbeiter (1994) wiesen in Modellstudien beim Erhitzen von Fetten nach 48 Stunden 170 bis 260 μmol dieser Verbindungen pro Gramm Fett nach.

2.6 Problemstellung

- (1) Aus Fettsäuren können von Mikroorganismen, darunter auch Bodenbakterien, verschiedene hydroxylierte Derivate gebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher mittels eines Screeningverfahrens unter Verwendung von Linolsäure Mikroorganismen aus Bodenproben isoliert werden, die das zugesetzte Substrat effizient und reproduzierbar zu polaren Verbindungen umsetzen. Zur Identifizierung der isolierten Stämme stehen Methoden zur phänotypischen und genotypischen Charakterisierung zur Verfügung.
- (2) Die Strukturen der biokatalytisch gebildeten Umsetzungsprodukte sollten mittels verschiedener Methoden wie Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{13}\text{C-DEPT}$, H/H-COSY, HMQC, HMBC) aufgeklärt werden.
- (3) Als mechanistische Studien sollten weitere Fettsäuren mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen als Substrate eingesetzt werden. Dabei waren neben der Kettenlänge insbesondere vorhandene Doppelbindungen oder funktionelle Gruppen zu variieren.
- (4) Es galt, die Absolutkonfiguration der Reaktionsprodukte mit chiralen Zentren nach der Synthese entsprechender Referenzsubstanzen mittels MDGC-Analytik aufzuklären. Alternativ sollte bei Vorliegen von derivatisierbaren funktionellen Gruppen die CD Exciton Chirality Methode eingesetzt werden.
- (5) Anhand der erhaltenen strukturellen Daten können unter Berücksichtigung des vermuteten Bildungsweges Untersuchungen zur Funktion der Reaktionsprodukte innerhalb des Bakteriums durchgeführt werden. Zusätzlich können bei ausreichend großer Ausbeute Einsatzmöglichkeiten für die Umsetzungsprodukte erschlossen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Isolierung und Charakterisierung geeigneter Mikroorganismen

3.1.1 Selektion von Mikroorganismen

Zur Isolierung von Mikroorganismen, die für biokatalytische Umsetzungen z.B. von xenobiotischen Substraten eingesetzt werden sollen, sind Bodenproben als Quelle gut geeignet, da ein Gramm Erde ca. 10^8 Bakterien und Fungi enthält (Blaine Metting Jr., 1993). Diese große Menge und der damit verbundene Artenreichtum bieten ein breites Angebot unterschiedlicher Phäno- und Genotypen, die eine Vielzahl verschiedener Reaktionen katalysieren können (Kennedy und Gewin, 1997; Katayama und Fujie, 2000; Paul, 2000).

Zur Selektion wird Bodenmaterial in Wasser angeschlämmt, entsprechend verdünnt und auf feste Nährmedien übertragen. Für ein effektives Screening wird in den verwendeten Nährmedien das zu untersuchende Substrat als einzige Kohlenstoffquelle vorgelegt. Dadurch ist jede auf diesen Platten anwachsende Kultur unter den gegebenen Bedingungen in der Lage, das Substrat zu verstoffwechseln und es somit biochemisch zu modifizieren. Allerdings ist es möglich, dass hierbei kein isolierbarer Metabolit freigesetzt wird, sondern dass das Substrat direkt zu CO_2 und H_2O abgebaut wird. Außerdem wird eine Vielzahl interessanter Verbindungen nicht als Nährstoffquelle akzeptiert. Alternativ zu diesem Verfahren können die Screeningmedien das Substrat zusätzlich zu einer weiteren Kohlenstoffquelle, meist einfache Zucker wie Glucose, enthalten. Die Konzentrationen an Substrat und Glucose müssen so optimiert werden, dass nur eine geringe Anzahl an Kulturen wächst. Diese zeigen einen Selektionsvorteil gegenüber den im Wachstum gehemmten Stämmen, der aus einer besseren Verwertbarkeit oder einer möglichen Entgiftungsreaktion des zugesetzten Substrats resultiert.

Im Fall von Linolsäure, die von uns als Screeningsubstrat zur Isolierung von Stämmen zur Fettsäuremodifizierung ausgewählt wurde, konnte keine der beiden Methoden gewählt werden. Für einige Organismen wie die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Salomonella typhimurium* sowie für *Leptospira*- und *Desulfovibrio*-Spezies wurde nachgewiesen, dass sie Fettsäuren als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können

(Nunn, 1987; Cote und Gherna, 1994). Dies gilt auch für die Hefestämme *Candida cloacea* und *Candida tropicalis* (Vanhanen et al., 2000). Nach ihrer Aufnahme in die Zellen werden die Fettsäuren dort direkt in komplexe Lipide eingebaut oder metabolisiert. In diesen Fällen ist jedoch mit einem kompletten Abbau zu rechnen, da daraus für die jeweiligen Mikroorganismen ein möglichst hoher Energiegewinn resultiert. Wird das Substrat zusätzlich zu einer weiteren C-Quelle eingesetzt, ist die Verstoffwechslung im Rahmen eines Co-Metabolismus möglich. Allerdings stellen langkettige Fettsäuren für Mikroorganismen keine xenobiotischen Verbindungen dar. Sie werden von einer Vielzahl von Bakterien als Kohlenstoffquelle akzeptiert und können zu verschiedenen Komponenten umgesetzt werden.

Ein Zusatz von Fettsäuren zum Medium bringt also keinen ausreichenden Selektionseffekt. Ein effektives Screening in der beschriebenen Form ist nicht möglich. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Isolierung relevanter Mikroorganismen Umsetzungen von Linolsäure in der Schüttelkultur direkt durch Zusatz von verschiedenen Bodenproben durchgeführt. Bei der HPLC-Analytik der dabei erhaltenen Extrakte zeigte sich, dass einer der Böden (Bodenprobe „BP3“, vgl. Kapitel 4.1.3) die zugesetzte Linolsäure reproduzierbar in eine unbekannte Verbindung (Abb. 3-1) umsetzte.

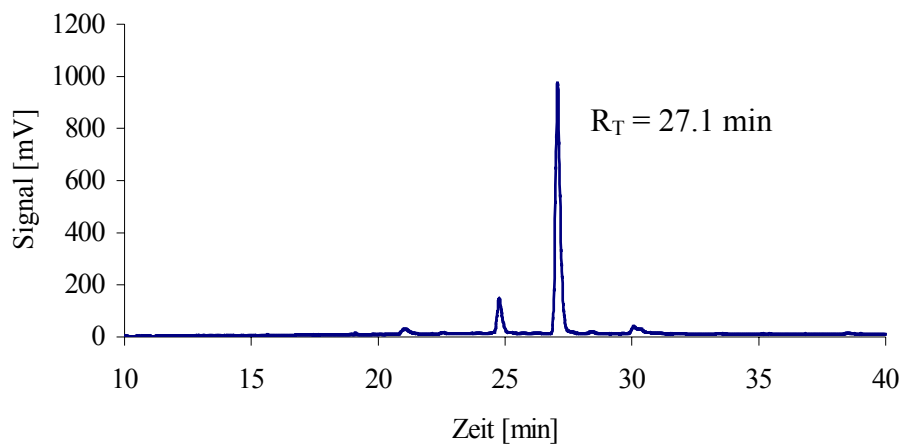


Abb. 3-1: HPLC-Trennung eines Extraktes der Umsetzung von Linolsäure mit der Bodenprobe „BP3“
HPLC 1, Trennsäule 1, Fließmittel 1, Gradient 1a, Detektion ELSD

Das Hauptumsetzungsprodukt wies unter den verwendeten Bedingungen eine Retentionszeit von 27.1 Minuten auf. Ein Vergleich mit den Retentionszeiten von Referenzverbindungen, nämlich Trihydroxy- sowie Monohydroxyderivaten der Linolsäure

(Beuerle, 1999) zeigte, dass es sich dabei um zweifach hydroxylierte Linolsäure oder um ein Monohydroxyderivat mit verkürzter Kohlenstoffkette handeln könnte.

Im Folgenden mussten aus der Bodenprobe „BP3“ die Mikroorganismen isoliert werden, die für die Bildung des unbekanntes Umsetzungsproduktes verantwortlich sind. Dazu wurden ausgehend von einer Anschlämmung verschiedene Aufarbeitungsmethoden angewandt (vgl. 4.3.7), um Bakterienlösungen in verschiedenen Verdünnungen zu erhalten, die anschließend auf Vollmedien ausplattiert wurden. Nach der Isolierung von Reinkulturen wurden diese in der Flüssigkultur überprüft. Abbildung 3-2 fasst die Vorgehensweise zur Isolierung von Mikroorganismen zur Umsetzung von Linolsäure zusammen.

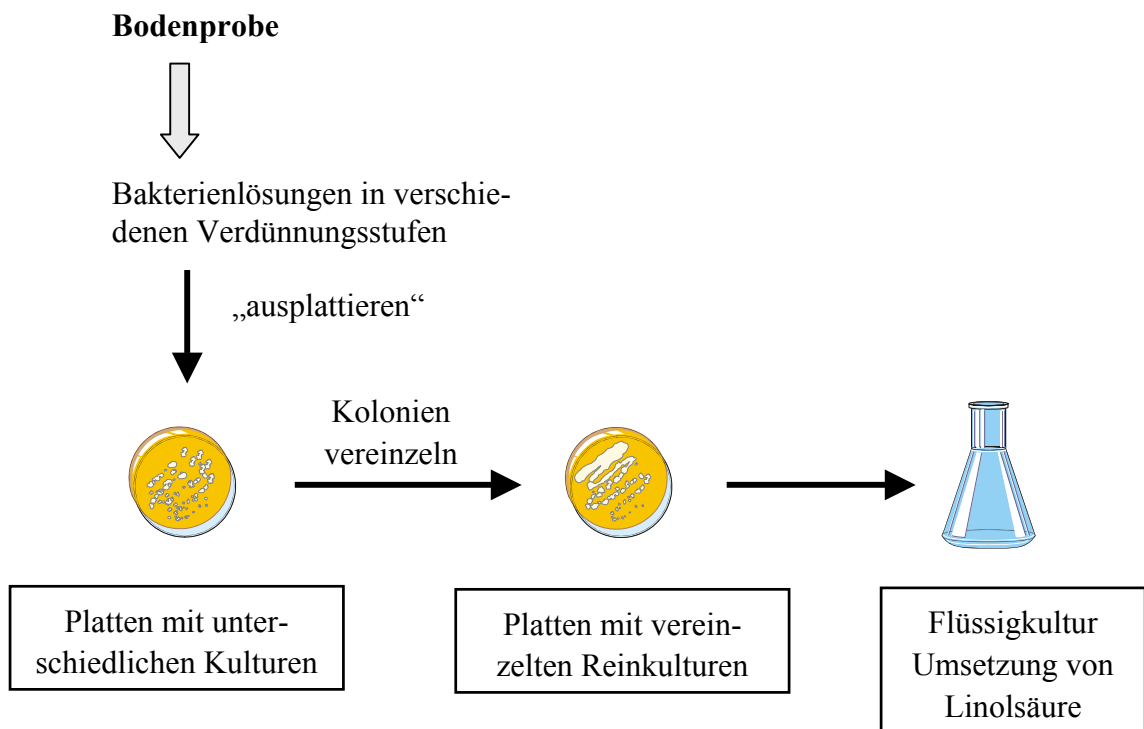


Abb. 3-2: Schematischer Ablauf des Screeningverfahrens zur Selektion von Bodenbakterien

3.1.2 Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

Die Identifizierung der isolierten Bakterien gliederte sich in zwei Teilbereiche, eine phänotypische und eine genotypische Charakterisierung.

Im Folgenden ist exemplarisch die Identifizierung des Stammes „BP3-16“ (interne Laborbezeichnung der selektierten Reinkultur) erläutert. Dieser Stamm setzte Linolsäure reproduzierbar zu drei unbekanntem Produkten um, deren Strukturaufklärung in Kapitel 3.2 beschrieben ist. Mit diesem Stamm wurde weiterhin das in dieser Arbeit beschriebene Substratscreening (vgl. Kapitel 3.3) durchgeführt.

3.1.2.1 Phänotypische Charakterisierung

Bei einer phänotypischen Charakterisierung werden neben Gestalt und Färbeverhalten des Bakteriums verschiedene Enzymaktivitäten und Stoffwechseleigenschaften getestet. Die mikroskopische Untersuchung der Gestalt ergab, dass Stäbchen vorlagen. Bei der Färbung nach Gram, die aufgrund von Unterschieden im Aufbau der Zellwand eine Differenzierung in Gram-positive und Gram-negative Stämme erlaubt, stellte sich heraus, dass es sich um einen Gram-negativen Keim handelt. Dies konnte auch durch den positiven Aminopeptidase-Test abgesichert werden, da dieses Enzym nur in der Zellwand Gram-negativer Bakterien in relevanten Mengen nachweisbar ist. Das Wachstumsverhalten des Keimes wurde bei 27 °C und 37 °C getestet. Bei beiden Temperaturen wuchs der Keim zu deutlicher Trübung an. In diesem Temperaturbereich erreichen mesophile Bakterien, zu denen die meisten Boden- und Wasserbakterien zählen, ihre optimale Wachstumsrate.

Weiterhin handelte es sich bei dem isolierten Stamm um einen sog. Nonfermenter, d.h. er wies kein Gärvermögen auf. Der O (Oxidations-) / F (Fermentations-) Test nach Hugh und Leifson dient zum Nachweis, ob Kohlenhydrate durch Oxidation (→ aerob) oder Fermentation (→ anaerob) verbraucht werden (Hugh und Leifson, 1953). Mit Glucose als Testkohlenhydrat lag sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Verhältnissen kein Abbau vor. Wurde dagegen Maltose verwendet, war unter aeroben Bedingungen ein Abbau festzustellen.

Zur weiteren taxonomischen Einordnung wurde der vorliegende Stamm bezüglich einiger enzymatischer Aktivitäten untersucht. Die Tests auf DNase (Vorhandensein von klaren Lysehöfen in einem DNA-haltigen Agar) und Katalase (Nachweis einer Gasentwicklung nach Zugabe von H₂O₂) waren positiv, der Oxidase-Test (Umsetzung von Tetramethyl-p-phenylendiaminoxalat zu einer blauen bis braunen Verbindung) war negativ.

Im Rahmen der Charakterisierung wurde mit Hilfe eines APIZYM 20 NE-Tests (kommerziell erhältlicher Test der Fa. BioMerieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) ein Stoffwechselprofil des Stammes erstellt. Solche standardisierten Testsysteme werden bereits seit vielen Jahren im Rahmen der Routineanalytik erfolgreich

zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt (Humble et al., 1977; Peladan und Monteil, 1988). Umfangreiche Studien belegen die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse im Bereich der Nonfermenter (Lampe und van der Reijden, 1984; Geiss et al., 1985; Truu et al., 1999). Im Rahmen dieses einfach und schnell durchzuführenden Tests werden verschiedene Enzymaktivitäten (z.B. Glykosidasen, Proteasen) untersucht. Zusätzlich wird den Bakterien eine Reihe unterschiedlicher Verbindungen (z.B. Zucker und Zuckerderivate, kurzkettige Fettsäuren) als alleinige C-Quelle angeboten und auf die Fähigkeit zur Verwertung dieser Substrate getestet. Tabelle 3-1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Testreaktionen sowie deren Ergebnisse für den isolierten Stamm „BP3-16“.

Tab. 3-1: Reaktionen des APIZYM 20 NE-Tests und deren Ergebnisse für den isolierten Stamm „BP3-16“

	Substrat	Reaktion / Enzym	Ergebnis
NO₃	Kaliumnitrat (KNO ₃)	Nitratreduktion	-
TRP	Tryptophan	Indolnachweis	-
GLU	Glucose	Fermentation	-
ADH	Arginin	Arginindihydrolase	-
URE	Harnstoff	Urease	+
ESC	Escolin	Hydrolyse (β-Glucosidase)	+
GEL	Gelatine (+ Tusche)	Hydrolyse (Protease)	+
pPNG	p-Nitro-Phenyl-β-Galactosid	β-Galactosidase	+
GLU	Glucose	Assimilation	+
ARA	Arabinose	Assimilation	-
MNE	Mannose	Assimilation	+
MAN	Mannit	Assimilation	-
NAG	N-Acetylglucosamin	Assimilation	+
MAL	Maltose	Assimilation	+
GNT	Gluconat	Assimilation	-
CAP	Caprat	Assimilation	+
ADI	Adipat	Assimilation	-
MLT	Malat	Assimilation	+
CIT	Citrat	Assimilation	+
PAC	Phenylacetat	Assimilation	-
OX	Tetramethyl-p-phenylen-diaminoxalat	Cytochromoxidase	-

Zu den eigentlichen 20 Reaktionen des APIZYM 20 NE-Tests wird als 21. Reaktion der Oxidase-Test hinzugenommen. Zur Auswertung erfolgt eine Einteilung der Reaktionen in 3er-Gruppen. Positive Reaktionen erhalten einen Zahlenwert, deren Addition das numerische Profil des Stammes ergeben. Die Zuordnung erfolgt anhand dieses Zahlen-codes über Tabellen (Profilindex) und ergab das Vorliegen von *Stenotropohmonas maltophilia*.

Abschließend wurde ein Antibiogramm des Stammes erstellt. Darunter versteht man das Ergebnis der *in vitro* vorgenommenen Empfindlichkeits- / Sensibilitäts- bzw. Resistenztestung von Bakterien (Krankheitserregern) gegen Antibiotika. Bestimmt wird die Wachstumshemmung der Keime im sog. Agardiffusionstest. Dabei wird die Bakterienpopulation auf der Agaroberfläche ausgeimpft und der Wirkstoff in definierten Mengen bzw. Volumina zur Diffusion gebracht. Die entstehende Wachstumshemmzone ist ein Maß für die Wirkung des jeweiligen Stoffes. Tabelle 3-2 fasst das Antibiogramm für den isolierten Stamm „BP3-16“ zusammen.

Tab. 3-2: Antibiogramm des Stammes „BP3-16“

Name des Antibiotikums	Strukturelle Eigenschaften des Antibiotikums ^a	Sensitivität
Ampicillin	partial-synthetisches Penicillinderivat	-
Piperacillin	partial-synthetisches Penicillinderivat	-
Imipenem	β-Lactam-Antibiotikum	-
Meropenem	Carbapenem-Antibiotikum	-
Cefotaxim	Cephalosporin-Antibiotikum	-
Cefotiam	Cephalosporin-Antibiotikum	-
Gentamycin	Aminoglykosid-Antibiotikum	-
Amicacin	halbsynthet. Aminoglykosid-Antibiotikum	-
Co-Trimoxazol	synergist. wirkende Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Verh. 1:5	+
Olfocacin	Chinolon-Carbonsäure-Derivat	+

^a Mutschler, 1986

Das Antibiogramm zeigt, daß es sich um einen extrem resistenten Keim handelte, der nur gegenüber Co-Trimoxazol und Olfocacin sensitiv war.

3.1.2.2 *Genotypische Charakterisierung*

Zusätzlich zur Identifizierung des Stammes „BP3-16“ anhand seiner phänotypischen Eigenschaften wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg eine genotypische Charakterisierung durchgeführt. Diese basiert auf der partiellen Sequenzierung der ribosomalen 16S-rRNA. Dabei werden Fragmente der DNA unter Verwendung von unspezifischen Primern mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Diese Fragmente werden anschließend mit der sog. Taq-cycle DyeDeoxyTM Terminator-Methode sequenziert. Die so erhaltene Sequenz wird dann mit Einträgen in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank verglichen. Die Sequenzierung der 16S-rRNA, die durch die zusätzliche Sequenzierung der 23S-rRNA überprüft und ergänzt werden kann, wird seit Jahren in der Bakteriologie eingesetzt (Lane, 1991; Chanama, 1999, Olive und Bean, 1999, Drancourt et al., 2000).

Die 16S-rRNA besteht aus ca. 1550 Basenpaaren. Davon wird eine hochvariable Region aus etwa 500 Basenpaaren sequenziert. Innerhalb einer Familie ist die ribosomale RNA hoch konserviert. Daher ist aufgrund der RNA-Sequenzierung die Eingruppierung in eine dieser Familien und somit das Festlegen der phylogenetischen Richtung gut möglich. Eine weitere Einteilung bzw. Zuordnung lässt sich nicht in allen Fällen treffen.

Vorbereitung der Zellen, Amplifizierung der Gene mittels PCR

Zur Isolierung von Nukleotiden aus den intakten Bakterien wurden die Zellen mit Hilfe von verschiedenen Verfahren, z.B. nach der Methode von Woods und Mitarbeitern (1993) aufgearbeitet (vgl. Kapitel 4.3.9.1). Unter Verwendung von literaturbekannten Primern, die spezifisch für das 16S-rRNA-Gen sind (Weisburg et al., 1991; Walerio-Aleixo et al., 2000), wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Vor der Sequenzierung mussten die eigentlichen Amplikone dann von überschüssigen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTs), Primern und zusätzlichen Reaktionsprodukten abgetrennt werden. Einsträngige DNA als Matrize für die Sequenzierung wurde durch die Anwendung der „Streptavidin-coated Magnetic Bead Separation Technique“ erhalten (Hultman et al., 1989).

Sequenzierung der PCR-Produkte mittels der Didesoxy-Methode

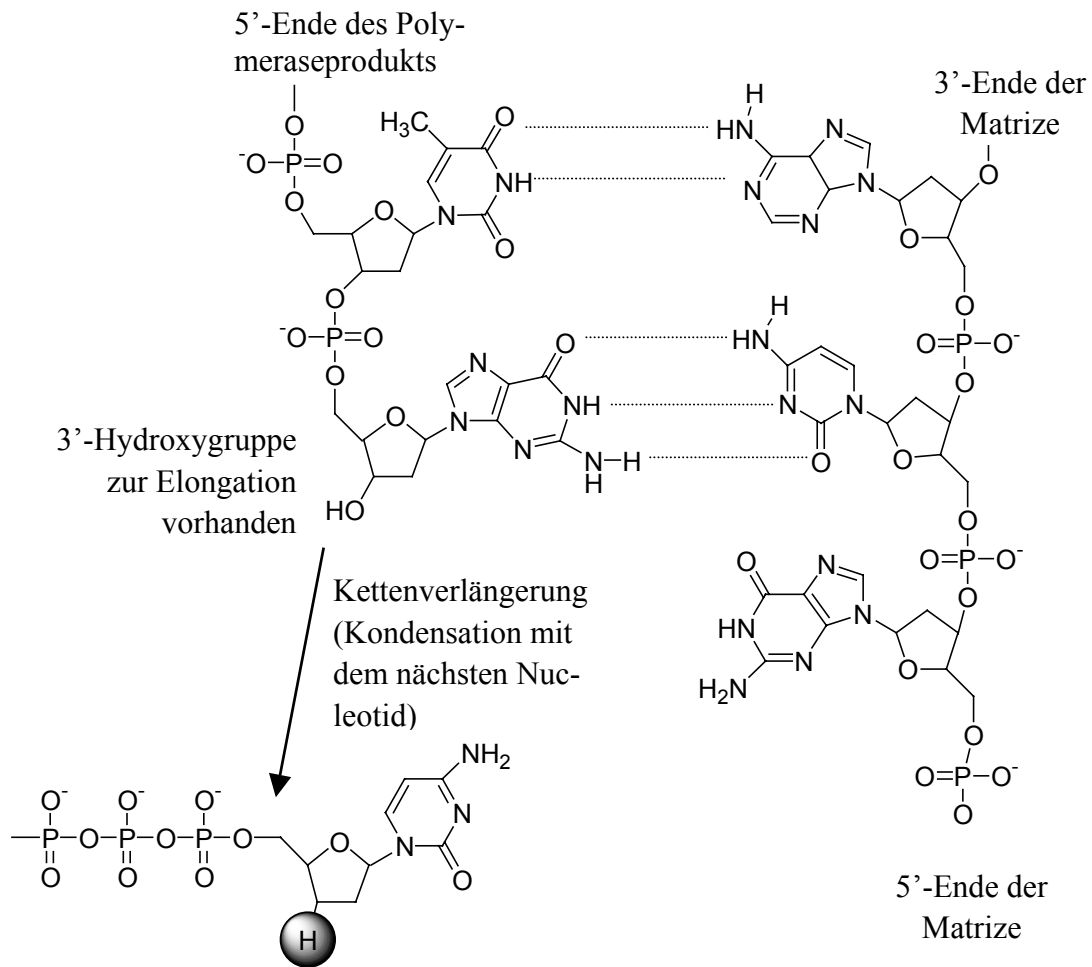
Die Basenfolge des Amplikons kann mit verschiedenen Verfahren ermittelt werden. Bei der Methode des chemischen Abbaus nach Maxam und Gilbert (1977, 1980) erzeugt man durch eine basenspezifische chemische Spaltung eines endmarkierten DNA-

Moleküls eine Folge markierter Moleküle, die alle an einer bestimmten Base enden. Nach einer denaturierenden Gelelektrophorese und dem autoradiographischen Nachweis der markierten Fragmente kann man die Sequenz der ursprünglichen DNA von der sich ergebenden „Sequenz-Leiter“ ablesen.

Bei der genotypischen Charakterisierung des Stammes „BP3-16“ wurde allerdings die Didesoxy-Methode eingesetzt, die auch als Kettenabbruch-Technik oder nach ihrem Erfinder als Sanger-Methode bezeichnet wird. Dieses Verfahren wurde 1977 erstmals beschrieben (Sanger et al., 1977) und seitdem nur geringfügig modifiziert und verbessert. Eine *Taq*-Polymerase verlängert die Primer mit den vorhandenen vier 2'-Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP-Moleküle) entlang einer einsträngigen Matrize. Ebenfalls im Reaktionsansatz enthaltene 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP-Moleküle) können als dNTP-Analoga von der *Taq*-Polymerase über ihre 5'-Phosphatgruppen in die wachsende DNA-Kette eingebaut werden. Ihnen fehlt allerdings die 3'-Hydroxygruppe, die für die Ausbildung der folgenden Phosphodiesterbrücke und somit für die Kettenverlängerung erforderlich ist. Es kommt also zu einem zufälligen Abbruch der Sequenzierungsreaktion (Abb. 3-3).

Für die Sequenzierung wurde der „ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Bei der darin enthaltenen *Taq*-Polymerase handelt es sich um eine Mutante des Enzyms aus *Thermus aquaticus* (*Taq*), nämlich um die AmpliTaq® DNA-Polymerase, FS, bei der im aktiven Zentrum des Enzyms eine Punktmutation durchgeführt wurde. Phenylalanin an Position 667 wurde durch Tyrosin ersetzt (F667Y), wodurch die Didesoxynucleotide besser als Substrate akzeptiert werden (Tabor und Richardson, 1995). Am N-terminalen Ende liegt eine weitere Punktmutation vor. Durch die Substitution von Glycin durch Aspartat an Position 46 (G46D) wird die endogene 5'→3'-Nukleaseaktivität des Enzyms nahezu vollständig eliminiert. Schließlich wurde dem Enzym eine thermostabile anorganische Phosphatase zugesetzt, die eine mögliche Rückreaktion bei hohen Pyrophosphatkonzentrationen verhindert.

Durch den Einbau der Didesoxynucleotide entstehen also unterschiedlich lange Ketten, die alle mit derselben Base enden. Diese trennt man anschließend in einer hochauflösenden denaturierenden Gelelektrophorese auf. Für den Nachweis der Ketten bedient man sich in der Regel radioaktiver oder fluoreszierender Marker. Radioisotope lassen sich in die Sequenzierungsprimer oder in die wachsende Kette einbauen. Um eine Fluoreszenzmarkierung einführen zu können, müssen die Primer, an die man die Farbstoffe (engl. *Dye*) koppelt, eine 5'-Aminogruppe tragen. Es können Fluorescein- und Rhodamin-Farbstoffe eingesetzt werden.



Einbau eines Didesoxynucleotids
 → keine 3' Hydroxygruppe zur weiteren Elongation vorhanden
 → Kettenabbruch

Abb. 3-3: Kettenabbruch bei der DNA-Synthese durch Einbau eines Didesoxynucleotids in die wachsende Kette (nach Alpey, 1998)

Bei Verwendung von vier unterschiedlichen Fluorochromen signalisiert nun die Farbe eines Fluoreszenzfarbstoffs eine der vier Didesoxyreaktionen, so dass man die Base anhand ihrer charakteristischen Fluoreszenz identifizieren kann. Bei der Verwendung von Dichlorrhodaminfarbstoffen können im Vergleich zum Einsatz von Rhodaminfarbstoffen bessere Ergebnisse erzielt werden (Rosenblum et al., 1997). Diese lassen sich über eine spezielle patentrechtlich geschützte Technik auch mit den ddNTP-Molekülen (*DyeDeoxy-Terminatoren*, P.E. Applied Biosystems) verbinden. Zur

weiteren Empfindlichkeitssteigerung der Methodik kann zusätzlich ein Fluorescein-Donor wie z.B. 6-Carboxyfluorescein an das Rhodamin gebunden werden (*BigDyeTM*). Die Verwendung dieser Moleküle ermöglicht, mit jedem Primer zu sequenzieren, ohne diesen extra mit einem Farbstoff markieren zu müssen. Die erhaltenen Gele werden schließlich mit einem Argonionenlaser abgetastet und die spezifische Emission der Farbstoffe aufgezeichnet. Jeder Farbstoff markiert nun die Stränge, die an einem der vier möglichen Didesoxynucleotide abbrechen. Die Verarbeitung der Rohdaten zu Elektropherogrammen sowie die weiterführende Analyse ergeben letztendlich die Sequenz als Basenfolge.

Die Standard-Kettenabbruchmethode bringt die Beschränkung mit sich, dass von jedem Komplex aus Matrize und Primer nur ein einziges markiertes DNA-Molekül synthetisiert werden kann. Ihre Empfindlichkeit ist daher durch die Molarität der Matrize begrenzt. Dies ist problematisch, wenn man große Matrizen oder gereinigte Fragmente wie PCR-Produkte sequenziert. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, denaturiert man nach Abschluss der Sequenzierung die Matrize und wiederholt die Reaktion. Durch diese zyklische Durchführung, die unter Verwendung der *Taq*-Polymerase als „*Taq* Cycle“-Methode (P.E. Applied Biosystems) bezeichnet wird, kann eine hohe Anzahl an Kettenabbruchprodukten erreicht werden.

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

3.1.2.3 Ergebnis der Charakterisierung des Stammes „BP3-16“

Die phänotypische und genotypische Charakterisierung des isolierten Stammes „BP3-16“ ergab, dass es sich um das Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia* (frühere Bezeichnungen: *Pseudomonas maltophilia*, *Xanthomonas maltophilia*) handelt. *Stenotrophomonas maltophilia* ist ein Keim, der häufig in klinischen Untersuchungsmaterialien, z.B. Sputum zu finden ist. Daher war die phänotypische Differenzierung relativ einfach und zuverlässig möglich. Charakteristische Merkmale und somit wichtige Kriterien zur Identifizierung des Keimes sind im Folgenden aufgeführt:

- es handelt sich um einen Nonfermenter
- das Bakterium ist DNase-positiv
- das "API-Profil" (Stoffwechselvermögen)
- die Resistenzeigenschaften

Die bei der genotypischen Differenzierung ermittelte Sequenz wies die höchste Homologie zu einem Eintrag "*Pseudomonas* sp." auf. Die 16S-rRNA-Sequenzierung ist im Fall von *Stenotrophomonas maltophilia* nicht genau, da in den verwendeten Datenbanken die Sequenzeinträge für Gram-negative Nonfermenter, aber auch Enterobacteriaceae unvollständig und von minderer Qualität sind.

3.1.3 Das Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia ist ein weit verbreitetes, frei lebendes Bakterium. In der Umwelt kann es aus Wasserproben, vor allem aus Oberflächenwasser isoliert werden, findet sich jedoch häufiger im Boden. Auch auf Pflanzenmaterial, besonders im Bereich der Rhizodermis, die einen besonders hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren aufweist, lässt sich der Stamm nachweisen. Der Nachweis des Bakteriums in Rohmilch, Tiefkühlkost und Eismaschinen ist als Infektionsquelle für den Menschen von Bedeutung. Wichtiger ist, dass es auch in Klinikmaterialien aller Art und menschlichen Gewebeproben zu finden ist (Bollet et al., 1995).

3.1.3.1 Entwicklung des Keimes *Stenotrophomonas maltophilia*

Die ersten Hinweise auf das Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia* finden sich im Jahre 1943. Damals isolierte J. L. Edwards am Gesundheitsamt in Stafford aus dem sog. Pleuraerguss (Flüssigkeitsansammlung in der sich im Brustbereich befindlichen Pleurahöhle; Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 1990) einen Keim, den er als *Bacterium brookeri* NCTC 6572 bezeichnete. 1953 ordneten Ulrich und Needham diesen Stamm der Spezies *Alcaligenes faecalis* zu. Im Rahmen weiterer Arbeiten zu den morphologischen und physiologischen Eigenschaften, die 1953 von Hugh innerhalb einer Studie der Gattung *Alcaligenes* durchgeführt wurden, erwies sich diese Einstufung jedoch als falsch. Stattdessen ergaben sich erste Hinweise auf eine enge verwandtschaftliche Beziehung zur Gattung *Pseudomonas*, die die Klassifizierung des Stammes NCTC 6572 zusammen mit sechs weiteren Keimen als *Pseudomonas maltophilia* zur Folge hatte.

Im Jahre 1960 wurden die Untersuchungen von Hugh und Ryschenkow abgeschlossen. Der nun als „*Pseudomonas maltophilia* Hugh & Ryschenkow, 1960“ bezeichnete Stamm wurde von den Autoren als Gram-negatives, streng aerobes Stäbchen der Maße $0.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ beschrieben, das weder Verkapselung noch Sporenbildung aufweist. Es ist beweglich und polar multitrich begeißelt, bildet graue bis weiße Kolonien, ist nicht hämolysierend und zeigt kein Wachstum bei pH 4.5. Tabelle 3-3 fasst die biochemischen Eigenschaften zusammen, die Hugh und Ryschenkow ermittelten.

Tab. 3-3: Biochemische Eigenschaften des Stammes *Stenotrophomonas maltophilia* nach Hugh und Ryschenkow (1961)

Getestete Reaktion / Eigenschaft	Ergebnis
Säureproduktion aus Glucose (aerob)	negativ
Säureproduktion aus Maltose (aerob)	positiv
Säureproduktion aus Maltose (anaerob)	negativ
Säureproduktion aus Mannose (aerob)	positiv
Citratverwertung	negativ
Resistenz gegen Kaliumcyanid	positiv
Nitratreduktion zu Stickstoff	negativ
Gelatineverflüssigung	positiv
Decarboxylierung von Lysin	positiv
Produktion von 2-Ketogluconat	negativ
Indolproduktion	negativ
Voges-Poskauer-Test	negativ
Harnstoffhydrolyse	negativ
Schwefelwasserstoffproduktion	negativ
Phenylalanindeaminase	negativ
Vorhandensein von Katalase	positiv

Weiterhin untersuchten die Autoren die Antigenstruktur des Keims. Um die in der Vergangenheit häufig erfolgten Verwechslungen mit anderen Keimen zu vermeiden, verwarfen sie die Artbezeichnung *brookeri* und ersetzten sie durch *maltophilia*. Diese Bezeichnung nimmt Bezug auf die seltene Eigenschaft, dass dieser Keim unter aeroben Bedingungen aus Maltose, nicht jedoch aus Glucose Säure produziert (Hugh und Ryschenkow, 1961).

Die Bezeichnung des Stammes als *Pseudomonas maltophilia* hielt sich anschließend über viele Jahre. 1983 veröffentlichten Swings und Mitarbeiter Ergebnisse, in denen sie enge verwandtschaftliche Beziehungen des Keims zur Gattung *Xanthomonas* darlegten. Dabei stützten sie sich vor allem auf biochemische Fakten. So fanden sie große Ähnlichkeiten im Guanidin- und Cytosingehalt der DNA und in der Enzymausstattung. Beispielsweise fehlt *Pseudomonas maltophilia* und Bakterien der Gattung *Xanthomonas* die NADP-gekuppelte Dehydrogenase für die Tyrosinbiosynthese. Ferner besitzen sie eine außergewöhnliche Abart der 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat-synthase. Deutliche Ähnlichkeiten existieren auch bei der Glutaminsynthase. Weiterhin gemeinsam sind *Pseudomonas maltophilia* und *Xanthomonas* sp. Ubichinone mit acht

Isoprenoideinheiten, während die meisten anderen Bakterien sogenannte Q-9 Ubichinone mit neun Isoprenoideinheiten besitzen. Auch bezüglich der Fettsäurezusammensetzung der Zellwand verwiesen die Autoren auf eine nähere Verwandtschaft des Stammes zur Gattung *Xanthomonas* als zur Gattung *Pseudomonas*. Beide Gattungen verfügen über charakteristische Fettsäuren wie 9-Methyldecansäure, 2-Hydroxy-9-methyldecansäure, 3-Hydroxy-9-methyldecansäure und 3-Hydroxy-11-methyldodecansäure. Das Vorliegen dieser Unterschiede wurde später im Rahmen umfangreicher Studien bestätigt (Norman et al., 1997). Die grösste Bedeutung schrieben die Autoren den Ergebnissen von DNA-rRNA-Hybridisierungsexperimenten zu. Hier zeigte sich bezüglich der thermischen Denaturierungstemperatur eine bessere Übereinstimmung mit den Xanthomonaden. Ferner beschrieben sie weitere phänotypische Eigenschaften, die ihrer Meinung nach eine Umbenennung in *Xanthomonas maltophilia* rechtfertigen. Aber auch dieses Autorenteam war sich gewisser Unterschiede zwischen dem fraglichen Keim und der Gattung *Xanthomonas* bewusst. Beispielsweise besitzen alle Xanthomonaden nur eine Geißel. Auch beim direkten DNA-Vergleich fanden sich Übereinstimmungen von nur 4 bis 15 % (Swings et al., 1983).

Zehn Jahre später setzten sich Palleroni und Bradbury (1993) kritisch mit dieser Veröffentlichung auseinander. Sie zeigten gravierende phänotypische Unterschiede zwischen *Xanthomonas maltophilia* und anderen Xanthomonaden auf. Hier wurde auf die Art der Begeißelung, die Pigmente, extrazelluläre Polysaccharide, das Temperaturoptimum, die Nitratreduktion und weitere biochemische Umsetzungen verwiesen. Vor allem aber bezweifelten sie die Ergebnisse der Guanidin- und Cytosinbestimmung, der DNA-rRNA-Hybridisierungsexperimente und des Wachstumstests. Als einen möglichen Grund nannten sie Fehler bei der Zusammensetzung der Kulturmedien. Die Autoren schlugen vor, den Keim der neugeschaffenen Gattung *Stenotrophomonas* zuzuordnen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gattungen wurden 1995 von Nesme und Mitar-beitern basierend auf der Sequenzierung von 16S ribosomaler RNA bestätigt.

Bei *Stenotrophomonas maltophilia* handelt es sich um Gram-negative Stäbchen der Maße 0.5 x 1.5 µm, die keine Sporen bilden. Sie sind beweglich und mit mehreren Flagellen polar begeißelt. Sie bilden weiße, graue oder schwach gelbe Kolonien. Poly-β-hydroxybutyrat wird weder gebildet noch verbraucht, wohingegen die meisten Stämme (ca. 96 %) Methionin zum Wachstum benötigen. Nitrat wird reduziert und Gelatine verflüssigt. Das Temperaturoptimum liegt bei 35 °C (Palleroni u. Bradbury, 1993; Denton und Kerr, 1995). Weitere biochemische Charakteristika des Stammes sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tab. 3-4: Biochemische Eigenschaften des Stammes *Stenotrophomonas maltophilia* nach Palleroni und Bradbury (1993) sowie Denton und Kerr (1995)

Getestete Reaktion / Eigenschaft	Ergebnis
Nachweis von Katalase	positiv (> 85 %)
Nitratreduktion zu Nitrit	positiv (16 - 84 %)
Indolproduktion	negativ (< 15 %)
Decarboxylierung von Lysin	positiv (> 85 %)
Decarboxylierung von Ornithin	negativ (< 15 %)
Voges-Proskauer-Test	negativ (< 15 %)
Hydrolyse von Esculin	positiv (> 85 %)
Hydrolyse von Gelatine	positiv (> 85 %)
Hydrolyse von DNA	positiv (> 85 %)
Hydrolyse von Stärke	negativ (< 15 %)
Hydrolyse von Harnstoff	negativ (< 15 %)
Citratverwertung	positiv (16 - 84 %)
Wachstum auf Arabinose als Kohlenstoffquelle	negativ (< 15 %)
Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle	positiv (> 85 %)
Wachstum auf Fructose als Kohlenstoffquelle	positiv (16 - 84 %)
Wachstum auf Galactose als Kohlenstoffquelle	positiv (16 - 84 %)
Wachstum auf Mannose als Kohlenstoffquelle	positiv (16 - 84 %)
Wachstum auf Mannitol als Kohlenstoffquelle	negativ (< 15 %)
Wachstum auf Rhamnose als Kohlenstoffquelle	negativ (< 15 %)
Wachstum auf Trehalose als Kohlenstoffquelle	negativ (< 15 %)

positiv (> 85 %): mehr als 85 % der untersuchten Stämme zeigen ein positives Ergebnis
 positiv (16 - 84 %): 16 - 84 % der untersuchten Stämme zeigen ein positives Ergebnis
 negativ (< 15 %): weniger als 15 % der untersuchten Stämme zeigen ein positives Ergebnis

Neben *S. maltophilia* sind bis heute zwei weitere Vertreter, nämlich *S. africana* und *S. nitritireducens* in der Gattung *Stenotrophomonas* enthalten (Drancourt et al., 1997; Finkmann et al., 2000).

3.1.3.2 *Klinische Aspekte des Bakteriums Stenotrophomonas maltophilia*

Bei *Stenotrophomonas maltophilia* handelt es sich um einen sog. Opportunisten oder Hospitalkeim. Darunter versteht man Bakterien, die zur normalen Flora eines gesunden Menschen und seiner Umgebung gehören, die jedoch Krankheiten auslösen können,

wenn sie auf Bereiche des Körpers übertragen werden, in denen sie normalerweise nicht vorkommen oder die Infektabwehr des Menschen geschwächt ist.

In den letzten Jahren stieg die Anzahl der mit *Stenotrophomonas maltophilia* in Verbindung gebrachten Krankenhausinfektionen, meist im postoperativen Bereich, stark an. Hier sind vor allem immungeschwächte Krebs- und Transplantationspatienten betroffen. *S. maltophilia* wurde als Erreger folgender Infekte identifiziert: Bakteriämie (kurzzeitiges Vorhandensein von Bakterien im Blut), Entzündungen des Magen-Darm- und Urogenitaltraktes, Mandelentzündung, Augenbindehautentzündung, Wundinfektionen, Nebenhodenentzündung und Herzinnenhautentzündung. Die Quellen und die Infektionswege sind noch weitgehend unbekannt. Als Virulenzfaktoren werden die Produktion von Elastase, Esterase, Hyaluronidase, Hämolysin, Lipase, Mucinase und RNase angesehen. Von besonderer Bedeutung ist, dass viele Stämme gegen Antibiotika wie β -Lactame und Aminoglycoside resistent sind. Alle Stämme haben sich weiterhin als resistent gegenüber Imipenem erwiesen. Hierfür ist eine zinkabhängige Penicillase verantwortlich. Daher sind Krankenhauspatienten, die mit Breitbandantibiotika behandelt werden, besonders gefährdet. Bei einer Infektion mit *S. maltophilia* wird im Humanbereich derzeit Co-Trimoxazol angewandt. Dabei handelt es sich um eine synergistisch wirkende Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol im Verhältnis 1:5 (Denton und Kerr, 1995; Spencer, 1995). Durch neue Methoden der Typisierung von klinischen Stämmen sind jedoch zunehmende Kenntnisse bezüglich Infektionen mit *Stenotrophomonas maltophilia* und damit verbesserte Preventionsmethoden zu erwarten (Chatelut et al., 1995; Yao et al., 1995).

3.1.3.3 Biotransformationen durch *Stenotrophomonas maltophilia*

Das Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia* galt zunächst als metabolisch relativ inaktiv. Bereits 1973 wurde jedoch von Fenton und Mitarbeitern gezeigt, dass *S. maltophilia* in der Lage ist, das Aminoglycosid-Antibiotikum Streptomycin zu flüchtigen Verbindungen zu zerlegen. Inzwischen wurden weitere Stämme nachgewiesen, die ungewöhnliche Substrate wie verschiedene Polymere, aromatische Sulfonsäuren, Toluol und Xylol sowie 1-Naphtholsäure umwandeln oder abbauen können (Kawai, 1993; Lee und Clark, 1993; Su und Kafkewitz, 1994; Phale et al., 1995). Binks und Mitarbeitern gelang 1995 die Isolation eines Stammes, der in der Lage ist, den verbreiteten Sprengstoff RDX („royal demolition explosive“; Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) als Stickstoffquelle zu nutzen und abzubauen. Als Metabolit wurde die Verbindung Methylen-*N*-(hydroxy-methyl)-hydroxylamin-*N'*-(hydroxymethyl)-nitroamin identifiziert. 1999 wurde von Zissi und Lyberatos ein Stamm kultiviert, der Anilin als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen kann.

3.2 Umsetzung von Linolsäure mit *Stenotrophomonas maltophilia*

3.2.1 Bakterielle Umsetzungen von Linolsäure

Mit den aus der Bodenprobe isolierten Bakterienstämmen wurden entsprechend der in Abbildung 3-4 dargestellten Vorgehensweise Umsetzungen von Linolsäure durchgeführt.

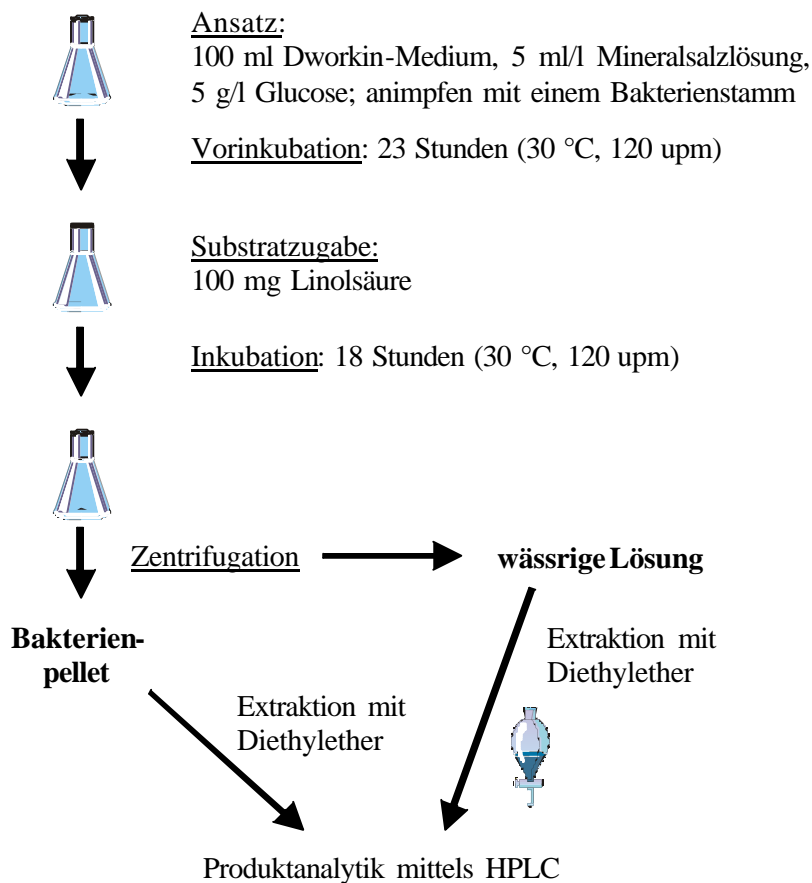


Abb. 3-4: Vorgehensweise bei der Umsetzung von Linolsäure mit den isolierten Bakterienstämmen

Die Bakterien wurden zunächst in einem Minimalmedium, das mit Spurenelementen und Glucose supplementiert wurde, vorgezchtet. Erst nach dieser Anwachsphase wurde die Fettsäure zugegeben. Dadurch ließ sich ein unerwünschter Blindabbau des Substrates unterdrücken. Nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden wurden entstandene Produkte sowohl aus dem Medium als auch aus dem im Verlauf der Aufarbeitung anfallenden Bakterienpellet extrahiert. Die Analytik der Extrakte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) lieferte einen Überblick über Anzahl und Konzentration der Umsetzungsprodukte. Als Detektor wurde ein „Evaporative Light Scattering Detector“ (ELSD, Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor) gewählt, mit dem Verbindungen empfindlich erfasst werden können, die keine UV-Absorption zeigen. Die erfolgreiche Anwendbarkeit der ELSD-Detektion für die Analytik von Lipiden wurde bereits beschrieben (Stolyhwo et al., 1987; Rehbock et al., 1997). Auch für andere Applikationen in der Lebensmittelanalytik wird diese Detektionsmethode zunehmend eingesetzt (Onken et al., 1998; Onken und Berger, 1998).

Bei der Umsetzung von Linolsäure mit dem als *Stenotrophomonasmaltophilia* identifizierten Stamm sind drei Umsetzungsprodukte in vergleichsweise hoher Konzentration entstanden, wie in Abbildung 3-5 ersichtlich ist. Nicht umgesetzte Linolsäure war dagegen nicht zu detektieren.

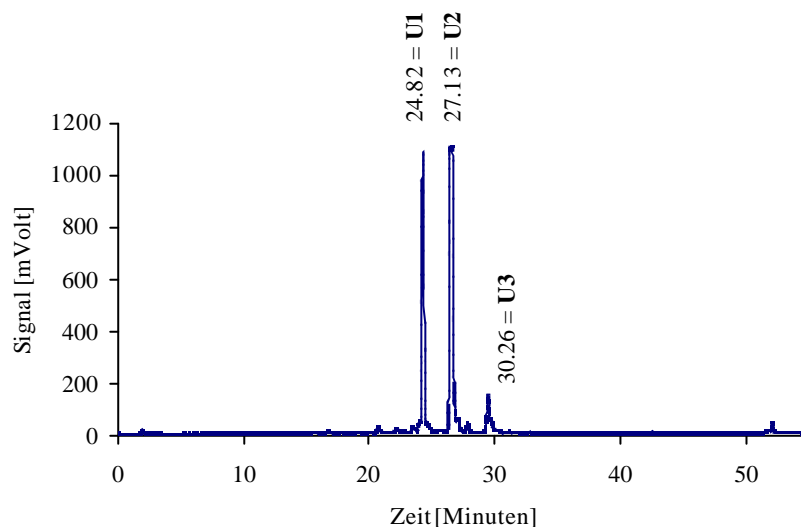


Abb. 3-5: HPLC-Trennung eines Extraktes der Umsetzung von Linolsäure mit dem isolierten Bakterienstamm *Stenotrophomonasmaltophilia*

HPLC 1, Trennsäule 1, Fließmittel 1, Gradient 1a, Detektion ELSD

U1 = 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure

U2 = 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure

U3 = 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure

Die Strukturaufklärung der gebildeten Komponenten **U1** bis **U3** sollte Hinweise auf die während der bakteriellen Umsetzung ablaufenden Vorgänge einschließlich des Abbauweges der zugesetzten Linolsäure geben. Zur Isolierung der Produkte **U1** bis **U3** wurden die bei den mikrobiellen Umsetzungen erhaltenen Rohprodukte einer Aufreinigung an einer RP-18 Säule unterzogen. Bei Verwendung eines Wasser/Acetonitril-Stufengradienten erhielt man alle gesuchten Komponenten in ausreichender Menge und Reinheit für weitere Untersuchungen.

3.2.2 Strukturaufklärung des Umsetzungsproduktes U1

3.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Mittels Massenspektrometrie können Verbindungen strukturell charakterisiert werden. Es handelt sich um eine Analysetechnik, die sich vor allem durch universelle Anwendbarkeit und geringe Nachweisgrenzen auszeichnet und daher in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Verschiedene Ionisierungstechniken sowie die Möglichkeit der direkten Kopplung an chromatographische Trennverfahren wie Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC) oder Kapillaronenelektrophorese (CE) haben den Anwendungsbereich zusätzlich erweitert.

Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung

Als Standardmethode zur chromatographischen Trennung polarer, schwerflüchtiger oder thermisch labiler Verbindungen hat sich die HPLC durchgesetzt. Sie liefert mit den herkömmlichen Durchflußdetektoren wie UV-Detektor oder ELSD nur bedingt strukturelle Informationen über die Analyten. Mit der direkten Kopplung an ein Massenspektrometer steht allerdings ein aussagekräftiges Instrument zur Verfügung.

Eine Interface-Technik, die in den letzten Jahren zunehmend erfolgreich eingesetzt wird, ist die *Electrospray*-Ionisierung (ESI). Sie eignet sich besonders gut zur Ionisierung geladener Moleküle und wird daher bevorzugt im Bereich der Bio- und Naturstoff-Analytik, beispielsweise für Proteine und Nucleinsäuren, angewandt (Gaskell, 1998; Griffiths et al., 2001). Auch in der Lebensmittelanalytik findet diese Methode verstärkte Verwendung (Herderich und Schreier, 1996; Careri et al., 1998). Applikationsbeispiele aus der pharmazeutischen und klinischen Analytik sind ebenfalls zunehmend zu finden (Niessen, 1999a und 1999b; Chace, 2001).

Im Elektrospray werden ionisierte Analyte aus der Lösung in die Gasphase übertragen. Dies setzt voraus, dass die Verbindungen bereits in der Lösung als Ionen vorliegen. Die Ionisation der Analyte kann durch eine Variation des pH-Wertes oder durch Assoziation eines Elektrolytens aus der Lösung erreicht werden. Im positiven Modus werden in der Regel Addukte mit Ammonium- oder Natriumionen beobachtet. Im negativen Modus liegen dagegen Chlorid-, Formiat-, Acetat- oder Trifluoracetationen vor (Bruins, 1998).

Im ESI-Interface sind drei wesentliche Schritte für den Transfer der Ionen aus der Lösung in die Gasphase verantwortlich:

- Bildung geladener Tropfen aus der Lösung
- Verkleinerung dieser Tropfen durch Verdampfen des Lösungsmittels und wiederholte Aufspaltung der Tropfen
- Bildung freier Ionen

Das HPLC-Eluat wird über eine beheizte Kapillare in das Interface geleitet und dort mit pneumatischer Unterstützung durch Hilfsgase (Argon, Stickstoff) in die Ionisationskammer vernebelt. Hier herrscht durch Anlegen einer hohen Spannung zwischen Kapillare und Kammerwand (3-5 kV) ein starkes elektrisches Feld, das die Entstehung kleiner geladener Tröpfchen unterstützt. Über Linsensysteme gelangen entstehende Ionen schließlich ins Massenspektrometer. Der genaue Mechanismus der Ionisierung ist noch nicht abschließend geklärt (Gaskell, 1997; Kebarle und Ho, 1997; Kebarle, 2000).

In Abhängigkeit von den Messbedingungen erhält man bei der Ionisierung mittels Electrospray Molekülionen wie $[M+NH_4]^+$ und somit indirekte Aussagen über das Molekulargewicht einer zu analysierenden Verbindung. Um darüber hinaus Strukturinformationen zu bekommen, wird die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) eingesetzt. Eine Zusammenfassung verschiedener Tandem-MS/MS-Techniken sind aktuellen Übersichtsartikeln zu entnehmen (Jennings, 1996; Mc Luckey und Wells, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet. Dieses Gerät besteht aus drei linear angeordneten Quadrupolen, wobei der erste und der dritte (Q1, Q3) als Massenanalysatoren fungieren. Der mittlere Quadrupol (Q2) dient als Stoßkammer. Hier kollidieren in Q1 ausgewählte Precursorionen mit einem inerten Stoßgas wie Argon und zerfallen in die sog. Produktionen, die dann in Q3 detektiert werden. Diese Technik wird als Produkt- oder Tochterionenscan bezeichnet und ist ein wertvolles Mittel zur Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen (Wysocki, 1992). Zur Bearbeitung weiterer analytischer Probleme können Tandemmassenspektrometer auch in anderen Scanmodi wie dem Elternionen- oder dem Neutralverlustscan betrieben werden (Johnson und Yost, 1985; De Hoffmann, 1996).

Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung

Die GC-MS-Kopplung hat sich als Routinemethode zur Analyse flüchtiger und thermisch stabiler Verbindungen durchgesetzt. Besondere Bedeutung besitzt diese Methode daher im Aromen- und Lebensmittelbereich, wie zahlreiche Applikationsbeispiele belegen (Merritt und Robertson, 1982; Cronin und Caplan, 1987; Heikes et al., 1995; Wizhers und Piggott, 1998; Sides et al., 2000). Auch im Rahmen der Spurenanalytik bei biologischen Proben findet die GC-MS-Analytik zunehmend Anwendung (Aggarwal et al., 1994). Detaillierte Angaben zu verschiedenen Kopplungs-, Interface- und Ionisierungstechniken finden sich in diversen Übersichtsartikeln (Mc Donald et al., 1994; Jahn und Jahn, 1997).

Zur Anwendbarkeit der GC-MS bei nichtflüchtigen Verbindungen stehen verschiedene Derivatisierungsmethoden zur Verfügung. Bei Säurederivaten handelt es sich hierbei um die Methylierung der Säurefunktion, die in der Regel mit Diazomethan durchgeführt wird (Fales et al., 1973; Black, 1983). Nach geeigneter Umsetzung sind also auch Verbindungen wie Fettsäuren oder Steroide der GC-MS-Analytik zugänglich (Christie, 1998; Wolthers und Kraan, 1999). Neben der Derivatisierung ist für die GC-MS-Analytik eine Probenvorbereitung durchzuführen, bei der die Proben aus der wässrigen Lösung in ein organisches Lösungsmittel überführt werden.

Ergebnisseder massenspektrometrischen Untersuchungen für U1

Für die Strukturaufklärung der bakteriell gebildeten Umsetzungsprodukte wurden LC-MS und GC-MS-Methoden angewandt, da sie sich sinnvoll ergänzen. Aufgrund der unterschiedlichen Ionisierungsmethoden treten jeweils verschiedene Fragmentierungsmuster auf, die charakteristische Signale zeigen und daher einen wertvollen Beitrag zur Identifizierung der Verbindungen liefern.

Bei den zur Strukturaufklärung von **U1** durchgeführten Untersuchungen mittels HPLC-ESI-MS/MS wurden Messungen im positiven sowie im negativen Modus durchgeführt, wobei sich der negative Modus zur Bestimmung der Molekularmasse als gut geeignet erwies. Im „fullscan-Spektrum“ waren lediglich 2 Signale mit den Massen m/z 213 und m/z 427 zu sehen. Dabei handelte es sich um die Signale für $[M-H]^-$ bzw. das Dimer der Verbindung $[2M-H]^-$. Zur Strukturaufklärung anhand von charakteristischen Tochterionen war der negative Modus allerdings ungeeignet, da unabhängig von der Stoßenergie lediglich eine Abspaltung von Acetat aus dem Molekül nachzuweisen war. Weitere Fragmente treten nicht auf.

Im positiven Modus ließen sich im „fullscan-Spektrum“ neben kleineren Signalen, die von Verunreinigungen stammen, die Quasi-Moleküllionen m/z 232 $[M+NH_4]^+$ und m/z

237 $[M+Na]^+$ detektieren. Aus der so ermittelten Molekularmasse der Verbindung von m/z 214 ließ sich ableiten, dass es sich bei der isolierten Verbindung um eine Komponente mit 12 C-Atomen handelt und somit eine Kettenverkürzung des Ausgangsmoleküls eingetreten ist.

Abbildung 3-6 zeigt das im positiven Modus aufgenommene Produktionenspektrum der unbekanntes Verbindung **U1**.

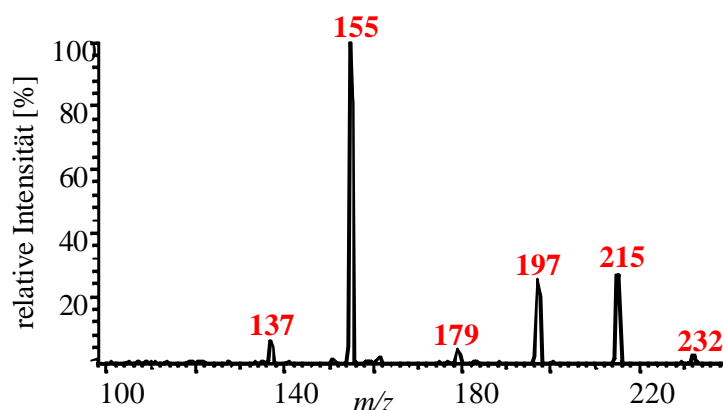


Abb. 3-6: Produktionenspektrum der isolierten Verbindung **U1**
loop-MS/MS, ESI positiv (Kapillarspannung 4 kV)
Precursorion: m/z 232, CID 1.8 mTorr Argon, Stoßenergie -12 eV
Fließmittel: 5 mM NH_4Ac – MeOH (1:1), Fluß: 200 μ l/min

Als Precursorion für das Produktionen-Experiment wurde mit m/z 232 das Ammoniumaddukt der Verbindung ausgewählt, da Metalladdukte in der Regel relativ schlecht und wenig aussagekräftig fragmentieren. Das Spektrum zeigt ein für Hydroxysäuren typisches Abspaltungsmuster. Nach dem Verlust von m/z 17, der Abspaltung von Ammoniak aus dem Molekül, ist eine sukzessive Abspaltung von zweimal m/z 18 zu beobachten, die sich als Verlust zweier Alkoholgruppen in Form von Wasser interpretieren lässt. Das intensivste Signal mit m/z 155 resultiert aus einer Spaltung des Moleküls. Da das Signal m/z 137 als weiterer Verlust eines Wassermoleküls aus diesem Fragment gedeutet werden kann, muss dieser Bruch zwischen der Carboxylgruppe und dem die zweite Hydroxyfunktion enthaltenden Rest stattfinden.

Nach Methylierung der isolierten Verbindungen mit Diazomethan wurde eine für die Analytik mittels GC-MS ausreichende Flüchtigkeit erreicht. Das im EI-Modus (Stoß-

energie 70 eV) erhaltene Massenspektrum zeigte dominierende Fragmente, die aus sukzessiven Spaltungen einer Alkylkette resultieren. Zusätzlich trat ein deutliches Signal mit m/z 103 auf, das typisch für β -Hydroxysäuren ist. Es kommt durch eine α -Spaltung neben der Hydroxygruppe zustande, bei der das Spaltprodukt $[C_4H_7O_3]$ auftritt.

3.2.2.2 NMR-Spektroskopie

Den höchsten Informationsgehalt zur Struktur einer unbekanntes Komponente erhält man aus den NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)-Spektren einer Verbindung. Diese Methode ist daher seit Jahren ein unerlässliches Mittel bei der Strukturaufklärung und wird in vielen Bereichen erfolgreich eingesetzt (Wendisch, 1993; Jaspars, 1999).

Neben den klassischen 1H - und ^{13}C -Übersichtsspektren gibt es bereits eindimensionale NMR-Experimente, die neben der chemischen Verschiebung der auftretenden Signale weitergehende Aussagen ermöglichen. Im DEPT-Spektrum (*Distortionsless Enhancement by Polarization Transfer*) kann anhand der Signale, die hier positiv und negativ auftreten, der Hybridisierungszustand eines C-Atoms bestimmt werden. Während primäre und tertiäre C-Atome positive Signale liefern, ergeben sekundäre C-Atome ein negatives Signal. Quartäre C-Atome sind im DEPT-Spektrum nicht zu sehen. Weitere Informationen liefern zweidimensionale NMR-Spektren. Die homonukleare H/H-Korrelation (H/H-COSY; *H/H-Homonuclear Correlation Spectroscopy*) liefert Spektren, die auf beiden Frequenzachsen 1H -chemische Verschiebungen aufweisen. Sie dient zur zweifelsfreien Festlegung von benachbarten H-Atomen, da sich ausgehend von einem bekannten H-Atom über die Korrelationspeaks weitere H-Atome eindeutig zuordnen lassen. Mit der direkten heteronuklearen H/C-Kopplung (HMQC; *1H -Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence*), bei der das 1H -Spektrum dem ^{13}C -Spektrum gegenübergestellt wird, lassen sich die Signalpaare eines C-Atoms und der dazugehörigen H-Atome ermitteln. Die indirekte H/C-Kopplung über zwei oder drei Bindungen (HMBC; *Heteronuclear Multiple-bond Connectivity*) dient wiederum zur Bestimmung von Nachbarschaften (Kriwacki und Pitner, 1989; Bria und Watkin, 1997; Friebolin, 1999).

Abbildung 3-7 zeigt exemplarisch das HMQC-Spektrum von U1. Neben dem Lösungsmittelsignal sind im ^{13}C -Spektrum insgesamt 12 Signale zu sehen. Dem Signal bei 177.6 ppm ist keine Kopplung mit einem der Signale des 1H -Spektrums zuzuordnen. Es handelt sich also um ein quartäres C-Atom. In U1 liegt folglich eine Carboxylfunktion vor. Zwei Signale weisen eine chemischen Verschiebung von ca. 130 ppm auf. Daraus lässt sich das Vorhandensein einer Doppelbindung ableiten. Die Existenz einer sekundären Hydroxyfunktion, auf die bereits die zweimalige Wasserabspaltung bei der LC-MS-Analytik hingewiesen hat, wird durch das Signal bei 67.7 ppm bestätigt. Die

weiteren Signale im Bereich von 41.2 bis 14.0 ppm stammen von einer Kohlenstoffkette, die aus insgesamt 8 C-Atomen besteht.

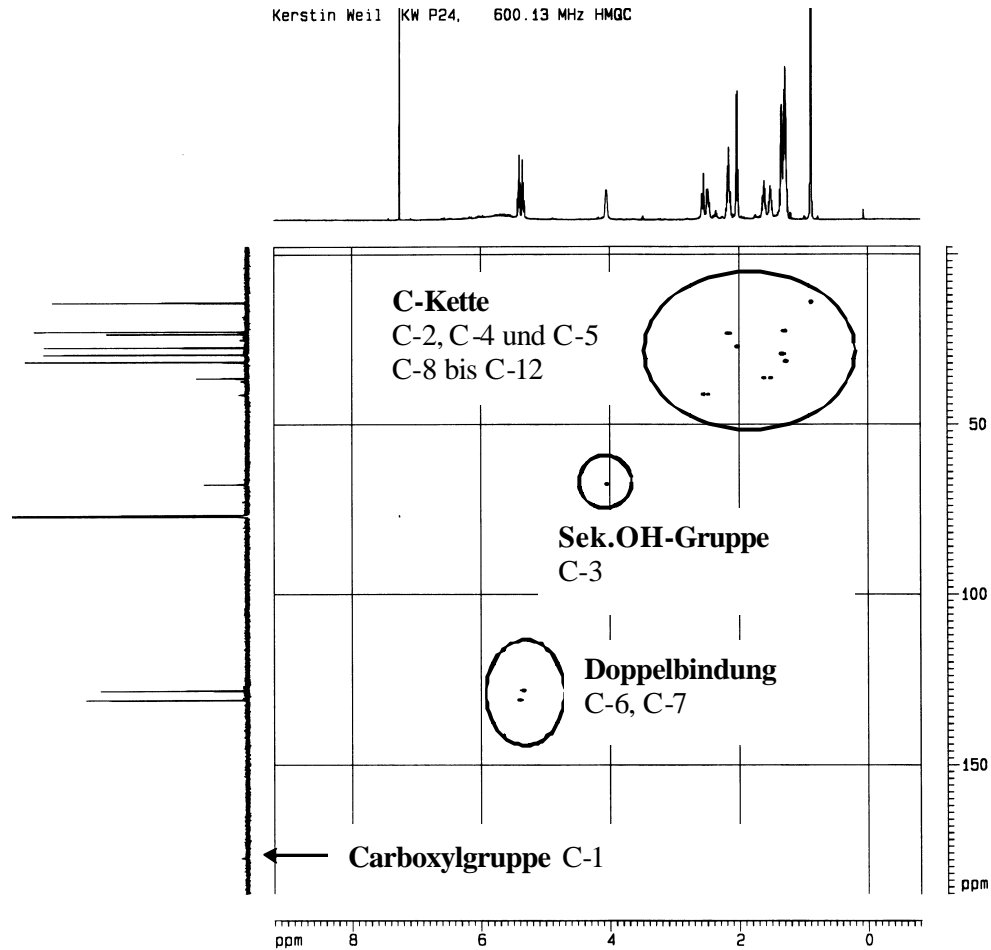
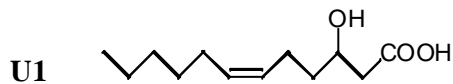


Abb. 3-7: HMQC-Spektrum der isolierten Verbindung **U1**

^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, Lösungsmittel CDCl_3

Die Auswertung aller NMR-Daten ergab, dass es sich bei **U1** um 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure handelt:



Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde im Folgenden eine Referenzsubstanz synthetisiert und die erhaltenen Daten miteinander verglichen.

3.2.2.3 Vergleich mit einer synthetischen Referenzsubstanz

Für die Synthese von β -Hydroxysäuren stehen mehrere Methoden zur Verfügung (vgl. Kapitel 2.2.1). Zur Darstellung der 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure wurde die Kopplung von Essigsäuremethylester an den entsprechenden Aldehyden, nämlich Z4-Decenal, gewählt. Diese Aldoladdition, die nach Einwirkung einer starken Base wie Lithiumdiisopropylamid (LDA) abläuft, liefert direkt die gewünschte Hydroxyfunktion an Position 3. Aus dem bei der Reaktion erhaltenen Methylester kann die Säure durch basenkatalysierte Spaltung freigesetzt werden (Abb. 3-8).

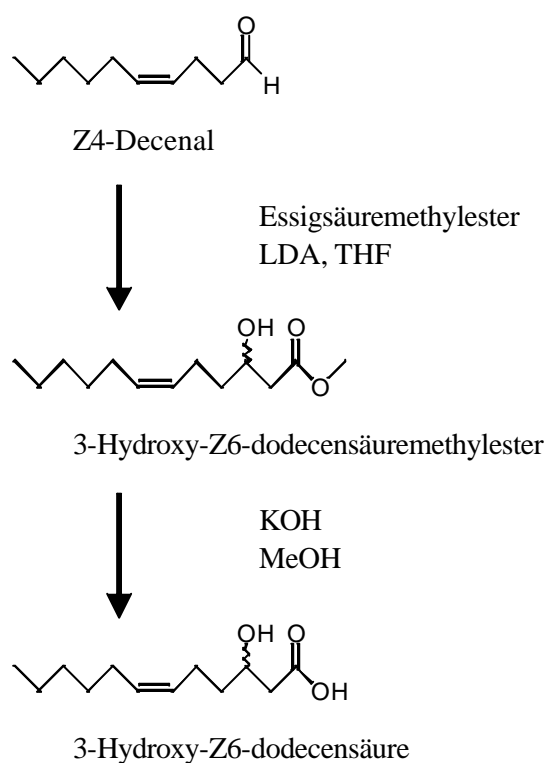


Abb. 3-8: Reaktionsschema zur Synthese von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure

Vergleicht man die ermittelten massenspektrometrischen Daten des isolierten mikrobiellen Transformationsproduktes **U1** (vgl. Kapitel 3.2.2.1) mit denen der synthetisierten Referenzsubstanz (vgl. Kapitel 4.4.2), sind die Übereinstimmungen offensichtlich. Auch die erhaltenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten, die in den Tabellen 3-5 und 3-6 zusammengefasst sind, stimmen überein. **U1** ist daher eindeutig als 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure identifiziert worden.

Tab. 3-5: Vergleich der ^1H -NMR-Daten von **U1** mit synthetischer 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure

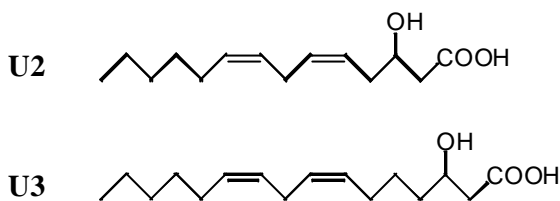
H-Atom	U1 ^1H -NMR-Daten δ [ppm], J [Hz]	Synthese ^1H -NMR-Daten δ [ppm], J [Hz]
C-7H	5.42 (1H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 17.9$)	5.43 (1H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 17.9$)
C-6H	5.35 (1H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 17.9$)	5.37 (1H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 17.8$)
C-3H	4.06 (1H, m)	4.06 (1H, m)
C-2H _a	2.56 (1H, dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 16.0$)	2.56 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.6$)
C-2H _b	2.47 (1H, dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.0$)	2.47 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.4$)
C-5H ₂	2.17 (2H, m)	2.16 (2H, m)
C-8H ₂	2.04 (1H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 14.3$)	2.03 (1H, dd, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 13.8$)
C-4H _a	1.62 (1H, m)	1.61 (1H, m)
C-4H _b	1.51 (1H, m)	1.51 (1H, m)
C-9H ₂ bis	1.33 (6H, m)	1.29 (6H, m)
C-11H ₂		
C-12H ₃	0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.1$)	0.88 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$)

Tab. 3-6: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von **U1** mit synthetischer 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure

C-Atom	U1 ^{13}C -NMR-Daten δ [ppm]	Synthese ^{13}C -NMR-Daten δ [ppm]
C-1	177.6	177.0
C-7	131.2	131.1
C-6	128.4	128.4
C-3	67.7	67.7
C-2	41.2	41.1
C-4	36.4	36.4
C-10	31.5	31.5
C-9	29.3	29.3
C-8	27.2	27.2
C-5	23.2	23.3
C-11	22.6	22.5
C-12	14.0	14.0

3.2.3 Strukturaufklärung der Umsetzungsprodukte U2 und U3

Analog zur strukturellen Charakterisierung des Umsetzungsproduktes **U1** wurden auch von **U2** und **U3** verschiedene Massen- sowie NMR-Spektren aufgenommen. Aufgrund der ermittelten Daten konnten die isolierten Verbindungen als 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (**U2**) bzw. 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure (**U3**) identifiziert werden:



Betrachtet man nun die Strukturen der bakteriell gebildeten Umsetzungsprodukte **U1** bis **U3** und bezieht sie auf das Ausgangsmolekül Linolsäure, stellt man fest, dass während des Abbaus nur geradzahlige Produkte auftreten, bei denen keine Änderung des Grundgerüsts vom ω -Ende her eingetreten ist. Dies resultiert aus einer sukzessiven Abspaltung von C2-Einheiten ausgehend von der Carboxylgruppe des Moleküls. Weiterhin lässt die Position der eingeführten Hydroxygruppe an C-3 auf einen Zusammenhang zur β -Oxidation als Abbauweg schließen.

Um weitere Informationen zum Mechanismus zu erhalten, der in *Stenotrophomonas maltophilia* beim oxidativen Abbau von Fettsäuren eine Rolle spielt, wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit weitere Fettsäuren mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen umgesetzt und die gebildeten Produkte mittels verschiedener Techniken charakterisiert.

3.3 Untersuchungen zur Substratspezifität des Stammes *Stenotrophomonas maltophilia*

Auf der Grundlage der bei der Umsetzung von Linolsäure erhaltenen Ergebnisse wurden weitere Substrate ausgewählt, die in analoger Vorgehensweise mit *Stenotrophomonas maltophilia* umgesetzt wurden. Diese Verbindungen variierten dabei in Anzahl, Position und Konfiguration vorhandener Doppelbindungen sowie in der Kettenlänge. Weiterhin wurden Fettsäuren eingesetzt, deren Carboxylfunktion blockiert war oder die funktionelle Gruppen im Molekül aufwiesen.

3.3.1 Variation der Doppelbindungen bei gleichbleibender Kettenlänge

3.3.1.1 Anzahl und Stellung von *cis*-Doppelbindungen

Als erste Substratgruppe wurden Fettsäuren mit 18 C-Atomen, die zur sog. „9er-Reihe“ zählen, ausgewählt. Neben Linolsäure gehören dazu α -Linolensäure [1a], die im Vergleich zu Linolsäure eine weitere Doppelbindung im Molekül aufweist, und Ölsäure [3a] mit nur einer Doppelbindung im Molekül. Auch die gesättigte Stearinsäure [4] wird zu dieser Gruppe gezählt. Abbildung 3-9 zeigt die als Substrate gewählten Verbindungen und die daraus durch *Stenotrophomonasmaltophilia* gebildeten Produkte. Zum Vergleich ist auch Linolsäure [2a] einschließlich der Hauptumsetzungsprodukte 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure [2b] und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [2c] gezeigt. Für die Reaktion entscheidende Struktureinheiten in den Edukten sind hervorgehoben.

Analog zu Linolsäure entstanden aus α -Linolensäure [1a] zwei Umsetzungsprodukte mit 12 bzw. 14 C-Atomen [1a, 1b], die entsprechend dem Edukt eine weitere Doppelbindung aufwiesen. Ölsäure wurde ebenfalls zu einem Produkt mit 14 C-Atomen [3b] abgebaut. Stearinsäure, die keine Doppelbindung im Molekül aufweist, wurde ohne detektierbare Zwischenprodukte abgebaut.

Bereits die Umsetzung dieser Substratgruppe zeigte, dass ungesättigte Fettsäuren mit einer *cis*-Doppelbindung in Position 9 abgebaut wurden, bis sich diese Doppelbindung in Position 5 befand. Auf dieser Stufe kam es zur Anreicherung von 3-Hydroxysäuren. Gesättigte Fettsäuren wurden von *Stenotrophomasmaltophilia* ohne Akkumulation von detektierbaren Zwischenprodukten abgebaut.

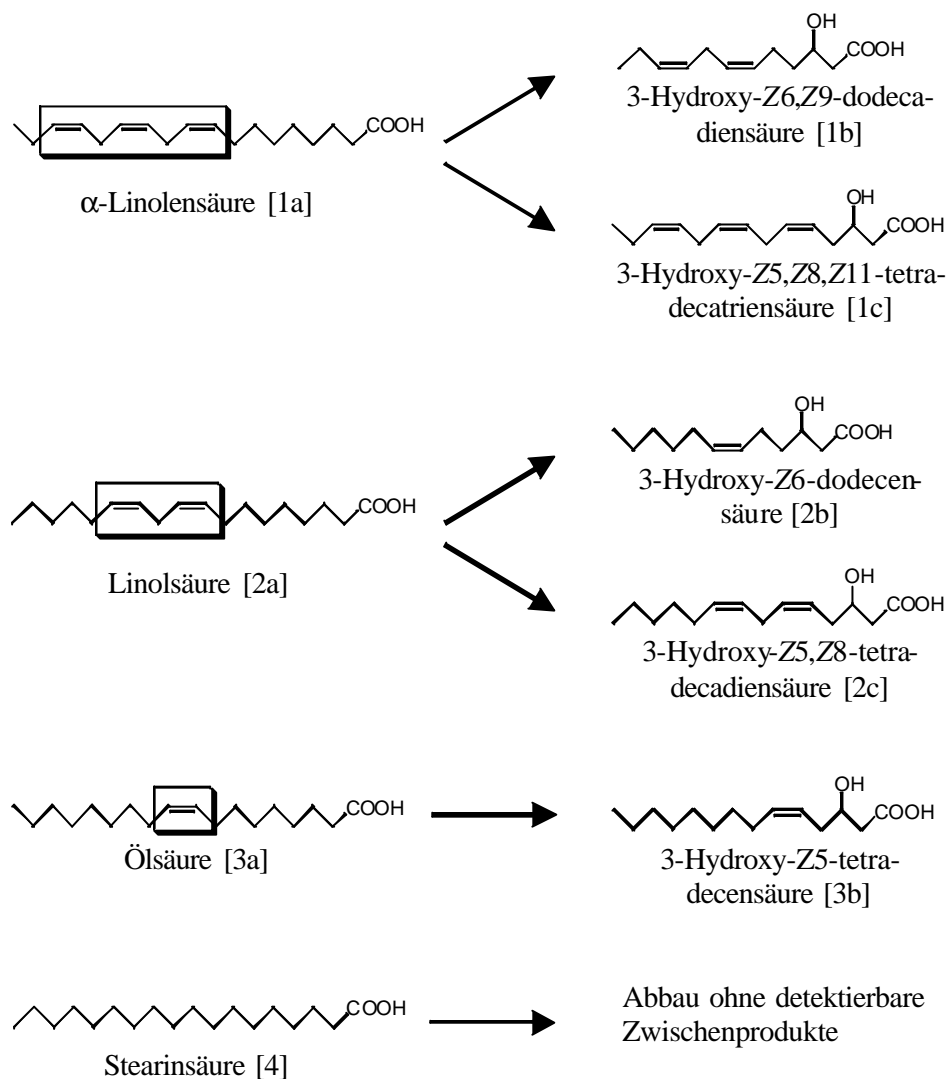


Abb. 3-9: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonas maltophilia* aus den Substraten α -Linolensäure [1a], Linolsäure [2a], Ölsäure [3a] und Stearinsäure [4] gebildet werden

Weiterhin wurden Fettsäuren ausgewählt, deren erste *cis*-Doppelbindung sich nicht in Position 9 befindet. Es handelte sich um *cis*-Vaccensäure [5a], *cis*-Petroselinensäure [6a] und γ -Linolensäure [7a]. Diese Verbindungen sind zusammen mit den durch *Stenotrophomonas maltophilia* gebildeten Reaktionsprodukten in Abbildung 3-10 wiedergegeben.

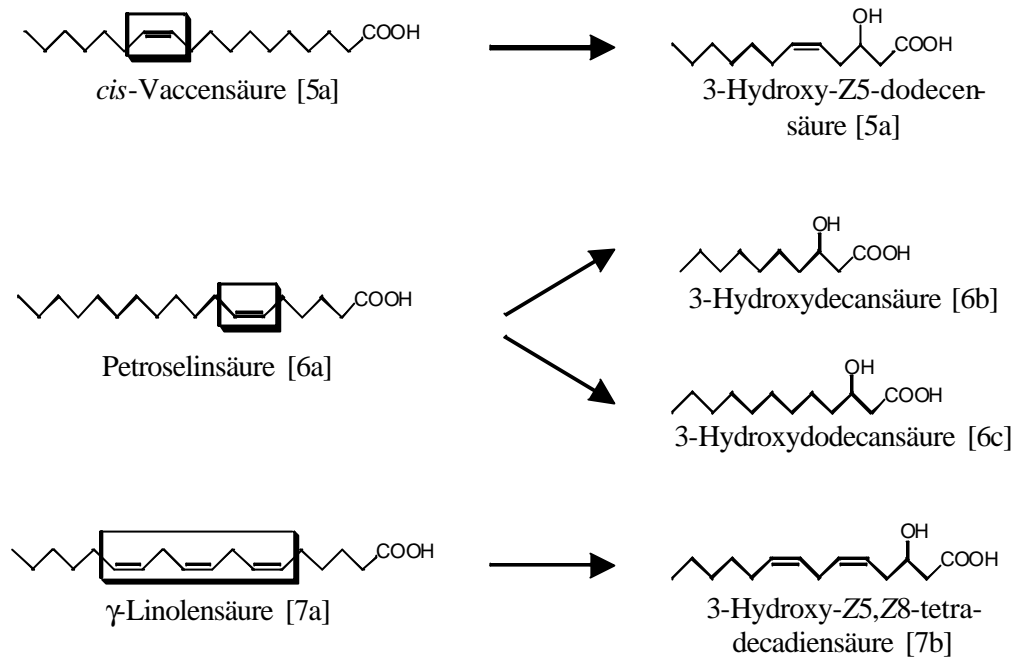


Abb. 3-10: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonas maltophilia* aus den Substraten *cis*-Vaccensäure [5a], *cis*-Petroselinsäure [6a] und γ -Linolensäure [7a] gebildet werden

Lag die Doppelbindung wie in *cis*-Vaccensäure [5a] weiter von der Carboxylgruppe entfernt, wurde das Substrat entsprechend weiter abgebaut, bis es wieder zur Akkumulation eines Reaktionsproduktes kam, das am C3 hydroxyliert war und eine *cis*-konfigurierte Doppelbindung zwischen C5 und C6 aufwies.

Befand sich die vorliegende *cis*-Doppelbindung des Ausgangsmoleküls an einem geradzahligem C-Atom, konnte diese durch *Stenotrophomonas maltophilia* beim Abbau überwunden werden. Dies belegte das Auftreten von gesättigten Reaktionsprodukten [6a, 6b] bei der Umsetzung von *cis*-Petroselinsäure [6a]. Die in den Abbau der Doppelbindung involvierten Reaktionen stellten allerdings die limitierenden Schritte innerhalb der Reaktionssequenz dar, da es im Vergleich zur Umsetzung von Stearinsäure [4] bei gleichbleibenden Bedingungen zu einer Anreicherung von hydroxylierten Produkten mittlerer Kettenlänge kam.

Wurde γ -Linolensäure [7a] als Substrat eingesetzt, kam es ebenfalls zu einer Kettenverkürzung um 4 C-Atome. Dieser Abbau schloß die Überwindung einer *cis*-Doppelbindung mit ein, die sich wie in *cis*-Petroselinsäure [6a] zwischen C6 und C7 befand.

Als Reaktionsprodukt wurde 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [7b] identifiziert. Diese Verbindung zeigte erneut die typischen Strukturmerkmale der Hauptumsetzungsprodukte.

3.3.1.2 Verbindungen mit *trans*-Doppelbindungen

Um den Einfluss der Konfiguration vorhandener Doppelbindungen bei gleichbleibender Kettenlänge auf deren Umsetzung durch *Stenotrophomonasmaltophilia* zu untersuchen, wurden Fettsäuren mit 18 C-Atomen ausgewählt, die sich in Anzahl und Stellung vorhandener *trans*-Doppelbindungen unterschieden. Dabei handelte es sich um Linolaidinsäure (*trans*-Linolsäure) [8a], Elaidinsäure (*trans*-Ölsäure) [9], *trans*-Vaccensäure [10] und *trans*-Petroselinensäure [11]. Abbildung 3-11 fasst diese Substrate und die daraus gebildeten Umsetzungsprodukte zusammen.

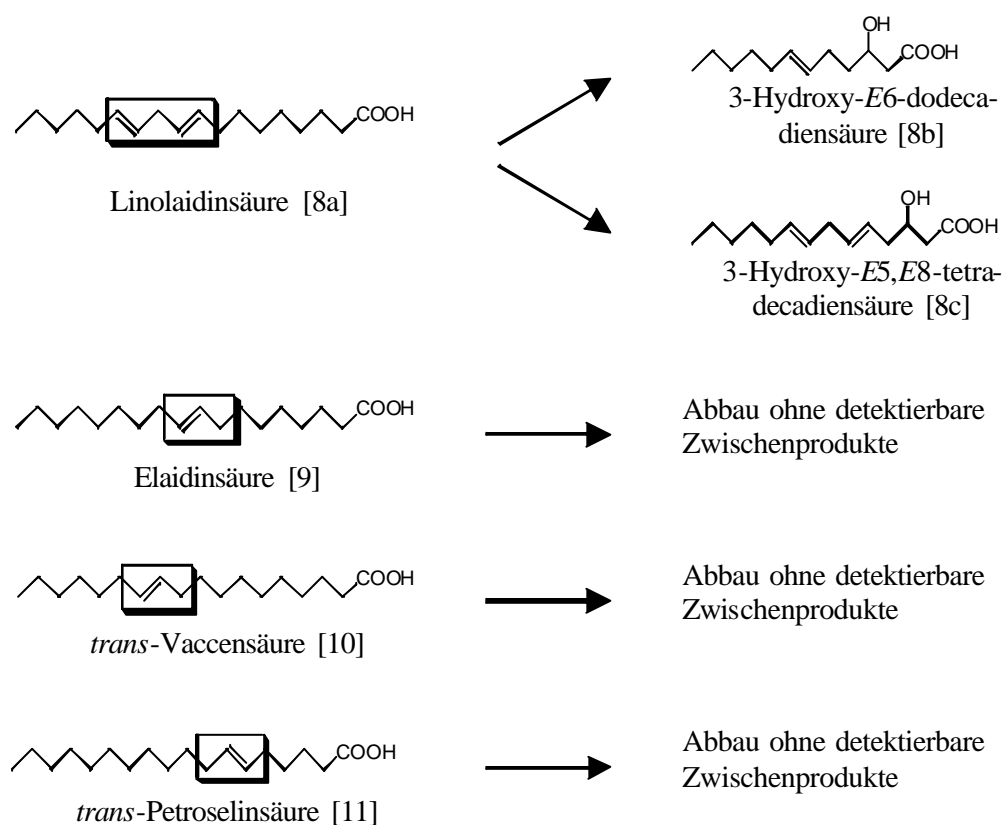


Abb. 3-11: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonasmaltophilia* aus den Substraten Linolaidinsäure [8a], Elaidinsäure [9], *trans*-Vaccensäure [10] und *trans*-Petroselinensäure [11] gebildet werden

Ungesättigte Fettsäuren, die im Molekül eine *trans*-Doppelbindung aufwiesen [9–11] wurden von *Stenotrophomonas maltophilia* unabhängig von deren Position innerhalb des Moleküls ohne detektierbare Zwischenprodukte verstoffwechselt. Bei der Umsetzung von Linolaidinsäure [8a], einer Verbindung mit zwei *trans*-Doppelbindungen, entstanden dagegen isolierbare Biotransformationsprodukte. Dabei handelte es sich um 3-Hydroxy-*E*-6-dodecadiensäure [8b] und 3-Hydroxy-*E*5,*E*8-tetradecadiensäure [8c], die *trans*-Analoge der aus Linolsäure entstehenden Verbindungen [2a, 2b]. Allerdings lag hier die Verbindung mit 12 C-Atomen [8a], die bereits einen weiteren Abbauzyklus durchlaufen hat, in deutlich höheren Konzentrationen vor, während beim Abbau von Linolsäure die C14-Komponente [2b] als Hauptprodukt entstand. Verbindungen mit *trans*-Doppelbindungen konnten also von den am Abbau beteiligten Enzymen in *Stenotrophomonas maltophilia* effizienter umgesetzt werden.

3.3.2 Variation der Kettenlänge

Im Folgenden wurden Verbindungen als Substrate ausgewählt, die zusätzlich zu den Unterschieden bezüglich vorhandener Doppelbindungen in ihrer Kettenlänge variieren.

3.3.2.1 Verlängerung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von *cis*-konfigurierten Doppelbindungen

Als Verbindungen, die über *cis*-Doppelbindungen im Molekül und zusätzlich im Vergleich zu den bisher genannten Substraten über einer längere Kohlenstoffkette verfügen, wurden Gondoensäure [12a] und Erucasäure [13a] ausgewählt (Abb. 3-12).

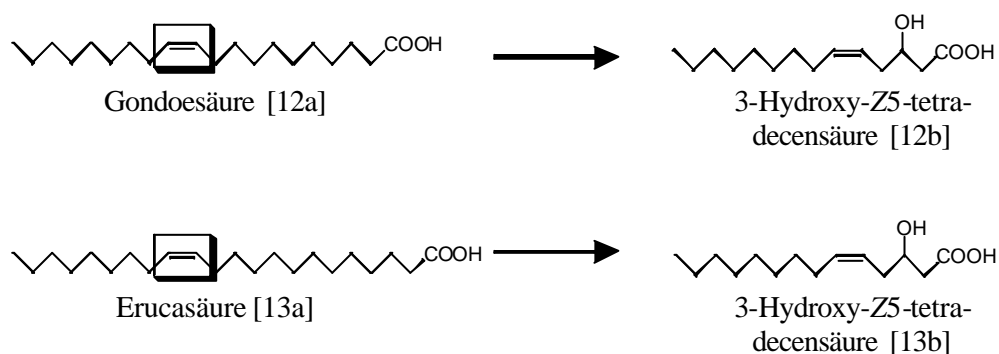


Abb. 3-12: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonas maltophilia* aus den Substraten Gondoensäure [12a] und Erucasäure [13a] gebildet werden

Bei den umgesetzten Fettsäuren handelte es sich wie bei Ölsäure [3a] um (n-9)-Fettsäuren. Diese Einstufung bezieht sich auf die Position der Doppelbindung bezogen auf das ω -Ende des Moleküls. Daher nimmt mit zunehmender Kettenlänge auch die Entfernung zwischen Carboxylgruppe und Doppelbindung zu. Dies war für die Umsetzung durch *Stenotrophomonas maltophilia* jedoch unerheblich. Analog zur Umsetzung von Ölsäure [3a] entstand aus Gondoensäure [12a] und Erucasäure [13a] 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure [3b, 12b, 13b] als gemeinsames Reaktionsprodukt. *Stenotrophomonas maltophilia* akzeptiert also Verbindungen mit 18, 20 und 22 C-Atomen als Substrat. Eine halbquantitative Abschätzung der Peakflächen von Edukt und Produkt bei der HPLC-ELSD-Analytik ergab, dass die Umsetzungsrate mit steigender Kettenlänge abnimmt. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass dies auch auf eine verminderte Löslichkeit der Substrate zurückzuführen sein kann.

Bei der Umsetzung von Arachidonsäure (Z5,Z8,Z11,Z14-Eicosatetraensäure) [14a] durch *Stenotrophomonas maltophilia* war im wässrigen Medium freie Linolsäure zusammen mit dem Hauptumsetzungsprodukt 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [14b] nachzuweisen (Abb. 3-13).

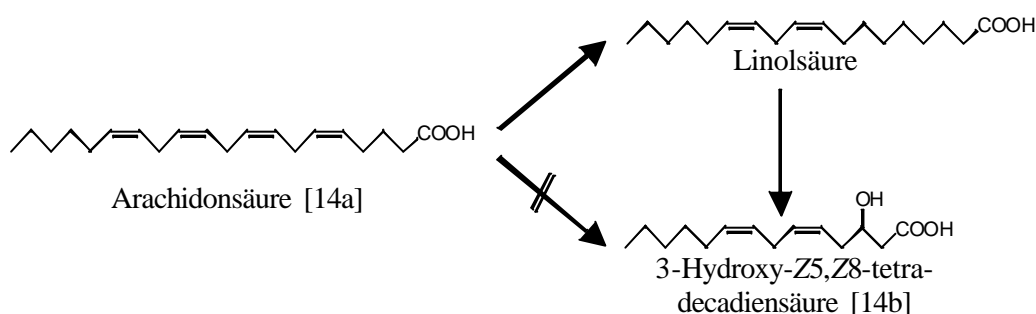


Abb. 3-13: Umsetzung von Arachidonsäure [14a] zu 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [14b] nach Retrokonversion zu Linolsäure durch *Stenotrophomonas maltophilia*

Die Umsetzung von Arachidonsäure [14a] führt nicht zur Bildung von 3-Hydroxy-Z5,Z8,Z11,Z14-eicosatetraensäure. Dieses Reaktionsprodukt würde die charakteristischen Strukturmerkmale der bisher erhaltenen Umsetzungsprodukte von *Stenotrophomonas maltophilia*, nämlich das Vorliegen einer Hydroxyfunktion am C3 und eine *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 aufweisen. Stattdessen wurde als Umsetzungsprodukt 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure identifiziert. Dessen Bildung kann durch eine sog. "Retrokonversion" von Arachidonsäure zu Linolsäure und deren anschließende Verstoffwechslung durch das Bakterium erklärt werden.

Ein derartiger Metabolismus wurde im Rahmen von Fütterungsstudien mit Ratten beobachtet, die einen Mangel an essentiellen Fettsäuren aufwiesen. Mit der Nahrung zugeführte Arachidonsäure wurde in einem Mechanismus, der den Verlust von zwei Doppelbindungen und zwei C-Atomen einschließt, zu Linolsäure abgebaut (Hansen et al., 1986).

Die Umsetzung von Arachidonsäure zu 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure nach Retrokonversion zu Linolsäure ist auch in dem Bodenpilz *Mucor genevensis* beschrieben worden. Im Unterschied zu *Stenotrophomonas maltophilia* wurde in diesem Pilz jedoch exogen zugeführte Linolsäure nicht unter Bildung von hydroxylierten Metaboliten verstoffwechselt. Die Autoren schlossen daraus, dass zugesetzte Linolsäure bevorzugt über die peroxisomale β -Oxidation abgebaut wird, während die Bildung von 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure in anderen Zellkompartimenten lokalisiert ist (Pohl et al., 1998).

3.3.2.2 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von *cis*-konfigurierten Doppelbindungen

Im Gegensatz zu *cis*-ungesättigten Verbindungen mit verlängerter Kohlenstoffkette wurden Substrate eingesetzt, deren Grundgerüst aus weniger als 18 C-Atomen besteht. Dabei handelte es sich um Palmitoleinsäure [15a], Myristoleinsäure [16a], Z5-Dodecensäure [17a], Z7-Decensäure [18a] und Z5-Octensäure [19a]. Diese sind kommerziell erhältlich oder wurden synthetisiert (vgl. 4.5). Die Strukturen sind zusammen mit den Metaboliten, die beim Abbau durch *Stenotrophomonas maltophilia* daraus entstehen, in Abbildung 3-14 zusammengefasst.

Die Verbindungen wurden von *Stenotrophomonas maltophilia* unabhängig von ihrer Kettenlänge verstoffwechselt. Während bei einer Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts im Vergleich zu den Substraten mit 18 C-Atomen eine abnehmende Reaktivität beobachtet wurde, lag hier kein Einfluss auf die Umsetzungsrate vor. Bei Substraten wie Palmitoleinsäure [15a], Myristoleinsäure [16a] oder Z7-Decensäure [18a], die jeweils eine *cis*-Doppelbindung zwischen C9 und C10 bzw. C7 und C8 aufweisen, erfolgte der Abbau des Substrates, bis sich diese Doppelbindung an C5 befand. Auf dieser Stufe kam es, wie bereits mehrfach erwähnt, zur Anreicherung von 3-Hydroxysäuren [15b, 16b, 17b]. Bei der Umsetzung von Palmitoleinsäure [15a] konnte als weiteres Reaktionsprodukt 3-Hydroxy-Z7-tetradecensäure [15c] identifiziert werden. Lag die vorhandene *cis*-Doppelbindung des Ausgangsmoleküls wie in Z5-Dodecensäure [17a] oder Z5-Octensäure [19a] bereits zwischen C5 und C6, erfolgte lediglich die Hydroxylierung des Substrates ohne Kettenverkürzung, da die Verbindungen keinen vollständigen β -Oxidationszyklus durchlaufen können [17b, 19b].

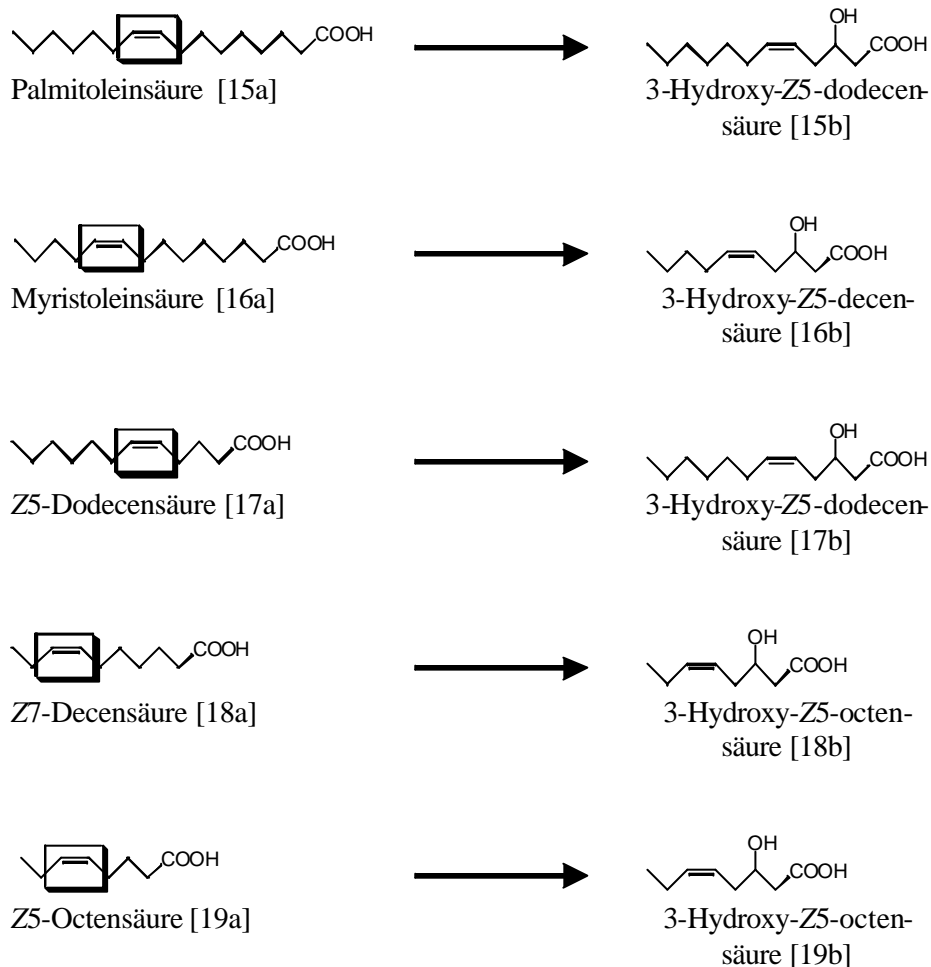


Abb. 3-14: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonasmaltophilia* aus den Substraten Palmitoleinsäure [15a], Myristoleinsäure [16a], Z5-Dodecensäure [17a], Z7-Decensäure [18a] und Z5-Octensäure [19a] gebildet werden

Im Rahmen der Umsetzung von *cis*-ungesättigten Substraten mit verkürzter Kohlenstoffkette wurde auch Z3-Octensäure [20] mit *Stenotrophomonasmaltophilia* umgesetzt. Da diese Verbindung eine *cis*-Doppelbindung zwischen C3 und C4 aufweist, ist die gemäß dem β -Oxidationszyklus folgende Ausbildung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 nicht direkt möglich. Wie in Kapitel 2.3.1.8 erläutert, sind zum β -oxidativen Abbau ungesättigter Verbindungen weitere Enzyme nötig. Ist in *Stenotrophomonasmaltophilia* eine Δ^3, Δ^2 -Isomerase vorhanden, kommt es entsprechend der in Abbildung 3-15 dargestellten Reaktionsfolge zu einem „Umklappen“ der Doppel-

bindung unter gleichzeitiger Änderung der Position und Konformation. Dies ermöglicht den weiteren Abbau über die β -Oxidation.

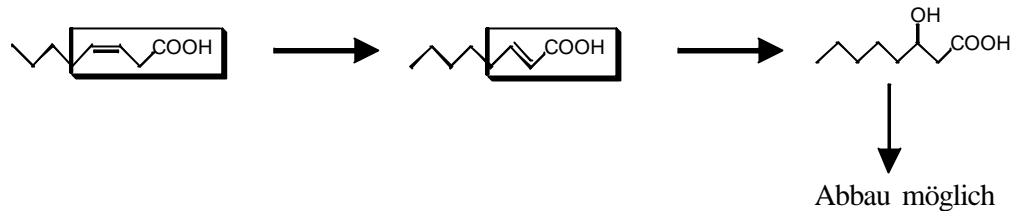


Abb. 3-15: Funktion der Δ^3, Δ^2 -Isomerase am Beispiel von Z3-Octensäure

Die nach der Umsetzung von Z3-Octensäure mit *Stenotrophomonasmaltophilia* erhaltenen Extrakte wurden methyliert (vgl. 4.3.3) und mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Dabei sind 3-Hydroxyoctansäuremethylester und 3-Hydroxyhexansäuremethylester nachgewiesen worden. Daraus kann geschlossen werden, dass das Bodenbakterium *Stenotrophomonasmaltophilia* über eine Δ^3, Δ^2 -Isomerase verfügt, die in der Lage ist, eine Z3- zur E2-Doppelbindung umzuwandeln. Da allerdings für alle Schritte der β -Oxidation mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität vorliegen (vgl. Kapitel 2.3.1), kann diese Reaktivität nicht uneingeschränkt auf alle Kettenlängen übertragen werden.

3.3.2.3 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei gleichzeitigem Vorhandensein von trans-konfigurierten Doppelbindungen

Bei den Fettsäuren mit 18 C-Atomen wurden Verbindungen mit einer *trans*-Doppelbindung unabhängig von deren Position im Molekül von *Stenotrophomonasmaltophilia* abgebaut, ohne dass Zwischenprodukte detektiert werden konnten. Diese Reaktivität sollte durch die Umsetzung von Palmitolaidinsäure (*trans*-Palmitoleinsäure, Abb. 3-16) [21] für eine Verbindung mit kürzerer Kohlenstoffkette bestätigt werden.

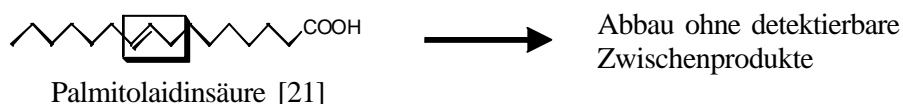


Abb. 3-16: Struktur von Palmitolaidinsäure [21]

Wie erwartet wurde Palmitolaidinsäure [21] von *Stenotrophomonasmaltophilia* ohne das Auftreten von Zwischenprodukte verstoffwechselt.

3.3.2.4 Verkürzung der Kohlenstoffkette bei Verbindungen ohne Doppelbindungen

Eine weitere Bestätigung bislang erarbeiteter Ergebnisse lieferte die Umsetzung von gesättigten Fettsäuren mit im Vergleich zu Stearinsäure kürzerer Kohlenstoffkette. Abbildung 3-17 zeigt die Strukturen von Palmitinsäure [22] und Myristinsäure [23], die durch *Stenotrophomonasmaltophilia* ebenfalls ohne Akkumulation von detektierbaren Metaboliten abgebaut werden.

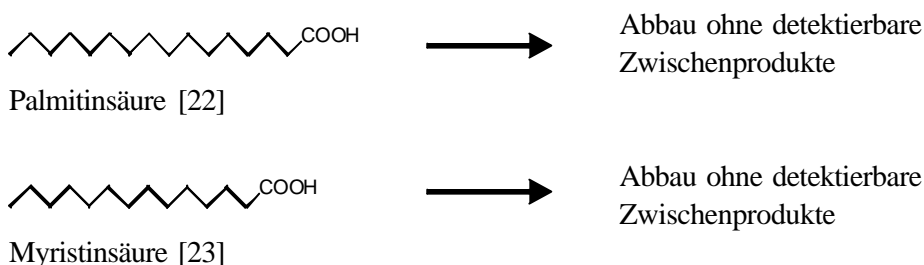


Abb. 3-17: Strukturen von Palmitinsäure [22] und Myristinsäure [23]

3.3.3 Umsetzung von Fettsäuren mit blockierter Carboxylgruppe

Fettsäuren stellen in ihrer freien Form keine Substrate für den Abbau über die β -Oxidation dar, sondern nur als aktivierte CoA-Ester. Durch die Umsetzung von Fettsäuren, deren Carboxylfunktion durch Veresterung oder Amidierung direkt oder durch das Vorliegen einer Hydroxygruppe in α -Position indirekt blockiert ist, sollten weitere Aussagen über den in *Stenotrophomonasmaltophilia* ablaufenden β -Oxidationsmechanismus einschließlich des Aktivierungsschrittes gewonnen werden. Als Substrate wurden Linolsäuremethylester [24a], Linolsäureethylester [25b], Ölsäureamid [26] und 2-Hydroxyölsäure [27] eingesetzt. Die Strukturen dieser Verbindungen sowie daraus gebildete Abbauprodukte sind in Abbildung 3-18 wiedergegeben.

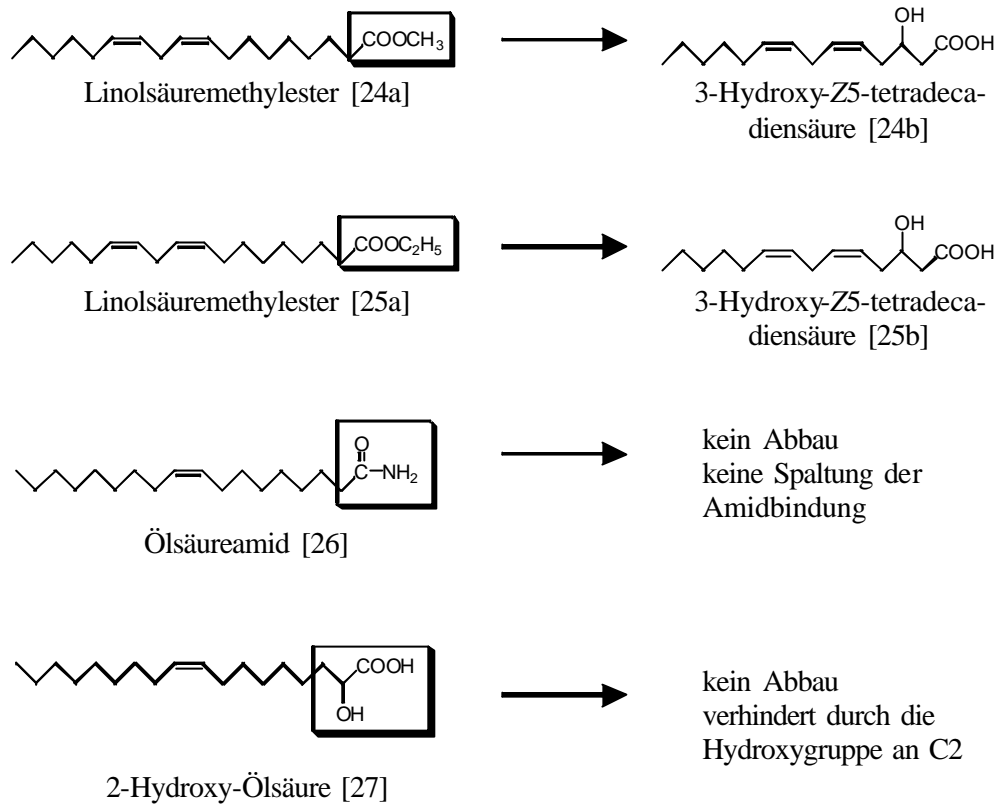


Abb. 3-18: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonasmaltophilia* aus den Substraten Linolsäuremethylester [24a], Linolsäureethylester [25a], Ölsäureamid [26] und 2-Hydroxy-Ölsäure [27] gebildet werden

Wurde Linolsäure als Methylester [24a] bzw. Ethylester [25a] als Substrat für die Biotransformation eingesetzt, entstand als Hauptumsetzungsprodukt 3-Hydroxy-Z5-tetradecadiensäure [24b, 25b]. Diese Verbindung wurde auch bei der Umsetzung von freier Linolsäure [1] gebildet. *Stenotrophomonasmaltophilia* verfügt demzufolge über eine Esteraseaktivität zur Spaltung der vorhandenen Esterbindungen.

Ölsäureamid [26] wurde dagegen von *Stenotrophomonasmaltophilia* nicht abgebaut. Das Bakterium war demzufolge nicht in der Lage, die vorliegende Amidbindung zu spalten. Auch 2-Hydroxy-Ölsäure [27] wurde im Rahmen der β -Oxidation nicht verstoffwechselt. Durch die polare funktionelle Gruppe in direkter Nachbarstellung zur Carboxylfunktion kann möglicherweise die Bindung des Substrats an das Enzym Acyl-CoA-Synthetase, das den Aktivierungsschritt katalysiert, unterbunden werden.

3.3.4 Umsetzung von Fettsäuren, die bereits funktionelle Gruppen aufweisen

3.3.4.1 Umsetzung von Ricinolsäure

Ricinolsäure (12-(*R*)-Hydroxy-*Z*9-octadecensäure), die dominierende Fettsäure in den Triacylglyceriden des Ricinusöls, verfügt bereits über eine Hydroxyfunktion im Molekül. Zusätzlich liegt eine *cis*-konfigurierte Doppelbindung vor, die den bisherigen Ergebnissen zufolge zu einem Abbruch der β -Oxidation in *Stenotrophomonasmaltophilia* führen sollte. Durch die Umsetzung von Ricinolsäure [28a] sollte überprüft werden, ob die Bildung von Dihydroxysäuren im Rahmen des β -Oxidationszyklus von *Stenotrophomonasmaltophilia* möglich ist bzw. welchen Einfluß eine bereits vorhandene funktionelle Gruppe auf den Abbau hat.

Die Strukturaufklärung des bei der Umsetzung von Ricinolsäure entstehenden Produktes ergab, dass es sich um eine monohydroxylierte Verbindung handelt. Dies zeigte unter anderem das Fragmentierungsmuster, das bei der Analytik des isolierten Umsetzungsproduktes mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) im Tochterionenmodus erhalten wurde. Wie bei den bisherigen Verbindungen erfolgte ein zweimaliger Verlust einer Alkoholfunktion in Form von Wasser. Beim Vorliegen einer weiteren Hydroxyfunktion wäre eine zusätzliche Wasserabspaltung zu beobachten. Die bisher beobachtete Kettenspaltung in α -Stellung zur Hydroxygruppe am C3 tritt nicht auf. Diese Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, dass es bei der Umsetzung von Ricinolsäure durch *Stenotrophomonasmaltophilia* nicht zur Bildung einer 3-Hydroxygruppe kommt. Diese Vermutung konnte nach Methylierung der Verbindung durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestätigt werden. Das für β -Hydroxysäuren typische Signal von m/z 103 trat im Massenspektrum nicht auf. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lag nur ein Signal für eine sekundäre OH-Gruppe vor. Das Fehlen der typischen Signalaufspaltung für die Protonen des C2 bestätigte wiederum, dass diese OH-Gruppe sich nicht am C3 befindet. Auch im $^{13}\text{C-NMR}$ -Übersichtsspektrum sowie im $^{13}\text{C-DEPT}$ lagen jeweils nur ein Signal mit der typischen Verschiebung für ein C-Atom mit sekundärer Hydroxyfunktion vor.

Mit Hilfe der zweidimensionalen NMR-Spektroskopien (H/H-COSY, HMQC, HMBC) ließ sich die Position der Hydroxygruppe im Molekül eindeutig festlegen. Im H/H-korrelierten Spektrum lag die Kopplung von C-8H ($\delta = 3,63$ ppm) auf C-7H₂ ($\delta = 2,21$ ppm) und C-9H₂ ($\delta = 1,45$ ppm) vor. Im HMBC-Spektrum, dem C/H-gekoppelten

nol- und Lesquerolsäure liegt die vorhandene Hydroxygruppe hier in (*S*)-Konfiguration vor. Zudem ist sie weiter von der *cis*-Doppelbindung entfernt. Es galt daher zu prüfen, ob das Molekül analog der Ricinolsäure umgesetzt wird oder ob diese strukturellen Merkmale die Bildung einer Dihydroxycarbonsäure ermöglichen.

Abbildung 320 fasst die Ergebnisse der Umsetzung dieser Substrate mit *Stenotrophomonasmaltophilia* zusammen.

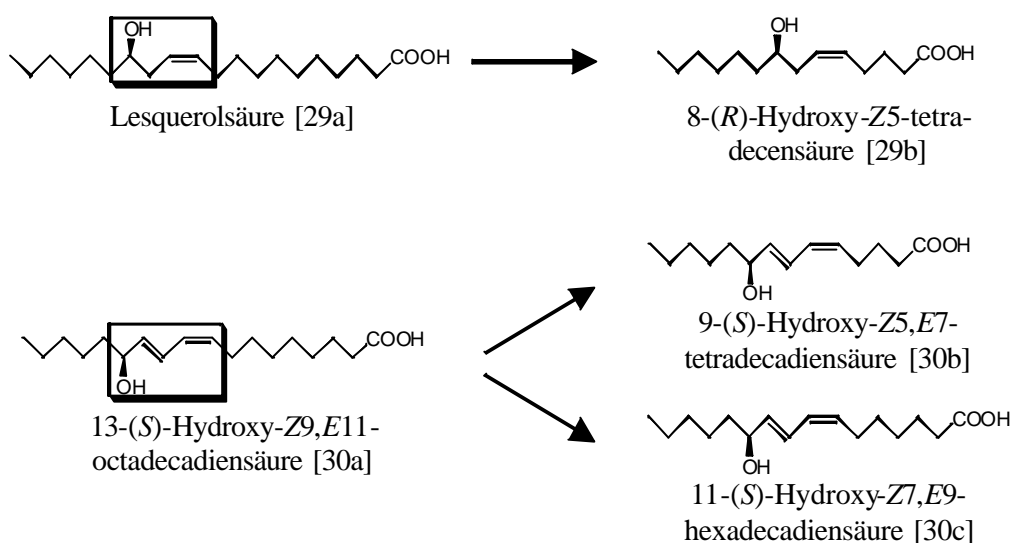


Abb. 3-20: Umsetzungsprodukte, die von *Stenotrophomonasmaltophilia* aus den Substraten Lesquerolsäure [29a] und 13-(*S*)-Hydroxy-Z9,*E*11-octadecadiensäure [30a] gebildet werden

Die Umsetzung von Lesquerolsäure [29a] führte zur Bildung von 8(*R*)-Hydroxy-Z5-tetradecensäure [29b]. Es entstand also das gleiche Reaktionsprodukt wie bei der Umsetzung von Ricinolsäure. Damit konnte die dort beobachtete Reaktivität bestätigt werden. Wurde 13-(*S*)-Hydroxy-Z9,*E*11-octadecadiensäure [30a] als Substrat eingesetzt, kam es ebenfalls zur Bildung von monohydroxylierten Produkten [30b, 30c], in denen die Hydroxygruppe nach der Kettenverkürzung an der Position vorliegt, an der sie sich auch im Ausgangsmolekül befindet. Eine Änderung der Struktureinheit aus Doppelbindung(en) und Hydroxyfunktion beeinflusste die ablaufende Reaktion demzufolge nicht.

In *trans*-Ricinolsäure und 12-Hydroxy-Stearinsäure liegt jeweils an Position 12 eine Hydroxygruppe vor. Da die entsprechenden Fettsäuren ohne diese Funktionalität - Stea-

rinsäure und Elaidinsäure - von *Stenotrophomonasmaltophilia* ohne detektierbare Zwischenprodukte abgebaut wurden, kann durch die Verwendung der oben genannten Substrate der Einfluß der Hydroxygruppe alleine bzw. in Verbindung mit dem Vorliegen einer *trans*-Doppelbindung beurteilt werden.

Abbildung 3-21 zeigt das Ergebnis der Umsetzung von *trans*-Ricinolsäure [31a] mit *Stenotrophomonasmaltophilia*.

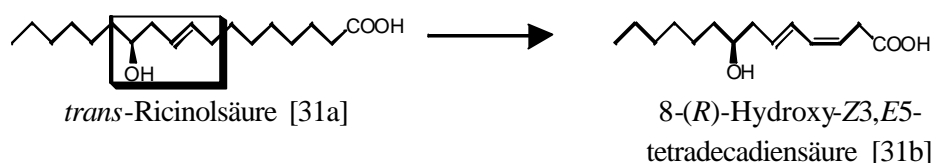


Abb. 3-21: Umsetzung von *trans*-Ricinolsäure [31a] zu 8-(*R*)-Hydroxy-Z3,E5-tetradecadiensäure [31b] durch *Stenotrophomonasmaltophilia*

Bereits bei der Kontrolle des Rohextraktes mittels HPLC mit gekoppelter UV- und ELSD-Detektion zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu den bisherigen Umsetzungen. Im Gegensatz zu allen bisher gebildeten Fettsäuremetaboliten konnte das Hauptumsetzungsprodukt der *trans*-Ricinolsäure [31a] bei einer Wellenlänge von 234 nm detektiert werden. Dies deutete auf das Vorhandensein eines konjugierten Doppelbindungssystems hin.

Diese Vermutung ist durch die weitere Strukturaufklärung bestätigt worden. Bei der Bestimmung der Molekularmassen mittels HPLC-MS im „Fullscan“-Modus sind die Pseudomolekularionen m/z 258 $[M+NH_4]^+$ und m/z 263 $[M+Na]^+$ detektiert worden. Daraus ließ sich eine Molekularmasse von m/z 240 ableiten, die aufgrund einer zusätzlichen Doppelbindung im Vergleich zum Umsetzungsprodukt aus *cis*-Ricinolsäure [28b] um zwei Masseneinheiten erniedrigt ist. Im ^{13}C -NMR-Übersichtsspektrum waren vier Signale im Bereich von 136 bis 125 ppm vorhanden, die ebenfalls das Vorliegen einer zweiten Doppelbindung belegten.

Zur abschließenden Identifizierung des Produktes [31a] wurden zweidimensionale NMR-Spektren (H/H-COSY, HMQC, HMBC) herangezogen. Aufgrund des Kopplungsmusters sowie der berechneten Kopplungskonstanten wurde das Vorliegen einer konjugierten Dieneinheit bestehend aus einer *cis*- und einer *trans*-Doppelbindung bestätigt. Damit konnte das aus *trans*-Ricinolsäure [31a] gebildete Umsetzungsprodukt als 8-(*R*)-Hydroxy-Z3,E5-tetradecadiensäure [31b] identifiziert werden. Zur endgültigen Ab-

sicherung des Ergebnisses können weitere NMR-Experimente (z.B. Einstrahlversuche) durchgeführt werden.

Die Einführung einer *cis*-Doppelbindung im Verlauf der β -Oxidation ist bisher nicht beschrieben. Vielmehr verfügen die verschiedenen Organismen über zusätzlich Enzyme, die den β -oxidativen Abbau von ungesättigten Fettsäuren ermöglichen. Daher ist die beobachtete Reaktivität durch die Umsetzung verwandter Substrate zu bestätigen.

12-Hydroxy-Stearinsäure [32] wurde von *Stenotrophomonasmaltophilia* ohne Akkumulation von Metaboliten abgebaut (Abb. 3-22).

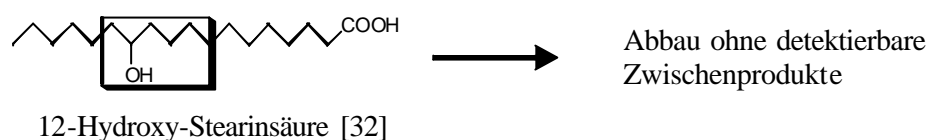


Abb. 3-22: Struktur von 12-Hydroxy-Stearinsäure [32]

Das alleinige Vorhandensein einer Hydroxygruppe im Substrat ohne die Anwesenheit einer Doppelbindung führte also nicht zu einer Anreicherung von detektierbaren Zwischenprodukten während der Umsetzung durch *Stenotrophomonasmaltophilia*. Dies verdeutlicht die Relevanz von Doppelbindungen für den ablaufenden Mechanismus zur Anreicherung von hydroxylierten Produkten.

Für 12-Hydroxy-Stearinsäure [32] wurde zur halbquantitativen Abschätzung des Abbaus der Anteil an nicht umgesetztem Substrat im Reaktionsansatz mittels HPLC-ELSD über eine Eichkurve bestimmt. Während in den Reagentienblindwerten 88 % des Eduktes nachgewiesen werden konnten, lagen in den Ansätzen nur noch durchschnittlich 51 % des zugesetzten Substrates vor (Mittelwert aus vier Ansätzen). In der Reaktionszeit von 18 Stunden wurden also etwa 40 % der exogen zugeführten 12-Hydroxy-Stearinsäure abgebaut. Dabei entstanden aus den Substratmolekülen keine Metabolite, die unter den verwendeten HPLC-Bedingungen erfasst werden können. Sind im Verlauf des Abbaus kurzkettenige Verbindungen (< 8 C-Atome) entstanden, sind sie für eine ELSD-Detektion zu flüchtig. Zur Kontrolle wurden die Ansätze daher methyliert und mittels GC-MS analysiert. Auch hier konnte keine Anreicherung von Zwischenprodukten nachgewiesen werden. Demzufolge wurde die Fettsäure weitgehend vollständig β -oxidativ verstoffwechselt. Daraus resultiert ein maximaler Energiegewinn für das Bakterium.

3.3.5 Versuche zur Quantifizierung der Umsetzungsrate

Zur Quantifizierung der Umsetzungsrate wurde [U-¹⁴C]-Ölsäure als Substrat für die Biotransformation eingesetzt. In einem gegenüber dem Standardansatz verkleinerten Reaktionsansatz (30 ml Medium) wurde nach der Vorinkubationsphase die uniform markierte Ölsäure (18×10^6 dpm) zusammen mit nicht markiertem Substrat (30 mg Ölsäure) mit *Stenotrophomonas maltophilia* inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde dem Ansatz ein Aliquot entnommen. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde mittels HPLC mit Radiodetektion analysiert. Abbildung 3-23 zeigt beispielhaft das Chromatogramm nach einer Reaktionszeit von 8 Stunden. Neben nicht umgesetzter Ölsäure ist als Hauptprodukt 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure sowie weitere polare Verbindungen zu sehen.

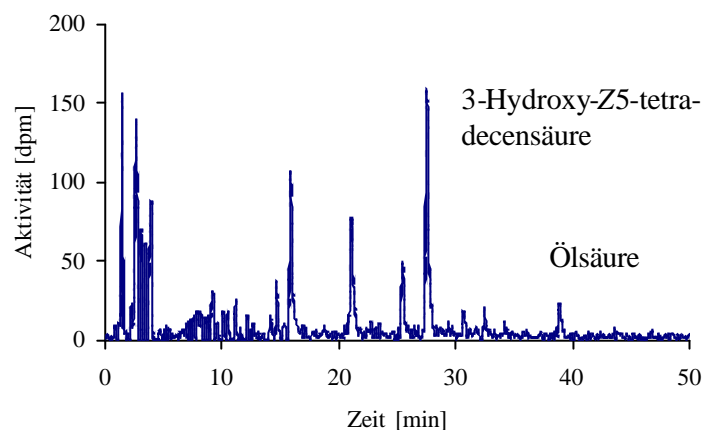


Abb. 3-23: HPLC-Analytik einer Umsetzung von [U-¹⁴C]-Ölsäure mit *Stenotrophomonas maltophilia* nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden

Zusätzlich zur HPLC-Analytik der Aliquote wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Flüssigszintillationszählung jeweils die Gesamtaktivität des Ansatzes sowie die Aktivität des nach Zentrifugation erhaltenen Überstandes ermittelt.

In Abbildung 3-24 ist die Aktivität im Überstand der Gesamtaktivität des Ansatzes zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt gegenübergestellt. Die Balken symbolisieren den prozentualen Anteil der Aktivität im Überstand von der Gesamtaktivität. Es ist ersichtlich, dass ein deutlicher Anteil der Aktivität an den bei der Zentrifugation erhaltenen Rückstand

assoziiert ist. Dies kann durch eine Inkorporation der zugesetzten Ölsäure oder deren Metabolite in Membranlipide oder eine adsorptive Bindung der unpolaren Substanzen an das Bakterienmaterial bedingt sein.

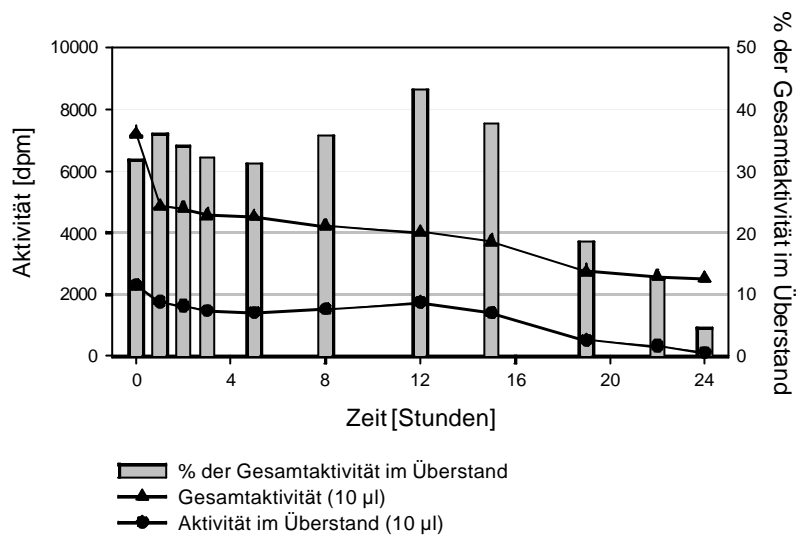


Abb. 3-24: Verlauf der Gesamtaktivität und der Aktivität im Überstand bei der Umsetzung von $[U-^{14}C]$ -Ölsäure mit *Stenotrophomonas maltophilia*

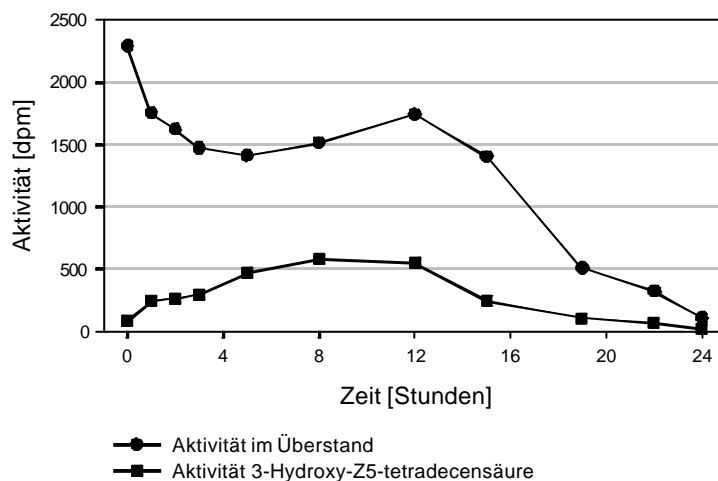


Abb. 3-25: Verlauf der Aktivität im Überstand sowie in 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure bei der Umsetzung von $[U-^{14}C]$ -Ölsäure mit *Stenotrophomonas maltophilia*

Abbildung 3-25 zeigt den Anteil der Aktivität im Hauptumsetzungsprodukt 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure im Vergleich zur Aktivität im Überstand. Nach 8 Stunden, dem Bildungsmaximum von 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure in diesem Versuch, waren 38 % der Aktivität des Überstandes in dieses Produkt eingebaut. Bezogen auf die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Gesamtaktivität betrug der Markierungsgrad des Produktes 13,7 %. Bezieht man die in 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure vorliegende Aktivität nach 8 Stunden auf die zu Beginn des Versuchs applizierte Gesamtaktivität, ergab sich ein Markierungsgrad von 8,0 %.

Diese relativ hohe Einbaurrate verdeutlicht die Bedeutung der β -Oxidation innerhalb des Stoffwechsels von *Stenotrophomonas maltophilia*. In einer vergleichbaren Studie von Nigam und Mitarbeitern (2000) wurde [U- ^{14}C]-Arachidonsäure als Kohlenstoffquelle an die Hefe *Candida albicans* verfüttert. Nach der Inkubation wurden etwa 60 % der Markierung in den Kohlehydraten des Stammes gefunden. Weitere 10 % wurden in Proteine eingebaut. Nur etwa 1 % der Markierung wurde in der polaren Lipidfraktion nachgewiesen.

3.4 Stereoanalytik von chiralen 3-Hydroxysäuren

Bei der biokatalytischen Umsetzung von Fettsäuren mit *Stenotrophomonasmaltophilia* werden als Hauptprodukte 3-Hydroxysäuren erhalten. Diese weisen an C3 ein chirales Zentrum auf.

Im Rahmen der β -Oxidation von Fettsäuren werden intermediär 3-(*S*)-Hydroxysäuren gebildet (vgl. Kapitel 2.3.1.3). Um weitere Informationen über den in *Stenotrophomonasmaltophilia* ablaufenden Mechanismus des oxidativen Abbaus von zugesetzten Fettsäuren zu erhalten, ist daher die Aufklärung der Stereochemie der gebildeten Umsetzungsprodukte von Interesse.

3.4.1 Enantiomerencharakterisierung

Ein Molekül, das außer Drehachsen kein Symmetrieelement enthält, nennt man chiral. Das Wort Chiralität, welches Händigkeit (gr. cheir: die Hand) bedeutet, bringt die notwendige und hinreichende Bedingung für die Existenz von Enantiomeren zum Ausdruck. Die beiden menschlichen Hände, als Vergleich zum chemischen Molekül, lassen sich nämlich nur durch Spiegelung, nicht aber durch geometrische Drehungen ineinander überführen. Chiralität ist eine inhärente Eigenschaft eines Moleküls. Die damit zusammenhängende optische Aktivität wird dagegen nur beobachtet, wenn eine ausreichende Menge an chiralen Molekülen vorliegt.

Seit der Entdeckung der Chiralität chemischer Moleküle im Jahre 1815 (Biot, 1815) ist das Interesse an diesen Verbindungen stark gestiegen. Insbesondere in den letzten Jahrzehnten nahm die Intensität der Forschung im Bereich der Entwicklung asymmetrischer Synthesen sowie analytischer Verfahren zur Erfassung chiraler Substanzen aufgrund mehrerer Faktoren stetig zu:

- Diastereomere und Enantiomere besitzen unterschiedliche biologische und physiologische Aktivität.
- Studien unter Verwendung chiraler Moleküle erleichtern die Aufklärung von Reaktionsmechanismen.
- Die Entwicklung biokatalytischer Verfahren ermöglicht den vereinfachten Zugang zu selektiven Darstellungsmöglichkeiten vieler chiraler Verbindungen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von neuen biokatalytischen Methoden in der asymmetrischen Synthese ist das Vorhandensein von geeigneten Analysen-

methoden zur Charakterisierung chiraler Verbindungen. Dabei sind stets zwei Aspekte zu berücksichtigen. Zum einen wird die Enantiomerenverteilung (Enantiomerenüberschuss, *ee*-Wert) quantitativ bestimmt und zum anderen wird die Enantioselektivität (absolute Konfiguration der Produkte) qualitativ erfasst.

3.4.1.1 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

Enantiomere unterscheiden sich lediglich in ihrer Wirkung auf polarisiertes Licht. Befinden sie sich in einer achiralen Umgebung, stimmen sie in allen anderen chemischen und physikalischen Eigenschaften überein und lassen sich folglich mit chemischen und physikalischen Methoden nicht voneinander trennen. Verändert man jedoch die äußere Umgebung in der Weise, dass ein chirales Medium vorliegt, tritt das unterschiedliche Verhalten der beiden Enantiomere auf und sie können unter geeigneten Umständen getrennt werden. Um den Enantiomerenüberschuss einer biokatalytischen Reaktion zu bestimmen, wird heute neben chiroptischen Methoden wie Polarimetrie, Circular-dichroismus (CD) und optischer Rotationsdispersion (ORD) auch die NMR-Spektroskopie, meist mit Lanthaniden-Shiftreagenzien, eingesetzt. Zunehmende Anwendung finden außerdem Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).

In der Praxis unterscheidet man zwischen direkten und indirekten Analysemethoden. Zu den direkten Verfahren zählen alle chiroptischen Methoden sowie GC- und HPLC-Analytik an chiralen Trennmaterialien. Außerdem gehören die HPLC-Analytik an achiralen Phasen unter Verwendung chiraler Additive sowie die NMR-Spektroskopie unter Einsatz von Lanthaniden-Shiftreagenzien oder chiralen deuterierten Lösungsmitteln in diesen Bereich. Der Vorteil direkter chromatographischer Methoden liegt darin, dass die zu analysierenden Verbindungen nicht rein vorliegen müssen, solange eine ausreichende Trennung der Komponenten erreicht wird. Bei den indirekten Verfahren erfolgt zunächst eine chemische Umwandlung der Enantiomere in Diastereomere durch Reaktion mit einem enantiomerenreinen Derivatisierungsreagenz. Die Bildung von Diastereomeren, die sich in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden, ist Voraussetzung für die Analyse chiraler Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie ohne Zusätze oder chromatographische Methoden wie GC und HPLC an achiralen Phasen.

Als qualitative Angabe wird üblicherweise der *ee*-Wert (enantiomeric excess) verwendet, der in Gleichung 3-1 definiert ist (Schurig und Weber, 1983).

$$ee = \frac{n(R) - n(S)}{n(R) + n(S)} * 100 \% \quad \text{für } n(R) > n(S) \quad (\text{Gl. 3-1})$$

Werden zur Trennung der Enantiomere chromatographische Methoden wie GC oder HPLC angewandt, können zur Berechnung anstelle der Stoffmenge n die Flächen unter den getrennten Enantiomerenpeaks herangezogen werden. Aufgrund dieser Definition ergibt sich für ein racemisches Gemisch $\{n(R) = n(S)\}$ ein *ee*-Wert von 0 %, während im allgemeinen chemischen Sprachgebrauch ein Wert von > 95 % eine enantiomerenreine Verbindung beschreibt.

3.4.1.2 Zuordnung der Konfiguration

Die Bestimmung der Konfiguration chiraler Verbindungen kann neben NMR-Spektroskopie mittels chiroptischen Methoden und chromatographischen Verfahren erfolgen. Zur Bestimmung der Absolutkonfiguration mittels GC oder HPLC-Analytik sind allerdings enantiomerenreine Referenzverbindungen oder Vergleiche mit Literaturdaten nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die absolute Konfiguration aufgrund der gaschromatographischen Elutionsreihenfolge der Enantiomere an einer chiralen stationären Phase oder nach Überführung der Enantiomere in Diastereomere durch Reaktion mit einem optisch reinen Derivatisierungsreagenz an einer herkömmlichen achiralen stationären Phase bestimmt. Daneben wurde die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie erfolgreich zur Aufklärung der Absolutkonfiguration eingesetzt.

Da in der Literatur ausführliche Beschreibungen der Analytik chiraler Verbindungen vorhanden sind (Schreier et al., 1995), sollen hier nur die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Methoden vorgestellt werden.

3.4.2 Enantiomerencharakterisierung mittels GC-Analytik

3.4.2.1 Multidimensionale Gaschromatographie an chiralen stationären Phasen

Erste Versuche, racemische Gemische an chiralen GC-Phasen zu trennen, stammen aus dem Jahr 1959. Als Trägermaterial wurde Al_2O_3 verwendet und mit einer dünnen Schicht Stärke oder (-)-Diethyltartrat belegt (Karagounis und Lippold, 1959). Die anfänglich entwickelten Phasen waren gepackte Säulen und zeigten nur eine geringe Trennleistung. Zudem wiesen sie eine schlechte Reproduzierbarkeit auf. Erst mit der Einführung hochauflösender Kapillarsäulen in die Gaschromatographie (HRGC: *high*

resolution gas chromatography) gelang der entscheidende Durchbruch (Schreier et al., 1995). Seitdem findet diese Methode eine breite, routinemäßige Anwendung.

Basierend auf ihren unterschiedlichen chiralen Erkennungsarten lassen sich enantiospezifische HRGC-Trennphasen in drei Klassen einteilen:

- Die chirale Erkennung beruht auf Koordinations-Wechselwirkungen mit optisch aktiven Metallchelaten (Schurig, 1980 und 1988). Bei der als Komplexierungs-Gaschromatographie bezeichneten Methode besteht der Selektor, der dem Trägermaterial beigemischt wird, aus einem chiralen Organometallkomplex. Die Wechselwirkung mit dem Selektanden erfolgt über Koordinationskomplexe. Häufig verwendete Metallionen sind Nickel und Kupfer, die mit β -Dicarbonyl-Liganden über die Sauerstofffunktion komplexiert sind. Die Retention beruht auf einer Elektronenabgabe zum Metallkation, so dass mit dieser Analysetechnik unpolare Verbindungen getrennt werden können.
- Die chirale Erkennung beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Trennung der Enantiomere erfolgt durch die schnelle und reversible Bildung von diastereomeren Assoziationskomplexen zwischen den chiralen Probenmolekülen und der stationären Phase, die meist aus optisch aktiven Peptid- oder Aminosäureselektoren besteht. Bei der neueren Generation dieser Trennsäulen werden die Diamidphasen kovalent an ein Silikon-Polymer gebunden, wodurch ihre Stabilität entscheidend verbessert wurde (Frank et al., 1978; Schurig, 1984 und 1986).
- Die chirale Erkennung beruht auf Einschluß-Effekten in modifizierten Cyclodextrinphasen (König et al., 1988; Schurig und Nowotny, 1990). Cyclodextrine, die durch den bakteriellen Abbau von Stärke gewonnen werden, bestehen aus cyclischen α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten. Je nachdem, ob ein Ring aus sechs, sieben oder acht Kohlenhydrat-Monomeren besteht, werden sie als α -, β - oder γ -Cyclodextrine bezeichnet. Sie werden der chromatographischen Grundphase beigemischt oder sind auf dieser kovalent verankert. Neben Inklusionseffekten in den hydrophoben Hohlräumen spielen bei der Enantiomerentrennung auch Wechselwirkungen in der hydrophilen Molekülperipherie eine Rolle. Um einen erfolgreichen Einsatz in der chiralen Gaschromatographie zu ermöglichen, müssen allerdings die stark hydrophilen Hydroxygruppen durch Alkylierung oder Acylierung deaktiviert werden. Verwendet werden Methyl-/Pentyl-, Acetyl-/*tert.*-Butyldimethylsilyl- und Ethyl-/*tert.*-Butyldimethylsilyl-Seitenketten. In Abbildung 3-26 sind die Strukturen chiraler Phasen exemplarisch gezeigt.

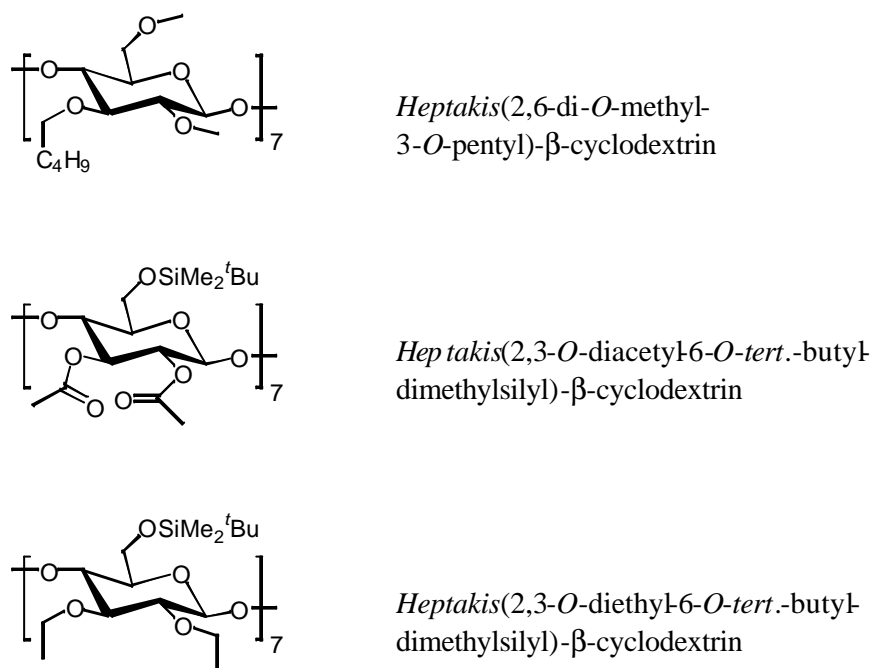


Abb. 3-26: β-Cyclodextrinphasen zur Enantiomerentrennung

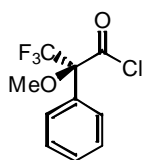
In der vorliegenden Arbeit wurde die Enantiomerenverteilung der biokatalytisch gewonnenen 3-Hydroxysäuren nach Methylierung der Säurefunktion an chiralen HRGC-Phasen bestimmt. Dabei kamen modifizierte β-Cyclodextrin-Phasen zum Einsatz. Aufgrund der gaschromatographischen Elutionsreihenfolge wurde die Konfiguration am Stereozentrum durch Vergleich mit authentischen Referenzverbindungen zugeordnet.

Diese Analytik wurde mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC), durchgeführt (Krammer et al., 1990; Schomburg, 1995; Tomlinson et al., 1996). Hierbei wird eine herkömmliche achirale Säule zur Vortrennung einer Probe verwendet. Durch Steuerung eines *Cut-Ventils* wird nur die relevante Analysenkomponente selektiv auf die chirale Trennphase, die damit in Reihe geschaltet ist, transferiert (MCSS: *Moving-Column-Switching-System*; König, 1998). Dieses gaschromatographische Verfahren ermöglicht die direkte Analyse von komplexen Stoffgemischen und verlängert die Haltbarkeit der teuren chiralen Phasen beträchtlich.

3.4.2.2 *Chirale Derivatisierungsreagenzien*

Die chemische Umwandlung von chiralen Verbindungen zu Diastereomeren (indirekte Methode, vgl. 3.4.1.1) mit enantiomerenreinen Derivatisierungsreagenzien (CDA) war bis vor einigen Jahren die einzige Möglichkeit, Enantiomere gaschromatographisch zu trennen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Vorgehensweise, die ursprünglich von Bailey und Hass (1941) entwickelt wurde, liegt darin, dass zur indirekten Bestimmung des Enantiomerenüberschusses über die Diastereomerenverteilung konventionelle stationäre GC-Phasen verwendet werden können. In vielen Fällen muß jedoch eine zeitaufwendige Probenvorbereitung durchgeführt werden.

Obwohl heute die direkte Methode der gaschromatographischen Enantiomerentrennung bevorzugt eingesetzt wird, stehen mehr als 100 verschiedene CDA's zur Verfügung, um spezifische Problemstellungen in der Stereoanalytik zu lösen (Schreier et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde das Mosher-Säurechlorid (Dale et al., 1969) in hoher optischer Reinheit als CDA zur Bestimmung der Enantiomerenverteilung des synthetisierten 3-Hydroxy-Z11-eicosensäuremethylesters (vgl. Kapitel 4.7.4) verwendet, da diese Verbindung einer direkten Analytik mittels MDGC nicht zugänglich ist. Die absolute Konfiguration der 3-Hydroxysäuren wurde durch Vergleich der gaschromatographischen Elutionsreihenfolge ihrer CDA-Derivate ermittelt. Dazu wurde die synthetisierte Referenzsubstanz 3(*R,S*)-Hydroxy-Z6-dodecensäure (vgl. Kapitel 3.2.2.3 und 4.4.2) sowie das entsprechende enantiomerenangereicherte bakterielle Umsetzungsprodukt herangezogen. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich mit literaturbekannten Referenzverbindungen (Schwab et al., 1989; Hoye und Braun, 1997; Ichikawa et al., 1997).



(*S*)-(+)- α -Methoxy-trifluormethyl-phenylacetic acid chloride (Mosher-Säurechlorid)

3.4.2.3 *Enantiomerenverteilung der Biotransformationsprodukte*

Die Bestimmung der Enantiomerenverteilung der bakteriell gebildeten 3-Hydroxysäuren erfolgte mittels MDGC-Analytik unter Verwendung einer modifizierten β -Cyclodextrinphase als chiraler Säule („Chiral 1“, vgl. Kapitel 4.2.8). Tabelle 37 fasst die Ergebnisse für ausgewählte Umsetzungsprodukte zusammen.

Tab. 3-7: Ergebnisse der MDGC-Analytik ausgewählter Umsetzungsprodukte

Verbindung	% Peak 1	% Peak 2	<i>ee</i> -Wert
3-Hydroxy-Z6-dodecensäure	3	97	94
3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure	6	94	88
3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure	8	92	84
3-Hydroxy-Z6,Z9-dodecadiensäure	5	95	90
3-Hydroxy-Z5,Z8,Z11-tetradecatriensäure	5	95	90
3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure	7	93	86
3-Hydroxy-Z5-dodecensäure	2	98	96
3-Hydroxy-Z5-decensäure	1	99	98
3-Hydroxy-Z5-octensäure	1	99	98
3-Hydroxy-E6-dodecensäure	4	96	92
3-Hydroxy-E5,E8-tetradecadiensäure	7	93	86
3-Hydroxy-dodecensäure	8	92	84
3-Hydroxy-decensäure	2	98	96

Für die Biotransformationsprodukte wurden Enantiomerenüberschüsse im Bereich von 84 – 98 % erhalten. Es stellte sich nun die Frage, ob eine Anreicherung des (*S*)-Enantiomers vorliegt, wie dies für die Hydroxyderivate der β -Oxidation üblich ist. Zur Aufklärung der Absolutkonfiguration wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden angewandt.

3.4.2.4 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses im Verlauf der Biotransformation

Im Rahmen eines Zeitversuchs wurden weitere Untersuchungen bezüglich der aus Linolsäure gebildeten Hauptumsetzungsprodukte 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure durchgeführt. Dazu wurden dem Reaktionsansatz in bestimmten Abständen Aliquote entnommen. Zur Erfassung der Produktzunahme wurde das nach Sterilfiltration der Probe erhaltene Filtrat mittels HPLC-ELSD analysiert (Abb. 3-27).

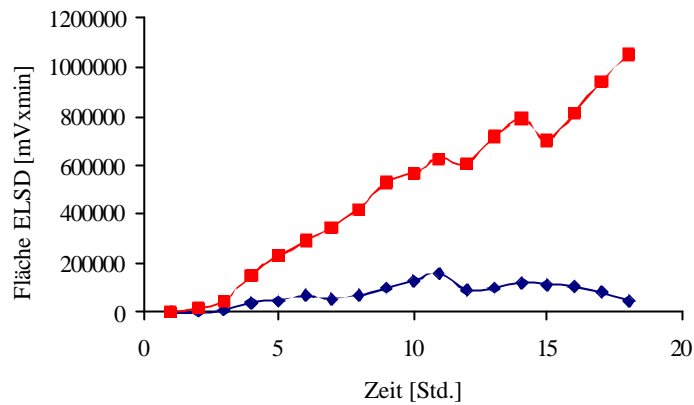


Abb. 3-27: Zeitlicher Verlauf der Bildung von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (◆) und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (■), gebildet aus Linolsäure

Nach Methylierung des Ansatzes erfolgte die Analytik mittels MDGC zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (Abb. 3-28).

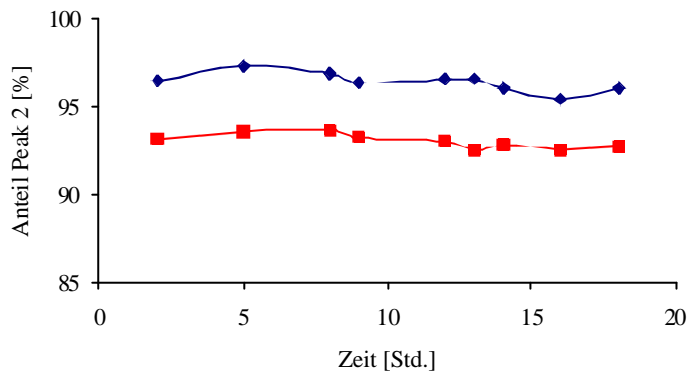


Abb. 3-28: Zeitlicher Verlauf des Enantiomerenüberschusses von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (◆) und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (■), gebildet aus Linolsäure

Es zeigte sich, dass die Menge der beiden durch *Stenotrophomonasmaltophilia* gebildeten Umsetzungsprodukte während des betrachteten Zeitraumes von 18 Stunden zunächst deutlich zunimmt. Dabei ist die Konzentration an 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure um ein Vielfaches höher. Nach etwa 12 Stunden nimmt der Gehalt an 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure wieder leicht ab. Der Enantiomerenüberschuss der Umsetzungsprodukte ist von Beginn an konstant.

3.4.2.5 Bestimmung der Absolutkonfiguration durch MDGC-Analytik von Dodecan-1,3-diol

Zur Aufklärung der Absolutkonfiguration an C3 wurde eines der bakteriellen Umsetzungsprodukte, nämlich 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure unter Erhalt der Konfiguration zu Dodecan-1,3-diol transformiert. Dazu wurde im ersten Schritt die vorhandene Doppelbindung hydriert. Anschließend wurde die Carboxylfunktion zur Hydroxygruppe reduziert. Analog wurde ausgehend von 3-(*R,S*)-Hydroxy-Z6-dodecensäuremethyl ester (vgl. Kapitel 3.2.2.3 und 4.4.1) (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol erhalten. Unter Verwendung von *E2*-Dodecen-1-ol als Edukt wurde im Rahmen einer Sharpless-Epoxidierung (*2S,3S*)-2,3-Epoxy-dodecan-1-ol dargestellt, dessen regioselektive Reduktion zur Bildung von (*S*)-Dodecan-1,3-diol führt. Abbildung 3-29 fasst die Synthesewege zur Verdeutlichung zusammen.

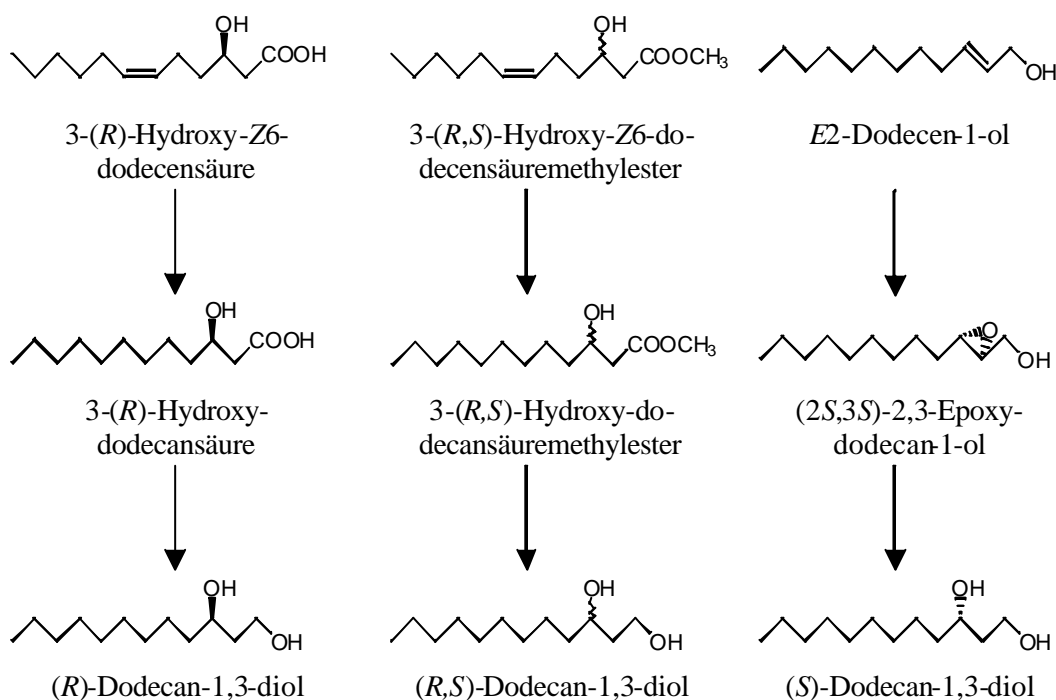


Abb. 3-29: Zusammenfassung der Vorgehensweise zur Darstellung der Dodecan-1,3-diole

Links: Darstellung von (*R*)-Dodecan-1,3-diol (vgl. Kapitel 4.8.1, 4.8.2)

Mitte: Darstellung von (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol (vgl. Kapitel 4.4.1, 4.8.3, 4.8.4)

Rechts: Darstellung von (*S*)-Dodecan-1,3-diol (vgl. Kapitel 4.8.5, 4.8.6)

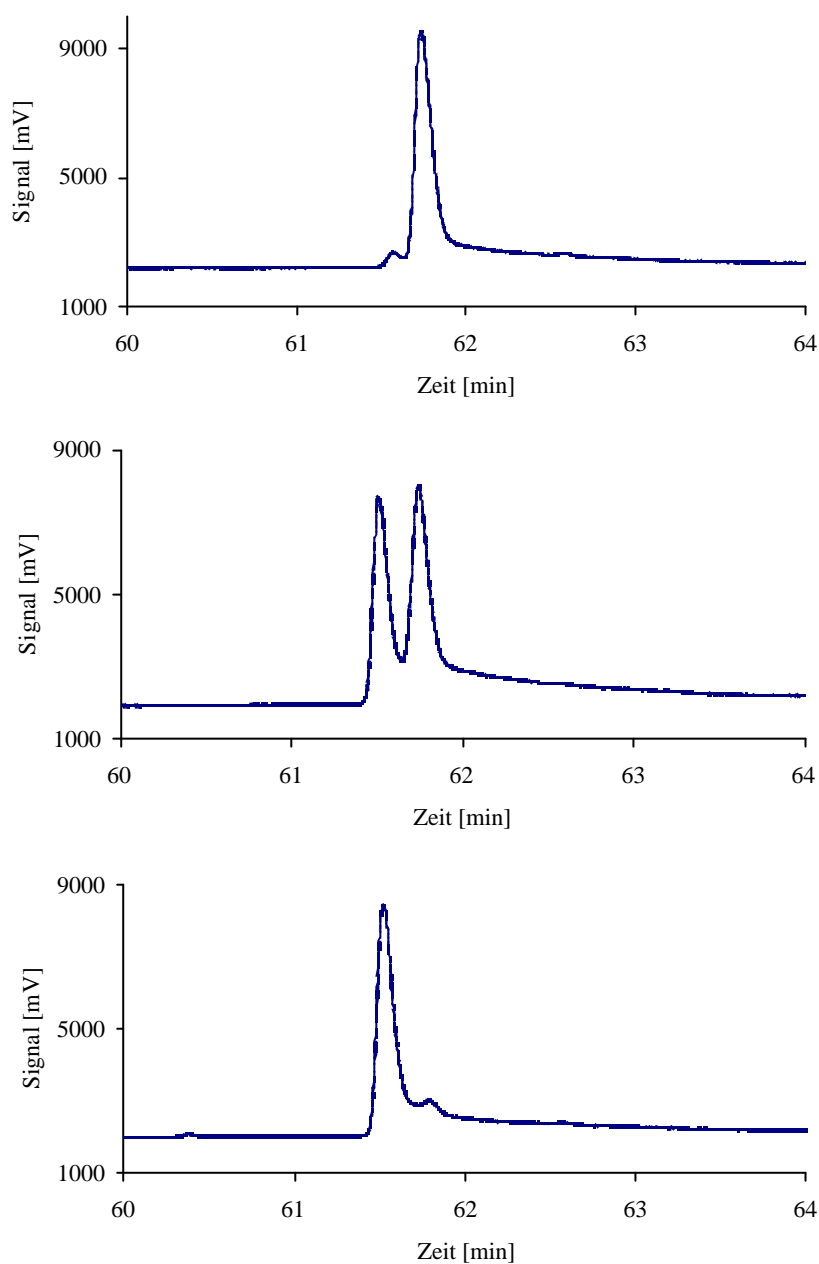


Abb. 3-30: Ergebnisse der MDGC-Analytik der synthetisierten Dodecan-1,3-diole
Oben: (*R*)-Dodecan-1,3-diol; synthetisiert ausgehend von der bakteriell gebildeten 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure
Mitte: (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol
Unten: (*S*)-Dodecan-1,3-diol

Die erhaltenen Dirole wurden anschließend mittels MDGC untersucht. Dabei wurde eine modifizierte β -Cyclodextrinphase als chirale Säule („Chiral 2“, vgl. Kapitel 4.2.8) verwendet. Abbildung 330 gibt die Ergebnisse der Untersuchungen wieder.

Vergleicht man die Elutionsreihenfolge der synthetisierten Referenzsubstanzen miteinander, ergibt sich, dass das (*S*)-Enantiomer der Dodecan-1,3-diole unter den verwendeten Bedingungen vor dem (*R*)-Enantiomer eluiert. Für die Verbindung, die ausgehend von der bakteriell gebildeten 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure erhalten wurde, lässt sich auf dieser Grundlage ein Überschuss (*R*)-Enantiomer bestimmen.

3.4.2.6 Untersuchungen zur Selektivität der Biotransformation

Durch die MDGC-Analytik der synthetisierten Dodecan-1,3-diole konnte gezeigt werden, dass bei der Umsetzung von verschiedenen Fettsäuren als Produkte (*R*)-konfigurierte 3-Hydroxysäuren gebildet werden. Als Intermediate im Verlauf der „normalen“ β -Oxidation treten jedoch 3-(*S*)-Hydroxysäuren auf. Um weitere Informationen zur Selektivität des in *Stenotrophomonasmaltophilia* ablaufenden β -Oxidationsmechanismus zu erhalten, sollte nun eine racemische 3-Hydroxysäure als Substrat an das Bakterium verfüttert werden. Damit war zu überprüfen, ob neben der selektiven Bildung der Produkte auch eines der beiden Enantiomere bevorzugt abgebaut wird. Handelt es sich hierbei um das (*R*)-Enantiomer, kann auf einen (*R*)-selektiven Abbauweg der zugesetzten Verbindungen geschlossen werden.

Um eine 3-Hydroxysäure mit den gewünschten strukturellen Eigenschaften, d.h. entsprechender Kettenlänge sowie mindestens einer *cis*-konfigurierten Doppelbindung zu erhalten, wurde entsprechend dem in Abbildung 331 aufgeführten Schema ausgehend von Ölsäure 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure synthetisiert.

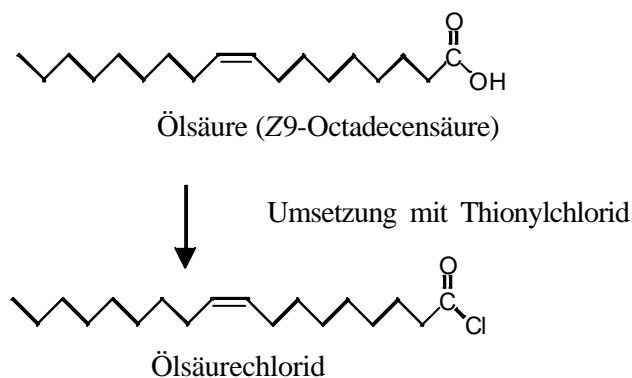


Abb. 3-31 Reaktionsschema zur Synthese von 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure

Fortsetzung von **Abbildung 3-31**:

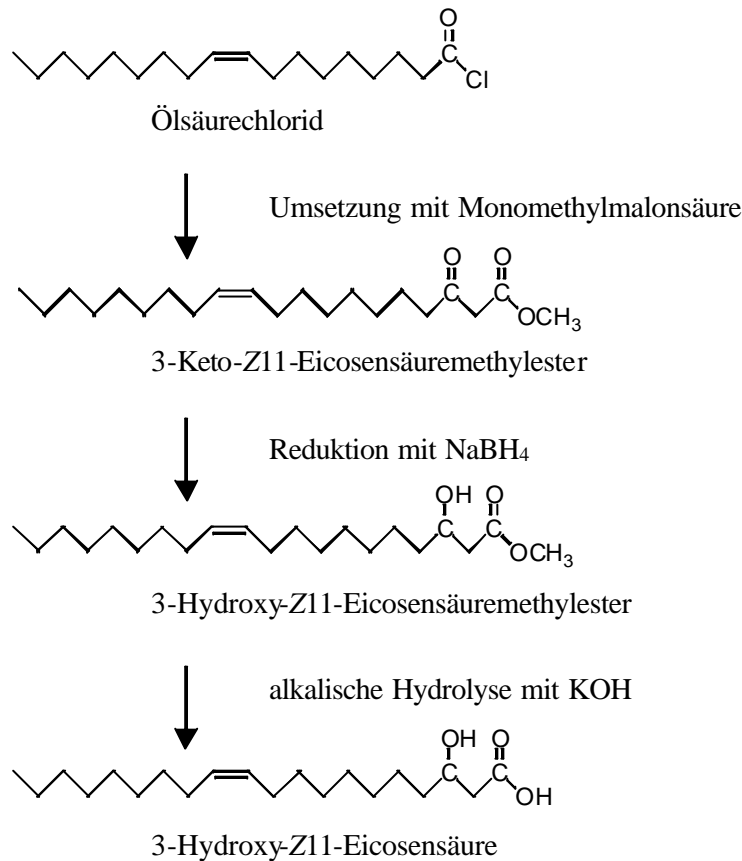


Abb. 3-31: Reaktionsschema zur Synthese von 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure

Nach der Aktivierung der Ölsäure zum entsprechenden Säurechlorid erfolgt die Kettenverlängerung durch Umsetzung mit Monomethylmalonsäure in Anwesenheit von Butyllithium. Der resultierende 3-Ketoester kann mit NaBH₄ zur entsprechenden 3-Hydroxyverbindung reduziert und anschließend alkalisch hydrolysiert werden.

Die synthetisierte Verbindung wurde nach der allgemeinen Vorgehensweise mit *Stenotrophomonas maltophilia* metabolisiert. Bei der Reaktionskontrolle mittels HPLC-ELSD zeigte sich, dass neben noch vorhandener 3-Hydroxy-Z11-Eicosensäure (R_T 42 min) ein Umsetzungsprodukt vorliegt (Abb. 332), das aufgrund seiner Retentionszeit 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure zugeordnet werden konnte. Diese Zuordnung ist nach Isolierung dieser Komponente mittels Massen- und NMR-Spektren bestätigt worden.

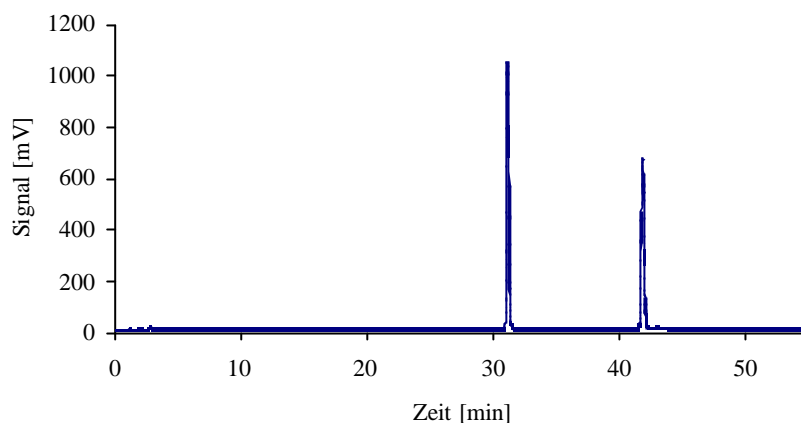


Abb. 3-32 HPLC-Trennung der Umsetzung von 3-Hydroxy-Z11-Eicosensäure mit *Stenotrophomonas maltophilia*

HPLC 1, Trennsäule 1, Fließmittel 1, Gradient 1a, Detektion ELSD

Nach Methylierung wurde das Enantiomerenverhältnis des Umsetzungsproduktes direkt mittels MDGC bestimmt. Es ergab sich ein Überschuss von 88 % zugunsten des (*R*)-Enantiomers (Abb. 3-33).

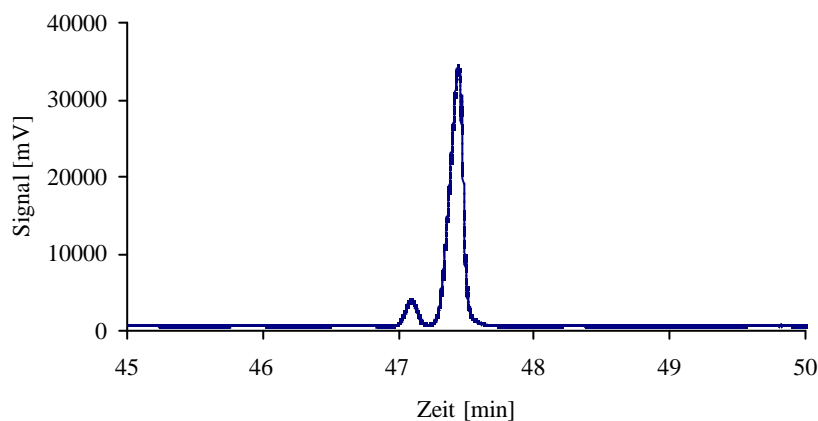


Abb. 3-33: MDGC-Analytik der aus 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure gebildeten 3-Hydroxy-Z5-tetradecensäure (vgl. 4.2.8)

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses der nicht umgesetzten 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure musste diese zunächst mit dem Mosher-Säurechlorid zu den entsprechenden Diastereomeren umgesetzt werden. Anschließend erfolgte die Analytik an einer achiralen Säule (GC 2). Abbildung 3-34 zeigt das Chromatogramm, das für die synthe-

tisierte Substanz erhalten wurde. In Abbildung 335 ist das Ergebnis der Verbindung nach der Umsetzung mit *Stenotrophomonasmaltophilia* dargestellt.

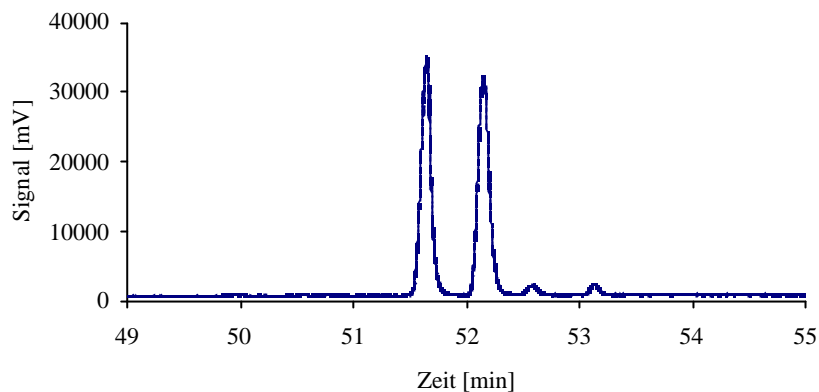


Abb. 3-34: Indirekte Bestimmung der Enantiomerenverteilung von 3-Hydroxy-Z11-Eicosensäure vor der Umsetzung mit *Stenotrophomonasmaltophilia*

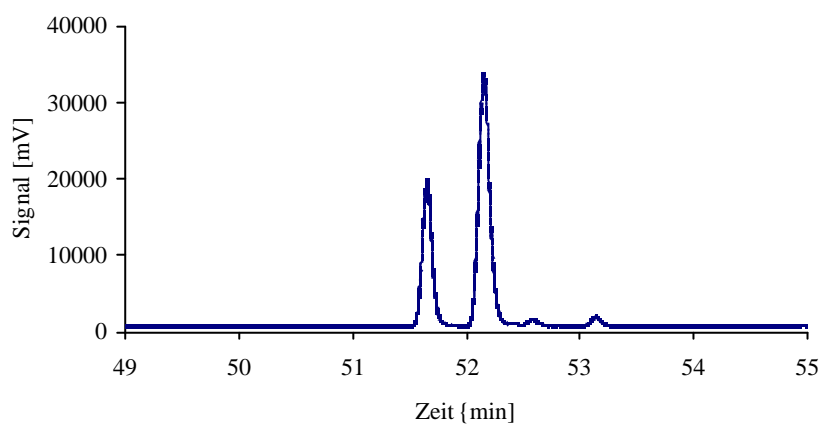


Abb. 3-35: Indirekte Bestimmung der Enantiomerenverteilung von 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure nach der Umsetzung mit *Stenotrophomonasmaltophilia*

Durch Vergleich mit 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure als Referenzverbindung sowie mit Literaturdaten konnte die Elutionsreihenfolge der Mosherdiester von 3-Hydroxy-Z11-eicosensäure bestimmt werden. Es eluiert das (*R,R*) vor dem (*S,R*)-Diastereomer. Auf dieser Grundlage ergab die Auswertung obiger Chromatogramme, dass es nach der Umsetzung der als Racemat eingesetzten Verbindung zu einer Anreicherung des (*S*)-Enan-

tiomers kommt. Das Verhältnis verschiebt sich von 50:50 nach 29:71. *Stenotrophomonas maltophilia* setzt also bevorzugt das (*R*)-Enantiomer der 3-Hydroxysäure um. Da auch die gebildeten Umsetzungsprodukte (*R*)-konfiguriert sind, ist offensichtlich, dass der in *Stenotrophomonas maltophilia* ablaufende β -Oxidationsmechanismus im Gegensatz zur „normalen“ β -Oxidation von Fettsäuren (*R*)-selektiv abläuft.

3.4.3 Enantiomerencharakterisierung mittels CD-Spektroskopie

Mittels MDGC-Analytik von synthetisierten Dodecan-1,3-diolen ist für die biokatalytisch aus Linolsäure gewonnene 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure eindeutig (*R*)-Konfiguration nachgewiesen worden. Aufgrund der gaschromatographischen Elutionsreihenfolge an chiraler Phase lässt sich dies auch für die anderen 3-Hydroxysäuren annehmen. Zur Absicherung dieser Annahme wurde im Rahmen dieser Arbeit die CD Exciton Chirality-Methode zur Aufklärung der Absolutkonfiguration eingesetzt.

3.4.3.1 CD-Spektroskopie

Polarisationszustände des Lichts

Licht kann als elektromagnetische Schwingung verschiedene Polarisationszustände annehmen. Linear polarisiertes Licht einerseits und zirkular polarisiertes Licht andererseits stellen die beiden Grenzzustände dar, zwischen denen sich die Polarisation einer Lichtwelle bewegt.

Im Falle einer linear polarisierten Lichtwelle schwingen der elektrische und damit auch der magnetische Feldvektor jeweils in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle. Die Spitze dieser Vektoren beschreibt eine Sinuskurve in Ausbreitungsrichtung. Liegt eine zirkular polarisierte Lichtwelle vor, rotiert der elektrische Feldvektor um die Ausbreitungsrichtung. Die Vektorspitze beschreibt hier eine Helix. Je nach Rotation im oder gegen den Uhrzeigersinn unterscheidet man zwischen recht-zirkular und links-zirkular polarisiertem Licht. Aus der Addition der beiden Feldvektoren der zirkular polarisierten Lichtwellen erhält man den Feldvektor von linear polarisiertem Licht (Snatzke, 1981; Nakanishi und Berova, 1994).

ORD und CD-Effekt

Eine optisch aktive Verbindung geht unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Teilstrahlen des zirkular polarisierten Lichtes ein, so dass sich die Brechungsindices n_l bzw. n_r und damit die Fortpflanzungsgeschwindigkeiten sowie die Wellenlängen λ_l bzw. λ_r von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht unterscheiden. Nach dem Austritt aus der Probe addieren sich die Vektoren wieder zu linear polarisiertem Licht, dessen Schwingungsebene jetzt aber um den Winkel α gedreht ist. Der Betrag von α ist abhängig von der jeweiligen Verbindung selbst sowie von äußeren Faktoren wie der Konzentration der Lösung, der Küvettenlänge und der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Die Änderung des Drehwinkels in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als optische Rotationsdispersion (ORD) bezeichnet.

Wird linear polarisiertes Licht mit Wellenlängen im Absorptionsbereich der chiralen Verbindung durch die Probe geschickt, wechselt der Drehwert α sein Vorzeichen im Absorptionsmaximum. Diese Erscheinung wird als Cotton-Effekt (CE) bezeichnet. Ein positiver Cotton-Effekt bedeutet, dass sich der Drehwert zu kürzeren Wellenlängen hin von positiv nach negativ ändert. Im umgekehrten Fall spricht man von einem negativen Cotton-Effekt.

Im Bereich der Absorptionsbande besitzt eine chirale Verbindung neben unterschiedlichen Brechungsindices zusätzlich verschiedene Extinktionskoeffizienten für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht. Die beiden zirkularen Teilstrahlen werden unterschiedlich stark absorbiert. Der Effekt des Circular dichroismus (CD), die Abweichung von der linearen Polarisation, tritt auf. Da die beiden Teilstrahlen beim Austritt aus der Probe nun eine unterschiedliche Amplitude besitzen, ist der austretende Summenstrahl elliptisch polarisiert (Snatzke, 1981; Nakanishi und Berova, 1994).

Bei der CD-Spektroskopie wird abwechselnd links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht gleicher Intensität durch die Probe geschickt und die Intensitäten der austretenden Lichtstrahlen gemessen. Der Circular dichroismus wird entweder als molare Elliptizität Θ oder üblicherweise als Extinktionsdifferenz ΔE gemessen. Bei ΔE handelt es sich um die Differenz zwischen der Extinktion für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht ($\Delta E = E_l - E_r$). Wenn ein CD-Effekt auftritt, haben die beiden Teilstrahlen nach dem Austritt unterschiedliche Intensitäten. Aus dem erhaltenen CD-Spektrum kann auf die absolute Konfiguration einer chiralen Verbindung geschlossen werden.

Zusammenhang zwischen optischer Aktivität und Stereochemie

Wie bereits erwähnt, können ORD- und CD-Spektroskopie zur Bestimmung von Konformation und Konfiguration von Molekülen verwendet werden. Es stellt sich also die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Molekülgeometrie und dem Auftreten von chiroptischen Effekten. Nach Pasteur ist die Grundbedingung für das Auftreten einer optischen Aktivität in Lösung die sog. „molekulare Dissymmetrie“, d.h. ein Molekül darf durch Drehung nicht in sein Spiegelbild überführbar sein. Solche Verbindungen bezeichnet man als „chiral“ (vgl. Kapitel 3.4.1). Die geometrische Bedingung dafür ist, dass das Molekül keine Drehspiegelachse enthält. Das Auftreten eines Cotton-Effekts ist an die Anwesenheit eines Chromophors gebunden.

Bei der Wechselwirkung von Licht mit Materie findet eine Energieabsorption nur dann statt, wenn sie bestimmte Bedingungen erfüllt. Zum einen muss die Energie des Lichts genau der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand, die die Elektronen einnehmen können, entsprechen. Zum anderen ist die Anregung mit einem elektrischen Übergangsmoment μ verknüpft.

Um einen CD-Effekt zu erhalten, muss die Elektronenanregung jedoch nicht nur mit einer Ladungsverschiebung, sondern auch mit einer Ladungsrotation verbunden sein. Da rotierende Ladungen ein Magnetfeld erzeugen, tritt zusätzlich ein magnetisches Übergangsmoment m auf. Über diese beiden Übergangsmomente kann die sog. Rotationsstärke R gemäß Gleichung 3-2 definiert werden:

$$R = \mu * m * \cos(\mu, m) \quad (\text{Gl. 3-2})$$

Das Vorzeichen des CD-Effekts, das man für die Bestimmung der absoluten Konfiguration heranzieht, wird nur vom Cosinusterm bestimmt. Schließen die beiden Übergangsmomente einen spitzen Winkel ein (Extremfall: parallele Anordnung), ist der Cosinus und damit der CD positiv. Bei stumpfem Winkel (Extremfall: antiparallele Anordnung), wird der Cosinus und damit der CD negativ. Es tritt kein CD-Effekt auf, wenn entweder μ oder m gleich Null ist oder die beiden senkrecht aufeinander stehen, da der Cosinus eines 90°-Winkels Null ist. Aufgrund dieser Beziehung kann vom CD-Spektrum einer Verbindung auf Lage und Richtung der elektrischen und magnetischen Übergangsmomente und damit auf die räumliche Struktur des Moleküls geschlossen werden (Snatzke, 1981 und 1982; Nakanishi und Berova, 1994).

Die CD Exciton Chirality-Methode

Die CD Exciton Chirality-Methode, die von Nakanishi und Harada entwickelt wurde, ist eine spezielle Anwendung der CD-Spektroskopie. Sie ermöglicht es, den absoluten Drehsinn zwischen zwei und mehr benachbarten chromophoren Gruppen und damit die Konformation und absolute Konfiguration dieser chiralen Verbindungen nach einem nicht empirischen Verfahren zu bestimmen (Harada et al., 1975; Harada und Nakanishi, 1983; Wiesler und Nakanishi, 1989; Nakanishi und Berova, 1994).

Voraussetzung für die Anwendung der Methode ist also das Vorliegen von mindestens zwei Chromophoren in der zu untersuchenden Verbindung. Dabei können diese bereits im Molekül vorhanden sein (z.B. konjugierte Diensysteme; Humpf et al., 1995; Schneider et al., 1997a) oder durch eine Derivatisierung funktioneller Gruppen eingeführt werden. Meist handelt es sich um eine *O*- oder *N*-Acetylierung. Als Chromophore werden üblicherweise symmetrische Moleküle mit hohen Extinktionskoeffizienten und bekannter Richtung des elektrischen Übergangsmomentes μ verwendet. Es ist dabei nicht notwendig, dass beide Chromophore identisch sind.

Die CD Exciton Chirality-Methode basiert auf der Wechselwirkung zwischen den elektrischen Übergangsmomenten benachbarter Chromophore. Dadurch kommt es zu einer Aufspaltung („*splitting*“) der beiden angeregten Zustände in einen energetisch tieferliegenden Zustand A sowie einen energiereichen Zustand B (Abb. 3-40). Die daraus resultierende Split-CD-Kurve ist abhängig von den Extinktionskoeffizienten und dem Unterschied in den Absorptionsmaxima $\Delta\lambda_{\max}$ der beiden Chromophore sowie deren räumlicher Entfernung. Die Amplitude *A* nimmt mit steigendem Extinktionskoeffizienten zu, mit zunehmendem $\Delta\lambda_{\max}$ sowie zunehmender räumlicher Entfernung dagegen ab. Sie wird zudem vom Winkel, den die beiden Chromophore zueinander einnehmen, beeinflusst. Durch die Kopplung der elektrischen Übergangsmomente ist die Anregung des Einzelübergangs eines Chromophors nicht mehr möglich. Es kann nur noch das komplette System, also die Kombination beider Übergänge angeregt werden. Von den beiden möglichen Kombinationen stellt die ungleichsinnige Dipol-Dipol-Wechselwirkung (anziehende Wechselwirkung der Übergangsmomente) den Übergang zum energetisch tieferliegenden Zustand A dar, während die gleichsinnige, abstoßende Wechselwirkung den Übergang zum energiereichen Zustand B darstellt (vgl. Abb. 3-36). Diese Wechselwirkungen lassen sich auch mit Hilfe von Wellenfunktionen berechnen.

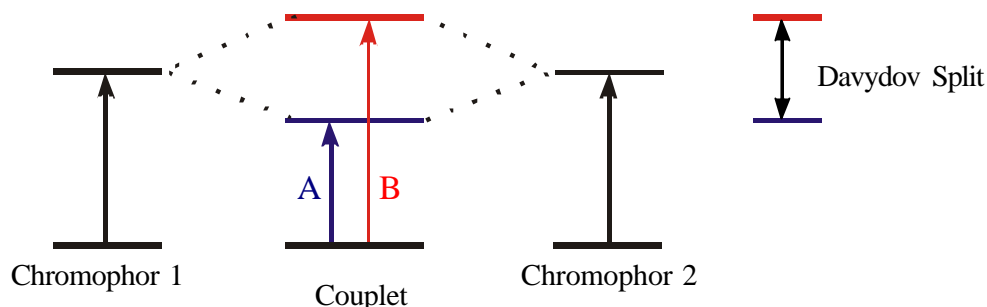


Abb. 3-36: Die Wechselwirkung zwischen den elektrischen Übergangsmomenten führt zu einer Aufspaltung in zwei Energiezustände, den energieärmeren Zustand A und den energiereicheren Zustand B. Die Differenz der Energieniveaus entspricht dem Davydov-Split.

Die Aufspaltung der angeregten Zustände ist im UV-Spektrum oft nur durch eine Kurve mit einfachem Maximum, aber doppelter Intensität erkennbar. Im CD-Spektrum äußert sich die Kopplung dagegen durch das Auftreten von zwei gegeneinander verschobenen Cotton-Effekten, die ein entgegengesetztes Vorzeichen aufweisen. Deren Addition ergibt die typische Split-CD-Kurve mit einem positiven und einem negativen Zweig, wie in Abbildung 3-37 schematisch veranschaulicht ist. Der Kurvenast bei höheren Wellenlängen wird dabei als erster Cotton-Effekt (CE) bezeichnet, der bei niedrigeren Wellenlängen als zweiter CE. Der Abstand zwischen den beiden Cotton-Effekten ist der sogenannte „Davydov-Split“ (Snatzke, 1982; Harada und Nakanishi, 1983).

Nach der Definition ergibt ein positiver erster CE und ein negativer zweiter CE ein positives Couplet; die Verbindung hat positive Chiralität. Um einen Zusammenhang zwischen Molekülgeometrie und Chiralität herzustellen, betrachtet man die Moleküle in der Newman-Projektion. Die Blickrichtung verläuft dabei entlang der GC-Achse der Kohlenstoffe, die die chromophoren Gruppen tragen. Sind die Übergangsdipolmomente der Chromophore im Uhrzeigersinn angeordnet, besitzt die Verbindung positive Chiralität, andernfalls spricht man von negativer Chiralität (Abb. 338). Dabei spielt es keine Rolle, von welcher Seite aus das Molekül betrachtet wird.

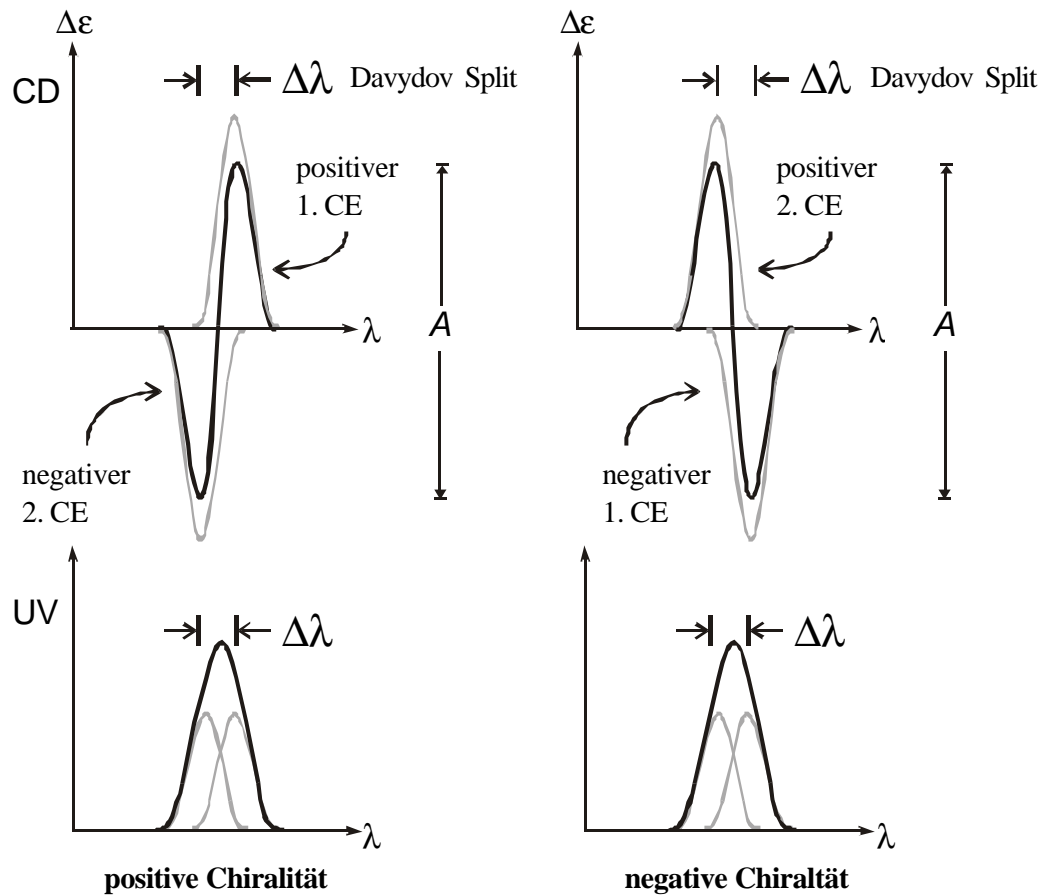


Abb. 3-37: Die Überlagerung der beiden Cotton-Effekte führt zu einem Couplet, dessen Vorzeichen von der Chiralität der Chromophore bestimmt wird. Die Höhe der Amplitude A ergibt sich durch Addition der Beträge des ersten und des zweiten Cotton-Effekts. Die Addition der Teilkurven im UV-Spektrum führt zu einem einzigen Maximum.

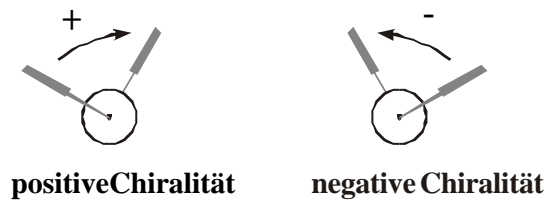


Abb. 3-38: Zusammenhang zwischen Molekülgeometrie und Chiralität

Die absolute räumliche Orientierung der beiden elektrischen Übergangsmomente definiert also das Vorzeichen einer CD-Kurve. Daraus können daher Rückschlüsse auf die absolute Konfiguration einer chiralen Verbindung gezogen werden.

Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde bereits an einer Reihe von Substraten wie 1,2- und 1,3-Polyolen (Rele et al., 1996), Aminen (Huang et al., 1998), 2-Hydroxysäuren (Adam et al., 1998; Hör et al., 1998; Rickman et al., 1998) sowie allylischen und homoallylischen Alkoholen (Hoch et al., 1997; Adam et al., 2000) dargelegt. Für eine ausführliche Beschreibung weiterer Applikationsbeispiele sei auf verschiedene Übersichtsartikel verwiesen (Nakanishi und Berova, 1994; Gawronski, 1995).

3.4.3.2 Absolute Konfiguration der chiralen 3-Hydroxysäuren

Um die CD Exciton Chirality-Methode für die Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Hydroxysäuren anwenden zu können, sind zwei Chromophore im Molekül nötig, die aufgrund von Wechselwirkungen zwischen ihren elektrischen Übergangsmomenten einen CD-Effekt hervorrufen (Gimple et al., 1997). Die Chromophore werden in einer zweistufigen Derivatisierung über die Hydroxygruppe und die Carboxylfunktion der biokatalytisch gewonnenen 3-Hydroxysäuren eingeführt.

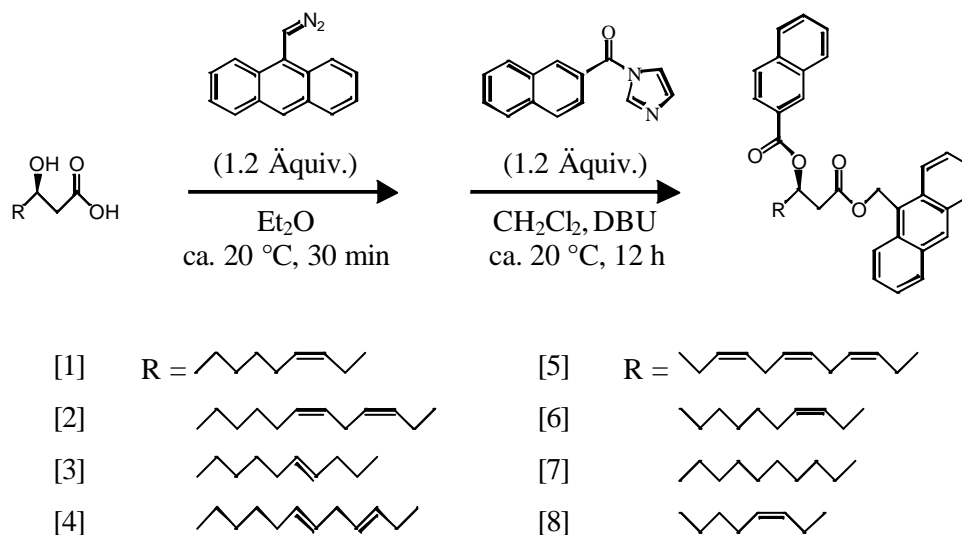


Abb. 3-39: Derivatisierung der chiralen 3-Hydroxysäuren [1] bis [8] zu bichromophoren Diestern

Im ersten Schritt dieser bichromophoren Funktionalisierung wird die Carboxylgruppe der 3-Hydroxysäure selektiv mit Anthryldiazomethan in den entsprechenden 9-Methylanthrylester überführt (Abb. 3-39). Diese Verbindung wurde ursprünglich als Fluoreszenzmarker für die HPLC-Analytik von Fettsäuren entwickelt (Nimura und Kinoshita, 1980). Anschließend wird der 9-Methylanthrylester über seine sekundäre Hydroxygruppe in β -Position mit 2-Naphthoylimidazol in das entsprechende bichromophore Derivat umgewandelt (Abb. 3-39). In Abbildung 3-43 sind die biokatalytisch gewonnenen 3-Hydroxysäuren aufgelistet, welche nach bichromophorer Derivatisierung zur Bestimmung der absoluten Konfiguration UV- und CD-spektroskopisch vermessen wurden.

Die Kombination der chromophoren 9-Methylanthryl- und 2-Naphthoylgruppe führt bei β -Hydroxysäuren zu starken gegensätzlichen Split CD-Kurven der Enantiomere. Aus dem Vorzeichen des experimentellen CD-Couplets lässt sich direkt die Konfiguration ableiten, da die bevorzugte Anordnung der Chromophore im energieärmsten Konformer positive Chiralität für (*R*)-konfigurierte 3-Hydroxysäuren besitzt bzw. umgekehrt und dies durch den Substituenten R am Stereozentrum des bichromophoren Diesters nicht beeinflusst wird. (Gimple et al., 1997).

In Abbildung 3-40 sind repräsentative UV- und CD-Spektren des Derivats 9'-Methylanthryl-(*R*)-3-(2''-naphthoyloxy)-dodec-Z6-enoat dargestellt.

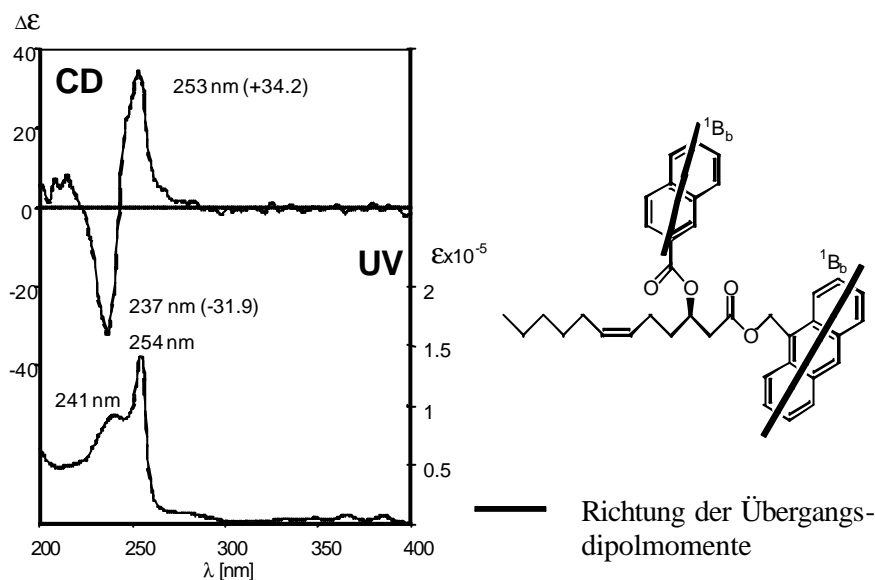


Abb. 3-40: Repräsentatives CD- und UV-Spektrum des bichromophoren Diesters von 3(*R*)-Hydroxy-Z6-dodecensäure in Acetonitril. An der CD- und der UV-Kurve sind jeweils die λ_{ext} ($\Delta\epsilon$)- bzw. λ_{max} -Werte angegeben.

In den bichromophoren Derivaten koppelt das elektrische Übergangsdipolmoment (1B_b) des 9-Methylanthrylchromophors mit dem Übergangsdipolmoment (1B_b) des 2-Naphthoylchromophors. Daraus resultiert eine intensive Split-CD-Kurve mit Extrema bei 254 nm und 237 nm.

In Tabelle 38 sind die CD-Daten der bichromophoren Diester [1] bis [8] zusammengefasst. Die positiven CD-Couplets aller Verbindungen zeigen, dass die elektrischen Übergangsdipolmomente des 9-Methylanthryl- und des 2-Naphthoylchromophors mit positiver Chiralität angeordnet sind, woraus sich die (*R*)-Konfiguration der optisch aktiven 3-Hydroxysäuren ableiten lässt.

Tab. 3-8: CD-Daten, Cotton-Effekte und absolute Konfiguration der bichromophoren Diester [1] bis [8]

Diester	ee^a (%)	λ_{\max} [nm]	Cotton-Effekte			A	Konfiguration
			1. $\Delta\epsilon$	λ_{\max} [nm]	2. $\Delta\epsilon$		
[1]	94	253	34.2	237	- 31.9	66.1	(<i>R</i>)
[2]	88	254	19.7	238	- 16.9	36.6	(<i>R</i>)
[3]	92	253	41.2	236	- 31.4	72.6	(<i>R</i>)
[4]	86	254	29.2	238	- 34.1	63.3	(<i>R</i>)
[5]	90	253	30.5	238	- 33.2	63.7	(<i>R</i>)
[6]	96	254	25.5	238	- 19.3	44.8	(<i>R</i>)
[7]	84	253	34.6	237	- 34.2	68.8	(<i>R</i>)
[8]	98	254	25.9	237	- 28.0	53.9	(<i>R</i>)

^a Die ee -Werte wurden für die mikrobiell gebildeten 3-Hydroxysäuren nach Methylierung mittels MDGC bestimmt (vgl. Kapitel 3.4.2).

Mit Hilfe der CD Exciton Chirality Methode ist es somit gelungen, die absolute Konfiguration optisch aktiver 3-Hydroxysäuren zu bestimmen. Die Ergebnisse, die mittels MDGC-Analytik von aus den 3-Hydroxysäuren hergestellten Derivaten und Vergleich mit Referenzsubstanzen ermittelt wurden, konnten bestätigt und auf die anderen mikrobiell erhaltenen Produkte übertragen werden.

3.5 Untersuchungen zur Reaktionskinetik der 3-(R)-Hydroxysäuren

3.5.1 Das Enzym Lipoxygenase (LOX)

3.5.1.1 Die Lipoxygenase-Katalyse

Lipoxygenasen (LOX, EC 1.13.11.12) sind eine Gruppe nichthäm-eisenhaltiger Dioxygenasen (Veldink und Vliegthart, 1984). Abhängig von ihrem Vorkommen katalysieren sie *in vivo* den Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, d.h. Linol- und Linolensäure in Pflanzen sowie Arachidonsäure in Säugtieren und im Menschen (Axelrod, 1974; Veldink et al., 1977; Yamamoto, 1992). Außer diesen natürlichen Substraten wird eine Vielzahl weiterer mehrfach ungesättigter Fettsäuren dioxygeniert (Hamberg und Samuelsson, 1967; Holman et al., 1969; Hatanaka et al., 1989 und 1990; Hatanaka, 1993), jedoch ist die Substratazeptanz auf langkettige Verbindungen begrenzt. Bei der Katalyse werden Substrate mit einer 1,4-Z,Z-Pentadieneinheit zu den korrespondierenden konjugierten 2,4-E,Z-Hydroperoxiden oxidiert (Abb. 3-41). Dabei verläuft die Katalyse entsprechend der Art und der Herkunft der Lipoxygenase regio- und enantioselektiv.

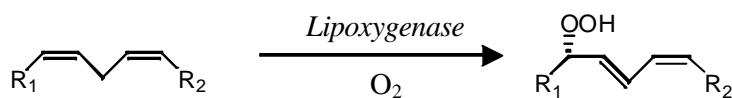


Abb. 3-41: Dioxygenierung 1,4-Z,Z-ungesättigter Fettsäuren durch Lipoxygenase
 R_1 = Carboxylende, R_2 = Methylende der Fettsäure

3.5.1.2 Substrate für Lipoxygenasen

Klassische Lipoxygenasesubstrate weisen drei gemeinsame Strukturelemente auf (Veldink und Vliegthart, 1991):

- eine hydrophile Carboxylgruppe (proximaler Rest)
- ein hydrophobes Methylende
- mindestens ein 1,4-Z,Z-Pentadiensystem

In Abbildung 342 ist dies am Beispiel von Linolsäure verdeutlicht.



Abb. 3-42: Gemeinsame Strukturelemente von Lipoxygenase-Substraten

- proximaler Rest
- Pentadiensystem
- distaler Rest

Mit der Carboxylgruppe verfügt Linolsäure über eine funktionelle Gruppe, welche bei pH 9, dem Aktivitätsoptimum von LOX-1, dissoziiert vorliegt. Das vorhandene 1,4-Z,Z-Pentadiensystem, an dessen doppeltallylständiger Methylengruppe die Abstraktion eines H-Atoms erfolgt, fungiert als Erkennungsmerkmal für Lipoxygenasen. Bei einem „optimalen“ LOX-1 Substrat wie Linolsäure befindet sich diese Methylengruppe in n-8 Position (Kühn et al., 1990). Auch die Kettenlänge der Linolsäure ist ideal für die Dioxygenierung durch LOX-1. C-18 Fettsäuren werden mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität umgesetzt. Bei kürzerkettigen Substraten dagegen verläuft die Reaktion langsamer und weniger selektiv (Hatanaka et al., 1989).

Die hydrophile Carboxylgruppe kann durch geladene Funktionalitäten wie Sulfat oder Säurechloridgruppen, durch Hydroxyfunktionen sowie ungeladene Ester- oder phenolische Gruppen ersetzt werden (Bild et al., 1977; Hatanaka et al., 1989 und 1990; Brash et al., 1987; Roth et al., 1998). *N*-Linolsäureamide werden ebenfalls von LOX-1 dioxygeniert (Van der Stelt et al., 1997). Eine Variation des proximalen Rests wirkt sich allerdings deutlich auf die Umsetzungsgeschwindigkeit wie auch die Selektivität der enzymatischen Umsetzung aus, wobei verschiedene Lipoxygenasen dabei unterschiedliche Tendenzen zeigen können. So weist LOX-1 die höchste Aktivität gegenüber dissoziierten Substraten auf, während die Sojabohnen-Isoenzyme LOX-2 und LOX-3 unpolare Substrate bevorzugen.

Neue Studien am Beispiel der Umsetzung von Curcumin belegen, dass auch Arylalkenole als Substrate von Lipoxygenase akzeptiert werden. Als Produkte konnten bislang jedoch nur sekundär gebildete Bizeyklen, aber keine Hydroperoxide isoliert werden (Schneider et al., 1998; Toth et al., 2000).

Auch das hydrophobe Methylende kann variiert werden, indem beispielsweise der Abstand des Pentadiensystems vom Methylende verändert oder die terminale Methylgruppe durch einen Cyclohexylrest ersetzt wird (Scheller et al., 1995). Von der Lage des

Pentadiensystems relativ zum Methylende wird die Regioselektivität der Enzymkatalyse maßgeblich beeinflusst. Reticulozyten-Lipoxygenase setzt Fettsäuren mit einer doppeltallyständigen Methylgruppe in $n-9$ Position regioselektiv um, während bei $n-8$ und $n-7$ Substraten eine verminderte Regioselektivität zu beobachten ist (Kühn et al., 1990).

Das 1,4-*Z,Z*-Pentadiensystem der Fettsäuren galt bis vor wenigen Jahren als für die Lipoxygenase-Katalyse unabdingbares Strukturelement. Im Jahre 1987 konnten Funk Jr. und Mitarbeiter dagegen zeigen, dass auch *Z,E*- bzw. *E,Z*-konfigurierte Isomere von Linolsäure von Lipoxygenase umgesetzt werden, allerdings mit verminderter Geschwindigkeit. Fettsäureanaloga mit 1-Keto-3-*Z*-en Subeinheiten anstelle des Pentadiensystems wurden ebenfalls als Substrate beschrieben (Wiseman und Nichols, 1988; Grechkin et al., 1991; Kühn et al., 1991). Hier entspricht die Methylengruppe zwischen Keto-funktion und Doppelbindung der doppeltallyständigen Methylengruppe „normaler“ 1,4-*Z,Z*-Pentadiensysteme.

3.5.1.3 *Lipoxygenase-Inhibitoren*

Die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer Inhibitoren von Lipoxygenasen wird seit einigen Jahren intensiv vorangetrieben. Da diese Enzyme an der Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen, den Mediatoren lokaler Immunreaktionen, Entzündungen und Asthma beteiligt sind (Nuhn et al., 1991), zielt die Forschung hier auf die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die als Antiallergika und Antihistaminika Anwendung finden sollen.

Eine Hemmung der LOX-katalysierten Dioxygenierung kann durch eine Vielzahl von Substanzen erreicht werden. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und dem daraus resultierenden Wirkungsmechanismus lassen sich die bekannten Lipoxygenase-Hemmer in drei Gruppen einteilen:

- Substrat- bzw. Produktanaloga
- Komplexbildner
- Antioxidantien bzw. Reduktionsmittel

Inhibierung setzt immer eine Wechselwirkung mit dem Enzym voraus. Substrat- bzw. Produktanaloga konkurrieren mit dem Substrat um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms, ohne selbst umgesetzt zu werden. Sie können aber auch mit anderen Gruppen des Enzyms in Wechselwirkung treten. Zu den LOX-1 Inhibitoren dieser Gruppe gehören unter anderem acetylenische Fettsäuren (Downing et al., 1970; Kühn et al., 1984) und 13-Thia-Fettsäuren (Funk Jr. und Altenecker, 1983; Corey et al., 1986). Auch halogenierte Verbindungen wie 12-Iod-9*Z*-octadecensäure (Rotenberg et al., 1988)

sowie Dien- und Trienfettsäurehydroperoxide (Kim und Sok, 1991) hemmen Lipoxygenase-1 als Substrat- bzw. Produktanaloga.

Inhibitoren der zweiten Gruppe komplexieren primär das Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms in seiner inaktiven Fe(II)- oder in der aktiven Fe(III)-Form. Fe(II) wird durch Zusatz von Cystein in Kombination mit *o*-Phenanthrolin wirkungsvoll komplexiert (Chan, 1973). Als besonders effizienter Komplexbildner für Fe(III) wird Tiron beschrieben (Pistorius und Axelrod, 1974). Unter Verwendung verschiedener Eisenchelatoren wie Desferrioxamin oder Feren S gelang sogar die vollständige Entfernung des Eisens aus dem Enzym (Gibian und Papathanasiou, 1987).

Antioxidantien fangen die bei der Lipoxygenase-Katalyse entstehenden Fettsäure- und Peroxyradikale ab, werden dabei selbst oxidiert und unterbrechen so den Katalysezyklus. Zu dieser Inhibitorkategorie zählen neben natürlichen phenolischen Antioxidantien wie Kaffeesäure auch verschiedene Flavonoide. Künstliche Antioxidantien wie das im Lebensmittelbereich eingesetzte 2,6-Di(*t*-butyl)-4-hydroxytoluol (BHT) sowie eine Reihe von Catecholen sind ebenfalls effektive Lipoxygenase-Inhibitoren dieser Gruppe (Pistorius und Axelrod, 1974; Navaratnam et al., 1988; King und Klein, 1987; Tait et al., 1996). Reduktionsmittel, zum Beispiel Hydroxylamine, Phenylhydrazone oder Azomethine verhindern die Bildung der aktiven Fe(III)-Form bzw. reduzieren das katalytisch aktive Enzym durch Bildung freier Radikale (Clapp et al., 1985; Wallach und Brown, 1981; Pietzsch et al., 1991).

In vielen Studien zur systematischen Erforschung von LOX-Inhibitoren wird LOX-1 aus Sojabohnen anstelle der labilen Säuger-Lipoxygenasen eingesetzt. Diese Vorgehensweise birgt das Risiko in sich, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane Lipoxygenasen nicht in allen Fällen gewährleistet ist. So scheint Reticulozyten-Lipoxygenase gegenüber substratanalogen Acetylenfettsäuren deutlich empfindlicher zu sein als das Enzym aus Sojabohnen (Schewe et al., 1986). Ein Vergleich der IC₅₀-Werte typischer Lipoxygenase-Hemmer mit Sojabohnen- und Reticulozyten-Lipoxygenase ergab jedoch eine gute Korrelation der Hemmwirkungen (Langner et al., 1987; Nuhn et al., 1991). Generell ließen sich im Rahmen der bisher durchgeführten Studien bezüglich der Wirkstärke von Inhibitoren übereinstimmende Tendenzen zwischen LOX-1 und humanen Lipoxygenasen feststellen.

3.5.2 Kinetik der Umsetzung von 3-(R)-Hydroxysäuren mit LOX

3.5.2.1 3-(R)-Hydroxysäuren als Substrate für LOX

Die bei der Umsetzung von Linolsäure bzw. α -Linolensäure mit *Stenotrophomonas maltophilia* gebildeten 3-(R)-Hydroxysäuren 3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure, 3-(R)-Hydroxy-Z6,Z9-dodecadiensäure und 3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8,Z11-tetradecatriensäure erfüllen aufgrund ihrer strukturellen Gegebenheiten die unter 3.5.1.2 genannten Kriterien für ein Lipoxygenase-Substrat. Sie verfügen über mindestens ein 1,4-Z,Z-Pentadiensystem, eine hydrophile Carboxylgruppe sowie ein hydrophobes Methylende. Im Folgenden sollen daher die kinetischen Parameter dieser Verbindungen ermittelt werden.

3.5.2.2 Methoden zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Lipoxygenase-Katalyse

Die Reaktionskinetik der Lipoxygenase-Katalyse kann entweder spektralphotometrisch oder polarographisch ermittelt werden (Abb. 343).

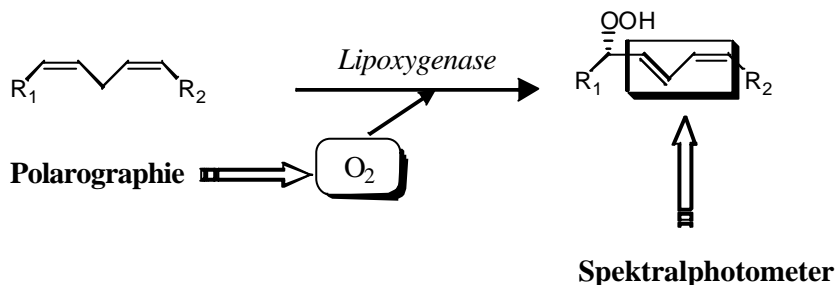


Abb. 3-43: Methoden zur Ermittlung der kinetischen Parameter der Lipoxygenase-Katalyse (Schema)

R₁ = Carboxylende, R₂ = Methylende der Fettsäure

Photometrisch lässt sich der Reaktionsverlauf anhand der Bildung der konjugierten Doppelbindung verfolgen, welche ein Absorptionsmaximum bei 234 nm aufweist. Mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark kann der während der Reaktion auftretende Verbrauch an Sauerstoff gemessen werden. Diese Methode ist zwar unempfindlicher

als die spektralphotometrische Messung, besitzt aber den Vorteil, dass sie auch bei trüben oder stark gefärbten Lösungen einsetzbar ist.

Wegen der leichteren Durchführung wurden die Reaktionskinetiken der 3(*R*)-Hydroxysäuren mit LOX-1 im Rahmen dieser Arbeit spektralphotometrisch ermittelt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Umsatzraten von Linol- und α -Linolensäure als Vergleichssubstanzen sowie der 3(*R*)-Hydroxysäuren bei konstanter Enzym- und steigender Substratkonzentration ermittelt. Abbildung 3-44 gibt die graphische Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit V der Hydroperoxidbildung pro Minute in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$ am Beispiel von Linolsäure wieder.

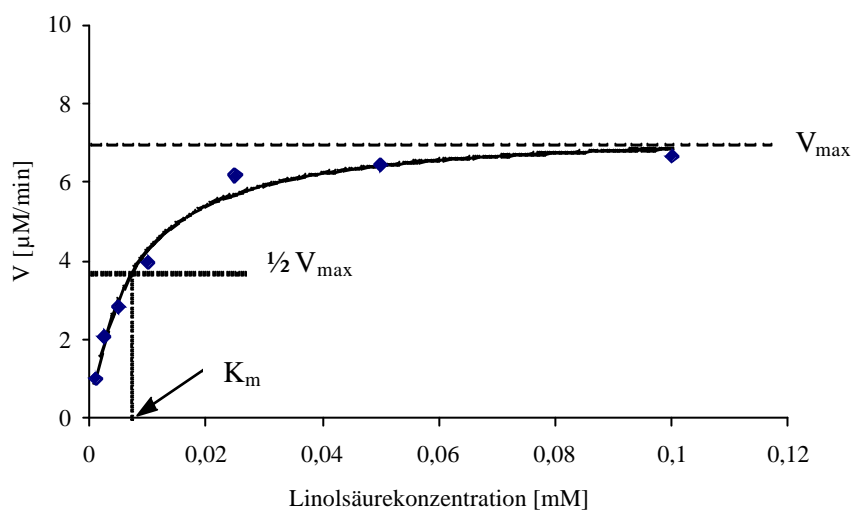


Abb. 3-44: Kinetik der Lipoxygenase-Katalyse am Beispiel von Linolsäure: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit V von der Substratkonzentration $[S]$ (bei konstanter Enzymkonzentration)
 V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit
 K_m = Michaelis-Konstante

Es zeigt sich der typische Verlauf einer hyperbolischen Sättigungskurve. Bei niedrigen Linolsäure-Konzentrationen verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit V annähernd proportional zu dieser. Bei hohen Konzentrationen wird die Geschwindigkeit unabhängig von der Substratkonzentration und nähert sich einem maximalen Wert V_{\max} . In diesem Sättigungsbereich ist die Umsatzrate nur noch von der Enzymmenge abhängig. Durch zunehmende Substratmengen kann kein Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden. Mathematisch lässt sich der Verlauf einer derartigen Hyperbel mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben.

3.5.2.3 Kinetik nach Michaelis-Menten

Michaelis und Menten entwickelten 1913 ein einfaches Modell für Ein-Substrat-Reaktionen, welches die Erfassung der kinetischen Daten vieler enzymkatalysierter Reaktionen auf der Basis der Michaelis-Menten-Gleichung erlaubt (Michaelis und Menten, 1913). Ihre Theorie wurde 1925 von Briggs und Haldane erweitert. Die Michaelis-Menten-Theorie setzt voraus, dass ein Enzym E zunächst mit dem Substrat S reversibel einen Enzym-Substrat-Komplex [ES] bildet. In einem zweiten Schritt zerfällt dieser Komplex, wobei das Produkt P und das Enzym E freigesetzt werden. Der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes ist gemäß Michaelis und Menten der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Basierend auf dieser Annahme lässt sich aus dem Massenwirkungsgesetz bei hohen Substratkonzentrationen die Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 3-3) ableiten:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Gl. 3-3})$$

mit:

V	=	Reaktionsgeschwindigkeit
V _{max}	=	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
[S]	=	Substratkonzentration
K _m	=	Michaelis-Konstante

Durch die Anwendung dieser Gleichung kann die Michaelis-Konstante K_m für ein Substrat bestimmt werden. K_m ist diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht (Abb. 3-48). Sie stellt ein Maß für die Affinität des Substrates zum Enzym dar. Je kleiner K_m, desto höher ist seine Affinität und desto geringer ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird. K_m ist abhängig von den Versuchsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert, weshalb diese Parameter genau eingestellt werden müssen. K_m ist unabhängig von der Enzymkonzentration [E]. Dies gilt nicht für die Maximalgeschwindigkeit V_{max}, die sich proportional zu [E] verhält. Mit der Wechselzahl k_{cat}, dem Quotienten aus V_{max} und [E], lässt sich ein von der Enzymkonzentration unabhängiger Parameter definieren. K_{cat} gibt an, wie viele Substratmoleküle ein Enzymmolekül bei Substratsättigung je Zeiteinheit umsetzen kann und spiegelt damit die Leistungsfähigkeit eines Enzyms wieder. Je größer k_{cat} ist, desto schneller verläuft die enzymkatalysierte Reaktion. Der Quotient aus k_{cat} und K_m wird als Spezifitätskonstante bezeichnet. Dieser Wert dient zur Abschätzung der Gesamteffizienz und -spezifität von Enzymen und wird vor allem dann herangezogen, wenn unterschiedliche Substrate miteinander verglichen werden sollen.

In Abhängigkeit von der Anzahl der an einer enzymatischen Umsetzung beteiligten Substrate unterscheidet man zwischen Ein- und Zwei-Substrat-Reaktionen. Bei der Lipoxygenase-Katalyse handelt es sich um eine Zwei-Substrat-Reaktion mit molekularem Sauerstoff und einer 1,4-Z,Z-Pentadienyl-Verbindung als Substrate. Da die Bestimmung der kinetischen Parameter allerdings in sauerstoffgesättigter Lösung erfolgt, resultiert eine von Sauerstoff unabhängige Reaktionskinetik, aus der sich die kinetischen Parameter gemäß den mathematischen Grundlagen einer Ein-Substrat-Reaktion ermitteln lassen. Somit kann das Michaelis-Menten-Modell auf die gemessenen Daten angewendet werden und die Michaelis-Konstante K_m aus der Sättigungskurve graphisch ermittelt bzw. berechnet werden.

Für die Auswertung der Ergebnisse ist es jedoch vorteilhaft, die Michaelis-Menten-Gleichung in lineare Beziehungen umzuformen. Dazu stehen mehrere Linearisierungsverfahren zur Verfügung. Nach dem bekanntesten Verfahren, benannt nach Lineweaver und Burk, trägt man die reziproken Werte $1/[S]$ und $1/V$ auf der x bzw. y-Achse des Diagramms auf und erhält so eine Gerade mit der Steigung K_m/V_{max} . Diese schneidet die x-Achse in $-1/K_m$, der y-Achsenschnittpunkt liegt bei $1/V_{max}$. Diese Darstellung wird zwar häufig angewandt, stellt aber ohne geeignete Gewichtung der Messpunkte die ungünstigste Transformation dar. Im Eadie-Hofstee-Diagramm, in welchem der Quotient $V/[S]$ (x-Achse) gegen die Geschwindigkeit V (y-Achse) aufgetragen wird, werden Abweichungen von der Gerade, also von der zugrunde liegenden Michaelis-Menten-Kinetik besonders deutlich. Die resultierende Gerade weist die Steigung $-K_m$ auf. Die Schnittpunkte mit x- bzw. y-Achse sind V_{max}/K_m bzw. V_{max} . Für eine graphische Auswertung erweist sich die Darstellung nach Hanes am günstigsten. Wird hier der Quotient aus Substratkonzentration und Geschwindigkeit $[S]/V$ in Abhängigkeit von $[S]$ aufgetragen, entspricht der Schnittpunkt der Geraden (Steigung $1/V_{max}$) mit der x-Achse dem K_m -Wert und der mit der y-Achse K_m/V_{max} (Lasch, 1987; Bisswanger, 1994).

3.5.2.4 Kinetische Parameter der 3-(R)-Hydroxysäuren

Für die Vergleichssubstanzen Linol- und α -Linolensäure wurden unter Anwendung des Linearisierungsverfahren nach Hanes folgende kinetische Parameter ermittelt (Tab. 3-9):

Tab. 3-9: Kinetische Parameter der LOX-Katalyse für Linol- und α -Linolensäure

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$]
Linolsäure	6.3	310	49
α -Linolensäure	17.9	388	22

Diese Werte liegen im Bereich von Literaturangaben (Spaapen et al., 1980; Axelrod et al., 1981; Asbi et al., 1989).

Bei Verwendung der bakteriell gebildeten 3-(R)-Hydroxysäuren als Substrate konnte im Gegensatz zu den Vergleichssubstanzen bei analogen Versuchsparametern photometrisch keine Hydroperoxidbildung festgestellt werden. Auch eine Erhöhung der Enzymkonzentration bis auf den fünffachen Wert pro Ansatz führte in keinem Fall zu einem Absorptionsanstieg bei 234 nm. Die 3-(R)-Hydroxysäuren stellen also keine Substrate für LOX dar. Es stellt sich daher die Frage, ob sie stattdessen als Substratanaloga die LOX-Katalyse hemmen.

3.5.2.5 Mechanismen der Enzyminhibierung

Inhibitoren sind Verbindungen, die die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen herabsetzen. Irreversible Inhibitoren gehen eine kovalente Bindung mit dem Enzym ein und können daher durch physikalische Verfahren nicht entfernt werden. Dagegen binden reversible Inhibitoren umkehrbar an das Enzym und können durch Verdünnung oder Dialyse entfernt werden, so dass die volle katalytische Aktivität des Enzyms wiederhergestellt wird. Reversible Inhibitoren bilden in der Regel schnell ein Gleichgewichtssystem mit dem Enzym aus und zeigen einen definierten Inhibierungsgrad. Dieser ist abhängig von den Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner (Substrat S, Enzym E, Inhibitor I) und im allgemeinen während der Dauer einer Messung konstant (Palmer, 1981; Lasch, 1987).

Je nach Mechanismus der Hemmung lassen sich reversible Inhibitoren in drei Klassen einteilen:

- *Kompetitive Hemmung*

Verbindungen, die mit dem Substrat direkt oder indirekt um die Bindung an das katalytische Zentrum konkurrieren, selbst aber nicht umgesetzt werden, bezeichnet man als kompetitive Inhibitoren. In der Regel sind sie dem Substrat strukturell ähnlich (Substratanalogen). Kompetitive Hemmer binden meist direkt an das aktive Zentrum des freien Enzyms oder in seltenen Fällen an eine andere Stelle des Moleküls. In jedem Fall schließen Substrat- und Inhibitorwirkung einander wechselseitig aus.

Der Enzym-Inhibitor-Komplex ist ein sog. „*dead-end*“-Komplex, der nicht zu einem Produkt führen kann. Die Hemmung lässt sich durch Sättigung des Enzyms mit Substrat wieder aufheben. Daher spricht man auch von kompetitiver Verdrängung. Bezüglich der kinetischen Parameter bedeutet dies, dass der Inhibitor V_{\max} nicht

beeinflusst. Dagegen ist die Michaelis-Konstante K_m in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors erhöht, was sich der graphischen Darstellung der Messwerte unmittelbar entnehmen lässt.

- *Unkompetitive Hemmung*

Die unkompetitive Hemmung ist ein selten auftretender Hemmtyp. Der Inhibitor bindet hier nur an den Enzym-Substrat-Komplex, nicht aber an das freie Enzym. Die Substratbindung bewirkt eine Konformationsänderung am Enzym und geht somit der Inhibitorbindung voraus. Außerdem ist es möglich, dass der Inhibitor direkt mit dem gebundenen Substrat reagiert. Der Inhibitor konkurriert hier also nicht mit dem Substrat um das aktive Zentrum, die Wirkung kann somit nicht durch eine erhöhte Substratkonzentration aufgehoben werden. In diesem Fall sind sowohl V_{max} als auch K_m von der Inhibierung betroffen.

- *Nicht-Kompetitive Hemmung*

Bei dieser Form der Hemmung bindet der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms als das Substrat. Der gebildete Enzym-Inhibitor-Komplex setzt gebundenes Substrat schlechter oder gar nicht mehr zum Produkt um. Assoziiert ein Enzym mit einem nicht-kompetitiven Inhibitor, so führt dies zu einer Veränderung der Konformation von Protein und/oder Substrat, so dass der katalytische Schritt teilweise oder vollständig blockiert wird. Die effektive Enzymkonzentration wird durch den Inhibitor also reduziert, so dass V_{max} kleiner wird, K_m aber nicht betroffen ist, da weder Inhibitor noch Substrat die Bindung des jeweils anderen am Enzym beeinflussen.

Neben den genannten Formen der Enzymhemmung gibt es noch gemischte Inhibierungstypen, partielle Inhibierung, allosterische Inhibierung sowie die Substratinhibierung (Palmer, 1981; Lasch, 1987; Bisswanger, 1994).

Zur Durchführung von Inhibitorstudien stehen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Ist der Mechanismus der Inhibierung unbekannt, nimmt man eine Michaelis-Menten-Kinetik unter Zusatz einer jeweils konstanten Inhibitorkonzentration auf. Zur Absicherung der Ergebnisse sollten dabei mindestens zwei unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen gewählt werden. Aus den dabei erhaltenen, veränderten Werten für V_{max} und K_m lassen sich der Inhibortyp bestimmen und die Inhibitor-konstante K_i berechnen. Ist der Inhibortyp bereits bekannt, ist es ausreichend, bei zwei verschiedenen, konstant gehaltenen Substratkonzentrationen jeweils die Inhibitor-konzentration zu variieren (sog. Dixon-Plot).

Da für die isolierten 3-(R)-Hydroxysäuren der Mechanismus der kompetitiven Hemmung angenommen wurde, erfolgte die Aufnahme von Kinetiken unter konstantem Zusatz der Verbindungen.

3.5.2.6 Inhibierung von LOX durch 3-(R)-Hydroxysäuren als Substratanaloga

Unter konstantem Zusatz von 10 μM 3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure pro Ansatz wurde eine Kinetik von Linolsäure als Substrat nach Michaelis-Menten aufgenommen. Diese wurde mit einer Kinetik ohne Inhibitorzusatz verglichen. Abbildung 3-45 zeigt die Ergebnisse, die nach der Auswertung entsprechend dem Hanes-Verfahren erhalten wurden.

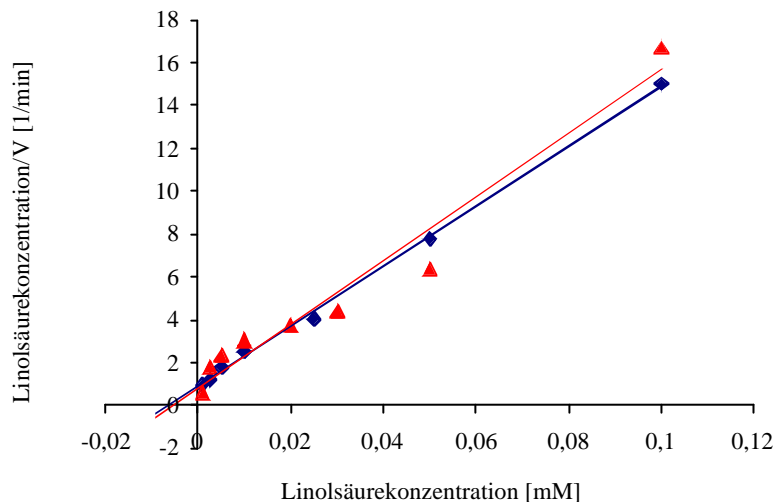


Abb. 3-45: Hanes-Diagramm zur Bestimmung der kinetischen Parameter der LOX-Katalyse

- ◆ Linolsäure als Substrat (zunehmende Konzentration)
- ▲ Linolsäure als Substrat, Zusatz von 3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure (10 μM pro Ansatz)

Aus obiger Abbildung geht hervor, dass der Zusatz von 3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure keinen Einfluss auf die LOX-katalysierte Hydroperoxidbildung aus Linolsäure hat. Um auszuschließen, dass die gewählte Konzentration des potentiellen Inhibitors falsch gewählt wurde, wurden drei verschiedene Konzentrationen an Linolsäure (5, 10 und 25 μM) unter Zusatz von jeweils fünf verschiedenen Mengen an 3-(R)-Hydroxy-

Z5,Z8-tetradecadiensäure im Bereich von 5 bis 100 μM mit LOX umgesetzt. Zusätzlich wurde ein Vergleichswert ohne Zusatz angefertigt. Die photometrisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten, die pro Ansatz den Mittelwert aus drei Bestimmungen darstellen, wurden in Abbildung 346 in Form eines Balkendiagramms miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass der Zusatz der 3-Hydroxysäure unabhängig von der Konzentration bei keiner der gewählten Linolsäurekonzentrationen eine signifikante Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Hydroperoxidbildung hat. Daraus kann gefolgert werden, dass die 3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure nicht als Inhibitor des Enzyms Lipoxygenase bei der Umsetzung von Linolsäure fungiert.

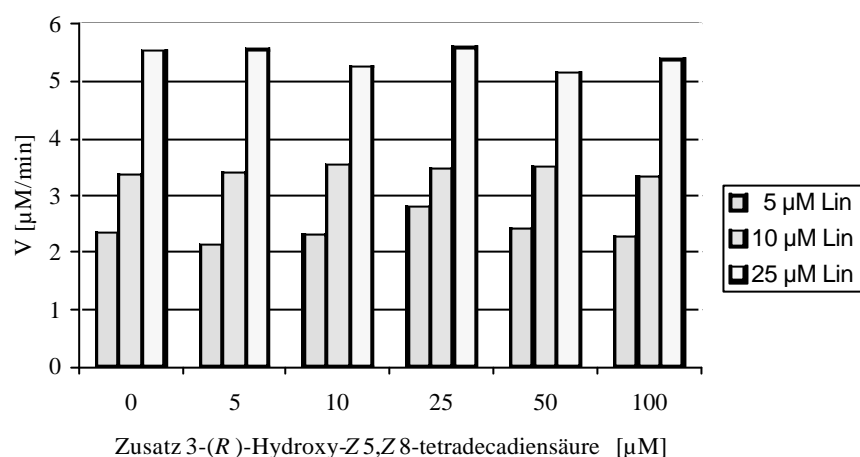


Abb. 3-46: Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der LOX-katalysierten Umsetzung von 5, 10 und 25 μM Linolsäure unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an 3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure zur Erfassung einer möglichen Inhibitorwirkung

Analoge Ergebnisse wurden auch für die anderen getesteten Verbindungen, nämlich 3-(*R*)-Hydroxy-Z6,Z9-dodecadiensäure und 3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8,Z11-tetradecatriensäure erhalten. Auch diese stellen trotz ihrer strukturellen Gegebenheiten weder ein Substrat noch einen Inhibitor für Lipoxygenase Typ L-1 aus Sojabohnen dar.

3.6 Charakterisierung weiterer Mikroorganismen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden neben *Stenotrophomonasmaltophilia* weitere Bakterien isoliert, die exogen zugeführte Linolsäure zu kettenverkürzten, in Position 3 hydroxylierten Metaboliten umsetzen. Ihre Charakterisierung wurde analog zur Identifizierung von *Stenotrophomonasmaltophilia* durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.2).

Während einige Stämme bereits aufgrund charakteristischer phänotypischer Merkmale eindeutig zugeordnet werden konnten, führte bei anderen erst die Sequenzierung der ribosomalen 16S-RNA zu einer zweifelsfreien Identifizierung.

3.6.1 Phänotypische Charakterisierung

Die aus einer Bodenprobe isolierten Stämme mit den internen Laborbezeichnungen BP3-77, BP3-82 und BP3-93 setzen Linolsäure analog zu *Stenotrophomonasmaltophilia* effizient und reproduzierbar zu 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure als Hauptprodukt um. Zur Identifizierung wurde zunächst das Wachstum der Stämme auf verschiedenen Selektivnährböden getestet. Dies ermöglicht bereits eine grobe taxonomische Einordnung und bestimmt so die weitere Vorgehensweise. Weiterhin wurden Nachweise auf das Vorliegen von Oxidase und DNase durchgeführt. In Tabelle 3-10 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Tab. 3-10: Charakterisierung der Stämme BP3-77, BP3-82 und BP3-93

Test	Ergebnis für BP3-77	Ergebnis für BP3-82	Ergebnis für BP3-93
Wachstum auf Mac Conkey-Agar ^{a)}	positiv	positiv	positiv
Wachstum auf Cetrimid-Agar ^{b)}	negativ	positiv	negativ
Nachweis von Oxidase	positiv	positiv	positiv
Nachweis von DNase	negativ	negativ	negativ

^{a)} Selektivagar für Gram-negative Stäbchen (vgl. 4.6.3.1)

^{b)} Selektivagar für Pseudomonaden (vgl. 4.6.3.2)

Durch den positiven Oxidase-Nachweis und den negativen DNase-Nachweis konnte bereits ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vorliegenden Stämmen um *Stenotrophomonasmaltophilia* handelt.

Zur weiteren Identifizierung wurde von den Isolaten unter Verwendung des APIZYM 20 NE-Testsystems ein Stoffwechselprofil erstellt. Tabelle 311 fasst die Ergebnisse für BP3-77, BP3-82 und BP3-93 im Vergleich zu *Stenotrophomonas maltophilia* zusammen (siehe Kapitel 3.1.2.1; Tab. 3-1).

Tab. 3-11: Reaktionen des APIZYM 20 NE-Tests und deren Ergebnisse für die isolierten Stämme BP3-77, BP3-82 und BP3-93 im Vergleich zu den Ergebnissen für *Stenotrophomonasmaltophilia*

Testreaktion	Ergebnis BP3-77	Ergebnis BP3-82	Ergebnis BP3-93	<i>S. malto- philia</i>
Nitratreduktion	+	-	-	-
Bildung von Indol aus Tryptophan	-	-	-	-
Fermentation von Glucose	-	-	-	-
Nachweis von Arginindihydrolase	-	+	+	-
Nachweis von Urease	-	+	-	+
Nachweis von β -Glucosidase	-	-	-	+
Nachweis von Proteaseaktivität	-	-	-	+
Nachweis von β -Galaktosidase	-	-	-	+
Assimilation von Glucose	-	+	+	+
Assimilation von Arabinose	-	+	+	-
Assimilation von Mannose	-	+	+	+
Assimilation von Mannit	-	-	+	-
Assimilation von <i>N</i> -Acetylglucosamin	-	-	+	+
Assimilation von Maltose	-	-	-	+
Assimilation von Gluconat	+	+	+	-
Assimilation von Caprat	-	+	+	+
Assimilation von Adipat	+	-	-	-
Assimilation von Malat	+	+	+	+
Assimilation von Citrat	+	+	+	+
Assimilation von Phenylacetat	+	-	-	-

Anhand dieser Ergebnisse konnte bereits eine eindeutige Zuordnung der Stämme BP3-77 und BP3-93 getroffen werden. Bei BP3-77 handelt es sich um *Alcaligenes denitrificans*. BP3-93 konnte als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert werden. Für diesen Stamm wurde beim Wachstumstest auf Cetrimid-Agar ein negatives Ergebnis erhalten (vgl. Tab. 3-10). Dieser Selektivagar wurde ursprünglich zur Isolierung und Differenzierung von *Pseudomonasaeruginosa* aus verschiedenen Materialien ent-

wickelt (Brown und Lowbury, 1965). Heute wird er generell als Vorprobe zur Identifizierung von Pseudomonaden herangezogen. *Pseudomonas fluorescens* stellt allerdings zusammen mit einigen anderen Pseudomonaden (z.B. *Pseudomonas stutzeri*) eine Ausnahme dar und kann mit diesem Test nicht erfasst werden.

Die Auswertung des APIZYM-Tests deutet darauf hin, dass es sich bei BP3-82 um *Pseudomonas putida* handelt. Dieses Bakterium zeigt ein ähnliches Reaktionsprofil wie *Pseudomonas fluorescens*. Da eine eindeutige Differenzierung beider Stämme auf Genusebene möglich ist, wurde für BP3-82 zusätzlich eine genotypische Charakterisierung durchgeführt.

3.6.2 Genotypische Charakterisierung

Für den isolierten Stamm BP3-82 wurde als Ergänzung und Absicherung des Ergebnisses der phänotypischen Charakterisierung die partielle Sequenz der ribosomalen 16S-RNA ermittelt. Zusätzlich wurde ein weiteres Isolat (BP3-98, interne Laborbezeichnung der Kultur) sequenziert. Für diesen Stamm deuteten die Vorproben (Oxidase: positiv, DNase: negativ) ebenfalls auf das Vorliegen einer *Pseudomonas* Spezies hin.

Mit Hilfe eines computergestützten „Alignments“ (Vergleich der Sequenz mit den Einträgen in Datenbanken, hier EMBL = European Molecular Biology Laboratory) konnten die isolierten Bakterien identifiziert werden.

Bei BP3-81 konnte das Ergebnis des APIZYM-Tests bestätigt werden. Es handelt sich um *Pseudomonas putida*. Die ermittelte Sequenz mit einer Länge von 317 Nukleinsäuren wies eine 99 %ige Homologie zu der in der Datenbank eingetragenen Sequenz auf.

Die Sequenz, die für BP3-98 erhalten wurde (313 Nukleinsäuren) zeigte ebenfalls eine Homologie von 99 % zu einem der Datenbankeinträge. Der Stamm konnte als *Pseudomonas* sp. **NN016918** (Johnsen und Nielsen, 1999) identifiziert werden.

3.6.3 Untersuchungen zur Selektivität

Die oben genannten Stämme bilden bei Zugabe von Linolsäure analog zu *Stenotrophomonas maltophilia* 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure als Nebenprodukt sowie 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure als Hauptprodukt. In *Stenotrophomonas maltophilia* werden diese hydroxylierten Metabolite (*R*)-konfiguriert gebildet und unterscheiden sich damit von den Intermediaten der „normalen“ β -Oxidation.

Um zu überprüfen, ob die anderen isolierten Stämme ebenfalls diese abweichende Stereoselektivität zeigen, wurden die gebildeten Produkte methyliert und mittels MDGC analysiert. Abbildung 3-47 zeigt die Ergebnisse für *Alcaligenesdenitrificans* (BP3-77) und *Pseudomonasfluorescens* (BP3-93).

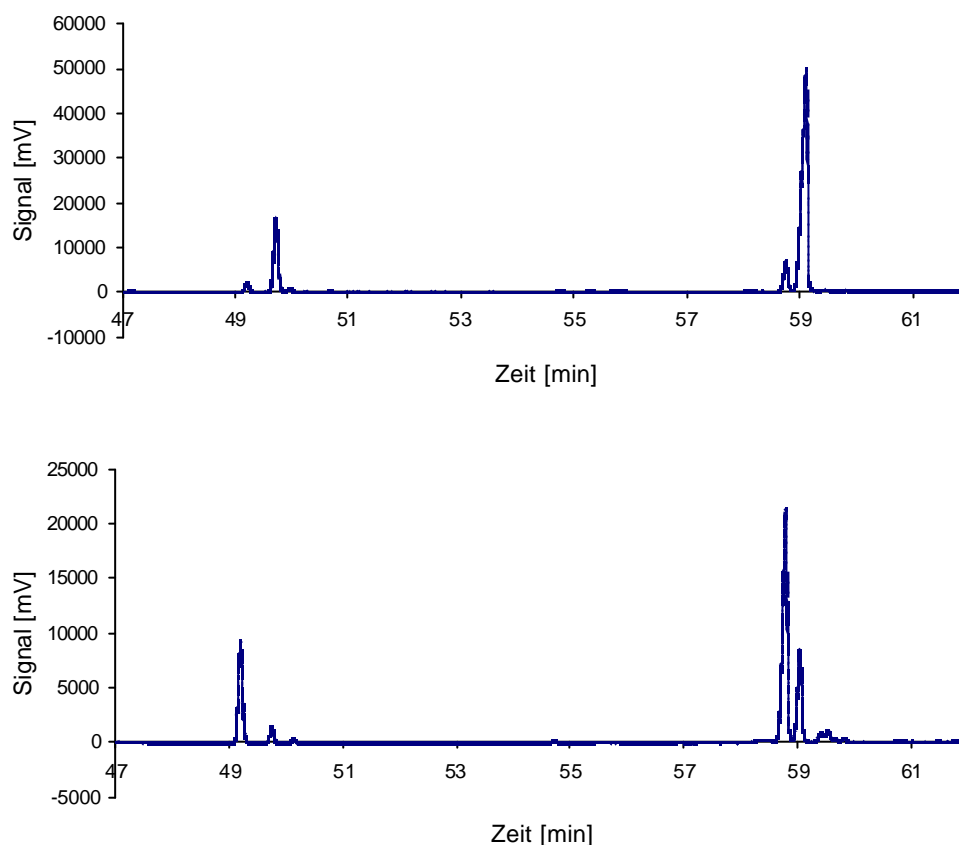


Abb. 3-47: Ergebnisse der MDGC-Analytik von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure und 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure, gebildet aus Linolsäure von *Alcaligenesdenitrificans* (oben) und *Pseudomonasfluorescens* (unten)

Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den für die Umsetzung von Linolsäure durch *Stenotrophomonasmaltophilia* erhaltenen Daten ergab, dass die von *Alcaligenesdenitrificans* gebildeten 3-Hydroxysäuren ebenfalls (*R*)-konfiguriert sind. Bei der Biotransformation durch *Pseudomonasfluorescens* kommt es dagegen zur Anreicherung von 3-Hydroxysäuren, in denen (*S*)-Konfiguration vorliegt. Damit liegt zwischen diesen Stämmen ein deutlicher Unterschied bezüglich des ablaufenden β -Oxidationsmechanismus vor.

Weiterhin bekräftigt dieses Ergebnis die Relevanz vorhandener *cis*-Doppelbindungen als Voraussetzung für die Akkumulation von 3-Hydroxysäuren in den isolierten Mikroorganismen. Werden wie in *Stenotrophomonasmaltophilia* und *Alcaligenes denitrificans* (*R*)-konfigurierte Hydroxyintermediate gebildet, kann deren Anreicherung durch die Selektivität der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase bedingt sein. In den meisten Organismen setzen diese Enzyme spezifisch nur (*S*)-konfigurierte Substrate um. Fehlen entsprechende Enzyme zur Epimerisierung der (*R*)- in die (*S*)-Enantiomere kommt es zur Akkumulation. Für *Stenotrophomonasmaltophilia* deuten die Ergebnisse jedoch auf das Vorliegen eines (*R*)-selektiven Abbaumechanismus hin. Weiterhin werden die 3-Hydroxysäuren auch in *Pseudomonas fluorescens* angereichert, obwohl sie die „richtige“ Konfiguration für den weiteren Abbau aufweisen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass nicht die Konfiguration der 3-Hydroxysäuren, sondern das Vorhandensein einer *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 als „*metabolicblock*“ eine Rolle spielt.

3.7 Diskussion der Ergebnisse

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde aus einer Bodenprobe ein Mikroorganismus isoliert, der exogen zugeführte Linolsäure zu drei polaren Produkten umsetzt. Anhand einer phänotypische und genotypische Charakterisierung konnte der vorliegende Stamm als *Stenotrophomonas maltophilia*, ein ubiquitär vorkommendes Bodenbakterium, identifiziert werden. Die Strukturaufklärung der isolierten Umsetzungsprodukte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) sowie verschiedenen ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{13}\text{C-DEPT}$, H/H-COSY, HMQC, HMBC) ergab, dass kettenverkürzte Metabolite gebildet werden, die in Position 3 hydroxyliert sind. Es handelt sich um 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure, 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure und 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure.

Die Bildung dieser Produkte kann anhand des in Abbildung 3-48 dargestellten β -Oxidationsmechanismus erklärt werden. Ausgehend von Linolsäure erfolgt zunächst die Kettenverkürzung auf 16 C-Atome durch einen vollständigen β -Oxidationszyklus. Nach den ersten Reaktionen der folgenden Sequenz, der Dehydrogenierung unter Bildung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 und deren Hydratisierung, liegt 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure als Metabolit vor. Im Vergleich zu den anderen Umsetzungsprodukten ist dessen Konzentration jedoch gering. Die Vervollständigung dieses β -Oxidationszyklus führt zur Verkürzung des Kohlenstoffgerüsts auf 14 C-Atome. Diese Verbindung ist analog zu den anderen nicht-hydroxylierten Zwischenstufen in den Extrakten nicht nachweisbar. Durch erneute Dehydrogenierung und anschließende Hydratisierung wird das Hauptumsetzungsprodukt 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure gebildet. Ist diese Reaktionsfolge durch Oxidation zur entsprechenden 3-Ketoverbindung und thiolytische Spaltung komplettiert, liegt eine Verbindung mit 12 C-Atomen und einer *cis*-Doppelbindung zwischen C3 und C4 vor. Katalysiert durch eine Δ^3,Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (vgl. Kapitel 2.3.1.8) ändern sich Position und Konformation dieser Doppelbindung. Im folgenden β -Oxidationszyklus kann 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure gebildet werden. Ein alternativer Weg zur Bildung der 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure ist der sogenannte „Reduktase-Weg“. Beim Vorliegen einer *cis*-5-Enoyl-CoA-Reduktase (Tserng und Jin, 1991) in *Stenotrophomonas maltophilia* wird ausgehend von Z5,Z8-Tetradecadiensäure im Rahmen einer NADPH-abhängigen Reduktion Z8-tetradecensäure gebildet. Durch die Hydroxylierung in der β -Oxidation entsteht daraus 3-Hydroxy-Z8-Tetradecensäure. Dieser hydroxylierte Metabolit kann in den Extrakten der Umsetzungen von Linolsäure mit *Stenotrophomonas maltophilia* nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer β -Oxidationszyklus führt jedoch zur Bildung von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure.

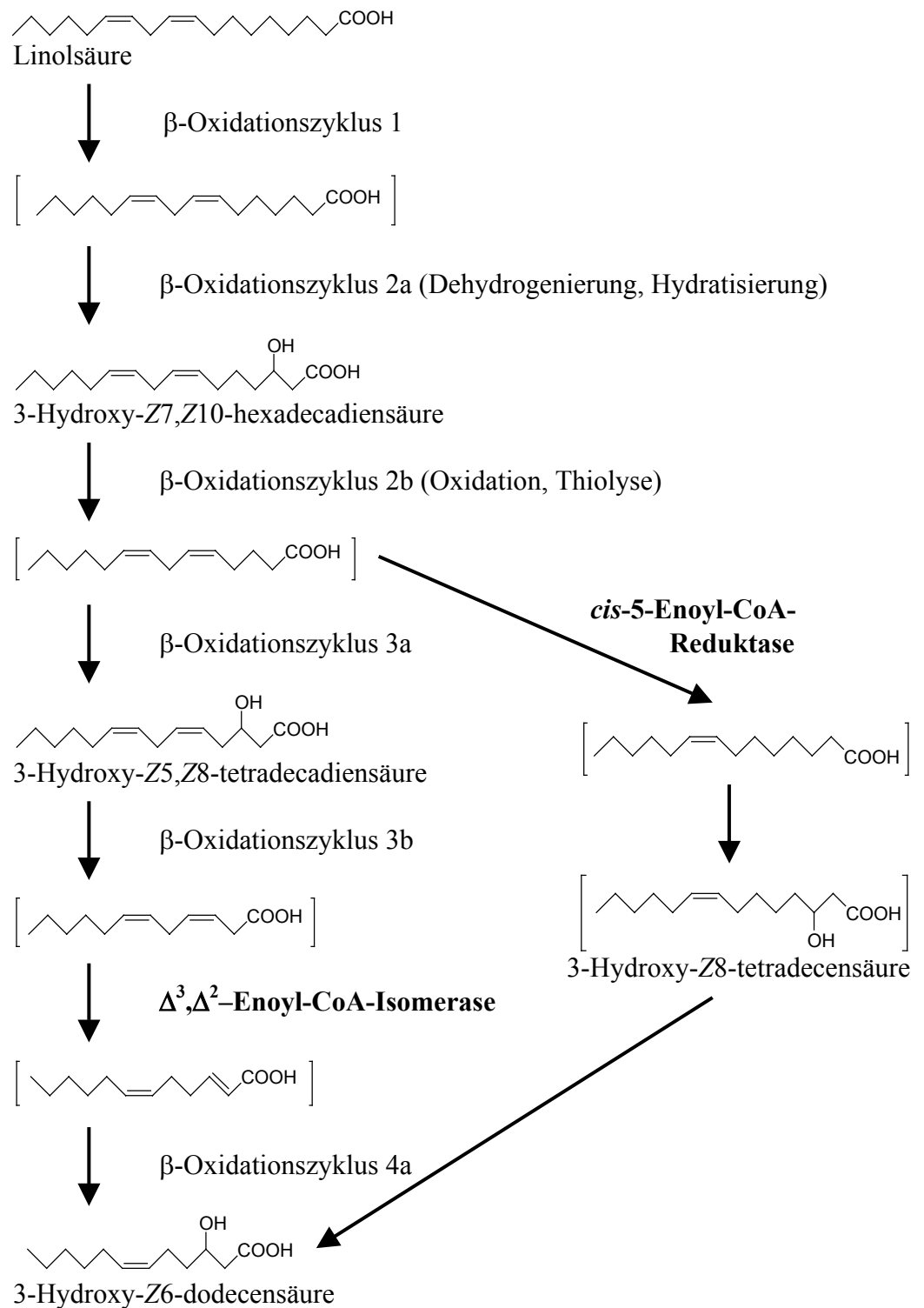


Abb. 3-48: Postulierter Bildungsweg von 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure, 3-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure und 3-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure in *Stenotrophomonas maltophilia*

Im Rahmen eines breit angelegten Substratscreenings wurden die strukturellen Voraussetzungen ermittelt, die für eine effiziente Umsetzung von Fettsäuren durch *Stenotrophomonas maltophilia* notwendig sind. Es zeigt sich, dass es beim Abbau von Substraten mit einer *cis*-Doppelbindung an einem ungeradzahligen C-Atom zur Akkumulation von 3-Hydroxysäuren kommt, in denen sich diese Doppelbindung zwischen C5 und C6 befindet. Ungesättigte Fettsäuren mit einer *trans*-Doppelbindung sowie gesättigte Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge werden dagegen ohne detektierbare Zwischenprodukte abgebaut.

Studien bezüglich der Kettenlänge der eingesetzten Verbindungen ergaben, dass *Stenotrophomonas maltophilia* geradzahlige Fettsäuren mit 8 bis 22 C-Atomen als Substrate akzeptiert.

Die entstehenden Metabolite zeigen als gemeinsame Struktureinheiten eine sekundäre Hydroxyfunktion an C3 und eine *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6. Das Vorliegen dieser *cis*-Doppelbindung in der Nähe zur Carboxylfunktion ist nicht direkt in den Katalysemechanismus involviert, scheint aber eine Signalfunktion auszuüben, die die Bindung des Substrates an das nächste Enzym in der Kaskade der β -Oxidation verhindert oder dessen Aktivität senkt.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Bildung von Dicarbonsäuren im Urin wiesen auch Jin und Tserng (1990) nach, dass das Vorhandensein einer *cis*-Doppelbindung zwischen C5 und C6 die β -Oxidationsrate limitiert. Statt der Umsetzung zur entsprechenden *cis*-3-Enoyl-CoA-Verbindung über die β -Oxidation schlugen die Autoren daher einen alternativen Abbauweg vor. Katalysiert von einer NADPH-abhängigen *cis*-5-Enoyl-CoA-Reduktase kommt es danach zu einer direkten Reduktion der Doppelbindung. Die Existenz eines solchen Enzyms ist in Rattenleberpräparationen nachgewiesen worden (Tserng und Jin, 1991; Tserng et al., 1996; Shoukry und Schulz, 1998). In *Stenotrophomonas maltophilia* ist dieser „Reduktase-Weg“ nicht aktiv oder dem „Isomerase-Weg“ gegenüber deutlich untergeordnet, da es zu einer Akkumulation von ungesättigten Hydroxysäuren kommt, in denen eine *cis*-Doppelbindung nicht in der beschriebenen Form überwunden werden kann.

Werden Substrate wie Ricinolsäure (12-(*R*)-Hydroxy-Z9-octadecensäure) eingesetzt, die innerhalb des Moleküls bereits eine Hydroxygruppe enthalten, entstehen kettenverkürzte Produkte, in denen nur die Hydroxygruppe des Ausgangsmoleküls vorliegt. Eine zweite Hydroxygruppe in Position 3 wird nicht eingeführt. Die dazu nötigen Reaktionen im Rahmen des β -Oxidationszyklus - die Einführung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C2 und C3 und die anschließende Hydratisierung unter Einführung der sekundären Hydroxygruppe am C3 - werden beim Vorliegen einer Hydroxygruppe

benachbart zur vorhandenen *cis*-Doppelbindung gar nicht oder nur mit deutlich verminderter Aktivität katalysiert.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern eindeutige Hinweise auf das Vorliegen eines β -Oxidationsmechanismus. Damit eine zugesetzte Fettsäure abgebaut werden kann, ist das Vorliegen einer freien Carboxylgruppe nötig. *Stenotrophomonas maltophilia* ist in der Lage, Esterbindungen zu spalten, dagegen werden Amide nicht als Substrate akzeptiert. Bei der Umsetzung der zugegebenen Fettsäuren werden nur geradzahlige Produkte gebildet. Vergleicht man deren Strukturen mit den jeweiligen Ausgangsmolekülen, liegt eine sukzessive Abspaltung von C2-Einheiten ausgehend von der Carboxylgruppe des Moleküls vor. Die strukturellen Merkmale des Kettenendes einschließlich vorhandener Doppelbindungen sind unerheblich und werden während der Katalyse nicht verändert.

Eine zusätzliche Absicherung zum Vorliegen eines β -oxidativen Abbauweges ist durch Versuche mit β -Oxidationshemmern wie Diethylpyrocarbonat (Inhibitor der Acyl-CoA-Dehydrogenase; Thorpe, 1981) oder Acetoacetyl-CoA (Inhibitor der Enoyl-CoA-Hydratase; Waterson und Hill, 1972) möglich. Eine Abgrenzung zum Vorliegen einer direkten Monooxygenierung am C3 über einen Cytochrom P-450 vermittelten Reaktionsweg kann durch Versuche unter Verwendung von ^{18}O -markiertem Wasser getroffen werden. Während das Sauerstoffatom bei einer solchen Monooxygenierung aus molekularem Sauerstoff stammt, wird es im Rahmen der β -Oxidation durch die Addition von Wasser eingeführt.

Die Aufklärung der Absolutkonfiguration wurde für 3-Hydroxy-Z6-dodecensäure über die Synthese von Dodecan-1,3-diolen und anschließender MDGC-Analytik durchgeführt. Für acht ausgewählte bakterielle Umsetzungsprodukte mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen wie Anzahl der C-Atome sowie Anzahl, Position und Konformation von Doppelbindungen wurde die Absolutkonfiguration mit der CD Exciton Chirality-Methode bestimmt. Beide Methoden ergaben, dass die Produkte (*R*)-konfiguriert gebildet werden.

Dies führte zunächst zur Annahme eines anabolen Bildungsweges. Bei der Biosynthese von Fettsäuren wird das Molekül ausgehend von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in einem Zyklus aus fünf Teilreaktionen jeweils um eine Acetat-Einheit verlängert. Die Übertragung von Malonyl-CoA auf den Acylrest erfolgt unter Katalyse der 3-Ketoacylsynthase. Diese Elongation wird durch die dabei resultierende CO_2 -Abspaltung energetisch begünstigt. Die anschließende Reduktion der 3-Ketosäure durch 3-Ketoacylreduktase liefert 3-Hydroxysäuren, die ausnahmslos (*R*)-Konfiguration aufweisen (Schweizer, 1996). Allerdings kann über die *de novo*-Synthese das Auftreten von Doppelbindungen in kurz- und mittelkettigen Produkten nicht erklärt werden, da die Desaturierung von

Fettsäuren in der Regel erst auf der C18-Stufe erfolgt (Karlsson, 1992; Voet und Voet, 1994).

Eine Erklärung der Bildung des (*R*)-Enantiomers ist das Vorliegen einer Enyol-CoA-Hydratase, die im Vergleich zu den bekannten Enzymen, z.B. aus Rattenleberzellen, eine gegensätzliche Stereoselektivität zeigt und so die direkte (*R*)-selektive Hydroxylierung der Substrate im Rahmen des β -oxidativen Abbaus katalysiert. Die Existenz solcher Hydratasen wurde bereits in den Bakterien *Aeromonas caviae* und *Rhodospirillum rubrum* nachgewiesen. Studien zur Substratazeptanz mit dem isolierten und gereinigten Enzym aus *Rhodospirillum rubrum* zeigten eine enge Spezifität bezüglich der Kettenlänge. Umgesetzt wurden nur Crotonyl-CoA, *E2*-Pentenyl-CoA und *E2*-Hexenyl-CoA. *E2*-Octenyl-CoA stellt dagegen kein Substrat dar, es führt vielmehr zu einer Inhibierung des Enzyms (Fukui et al., 1998; Reiser et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit ist das Vorliegen einer (*R*)-spezifischen 3-Ketoacyl-CoA-Reduktase, die die im Rahmen der β -Oxidation gebildeten 3-Ketoacyl-CoA-Derivate als Substrate akzeptiert. Werden diese Verbindungen dem Abbauzyklus entzogen und reduziert, führt dies zur Akkumulation der entsprechenden 3-Hydroxysäuren. Ein solches Enzym wurde kürzlich in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (Ren et al., 2000).

Neben *Stenotrophomonas maltophilia* wurden weitere Bodenbakterien isoliert, die Linolsäure zu 3-Hydroxysäuren umsetzen. Diese Stämme wurden basierend auf der Charakterisierung phänotypischer Eigenschaften und der Sequenzierung von ribosomaler 16S-RNA identifiziert. Es handelt sich um drei Pseudomonaden sowie eine *Alcaligines*-Spezies. Diese Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* sind untereinander eng verwandt. Sie gehören alle zur sog. rRNA-Homologiegruppe 1 (Bergey, 1994). Ähnlichkeiten zu *Stenotrophomonas maltophilia* belegt die frühere Zuordnung dieses Stammes zur Gattung *Pseudomonas*.

In verschiedenen Pseudomonaden (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*) sowie in *Alcaligines eutrophus* wurde die Anreicherung von kurz- und mittelkettigen 3-Hydroxysäuren in Form einer Speichersubstanz, den Polyhydroxyalkanoaten (PHA), nachgewiesen. Diese Biopolymere werden durch eine PHA-Synthase aus 3-Hydroxyalkansäuren aufgebaut. Die Bildung der Verbindungen ist eng mit dem Abbau von Fettsäuren verknüpft. Intermediate der β -Oxidation können als Prekusoren für die Biosynthese der PHAs verwendet werden. Liegen keine aliphatischen Verbindungen, sondern z.B. Glucose als Kohlenstoffquelle vor, werden Intermediate der *de novo*-Fettsäuresynthese zur PHA-Bildung verwendet (de Waard et al., 1993; Mittendorf et al., 1998; Jung et al., 2000).

Die durchgeführten Arbeiten zeigen die Möglichkeiten zur Bildung von optisch aktiven 3-Hydroxysäuren durch das Bodenbakterium *Stenotrophomonas maltophilia*. Die Produkte unterscheiden sich je nach zugegebener Fettsäure in ihrer Kettenlänge sowie in Anzahl und Stellung vorhandener Doppelbindungen. Das Potential des Stammes ist damit jedoch nicht ausgeschöpft. Neben einer Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Erzielung höherer Ausbeuten können weitere Substrate mit anderen Strukturmerkmalen für die Biotransformation eingesetzt werden. Beispielsweise ist die Umsetzung von Fettsäuren mit Dreifachbindung(en) oder Heteroatomen innerhalb der Kohlenstoffkette sowie ungeradzahligem oder verzweigten Edukten denkbar. Auch Fettsäuren, die über eine Keto-, Epoxy- oder Cyclopropyl-Einheit verfügen, sind mögliche Substrate. Die Strukturaufklärung entstehender Produkte kann weitere Erkenntnisse zum vorliegenden Reaktionsmechanismus und den katalytischen Eigenschaften beteiligter Enzyme liefern. Damit wird ein gezieltes Ausnutzen der Reaktivität zur Darstellung von ungesättigten optisch aktiven 3-Hydroxysäuren möglich, deren chemische Darstellung im Vergleich zu dieser Biotransformation deutlich schwieriger zu realisieren ist. Für solche Verbindungen besteht in der organischen Synthese von Naturstoffen wie Pheromonen, Vitaminen und Antibiotika Bedarf.

4 Experimententeil

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Acros (Acros Organics, Geel, Belgien), Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland), Avocado (ABRC GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland), ICN (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland), Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die für die Biotransformationen verwendeten Fettsäuren sind in Tabelle 4.1 gesondert aufgelistet. Plate-Count Agar wurde bei Creatogen (Creatogen Biosciences GmbH, Augsburg, Deutschland) erworben. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert.

Die Identifizierung der nachgewiesenen Verbindungen erfolgte anhand authentischer Referenzsubstanzen. Identifizierungen unter Verwendung von Literaturdaten wurden explizit ausgewiesen. Neben selbst synthetisierten und isolierten Verbindungen wurden die in der Referenzsammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben herangezogen.

Tab. 4.1: Für die Biotransformationen eingesetzte Fettsäuren

Bezeichnung der Verbindung (Trivialname)	Name der Verbindung	Vertrieb
Arachidonsäure	5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure	ICN
5Z-Dodecensäure	5Z-Dodecensäure	Aldrich
Elaidinsäure	9E-Octadecensäure	Sigma
Erucasäure	13Z-Docosensäure	Sigma
Gondoesäure	11Z-Eicosensäure	Sigma
12-Hydroxy-Stearinsäure	12-Hydroxy-Octadecensäure	ICN

Fortsetzung von **Tabelle 4-1**:

Bezeichnung der Verbindung (Trivialname)	Name der Verbindung	Vertrieb
Lesquerolsäuremethylester	14-Hydroxy-11Z-eicosensäure	Aldrich
Linolaidinsäure	9E,12E-Octadecadiensäure	ICN
α -Linolensäure	9Z,12Z,15Z-Octadecatriensäure	Aldrich
γ -Linolensäure	6Z,9Z,12Z-Octadecatriensäure	ICN
Linolsäure	9Z,12Z-Octadecadiensäure	Aldrich
Linolsäureethylester	Ethyl-9Z,12Z-Octadecadienoat	Sigma
Linolsäuremethylester	Methyl-9Z,12Z-Octadecadienoat	Sigma
Myristinsäure	Tetradecansäure	Aldrich
Myristoleinsäure	9Z-Tetradecensäure	Sigma
Ölsäure	9Z-Octadecensäure	Aldrich
Petroselaidinsäure	6E-Octadecensäure	ICN
Petroselinsäure	6Z-Octadecensäure	Sigma
Palmitinsäure	Hexadecansäure	Aldrich
Palmitolaidinsäure	9E-Hexadecensäure	ICN
Palmitoleinsäure	9Z-Hexadecensäure	Aldrich
Ricinolaidinsäure	12-Hydroxy-9E-octadecensäure	ICN
Ricinolsäure	12-Hydroxy-9Z-octadecensäure	ICN
Stearinsäure	Octadecansäure	Fluka
<i>cis</i> -Vaccensäure	9Z-Octadecensäure	ICN
<i>trans</i> -Vaccensäure	9E-Octadecensäure	ICN

Weitere für die Biotransformation verwendete Substanzen wurden synthetisiert (vgl. Kapitel 4.5.3, 4.5.4, 4.5.5, 4.6, 4.7). Ölsäureamid sowie 2-Hydroxy-Ölsäure wurden von Bernhard Weckerle bzw. Dr. Michael Lazarus zur Verfügung gestellt.

Isotopenmarkierte [U-¹⁴C]-Ölsäure (spezifische Radioaktivität: 768 mCi/mmol; DuPont, Boston, USA) wurde zur Bestimmung der Umsetzungsrate der Biotransformation mit *Stenotrophomonas maltophilia* eingesetzt.

4.1.2 Enzyme

- Die im Rahmen der Sequenzierung der isolierten Bakterienstämme verwendeten Polymerasen AmpliTaq[®] GOLD DNA-Polymerase sowie AmpliTaq[®] DNA-Poly-

merase, FS wurden von Perkin Elmer (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) erworben.

- Die für die kinetischen Untersuchungen sowie für die Synthese von 13-(*S*)-Linolsäurehydroperoxid verwendete Lipoxygenase stammte von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) (L-8383, Typ-I-S) und war wie folgt spezifiziert: Lipoxygenase aus Sojabohnen, 88000 U/mg Protein (1 U = Absorptionsanstieg von 0.001/min bei 234 nm mit Linolsäure als Substrat gemessen in 0.1 M Natriumboratpuffer pH 9 bei 25 °C, Lichtweg 1 cm).

4.1.3 Mikroorganismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden aus Bodenproben isoliert, die im März 1998 auf dem Universitätsgelände der Universität Würzburg entnommen wurden. Die Identifizierung der Isolate wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

4.1.4 Adsorptionsmaterial

- Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.032 – 0.063 mm; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet; Glassäulen 2 x 70 cm bzw. 3 x 50 cm.
- Für die Säulenchromatographie an einer Umkehrphase wurde LiChroprep[®] RP-18 Material (Korngröße 0.040 – 0.063 mm; Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt; Glassäule 2 x 20 cm. Das Material wurde mit Acetonitril gewaschen und anschließend mit demineralisiertem Wasser konditioniert.

4.1.5 Dünnschichtchromatographie

Träger: DC Alufolien-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄
Schichtdicke: 0.2 mm
(Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Detektion: UV bei 254 und 366 nm
Jodkammer

4.2 Geräte

4.2.1 Schüttelinkubator

Geräte: GFL 3031 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
GFL 3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)

Temperatur: 30 °C
Schüttelgeschwindigkeit: 120 upm (3031)
160 upm (3033)

4.2.2 Autoklav

Gerät: Wolf Sanoclav, Typ S-MCS (Wolf, Geisslingen, Deutschland)

Temperatur: 121 °C
Autoklavierzeit: 16 min

4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1: Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)

Degasser: 4-Wege-Degasser (Knauer)
Pumpe: Knauer HPLC Maxi-Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf
Mischkammer: dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler: Basic Marathon (Spark, Emmen, Holland) mit Rheodyne Probenventil Nr. 7125, Probenschleife 20 µl
Injektor: Knauer Six-Port-Probenventil Nr. A0258, Probenschleife 200 µl
Trennsäule 1: Eurospher 100 C-18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel 1: A: Wasser/Ameisensäure = 100/0.05 (v/v)
B: Acetonitril
C: Isopropanol
Fluß: 1 ml/min

Gradient 1a:	0 – 30 min: 5 – 80 % B, 30 – 40 min: 80 – 100 % B, 40 – 45 min: 100 % B
Gradient 1b:	0 – 20 min: 5 – 100 % B, 20 – 30 min: 100 % B – 20 % C, 30 – 35 min: 80 % B, 20 % C
Detektoren:	Knauer UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge Sedere Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD), Modell Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich); Temperatur: 40 °C, Druck 2.4 atm, Luft als Evaporationsgas
Steuerung:	Software Eurochrom 2000 (Knauer)
Datenverarbeitung:	Software Eurochrom 2000 (Knauer)

4.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

HPLC 2: Applied Biosystems (Applied Biosystems, Bensheim, Deutschland)

Pumpe:	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruck-Gradienten
Autosampler:	Triathlon (Spark, Emmen, Holland)
Injektor:	Rheodyne Probenventil Nr. 8125, Probenschleife 5 µl
Trennsäule 2:	Eurospher 100 C-18 (100 x 2 mm; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel 2:	A: Wasser/5 mM Ammoniumacetat B: Methanol
Fluß:	0.2 ml/min
Gradient 2:	0 – 20 min: 5 – 55 % B, 20 – 25 min: 55 – 100 % B, 25 – 30 min: 100 % B

Tandemmassenspektrometer: Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Tandemmassenspektrometer mit Finnigan Electrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)

Injektion:	Loop-Injektion (1-5 µl)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck (760 Torr), Raumtemperatur
ESI-Interface:	Quarzkapillare 200 - 260 °C Kapillarspannung ESI positiv: 3.5 bzw. 4 kV Kapillarspannung ESI negativ: 3 kV Sheathgas: Stickstoff 5.0 (60 bzw. 70 psi)

	Hilfsgas: Stickstoff 5.0 (10 l/min)
Scanbereich:	Fullscan positiv: 100 - 500 u/sec Fullscan negativ: 100 - 800 u/sec DAU: jeweils im Text angegeben
Multipliiert:	1200 - 1800 V
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck in der Stoßzelle 1.8 mTorr
Kollisionsenergie:	-8 eV bis -12 eV (jeweils im Text angegeben)

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit dem ICIS Data System 8.1 (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) sowie der Personal DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland).

4.2.5 Kapillargaschromatographie (HRGC)

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

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

GC 2: Fisons Instruments GC 8160 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Injektor:	Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 220 °C
Trennsäule:	J&W DB-5 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Temperaturprogramm:	60 °C - 5 °C/min - 300 °C (10 min isotherm)
Trägergas:	2.0 ml/min Helium 5.0
Make-up-Gas:	30 ml/min Stickstoff
Brenngas:	30 ml/min Wasserstoff, 300 ml/min Luft

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-Kompatiblen Personal-Computer und der Software „Chrom-Card for Windows“.

4.2.6 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

GC 3: Fisons Instruments GC 8060 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:30), Temperatur 250 °C
 Autosampler: Fisons AS 800
 Trennsäule 1: J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
 Temperaturprogramm 1: 50 °C (3 min isotherm) - 4 °C/min - 240 °C (10 min isotherm)
 Trennsäule 2: J&W DB-5 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
 Temperaturprogramm 2: 60 °C - 5 °C/min - 300 °C (10 min isotherm)
 Trennsäule 3: OV 1701 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
 Temperaturprogramm 3: 50 °C (1 min isotherm) - 4 °C/min - 270 °C (5 min isotherm)
 Trägergas: 2.0 ml/min Helium 5.0

MS 1: Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
 Temperatur: Ionenquelle 230 °C, Interface 220 C
 Quellendruck: 1 mPa
 Multiplier: 350V
 Massenbereich 1: 40 - 250 u („*low mass*“)
 Massenbereich 2: 50 - 480 u („*high mass*“)
 Massenbereich 3: 35 - 480 u

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-Kompatiblen Personal-Computer und der Software „*Mass-Lab for Windows*“ bzw. „*X-Calibur*“.

GC 4: Varian Aerograph 3300 (Varian, Darmstadt, Deutschland)

Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
 Trennsäule: J&W DB-5 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
 Temperaturprogramm: 60 °C - 5 °C/min - 300 °C (10 min isotherm)
 Trägergas: 25 cm/s Helium 5.0

MS 2: Finnigan MAT 44 Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)

Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
 Massenbereich: 40 - 400 u
 Temperaturen: Ionenquelle 210 °C; Kopplungsteile 250 °C
 Kathodenstrom: 0.6 – 0.8 mA
 Quelledruck: 12 nbar
 Multiplier: 1400 – 1900 V

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-Kompatiblen Personal-Computer und der Software „PCDS-Datensystem“.

4.2.7 Multidimensionale Gaschromatographie mit Moving-capillary-stream-switching-System (MDGC-MCSS)

GC 5: Fisons Instruments GC 8000 Series (8160 und 8130; ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:10), Temperatur 230 °C
 Trennsäulen: Vorsäule in Ofen 1: J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25$ m)
 Hauptsäule in Ofen 2: Säulen mit chiraler Phase
 Temperaturprogramme: Ofen 1: 100 °C - 10 °C/min - 240 °C (10 min isotherm)
 Ofen 2: 100 °C (14 – 24 min isotherm) - 2 °C/min - 200 °C

MCSS-System mit Glasdom (desaktiviert, inert) in Ofen 1 zwischen Vorsäule und Hauptsäule

Trägergas: Helium 5.0
 Ofen 1: 150 kPa
 Ofen 2: 85 kPa

Monitor-detektor für Vorsäule und Hauptdetektor für Hauptsäule:
 Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250 °C

Brenngase: 70 kPa Wasserstoff, 130 kPa Luft, 175 kPa Stickstoff

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-Kompatiblen Personal-Computer und der Software „Chrom-Card for Windows“.

HRGC-Säulen mit chiraler Phase:

Chiral 1: 30 % 2,3-Diethyl-6-*tert.*-butyl-dimethylsilyl- β -cyclodextrin
in PS 086 (25 m x 0.25 mm, $d_f = 0.15 \mu\text{m}$)

Chiral 2: 30 % 2,3-Diacetyl-6-*tert.*-butyl-dimethylsilyl- β -cyclodextrin
in OV 1701 (25 m x 0.25 mm, $d_f = 0.15 \mu\text{m}$)

4.2.8 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Geräte: Bruker AC 250 (250 MHz bzw. 63 MHz)
Bruker WM 400 (400 MHz bzw. 100 MHz)
Bruker DMX 600 (600 MHz bzw. 150 MHz)

Lösungsmittel: CDCl_3 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wird relativ zum Lösungsmittelsignal ($^1\text{H-NMR}$: 7.27 ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: 77.0 ppm) oder unter Verwendung des Standards Trimethylsilan (TMS) $\delta = 0.00$ angegeben.

Die 2d-Experimente werden mit den Bruker Standard-Impulssequenzen durchgeführt. Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, dd = Duplett vom Duplett, dt = Duplett vom Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett.

4.2.9 Infrarot-Spektrometer (IR-Spektrometer)

Gerät: 1310 Infrared-Spectrophotometer (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland)

4.2.10 UV-Vis-Spektralphotometer

Gerät: registrierendes Zweistrahlphotometer
UV 2101 PC UV-VIS Scanning Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

4.2.11 Circular dichroismus (CD)

Gerät: JASCO J-600 Spectropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Lösungsmittel: Acetonitril
Küvette: 1 ml-Rundküvette aus Quarzglas (mit Stopfen)
Schichtdicke: 1 cm
Temperatur: 25 °C

4.2.12 Geräte zur Radioaktivitätsbestimmung

4.2.12.1 HPLC mit Radiodetektion

HPLC 3: Analytische HPLC von Waters (Waters, Milford, USA)

Pumpen: 2 x Waters-Pumpe Model 510 mit analytischem Pumpenkopf
Gradientenformer: Automated Gradient Controller (Waters)
Injektor: Rheodyne Probenventil Nr. 7125, Probenschleife 100 µl
Trennsäule 3: Eurospher 100 C-18 (100 x 4.6 mm; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel 3: A: Wasser/Ameisensäure = 100/0.05 (v/v)
B: Acetonitril
Fluß: 1 ml/min
Gradient 3: 0 – 30 min: 5 – 80 % B, 30 – 40 min: 80 – 100 % B, 40 – 45 min: 100 % B
Cocktail: Ultima-Flow™ AF (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande)
Detektor: Flow Scintillation Analyzer Radiomatic™ 500 TR Series (Packard Instrument Company, Meriden, USA)
Steuerung: Software „Flo ONE Control“ (Packard)
Datenverarbeitung: Software „Flo ONE Analysis“ (Packard)

4.2.12.2 Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting, LSC)

Gerät: Rackbeta 1214 LKB (Wallac, Freiburg, Deutschland)

Photomultiplier: 10 °C
Messkammer: 10 °C
Messzeiten: 1 bzw. 10 min

LSC-Vials:	20 ml (Packard Bioscience)
Cocktail:	Emulsifier-Safe TM (Packard Bioscience)
Automatische Löschkorrektur:	Standard-Kanalverhältnismethode mit ²²⁶ Ra als externem Standard
Auswertung:	Software „ <i>Ultra-Term</i> “ (Wallac)

4.2.13 Sonstige Geräte

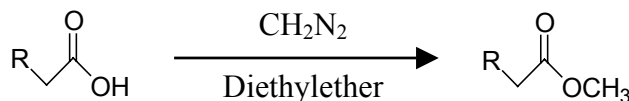
Sterile Werkbank:	Laminar Airflow Bench, Modell-Nr. NU440600E (NuAire Inc., Plymouth, MN, USA)
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex TK 52
Kühlzentrifuge:	Beckman Typ J2-21 (Rotor JA10) Betriebsparameter: 9000 upm, 20 min, 4 °C
pH-Meter:	Labor pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland) Einstabmesselektrode (Ingold)
Waagen:	Mettler PL 300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) Sartorius BP 210 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Rotavapor:	Büchi Rotavapor mit Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz, Deutschland)
UV-Lampe:	Minuvis (Degussa, Heidelberg, Deutschland) Wellenlänge: 254 und 366 nm
Lyophilisator:	Christ LDC Alpha 1 – 4, 0.1 mbar (Christ, Osterode, Deutschland)
RNA-Sequenz- bestimmer:	373A automatischer Sequenzbestimmer für RNA/DNA- Bestimmungen (ABI, Weiterstadt, Deutschland)

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.3.1 Pufferherstellung

Boratpuffer wird durch Titration der entsprechenden Menge an Borsäure mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum kann dem Puffer 0.02 % Azid (NaN_3) zugesetzt werden.

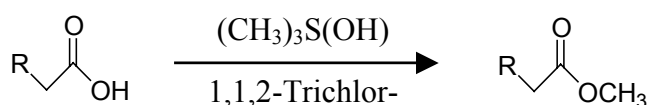
4.3.2 Methylierung der Säurederivate mit Diazomethan



N-Methyl-*N*-nitroso-4-toluolsulfonsäureamid (1.5 g, 7.0 mmol) wird in einem Dreihalskolben eingewogen, auf dem ein Einleitungsrohr für Stickstoff, ein Tropftrichter und ein Glasrohr (zum Austreiben des entstehenden Diazomethans in die Probe) befestigt werden. Zu dem Methylierungsreagenz werden in der geschlossenen Apparatur (Vorlage mit Diethylether an das Glasrohr hängen) im Abzug (!) 100 ml Diethylether über den Tropftrichter zugegeben und das Reagenz unter Rühren gelöst. Nach vollständigem Lösen lässt man vorsichtig methanolische KOH (10 g KOH in 20 ml Wasser / Methanol 1:1) über den Tropftrichter zutropfen und leitet Stickstoff durch die Apparatur. Das entstehende gasförmige Diazomethan wird mit Hilfe des Stickstoffstromes in die in Diethylether gelöste Probe geleitet. Nach Beendigung der Reaktion (die zu methylierende Lösung ist gelb gefärbt) wird das überschüssige Diazomethan durch Einleiten von Stickstoff in die Lösung entfernt (Fales et al., 1973; Black, 1983).

Die Analytik der methylierten Verbindungen erfolgte mittels GC 1 – 5.

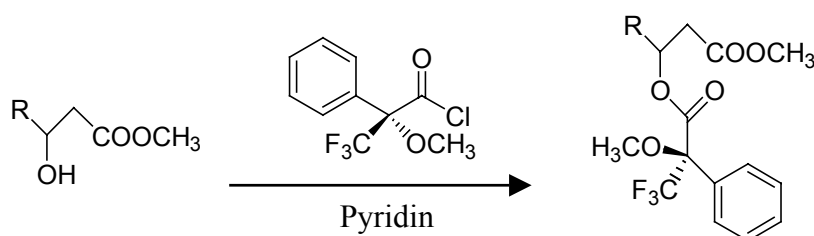
4.3.3 Methylierung der Säurederivate mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)



trifluorethan

Als schnelle Alternative zur Methylierung von Säurederivaten mit Diazomethan kann eine sog. Injektormethylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) durchgeführt werden. Dazu wird ca. 1 mg der Substanz in 500 µl 1,1,2-Trichlortrifluorethan gelöst und mit 125 µl TMSH (ca. 0.25 M in MeOH) versetzt. Diese Mischung kann direkt für die GC-Analytik eingesetzt werden. Die Methylierung der Säurefunktion findet im heißen Injektorblock (Temperatur > 220 °C) statt (Yamauchi et al., 1979; Butte, 1983; Müller et al., 1990).

4.3.4 Derivatisierung mit Mosher-Säurechlorid



Eine etherische Lösung der methylierten Säurederivate (ca. 250 µg) wird in einem GC-Gläschen unter einem schwachen Stickstoffstrom aufkonzentriert. Der Rückstand wird in 200 µl trockenem Pyridin gelöst und mit 2 µl (*S*)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenyllessigsäurechlorid versetzt. Bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) wird der Ansatz über Nacht inkubiert. Danach werden 500 µl MeOH zugegeben, um überschüssiges Derivatisierungsreagenz abzusättigen. Die Analytik der Diastereomere erfolgt gaschromatographisch an einer J&W DB-5 Phase (GC 2) (Dale et al., 1969). Bei den derivatisierten 3-Hydroxysäuremethylestern eluiert das (*R,R*)- vor dem (*S,R*)-Diastereomer.

4.3.5 Herstellung der Wachstumsmedien

Zur Anzucht der Bakterienkulturen wird ein Minimalmedium nach Dworkin et al. (Tab. 4-2; Dworkin und Foster, 1967) verwendet.

Tab. 4-2: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Dworkin

Substanz	Formel	Menge ^a
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	4.0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	6.0 g
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	0.2 g

^a Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1000 ml dest. Wasser (pH 6.9).

Jeder Ansatz wird vor dem Autoklavieren mit 5 ml/l einer Spurenelementlösung (Tab. 4-3; Atlas und Parks, 1993) versetzt.

Tab. 4-3: Zusammensetzung der *Pseudomonas*-Spurenelementlösung

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

^a Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1000 ml dest. Wasser.

Nach dem Autoklavieren (121 °C, 16 min) wird dem Medium 5.0 g/l Glucose in Form einer 50%igen sterilen Glucoselösung zugegeben. Die Zugabe erfolgt erst nach der Sterilisation des Mediums, um unerwünschte chemische Reaktionen wie z.B. die Maillard-Reaktion zu vermeiden. Damit kann eine Veränderung der ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse sowie eine Bräunung des Mediums unterbunden werden.

4.3.6 Weitere Nährmedien

4.3.6.1 *Mac Conkey-Agar (Selektivagar für Gram-negative Stäbchen)*

Pepton	20 g/l
Lactose	10 g/l
Gallensalze	5 g/l
NaCl	5 g/l
Neutralrot	0.075 g/l
Agar	12 g/l

4.3.6.2 *Cetrimid-Agar (Selektivagar für Pseudomonaden)*

Gelatine-Pepton	20 g/l
K ₂ SO ₄	10 g/l
MgCl ₂	1.4 g/l
Cetrimid	0.3 g/l

Agar 13 g/l

4.3.7 Isolierung von Mikroorganismen aus Bodenproben

Zur Isolierung von Mikroorganismen aus Bodenproben wird zunächst ein Rohextrakt hergestellt. Dazu werden 1 g Material mit 100 ml autoklaviertem Leitungswasser versetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem sich die groben Teile abgesetzt haben, wird der Überstand unterschiedlichen Aufarbeitungen unterzogen.

4.3.7.1 Direkte Aufarbeitung

Bei der direkten Aufarbeitung werden ausgehend vom erhaltenen Überstand Verdünnungen bis 10^{-6} hergestellt. Dabei wird aufgrund osmotischer Bedingungen Saline-Lösung (enthält NaCl, $MgSO_4$) verwendet. Diese verdünnten Bodenlösungen, die eine komplexe Mischung verschiedener Bakterien enthalten, werden auf Plate Count Agar (Vollmedium) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wird täglich überprüft. Im nächsten Schritt werden einzelne Kulturen auf ein neues Vollmedium übertragen (sog. „Pick-Verfahren“), um zu gewährleisten, dass nur eine einzige Kultur isoliert wird. Die so erhaltenen Reinkulturen können nun in der Schüttelkultur getestet werden.

4.3.7.2 Aufarbeitung nach Anzucht im Minimalmedium

Bei dieser Aufarbeitungsmethode wird der erhaltene Überstand zunächst in einer Schüttelkultur vorinkubiert. Dazu werden 10 ml des Überstandes einem Standardansatz aus 100 ml Dworkin-Lösung (Minimalmedium) mit 0.5 ml *Pseudomonas*-Stammlösung, zugesetzt. Durch die Verwendung des Minimalmediums kann gegenüber der direkten Aufarbeitung eine gewisse Vorselektion erreicht werden.

Nach einer Inkubationszeit von 22 Stunden bei 30 °C und 120 upm wird 1 ml der Bakterienbrühe entnommen und eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt. Der restliche Ansatz wird zentrifugiert (20 min, 9000 upm). Das dabei erhaltene Bakterienpellet wird in 5 ml Saline-Lösung aufgenommen und daraus ebenfalls Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt. Die verdünnten Lösungen werden wie unter 4.3.7.1 behandelt.

4.3.7.3 Aufarbeitung nach Anzucht im Minimalmedium unter Zusatz von Linolsäure

In diesem Fall werden zunächst analog der Aufarbeitungsmethode 4.3.7.2 10 ml des Überstandes im Minimalmedium vorinkubiert. Nach 25 Stunden wird den Ansätzen je 100 mg Linolsäure zugesetzt. Dies entspricht der Vorgehensweise bei den mit Bodenproben durchgeführten Umsetzungen. Durch die Anwesenheit des Substrates kann im Vergleich zu 4.3.7.2 eine weitere Selektion erreicht werden.

Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden werden auch hier 1 ml der Bakterien-suspension sowie das nach Zentrifugation erhaltene, in Saline-Lösung aufgenommene Pellet entsprechend verdünnt und wie unter 4.3.7.1 ausplattiert.

4.3.8 Phänotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

4.3.8.1 Die Gram-Färbung

Eine wässrige Bakterien-suspension wird auf einen Objektträger aufgebracht, hitzefixiert und mit dem basischen Farbstoff Kristallviolett (0.5 %ige wässrige Lösung) angefärbt. Anschließend wird das Präparat mit einer Jodlösung behandelt. Das Jod bildet nun mit Kristallviolett Lacke, die in Wasser unlöslich, in Alkoholen und Aceton dagegen mäßig löslich sind. Bei der folgenden Behandlung mit Alkohol behalten Gram-positive Zellen den Jod-Farbstoff-Komplex zurück und bleiben blau, während Gram-negative Zellen entfärbt werden. Zur Absicherung wird eine Gegenfärbung mit Fuchsin oder Safranin als Kontrastfarbstoff durchgeführt, die bei Gram-negativen Zellen zu einer Rotfärbung führt (Schlegel, 1992; Murray et al., 1994).

4.3.8.2 Nachweis von Aminopeptidase

Der Nachweis von L-Alanin-Aminopeptidase wird mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Teststäbchens (Bactident[®], Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Aufgebrachtes Alanin-4-nitroanilid wird beim Vorhandensein von Aminopeptidase gespalten. Das freigesetzte 4-Nitroanilin ruft eine Gelbfärbung hervor.

4.3.8.3 Der O (Oxidations-) / F (Fermentations-) Test nach Hugh und Leifson

Um festzustellen, ob Kohlenhydrate durch Oxidation (aerob) oder Fermentation (anaerob) verbraucht werden, setzt man in Reagenzgläsern das Basismedium nach Hugh und Leifson an, das das jeweilige Testkohlenhydrat (Glucose, Maltose) und Bromthymolblau als pH-Indikator enthält. Diese Reagenzgläser werden in einem kochenden Wasserbad erhitzt, um den größten Teil des gelösten Sauerstoffs zu entfernen. Ein zu testender Stamm wird mit Hilfe eines Drahtes jeweils in zwei Reagenzgläser eingebracht. Eines davon wird nun mit Flüssigparaffin überschichtet (→ anaerobe Verhältnisse), das zweite nicht (→ aerobe Bedingungen). Beide Gläser werden unter für das Wachstum geeigneten Bedingungen (30 °C) inkubiert.

Oxidierer zeigen nun eine Säurebildung und führen im offenen Reagenzglas zu einem Umschlagen des Indikators von blau nach gelb. Eine Fermentierung zeigt sich analog durch Säureproduktion im bedeckten und im offenen Reagenzglas (Hugh und Leifson, 1953; Andrews, 1976).

4.3.8.4 Nachweis von DNase

Für den Nachweis von DNase wird ein DNA-haltiger Agar (0.2 %) verwendet. Beim Vorhandensein von DNase-Aktivität kommt es zur Bildung von klaren Lysehöfen rund um die Kolonien (Chaudhuri und Singh, 1992; Basse et al., 1994).

4.3.8.5 Nachweis von Katalase

Die Existenz von aktiver Katalase führt zur Gasbildung durch die Freisetzung von Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid. Zum Nachweis dieses Enzyms werden einige Zellen der Testorganismen auf einen Objektträger übertragen und dort mit wenigen Tropfen einer 3 %igen H₂O₂-Lösung gemischt. Liegt Katalaseaktivität vor, ist dies nach einigen Minuten durch Bläschenbildung sichtbar (Smibert und Krieg, 1994; Isaac und Jennings, 1996).

4.3.8.6 Nachweis von Oxidase

Zum Nachweis von (Cytochrom-)Oxidase-Aktivität wird der zu testende Stamm auf einer Agar-Platte angezogen. Nach erfolgtem Bakterienwachstum wird die Platte mit einer Reagenz aus 1 %igem α -Naphthol in 95 %igem EtOH sowie 1 %igem wässrigen Tetramethyl-p-Phenylendiaminimoxalat im Verhältnis 1:1 überschichtet. Bereits nach

einigen Sekunden zeigt die blaue oder braune Färbung der Kolonien eine positive Reaktion an (Atlas et al., 1984; Isaac und Jennings, 1996).

4.3.8.7 Durchführung des APIZYM 20 NE-Tests

Der APIZYM 20 NE-Test ist ein standardisiertes System zur Charakterisierung von Bakterien, das 8 konventionelle und 12 Assimilations-Reaktionen beinhaltet. Diese physiologischen Tests werden in miniaturisierten Reaktionsgefäßen durchgeführt; in diesem Fall handelt es sich um einen Plastikstreifen mit Kunststoffbechern. Der APIZYM 20 NE ist geeignet für die Identifizierung Gram-negativer Bakterien, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae gehören. Er dient zur Klassifizierung von sog. Nonfermentern (Abkürzung NE) und findet in der Regel Anwendung, wenn der Oxidase-Test positiv ist und/oder Glucose nicht fermentativ verwertet werden kann.

Zur Identifizierung eines Mikroorganismus mit Hilfe des APIZYM 20 NE-Tests wird der zu testende Stamm auf einer Agar-Platte vorgezogen. Eine Kolonie wird abgenommen und in 0.85 %iger NaCl-Lösung suspendiert. Damit werden die Röhrchen für die konventionellen Tests (Nitratreduktion, Indol-Nachweis, Glucosefermentation, Arginindihydrolase, Urease, β -Glucosidase, Protease, β -Galactosidase), die die Substrate in dehydratisierter Form enthalten, angeimpft. Die Reaktionen können anhand von Farbumschlägen, die spontan oder nach Zugabe von weiteren Reagentien während der 24- bzw. 48-stündigen Inkubation des Teststreifens bei 30 °C erfolgen, mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Ablesetabelle ausgewertet werden. Zur Überprüfung der Assimilationsreaktionen (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannit, N-Acetylglucosamin, Maltose, Gluconat, Caprat, Adipat, Malat, Citrat, Phenylacetat) wird die Bakterien-suspension in ein Minimalmedium (AUX-Medium) gegeben, mit welchem anschließend die Inkubationsröhrchen befüllt werden. Die Mikroorganismen wachsen nur dann zu sichtbarer Trübung an, wenn sie das entsprechende Substrat verwerten können. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation bei 30 °C kann das Ergebnis abgelesen werden. Die Auswertung des Tests erfolgt entsprechend dem beiliegenden Schema. Über den erhaltenen numerischen Code erfolgt die Identifizierung mit Hilfe des Profilindex.

4.3.8.8 Erstellung eines Antibiogramms

Die Untersuchung der Resistenzeigenschaften der isolierten Kulturen erfolgt mittels Agardiffusionstest. Ein zu testender Stamm wird auf der Agaroberfläche ausplattiert und der jeweilige Hemmstoff in einer definierten Konzentration (100 μ g/ml) zur Diffusion gebracht. Eingesetzt werden folgende antibiotisch wirkende Stoffe: Ampicillin, Piperacillin, Imipenem, Meropenem, Cefotaxim, Cefotiam, Gentamycin, Amicacin, Co-Trimoxazol und Ofloxacain. Die um die Kulturen entstehenden Wachstumshemmzonen

sind ein Maß für die Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums (Hammonds, 1995; Schmitz et al., 1996).

4.3.9 Genotypische Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

4.3.9.1 Vorbereitung der Zellen: Isolierung von DNA

Zur Aufarbeitung der Zellen für die folgende Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die im Rahmen der genotypischen Charakterisierung durchgeführt wird, stehen zwei Methoden zur Verfügung.

Liegen die Kulturen auf Agar-Platten vor, wird Bakterienmaterial mit Wasser, evtl. unter Zusatz von „Glas-Beads“, verrieben und aufgekocht. Dabei wird DNA freigesetzt. Nach dem Abzentrifugieren wird der erhaltene Überstand für die PCR eingesetzt.

Alternativ können die intakten Bakterienzellen nach der Methode von Woods et al. (1993) vorbereitet werden. Dabei werden die Zellen im Luria Bertani (LB)-Medium (Trypton 10 g/l, Hefe-Extrakt 5g/l, NaCl 5 g/l) angezogen, zentrifugiert und mit 1 M NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend werden die Zellen in TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6) resuspendiert und mit dem gleichen Puffer so verdünnt, dass bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm eine optischen Dichte von 1.0 vorliegt. Ein Aliquot dieser Zellsuspension (1 μ l) wird für die PCR verwendet.

4.3.9.2 Amplifizierung der Gene mittels PCR

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

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wird ein „Purification Kit“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Je nach Konzentration werden 2 – 7 μ l des dabei erhaltenen Eluats zur Sequenzierung eingesetzt.

4.3.9.3 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung erfolgt nach der Sanger-Methode (vgl. Kapitel 3.1.2.2) unter Verwendung des „ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Sie wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl entsprechend den vom Hersteller mitgelieferten Angaben durchgeführt. Als Primer wird einer der beiden PCR-Primer, in der Regel „FD1“ eingesetzt.

Die erhaltenen Sequenzen werden mit Einträgen in der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory) verglichen.

4.3.10 Allgemeine Vorschrift zur Biotransformation von Fettsäuren

4.3.10.1 Vorinkubationsphase

Für die Biotransformationen werden in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben 100 ml Flüssigmedium nach Dworkin et al. mit 5 ml/l Mineralsalzlösung versetzt. Das Gefäß wird mit einem 100 ml-Becherglas verschlossen. Nach dem Autoklavieren wird jeder Kultur Glucose in einer Konzentration von 5 g/l zugesetzt (vgl. Kap. 4.3.5). Zum Beimpfen wird Bakterienmaterial von frisch angewachsenen Platten mit Hilfe einer Impföse in die Gefäße überführt. Im Schüttelinkubator (30 °C, 120 bzw. 160 upm) werden die Ansätze für 23 Stunden vorinkubiert.

Im Rahmen des Screenings werden die Ansätze analog durchgeführt. Statt Zugabe von Bakterienmaterial wird jedoch eine wässrige Bodensuspension zugegeben (vgl. Kap. 4.3.7.3).

4.3.10.2 Substratzugabe und Inkubationsphase

Nach Beendigung der Vorinkubationsphase werden dem Ansatz 100 mg der jeweiligen Fettsäure (bei Abweichungen wird die Menge gesondert angegeben) direkt zugegeben. Danach wird die Inkubation unter gleichen Bedingungen für weitere 18 Stunden fortgesetzt.

4.3.10.3 Aufarbeitung der Umsetzungen

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Ansätze zunächst 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Bakterienzellwände aufzubrechen und evtl. intrazellulär vorliegende Produkte freizusetzen. Anschließend wird für 20 Minuten (9000 upm, 4 °C) zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung der hier anfallenden Bakterienpellets ist unter 4.3.10.4 beschrieben. Die wässrigen Überstände werden jeweils mit 10 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt und im Scheidetrichter dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer (30 °C, 700 mbar) vom Lösungsmittel befreit. Für die nachfolgende Reaktionskontrolle mittels HPLC (HPLC 1, Trennsäule 1, Gradient 1a) wird der Rückstand in 5 ml Methanol/Wasser (1:1, v/v) aufgenommen und je nach Trübung verdünnt.

4.3.10.4 Extraktion der Bakterienpellets

Zur vollständigen Erfassung der Biotransformationsprodukte sowie des nicht umgesetzten Substrats werden die bei der Zentrifugation anfallenden Bakterienpellets ebenfalls extrahiert. Dies ist vor allem bei Fettsäuren wichtig, die den Ansätzen als Feststoffe zugegeben wurden, da hier eine adsorptive Bindung an das Bakterienmaterial auftritt. Die Pellets werden mit insgesamt 100 ml Wasser aus dem Zentrifugenbecher in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Diese Suspension wird mit 10%iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt und mit 50 ml Diethylether versetzt. Diese Mischung wird bei Raumtemperatur für 2 Stunden vorsichtig gerührt, so dass keine vollständige Durchmischung der beiden Phasen eintritt. Anschließend wird die Etherphase abpipettiert, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer (30 °C, 700 mbar) vom Lösungsmittel befreit. Für die nachfolgende Reaktionskontrolle mittels HPLC (HPLC 1, Trennsäule 1, Gradient 1a) wird der Rückstand in 5 ml Methanol/Wasser (1:1, v/v) aufgenommen und je nach Trübung verdünnt.

4.3.11 Kontrollexperimente

4.3.11.1 „Bakterienblindwert“

Zur Erfassung der Reaktionsprodukte, die das Bakterium ohne Zugabe einer Fettsäure bildet, werden analog zu den Biotransformationen sogenannte „Bakterienblindwerte“ erstellt. Dabei unterbleibt lediglich die Substratzugabe.

4.3.11.2 „Reagentienblindwert“

Zur Beurteilung der Umsetzungen ist es unerlässlich, zu wissen, ob während der Inkubationsphase eines Substrates auch ohne Anwesenheit des Bakteriums Produkte gebildet werden. Dabei ist besonders bei ungesättigten Fettsäuren eine mögliche Autoxidation zu berücksichtigen, da hierfür aufgrund der erhöhten Temperatur, der permanenten Luftzufuhr sowie der Anwesenheit von Metallsalzen günstige Bedingungen vorliegen.

Um die Stabilität und die Reinheit der verwendeten Edukte zu prüfen, werden zu jeder Umsetzungsserie sogenannte „Reagentienblindwerte“ erstellt. Vorgehensweise und Inkubationsbedingungen sind analog den Biotransformationen, es wird jedoch kein Bakterienmaterial eingebracht.

4.3.12 Isolierung und Aufreinigung gebildeter Umsetzungsprodukte

Zur Isolierung gebildeter Produkte für die nachfolgende Strukturanalytik werden die aufgearbeiteten Umsetzungen des gleichen Substrats vereinigt. Am Rotationsverdampfer wird das vorhandene Methanol entfernt. Der wässrige Rückstand wird anschließend durch Säulenchromatographie an RP 18-Material aufgereinigt. Nach entsprechender Konditionierung des Materials wird die Probe aufgegeben und mit einem Stufengradienten aus Wasser (pH 2.8) und Acetonitril eluiert. Es werden jeweils 100 ml eines Fließmittelgemisches verwendet, wobei der Anteil an Acetonitril in 5-Schritten von 40 auf 100 % erhöht wird. Die erhaltenen Fraktionen (ca. 10 ml) werden mittels HPLC (HPLC 1, Trennsäule 1, Gradient 1a) kontrolliert.

4.3.13 Kinetische Untersuchungen an 3-(*R*)-Hydroxysäuren

Die enzymatische Aktivität der Lipoxygenase kann direkt bestimmt werden. Die während der Reaktion gebildeten Hydroperoxide besitzen aufgrund der konjugierten Doppelbindung ein Absorptionsmaximum bei 234 nm, so dass die Produktentstehung spektralphotometrisch gemessen werden kann.

Die Messung der Enzymaktivität, die gemäß der Methode von Axelrod et al. (1981) durchgeführt wird, erfolgt bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) in 0.1 M Boratpuffer (pH 9.0) in sauerstoffgesättigter Lösung. Es werden folgende Stammlösungen hergestellt:

Enzymlösung (in Boratpuffer): 0.5 mg/ml

Substratlösungen (Linolsäure, Linolensäure, Umsetzungsprodukte):

Stammlösung (in EtOH): 10 mM

Verdünnung (in Boratpuffer): 1 mM

Die Aufnahme von Kinetiken erfolgt bei konstanter Enzymkonzentration (jeweils 10 μl der Enzymlösung pro Küvette). Die Substratkonzentration wird hingegen im Bereich von 1 - 100 μM variiert. Das Küvettenvolumen wird auf 3 ml festgelegt. Pro Ansatz werden also 3000 μl – 10 μl – x μl 0.1 M Boratpuffer vorgelegt. Dazu werden x μl (x = 2 – 200 μl) der jeweiligen Substratlösung pipettiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 10 μl Enzymlösung gestartet.

Gemessen wird die Extinktionszunahme pro Minute bei 234 nm gegen einen Reagentienblindwert ohne Enzym. Als Maß für die enzymatische Aktivität wird die Steigung der Reaktionskurve im linearen Bereich (graphische Auswertung durch Anlegen einer Tangente) herangezogen, da je nach Enzymmenge und Beschaffenheit des Substrates unterschiedlich lange lag-Phasen auftreten können. Die Extinktionszunahme sollte zwischen 0.08 und 0.15 pro Minute liegen (Axelrod et al., 1981).

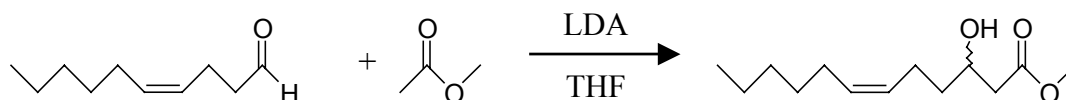
Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{234 \text{ nm}}$ der konjugierten Doppelbindung beträgt 25000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Johnston et al., 1961). Es werden Küvetten mit einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ verwendet. Die Initialgeschwindigkeit V_i berechnet sich mit diesen Angaben gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$V_i = \frac{\Delta c}{\text{min}} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot \text{min}}$$

mit:	V_i	= Initialgeschwindigkeit	$[\mu\text{mol l}^{-1} \text{min}^{-1}]$
	Δc	= Konzentrationsänderung pro Minute	$[\mu\text{mol l}^{-1}]$
	ΔE	= Extinktionszunahme pro Minute bei 234 nm	dimensionslos
	$\epsilon_{234 \text{ nm}}$	= 25000	$[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
	d	= Schichtdicke der Küvette	$[\text{cm}]$

4.4 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure

4.4.1 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäuremethylester



In einem 100 ml-Dreihalskolben werden 25 ml (ca. 50 mmol, 1.5 Äquiv.) einer Lithium-diisopropylamid-Lösung (LDA, ca. 2 M in Tetrahydrofuran/Heptan) vorgelegt und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Tropfenweise wird Methylacetat (3.6 g, 3.9 ml, 46.6 mmol, 1.5 Äquiv.), gelöst in 35 ml trockenem Tetrahydrofuran, zugegeben. Nach 15 Minuten werden 5 g Z4-Decenal (32.3 mmol, 1 Äquiv.) in 15 ml THF schnell zugetropft, wobei die interne Temperatur auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten wird. Unter permanentem Rühren wird die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wird nun durch die Zugabe von 30 ml einer 10 %igen HCl-Lösung abgebrochen und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen (Taber et al., 1988). Der ölige Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel unter Verwendung einer Diethylether/Pentan (2:1)-Mischung aufgereinigt. Man erhält das Produkt als klares, gelb gefärbtes Öl.

Ausbeute: 6.9 g (30.7 mmol, 95 %)

R_f (Diethylether/Pentan, 2:1):	0,47
R_t GC 1:	39,82 min
R_t GC 2:	23,83 min
R_t HPLC 1 (Gradient 1a):	30,88 min

IR (V_{\max}): cm^{-1} 3400 (OH), 2900, 2840 (CH), 1720 (C=O), 1630 (C=C), 1440, 1250, 880, 720.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.37 (m, 2H, C-6H, C-7H), 4.02 (m, 1H, C-3H), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.52 (dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_a), 2.43 (dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_b), 2.17 (m, 2H, C-5H₂), 2.04 (dd, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 14.0$, 2H, C-8H₂), 1.59 (m, 1H, C-4H_a), 1.48 (m, 1H, C-4H_b), 1.29 (m, 6H, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

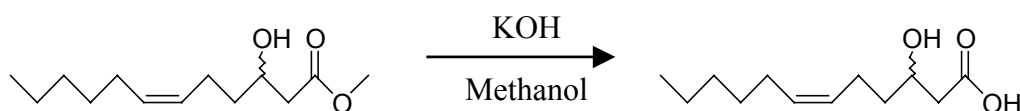
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 169.4 (C-1), 135.3 (C-7), 124.5 (C-6), 68.5 (C-3), 51.9 (OCH_3), 43.1 (C-2), 36.6 (C-4), 31.2 (C-10), 29.5 (C-9), 27.1 (C-8), 22.9 (C-5), 22.4 (C-11), 13.8 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 246 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 246, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 246 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (16), 229 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 211 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (7), 179 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2+\text{H}]^+$ (13), 155 $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}]$ (11).

HRGC-EI-MS (70 eV): m/z (%) 228 (3), 210 (13), 178 (12), 150 (22), 136 (80), 121 (33), 103 (27), 93 (60), 84 (39), 81 (83), 80 (87), 79 (100), 71 (59), 69 (56), 67 (91), 55 (97), 54 (69), 43 (89), 41 (92).

4.4.2 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure



500 mg (2.2 mmol) (*R,S*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäuremethylester werden in 150 ml Methanol gelöst, mit 10 g Kaliumhydroxid versetzt und 70 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird mit 1 M HCl auf pH 3 angesäuert und dreimal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Zur Aufreinigung des Produktes werden die vereinigten organischen Phasen anschließend dreimal mit je 100 ml einer 1 M KOH-Lösung extrahiert. Die wässrige Lösung wird jetzt wieder auf pH 3 eingestellt und erneut dreimal mit je 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der Etherphase über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Reste der Lösungsmittels werden im Stickstoffstrom vertrieben.

Ausbeute: 354 mg (1.67 mmol, 76 %)

R_f (Pentan/Diethylether 1:1 + 0.1 % AcOH): 0,59

R_t HPLC 1 (Gradient 1a): 25,15 min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.41 (dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 17.8$, 1H, C-7H), 5.35 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 18.0$, 1H, C-6H), 4.06 (m, 1H, C-3H), 2.56 (dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, 1H, C-2H_a), 2.47 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_b), 2.16 (m, 2H, C-5H₂), 2.03 (dd, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 13.8$, 2H, C-8H₂), 1.61 (m, 1H, C-4H_a), 1.51 (m, 1H, C-4H_b), 1.29 (m, 6H, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.0 (C-1), 131.1 (C-7), 128.4 (C-6), 67.7 (C-3), 41.1 (C-2), 36.4 (C-4), 31.5 (C-10), 29.3 (C-9), 27.2 (C-8), 23.3 (C-5), 22.5 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 237 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (51), 232 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100).

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 232, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 232 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (32), 215 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 197 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (30), 179 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (10), 155 $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}]^+$ (67), 137 $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (9).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 427 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (90), 213 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100).

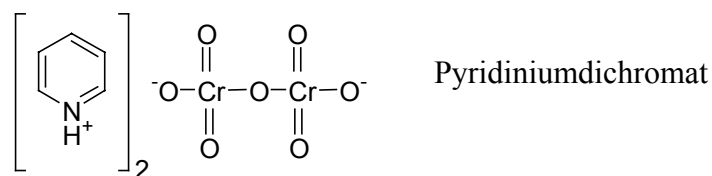
Das **HRGC-EI-Massenspektrum (70 eV)**, das nach Methylierung der Verbindung (Arbeitsvorschriften 4.3.2 und 4.3.3) erhalten wurde, entspricht dem unter 4.4.1.

4.5 Oxidationen mit Pyridiniumdichromat (PDC)

4.5.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Pyridiniumdichromat (PDC) oxidiert in einem aprotischen Medium wie Dimethylformamid primäre Alkohole und Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren. Im Gegensatz zur Verwendung von Pyridiniumchlorochromat (PCC) (Piancatelli et al., 1982) kann es auch eingesetzt werden, wenn säure- oder basenlabile funktionelle Gruppen in den Edukten vorhanden sind. Während der Umsetzung mit PDC tritt keine Isomerisierung vorhandener Doppelbindungen auf.

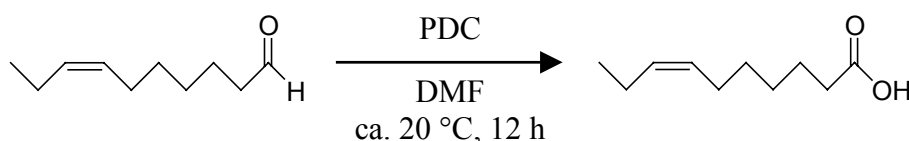
Die Verwendung von Pyridiniumdichromat ist in der Literatur für die Oxidation vieler Verbindungen beschrieben (Coates und Corrigan, 1969; Corey und Schmidt, 1979; Herscovici et al., 1982; D'Auria et al., 1985, Luzzio und Guziec, 1988).



4.5.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift für Oxidationen mit Pyridiniumdichromat (PDC)

Zur Darstellung der *cis*-Alkensäuren Z7-Decensäure, Z5-Octensäure und Z3-Octensäure werden die entsprechenden Edukte in 30 bzw. 60 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit 2 (Aldehyde) bzw. 3.5 Äquivalenten (primäre Alkohole) Pyridiniumdichromat (PDC) versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) gerührt (Corey und Schmidt, 1979). Anschließend wird der Reaktionsansatz mit der 8-fachen Menge Wasser versetzt und viermal mit je 75 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden abgetrennt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer (ca. 20 °C, 17 Torr) entfernt. Die verbleibenden Rückstände werden säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Pentan/Diethylether-Gemisch (70:30) gereinigt. Eine kleine Menge (ca. 1 mg) der gereinigten Carbonsäuren wird mit Diazomethan nach Arbeitsvorschrift 4.3.2 für die HRGC-MS-Analytik methyliert.

4.5.3 Darstellung von Z7-Decensäure



Ansatz: Z7-Decenal: 3.0 g (19.5 mmol)
 PDC: 14.6 g (38.9 mmol)
 Ausbeute: Z7-Decensäure: 1.77 g (10.4 mmol, 54 %)

R_f (Pentan/Diethylether 1:1 + 0.1 % AcOH): 0,59
 R_t GC 1 (freie Säure): 41,24 min
 R_t GC 1 (Methylester): 22,92 min

IR (V_{max}): cm⁻¹ 3200-2900 (OH), 2970, 2950, 2900, 2850, 1700 (C=O).

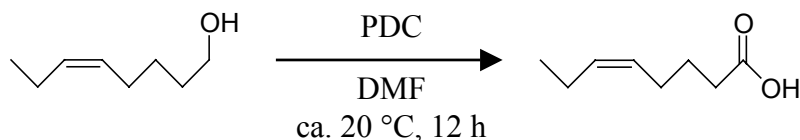
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.34 (m, 2H, C-7H, C-8H), 2.36 (t, J₁ = 7.4, J₂ = 7.7, 2H, C-2H₂), 2.03 (m, 4H, C-6H₂, C-9H₂), 1.64 (m, 2H, C-3H₂), 1.36 (m, 4H, C-4H₂, C-5H₂), 0.96 (t, J₁ = 7.3, J₂ = 7.7, 3H, C-10H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 179.8 (C-1), 131.9 (C-7), 128.9 (C-8), 34.0 (C-2), 29.3 (C-5), 28.7 (C-4), 26.9 (C-6), 24.6 (C-3), 20.5 (C-9), 14.3 (C-10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z (%) 339 [2M-H]⁻ (64), 229 [M+CH₃COOH-H]⁻ (100), 201 [M+MeOH-H]⁻ (9), 169 [M-H]⁻ (78).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 184 (5), 152 (56), 123 (32), 110 (52), 96 (37), 87 (53), 84 (49), 81 (39), 74 (100), 69 (63), 55 (98), 41 (96).

4.5.4 Darstellung von Z5-Octensäure



Ansatz: Z5-Octen-1-ol: 3.0 g (23.4 mmol)
 PDC: 30.8 g (81.9 mmol)
 Ausbeute: Z5-Octensäure: 1.83 g (12.9 mmol, 55 %)

R_t GC 1 (freie Säure): 36,19 min
 R_t GC 1 (Methylester): 16,08 min

IR (V_{\max}): cm^{-1} 3100-2800 (OH), 2960, 2940, 2890, 2850, 1700 (C=O).

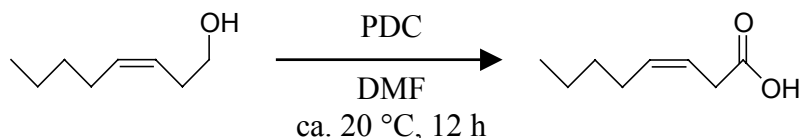
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.40 (dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 18.0$, 1H, C-6H), 5.30 (dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.0$, 1H, C-5H), 2.36 (t, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 7.7$, 2H, C-2H₂), 2.06 (m, 4H, C-4H₂, C-7H₂), 1.69 (m, 2H, C-3H₂), 0.95 (t, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 7.7$, 3H, C-8H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 179.9 (C-1), 132.9 (C-5), 127.6 (C-6), 33.4 (C-2), 26.4 (C-4), 24.7 (C-3), 20.5 (C-7), 14.2 (C-8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z (%) 283 [2M-H]⁻ (64), 201 [M+CH₃COOH-H]⁻ (100), 173 [M+MeOH-H]⁻ (21), 141 [M-H]⁻ (74).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 156 (9), 125 (33), 124 (84), 96 (76), 83 (48), 82 (92), 74 (100), 67 (83), 59 (54), 55 (92), 43 (74), 41 (76).

4.5.5 Darstellung von Z3-Octensäure



Ansatz: Z3-Octen-1-ol: 3.0 g (23.4 mmol)
 PDC: 30.8 g (81.9 mmol)
 Ausbeute: Z3-Octensäure: 1.07 g (7.5 mmol, 32 %)

R_t GC 1 (freie Säure): 37,44 min
 R_t GC 1 (Methylester): 16,61 min

IR (V_{max}): cm⁻¹ 3100-2850 (OH), 2980, 2960, 2900, 2860, 1710 (C=O).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.58 (m, 2H, C-3H, C-4H), 3.15 (d, *J* = 7.0, 2H, C-2H₂), 2.11 (m, 2H, C-5H₂), 1.33 (m, 4H, C-6H₂, C-7H₂), 0.90 (t, *J*₁ = 7.0, *J*₂ = 7.0, 3H, C-8H₃).

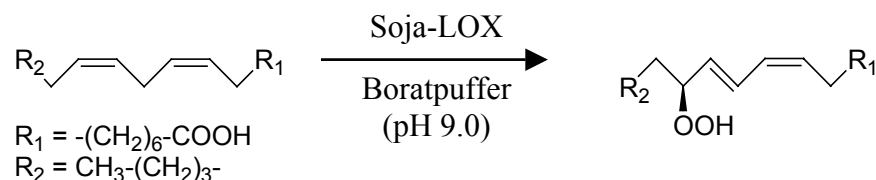
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.1 (C-1), 134.1 (C-4), 120.0 (C-3), 32.7 (C-2), 31.4 (C-6), 27.1 (C-5), 22.3 (C-7), 13.8 (C-8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* (%) 283 [2M-H]⁻ (18), 201 [M+CH₃COOH-H]⁻ (100), 173 [M+MeOH-H]⁻ (22), 141 [M-H]⁻ (74).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 156 (3), 124 (54), 96 (47), 83 (24), 82 (64), 74 (72), 71 (28), 67 (34), 59 (54), 55 (100), 43 (35), 41 (62).

4.6 Darstellung von (S)-13-Hydroxy-Z9,E11-octadecadiensäure

4.6.1 Enzymatische Darstellung von 13-(S)-Hydroperoxy-Z9,E11-octadecadiensäure



In 2000 ml 0.1 M Boratpuffer (pH 9.0), der auf 4 °C gekühlt wird, werden 2 g Linolsäure (7.14 mmol), gelöst in 5 ml Ethanol, unter Rühren zugetropft. Die entstandene trübe Lösung wird zunächst für 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend kräftig geschüttelt, um eine homogene Verteilung der Linolsäure als Suspension zu erreichen. Unter Eisbadkühlung wird für 10 min Sauerstoff in die Lösung eingeleitet.

Nach erreichter Sauerstoffsättigung erfolgt die Zugabe des in 50 ml Puffer gelösten Soja-LOX-Präparates (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Während der nun ablaufenden enzymatischen Umsetzung erfolgt eine konstante Einleitung von Sauerstoff. Der Verlauf der Reaktion wird photometrisch über die Zunahme der Dien-Absorption bei 234 nm verfolgt. In der Regel ist die Reaktion beendet, wenn die vormals trübe Substratsuspension klar geworden ist. Dies ist nach etwa 90 Minuten der Fall. Durch Ansäuern mit 6 N HCl auf pH 3 wird die Reaktion abgebrochen. Die Lösung wird nun mit NaCl gesättigt und in zwei Portionen aufgeteilt. Jeder Anteil wird dreimal mit je 200 ml Diethylether extrahiert. Alle erhaltenen organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt (Iacazio et al., 1990; Fauconnier und Marlier, 1996). Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für die folgende Reduktion eingesetzt.

Ausbeute: 1.67 g (5.35 mmol, 75 %)

R_f (Pentan/Diethylether 12:8 + 1 % AcOH): 0,50

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.56 (dd, *J*₁ = 11.0, *J*₂ = 15.1, 1H, C-11H), 5.98 (dd, *J*₁ = 10.8, *J*₂ = 11.0, 1H, C-10H), 5.56 (dd, *J*₁ = 8.1, *J*₂ = 15.2, 1H, C-12H), 5.49 (dd, *J*₁ = 7.5, *J*₂ = 11.0, 1H, C-9H), 4.37 (dt, *J*₁ = 7.0, *J*₂ = 7.7, 1H, C-13H), 2.34 (t, *J*₁ = 7.2, *J*₂ = 7.3, 2H, C-2H₂), 2.17 (dd, *J*₁ = 7.2, *J*₂ = 14.3, 2H, C-8H₂), 1.56 (m, 4H, C-3 H₂, C-14H₂), 1.29 (m, 14 H, C-4H₂ bis C-7H₂ sowie C-15H₂ bis C-17H₂), 0.87 (t, *J*₁ = 7.0, *J*₂ = 7.0, 2H, C-18H₃).

Die erhaltenen ¹H-NMR-Daten einschließlich der Kopplungskonstanten im Doppelbindungsbereich entsprechen Literaturangaben und bestätigen das Vorhandensein des *Z,E*-Diensystems (Gardner und Weisleder, 1972; Chudinova et al., 1995).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 179.2 (C-1), 135.7 (C-12), 131.2 (C-9), 129.8, 127.6 (C-10, C-11), 86.6 (C-13), 33.8 (C-2), 32.5 (C-14), 31.7 (C-16), 29.3, 29.2, 28.9, 28.8 (C-4, C-5, C-6, C-7), 27.6 (C-8), 24.9 (C-3), 24.6 (C-15), 22.4 (C-17), 13.9 (C-18).

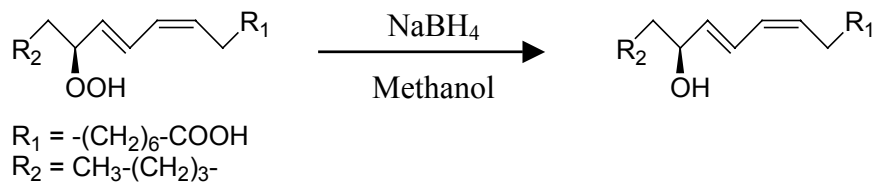
ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 330 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 330, -8 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 330 [M+NH₄]⁺ (80), 312 [M-H₂O+NH₄]⁺ (12), 295 [M-H₂O+H]⁺ (100), 279 [M-H₂O₂+H]⁺ (28), 277 [M-2H₂O+H]⁺ (77), 195 [C₁₂H₁₉O₂]⁺ (64).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* 311 [M-H]⁻.

Das charakteristische Fragment mit *m/z* 279, welches aus einer Abspaltung von H₂O₂ aus dem Molekül resultiert, beweist das Vorliegen eines Hydroperoxides (Schneider et al., 1997b).

4.6.2 Synthese von 13-(*S*)-Hydroxy-Z9,E11-octadecadiensäure



Zur Reduktion des Hydroperoxids wird die unter 4.6.1 erhaltene 13-(*S*)-Hydroperoxy-Z9,E11-octadecadiensäure (1.67 g, 5.35 mmol) in 200 ml Methanol aufgenommen. Unter Eiskühlung wird in kleinen Portionen NaBH₄ (0.4 g, 10.7 mmol) zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionsmischung für 45 min. bei 0 °C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur (ca. 20 °C) wird zur Vervollständigung der Reaktion für weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 200 ml Wasser versetzt und mit 6 N HCl vorsichtig angesäuert. Nach Sättigung mit NaCl wird der Ansatz viermal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet (Brown und Krishnamurthy, 1979; Iacazio et al., 1990). Die Vollständigkeit der Reaktion wird mittels DC überprüft. Nach Methylierung (vgl. Kapitel 4.3.2) ist zudem eine Charakterisierung mittels GC 2 und GC 3 (GC-MS, Trennsäule 2) möglich.

Das Syntheseprodukt wird durch Chromatographie an Kieselgel unter Verwendung eines Dichlormethan/Methanol-Gemisches (9:1) als Fließmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 1.43 g (4.82 mmol, 90 %)

R_f (Pentan/Diethylether 12:8 + 1 % AcOH): 0,35
 R_t GC 3 (Trennsäule 3): 37,54 min
 R_t HPLC 1 (Gradient 1a), UV: 31,72 min
 R_t HPLC 1 (Gradient 1a), ELSD: 31,90 min

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 6.49 (dd, $J_1 = 11.1$, $J_2 = 15.0$, 1H, C-11H), 5.97 (dd, $J_1 = 11.0$, $J_2 = 11.0$, 1H, C-10H), 5.67 (dd, $J_1 = 7.8$, $J_2 = 15.0$, 1H, C-12H), 5.44 (dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 11.0$, 1H, C-9H), 4.16 (dt, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 7.7$, 1H, C-13H), 2.35 (t, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 7.2$, 2H, C-2H₂), 2.16 (dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 14.2$, 2H, C-8H₂), 1.60 (m, 4H, C-3 H₂, C-14H₂), 1.32 (m, 14 H, C-4H₂ bis C-7H₂ sowie C-15H₂ bis C-17H₂), 0.88 (t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.0$, 2H, C-18H₃).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ 179.5 (C-1), 136.1 (C-12), 133.2 (C-9), 128.2, 126.2 (C-10, C-11), 73.3 (C-13), 37.6 (C-14), 34.3 (C-2), 32.2 (C-16), 29.8, 29.3, 29.2 (C-5, C-6, C-7), 28.0 (C-4), 27.6 (C-8), 25.1 (C-3), 24.6 (C-15), 22.6 (C-17), 14.0 (C-18).

Die erhaltenen NMR-Daten stimmen mit Literaturangaben überein (Iacazio et al., 1990; Babudri et al., 2000).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* (%) 319 [M+Na]⁺ (36), 314 [M+NH₄]⁺ (100).

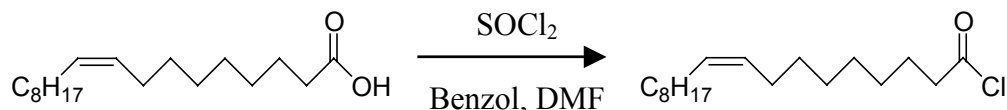
ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 314, -8 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 314 [M+NH₄]⁺ (18), 296 [M-H₂O+NH₄]⁺ (22), 279 [M-H₂O+H]⁺ (100), 261 [M-2H₂O+H]⁺ (7).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* (%) 591 [2M-H]⁻ (42), 295 [M-H]⁻ (100).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 310 (2), 296 (2), 278 (4), 236 (5), 210 (7), 178 (10), 151 (12), 136 (19), 121 (16), 109 (17), 107 (20), 105 (13), 99 (100), 95 (43), 91 (27), 81 (58), 79 (54), 71 (55), 67 (65), 55 (82), 43 (61), 41 (46).

4.7 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-Z11-eicosensäure

4.7.1 Darstellung von Ölsäurechlorid



10 g Ölsäure (Z9-Octadecensäure; 35.5 mmol) werden in 50 ml Benzol gelöst und mit 5.16 ml Thionylchlorid (8.44 g, 71 mmol) sowie katalytischen Mengen an Dimethylformamid (DMF) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) gerührt. Überschüssiges Thionylchlorid sowie das Lösungsmittel werden anschließend im Vakuum (100 mbar, 40 °C) entfernt (Bauer, 1946; Holden et al., 1984). Das erhaltene Produkt wird ohne Aufreinigung für die weitere Synthese eingesetzt. Die Ausbeute der Reaktion bzw. der noch verbliebene Anteil an nicht umgesetzter Ölsäure kann über das Verhältnis der Signale im IR-Spektrum bestimmt werden. Während die freie Säure bei 1700 cm⁻¹ absorbiert, zeigt das Säurechlorid eine Bande bei 1800 cm⁻¹ (Youngs et al., 1956).

Ausbeute: 9.37 g (31.2 mmol, 88 %)

R_t GC 3 (Trennsäule 2): 33,38 min

IR (V_{\max}): cm^{-1} 3600 (OH, kleines Signal, stammt von nicht umgesetzter Ölsäure), 3040, 2980, 2940, 2880 (C-H-Valenzen), 1800 (C=O, Ölsäurechlorid), 1700 (C=O, Ölsäure), 1470, 1420 (CH_2 -Deformation), 960, 730 (CH-Deformation von *cis*-1,2-disubstituierten Ethylenen), 680.

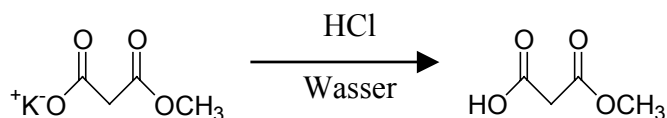
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 5.35 (m, 2H, C-9H, C-10H), 2.89 (t, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 7.3$, 2H, C-2H₂), 2.02 (dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 12.2$, 4H, C-8H₂, C-11H₂), 1.72 (m, 2H, C-3H₂), 1.31 (m, 20 H, C-4H₂ bis C-7H₂ sowie C-12H₂ bis C-17H₂), 0.89 (t, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-18H₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ 173.6 (C-1), 130.1 (C-10), 129.6 (C-9), 47.1 (C-2), 31.9 (C-16), 29.8, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 29.0, 28.9 (C-5, C-6, C-7, C-12, C-13, C-14, C-15), 28.4 (C-4), 27.2, 27.1 (C-8, C-11), 25.0 (C-3), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18).

HRGC-EL-MS (70 eV): m/z (%) 300 (2), 264 (9), 222 (8), 180 (6), 152 (6), 123 (13), 111 (18), 97 (45), 87 (40), 83 (46), 74 (46), 69 (54), 67 (30), 57 (31), 55 (100), 43 (45), 41 (52).

Eine Reaktionskontrolle mittels HPLC-MS ist nicht möglich, da das Säurechlorid bei der Verwendung eines wässrigen Fließmittels hydrolysiert.

4.7.2 Darstellung von Monomethylmalonsäure



Kalium-monomethylmalonat (30 g, 0.192 mol) wird in 30 ml Wasser gelöst und auf ca. 5 °C gekühlt. Danach werden 15 ml HCl_{conc} so zugetropft, dass die Temperatur dabei nicht über 10 °C ansteigt. Der entstandene Niederschlag von Kaliumchlorid wird abgenuzt und mit 100 ml Diethylether gewaschen. Die etherische Phase wird im Scheidetrichter abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der flüssige Rückstand von Monomethylmalonat wird im evakuierten Exsikkator getrocknet (Strube, 1963).

Ausbeute: 18.57 g (0.157 mol, 82 %)

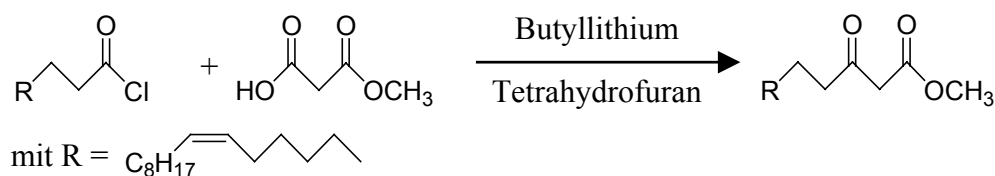
IR (V_{\max}): cm^{-1} 3500 und 2570 (OH-Valenz, assoziiert bei Carbonsäuren), 2960 und 2930 (CH), 1730 und 1710 (C=O), 1360 (C=O-Valenz in $-\text{COO}^-$) 1150 (C-O-C-Valenz)

in gesättigten Estern), 960 (O-H···O-Deformation bei Carbonsäuredimeren); (Strube, 1963).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.73 (3H, s, O- CH_3), 3.41 (2H, s, C-2 H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.5 (C-3), 167.2 (C-1), 52.2 (O- CH_3), 40.6 (C-2).

4.7.3 Darstellung von 3-Keto-Z11-eicosensäuremethylester



6.37 g Monomethylmalonat (54 mmol; 1.8-facher Überschuß bzgl. des Säurechlorids) werden unter Argonatmosphäre in 250 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Als Redoxindikator werden einige Milligramm 2,2'-Bipyridin zugesetzt. Die Lösung wird auf $-65\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und langsam 54 ml einer n-Butyllithiumlösung (ca. 2 M in Cyclohexan, 108 mmol; 2 Äquivalente bzgl. des Monomethylmalonats) zugetropft, bis der Indikator pink bleibt. Während der Zugabe steigt die Temperatur der Lösung auf $-30\text{ }^\circ\text{C}$ an. Nach erneutem Abkühlen auf $-65\text{ }^\circ\text{C}$ wird tropfenweise Ölsäurechlorid (9.0 g, 30 mmol) zugegeben. Die erhaltene heterogene Reaktionsmischung wird anschließend noch 15 Minuten bei $-65\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und in ein Gemisch aus 400 ml Diethylether und 200 ml 1 N HCl gegossen. Nach der Extraktion wird die wässrige Phase abgetrennt und die verbleibende etherische Phase zweimal mit je 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung sowie 100 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Für die nächste Stufe wird das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt (Wierenga und Skulnick, 1979).

Ausbeute: 7.81 g (23 mmol, 77 %)

R_t GC 3 (Trennsäule 2): 38,10 min

R_t HPLC 1 (Gradient 1a): 46,02 min

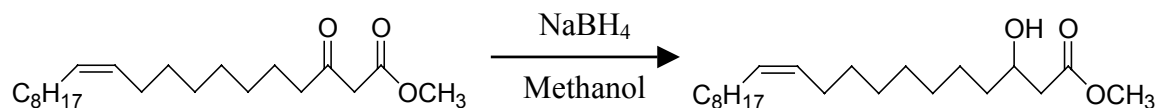
IR (V_{max}): cm^{-1} 3020, 2980, 2960, 2930 (C-H-Valenzen), 1850, 1760, 1730, 1650 (C=O), 1470, 1420 (CH_2 -Deformation), 1250, 1030 (C-O-C-Valenz in Estern), 810.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 5.33 (m, 2H, C-11H, C-12H), 3.72 (s, 3H, O- CH_3), 3.44 (s, 2H, C-2 H_2), 2.52 (t, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 7.6$, 2H, C-4 H_2), 2.00 (dd, $J_1 = 6.3$, $J_2 = 11.4$, 4H, C-10 H_2 , C-13 H_2), 1.60 (m, 2H, C-5 H_2), 1.29 (m, 20H, C-6 H_2 bis C-9 H_2 sowie C-14 H_2 bis C-19 H_2), 0.87 (t, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 6.7$, 3H, C-20 H_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ 202.7 (C-3), 167.6 (C-1), 130.0 (C-12), 129.7 (C-11), 52.2 (O- CH_3), 49.0 (C-2), 43.0 (C-4), 31.8 (C-18), 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9 (C-6, C-7, C-8, C-9, C-14, C-15, C-16, C-17), 27.4, 27.1 (C-10, C-13), 25.6 (C-5), 22.6 (C-19), 14.0 (C-20).

HRGC-EL-MS (70 eV): m/z (%) 338 (1), 320 (4) 265 (7), 222 (2), 167 (20), 153 (12), 139 (12), 121 (10), 113 (32), 101 (23), 97 (35), 85 (77), 83 (36), 81 (28), 69 (41), 67 (32), 57 (100), 55 (79), 43 (37), 41 (53).

4.7.4 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-Z11-eicosensäuremethylester



5 g 3-Keto-Z11-eicosensäuremethylester (14.8 mmol) werden in 50 ml Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden portionsweise insgesamt 1.68 g NaBH_4 (44.3 mmol) zugesetzt. Dieser große Überschuß an Reduktionsmittel ist nötig, da Methanol als Lösungsmittel verwendet wird und dieses selbst deutlich mit NaBH_4 reagiert. Anschließend wird die trübe Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand vorsichtig mit 1 N HCl versetzt, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr beobachtet wird. Die wässrige Lösung wird viermal mit je 50 ml Diethylether extrahiert, der Extrakt über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen (Brown und Krishnamurthy, 1979). Zur Abtrennung von nicht umgesetzter Ölsäure, die seit der ersten Stufe in geringen Anteilen im Reaktionsansatz vorliegt, wird das Produkt jetzt einer Aufreinigung an RP-18 Material unterzogen. Als Fließmittel wird ein Stufengradient von Wasser (pH 2.8) und Acetonitril (30:70 auf 100) eingesetzt. Fraktionen, in denen bei der HPLC-ELSD-Kontrolle die gesuchte Komponente nachgewiesen werden kann, werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der verbleibende Rest an Wasser wird mittels Lyophilisation entfernt.

Ausbeute: 4.62 g (13.6 mmol, 92 %)

Etherphase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Ein Rückstand an Wasser wird durch Lyophilisieren entfernt.

Ausbeute: 417 mg (13.6 mmol, 87 %)

R_t HPLC 1 (Gradient 1a): 41,73 min

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 5.34 (m, 2H, C-11H, C-12H), 4.02 (m, 1H, C-3H), 2.56 (dd, *J*₁ = 3.4, *J*₂ = 16.5, 1H, C-2H_a), 2.44 (dd, *J*₁ = 8.5, *J*₂ = 16.0, 1H, C-2H_b), 2.01 (dd, *J*₁ = 6.7, *J*₂ = 12.2, 4H, C-10H₂, C-13H₂), 1.47 (m, 2H, C-4H₂), 1.29 (m, 22H, C-5H₂ bis C-9H₂ sowie C-14H₂ bis C-19H₂), 0.88 (t, *J*₁ = 6.4, *J*₂ = 7.0, 3H, C-20H₃).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ 177.0 (C-1), 129.9 (C-12), 129.8 (C-11), 65.8 (C-3), 40.9 (C-2), 36.5 (C-4), 31.9 (C-18), 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0 (C-6, C-7, C-8, C-9, C-14, C-15, C-16, C-17), 27.2, 27.1 (C-10, C-13), 25.4 (C-5), 22.7 (C-19), 14.1 (C-20).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 349 [M+Na]⁺ (51), 344 [M+NH₄]⁺ (100).

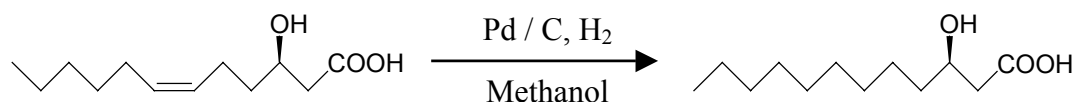
ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 344, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 344 [M+NH₄]⁺ (23), 327 [M+H]⁺ (100), 309 [M-H₂O+H]⁺ (27), 291 [M-2H₂O+H]⁺ (13), 267 [C₁₈H₃₅O]⁺ (45), 249 [C₁₈H₃₅O-H₂O]⁺ (15).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* 651 [2M-H]⁻ (78), 325 [M-H]⁻ (100).

Das HRGC-EI-Massenspektrum (70 eV), das nach Methylierung der Verbindung (Arbeitsvorschriften 4.3.2 und 4.3.3) erhalten wurde, entspricht dem unter 4.7.4.

4.8 Darstellung von Dodecan-1,3-diolen

4.8.1 Darstellung von (*R*)-3-Hydroxy-dodecansäure



15 mg (*R*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (0.07 mmol), isoliert aus einer bakteriellen Umsetzung von Linolsäure, werden in 15 ml Methanol gelöst und mit 15 mg Palladium-Aktivkohle (10 % Pd auf Aktivkohle) versetzt. Der Kolben wird mehrmals evakuiert

und mit Wasserstoff belüftet, schließlich mit einem wasserstoffgefüllten Ballon verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach völligem Umsatz (Kontrolle GC 1, nach Methylierung) werden drei Spatelspitzen Celite zugesetzt und die Lösung filtriert. Der Rückstand wird mit insgesamt 30 ml Methanol gewaschen und das Lösungsmittel abgezogen (Karakhanow et al., 1987; Beuerle, 1999). Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Aufreinigung direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Ein Teil wird zur Aufnahme eines GC-MS-Spektrums nach Vorschrift 4.3.2 methyliert.

Ausbeute: 14.2 mg (0.066 mmol, 95 %)

R_t GC 1 (Methylester): 39,46 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.04 (m, 1H, C-3H), 2.56 (dd, *J*₁ = 3.2, *J*₂ = 16.2, 1H, C-2H_a), 2.48 (dd, *J*₁ = 9.1, *J*₂ = 16.5, 1H, C-2H_b), 1.54 (m, 1H, C-4H_a), 1.45 (m, 1H, C-4H_b), 1.29 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.89 (t, *J*₁ = 6.6, *J*₂ = 7.0, 3H, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.6 (C-1), 68.1 (C-2), 43.1 (C-2), 36.4 (C-4), 31.8 (C-10), 29.9, 29.5, 29.5, 29.3 (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.5 (C-5), 22.3 (C-11), 14.1 (C-12).

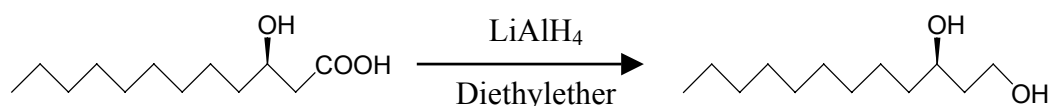
ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* (%) 239 [M+Na]⁺ (46), 234 [M+NH₄]⁺ (100).

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 234, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 234 [M+NH₄]⁺ (46), 217 [M+H]⁺ (89), 199 [M-H₂O+H]⁺ (100), 181 [M-2H₂O+H]⁺ (16), 157 [C₁₀H₂₁O]⁺ (23), 139 [C₁₀H₂₁O-H₂O]⁺ (11).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* (%) 431 [2M-H]⁻ (77), 215 [M-H]⁻ (100).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 230 (1), 212 (1), 180 (5), 163 (6), 155 (7), 138 (14), 110 (7), 104 (12), 103 (100), 96 (15), 83 (36), 74 (56), 71 (62), 69 (31), 61 (57), 57 (38), 55 (54), 43 (73), 41 (52).

4.8.2 Darstellung von (*R*)-Dodecan-1,3-diol



1.9 mg Lithiumaluminiumhydrid (0.05 mmol) werden in 4 ml trockenem Diethylether suspensiert und vorsichtig 10 mg (*R*)-3-Hydroxy-dodecansäure (0.05 mmol), gelöst in 2

ml Diethylether, zugetropft. Die Suspension wird zwei Stunden am Rückfluss gekocht. Um den Überschuss an LiAlH_4 zu zerstören, wird dem Ansatz anschließend unter Eiskühlung so lange Eiswasser zugetropft, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Anschließend wird soviel 10 %ige Schwefelsäure zugesetzt, bis sich der Niederschlag von Aluminiumhydroxid aufgelöst hat. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 5 ml Diethylether extrahiert, die vereinigte organische Phase mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wird das Lösungsmittel unter dem Stickstoffstrom vertrieben (Beuerle, 1999; Beuerle et al., 1999). Das erhaltene Produkt wird aufgrund der geringen Menge nicht mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 5.9 mg (0.03 mmol, 58 %)

R_t GC 1: 45,50 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.87 (m, 3H, C-1H₂OH, C-3HOH), 2.59 (s br, 2H, OH), 1.71 (m, 2H, C-2H₂) 1.50 (m, 2H, C-4H₂), 1.26 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

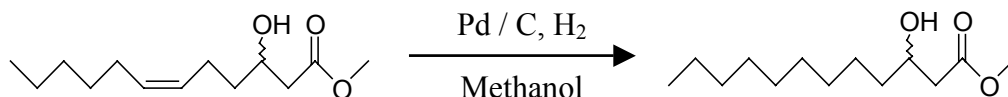
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 72.0 (C-1), 61.7 (C-3), 38.1 (C-2), 37.6 (C-4), 31.8 (C-10), 29.7, 29.6, 29.5, 29.3 (C,6, C-7, C-8, C-9), 25.6 (C-5), 22.8 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 220 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 220, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 220 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (44), 203 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 185 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (43), 167 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (23).

HRGC-MS (70 eV): m/z (%) 202 (2), 157 (3), 155 (9), 112 (3), 111 (11), 110 (40), 97 (19), 95 (12), 83 (25), 81 (21), 75 (100), 71 (23), 69 (30), 67 (42), 57 (65), 55 (67), 45 (79), 43 (81), 41 (45).

4.8.3 Darstellung von (*R,S*)-3-Hydroxy-dodecensäuremethylester



Analog zur Hydrierung von (*R*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäure (4.8.1) werden 100 mg (0.47 mmol) (*R,S*)-3-Hydroxy-Z6-dodecensäuremethylester in 100 ml Methanol gelöst, mit 100 mg Palladium-Aktivkohle (10 % Pd auf Aktivkohle) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 12 Stunden gerührt. Nach der Filtration

des Ansatzes wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für die Synthese von (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol eingesetzt.

Ausbeute: 96 mg (0.44 mmol, 95 %)

R_t GC 1 (Methylester): 39,46 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 4.00 (m, 1H, C-3H), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.52 (dd, $J_1 = 2.9$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_a), 2.42 (dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.5$, 1H, C-2H_b), 1.52 (m, 1H, C-4H_a), 1.43 (m, 1H, C-4H_b), 1.28 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.4$, 3H, C-12H₃).

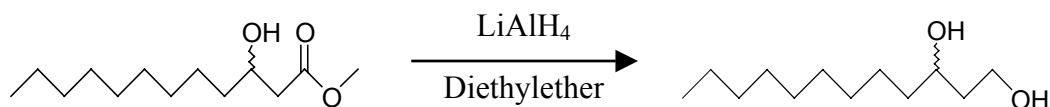
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 169.9 (C-1), 68.1 (C-3), 51.6 (OCH_3), 42.7 (C-2), 36.6 (C-4), 31.9 (C-10), 29.9, 29.6, 29.5, 29.3 (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.5 (C-5), 22.6 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z (%) 248 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 248, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 248 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (21), 231 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 213 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (13), 181 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2^2+\text{H}]^+$ (17), 157 $[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}]$ (12).

HRGC-EI-MS (70 eV): m/z (%) 230 (1), 212 (1), 180 (7), 163 (7), 155 (9), 138 (22), 110 (22), 104 (27), 103 (100), 96 (37), 83 (60), 74 (83), 71 (84), 69 (61), 61 (67), 57 (60), 55 (67), 43 (81), 41 (67).

4.8.4 Darstellung von (*R,S*)-Dodecan-1,3-diol



80 mg (*R,S*)-3-Hydroxy-dodecansäuremethylester (0.35 mmol) wird tropfenweise zu einer Suspension von 13.2 mg Lithiumaluminiumhydrid (0.35 mmol) in 4 ml trockenem Diethylether zugegeben. Die Reaktion wird analog der Reduktion der enantiomerenreinen Verbindung (vgl. Kapitel 4.8.2) durchgeführt. Das nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel Diethylether/Pentan, 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 43.2 mg (0.21 mmol, 61 %)

R_t GC 1: 45,45 min

R_t GC 2: 24,51 min
 R_t HPLC 1 (Gradient 1a): 30,21 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.87 (m, 3H, C-1H₂OH, C-3HOH), 2.51 (s br, 2H, OH), 1.71 (m, 2H, C-2H₂) 1.49 (m, 2H, C-4H₂), 1.27 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, *J*₁ = 6.6, *J*₂ = 7.0, 3H, C-12H₃).

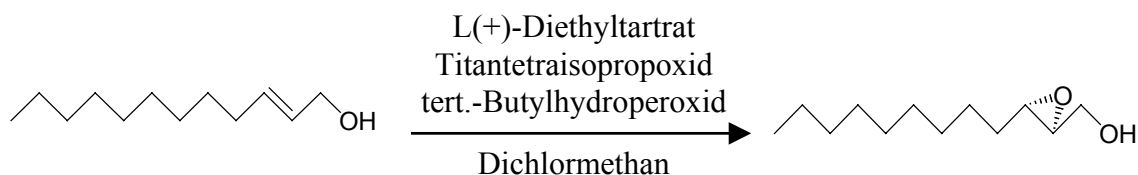
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 72.0 (C-1), 61.7 (C-3), 38.2 (C-2), 37.7 (C-4), 31.8 (C-10), 29.6, 29.6, 29.5, 29.3 (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.3 (C-5), 22.8 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 220 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 220, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 220 [M+NH₄]⁺ (53), 203 [M+H]⁺ (100), 185 [M-H₂O+H]⁺ (76), 167 [M-2H₂O+H]⁺ (4).

HRGC-MS (70 eV): *m/z* (%) 202 (4), 157 (6), 155 (19), 112 (12), 110 (9), 97 (25), 95 (22), 83 (60), 81 (31), 75 (100), 71 (31), 69 (48), 67 (42), 57 (91), 55 (73), 45 (61), 43 (70), 41 (66).

4.8.5 Darstellung von (2*S*,3*S*)-2,3-Epoxy-dodecan-1-ol



Ein 500 ml-Rundkolben wird im Trockenschrank getrocknet und mit trockenem Argon begast. Unter Argonatmosphäre werden 160 ml trockenes Dichlormethan vorgelegt und auf -30 °C gekühlt. Anschließend werden unter ständigem Rühren 5.1 ml (4.9 g, 16 mmol) Titan-tetraisopropoxid und 2.8 ml (3.3 g, 16 mmol) L(+)-Diethyltartrat über ein Septum injiziert. Nach 5-minütiger Pause werden 3.5 ml (3.0 g, 16 mmol) *E*2-Dodec-1-ol und zuletzt 5.8 ml einer 5.5 M tert.-Butylhydroperoxidlösung in Decan (32 mmol) zugegeben. Die so erhaltene homogene gelbe Lösung wird sorgfältig mit Stickstoff begast und im verschlossenen Reaktionsgefäß 48 Stunden in einem Gefrierfach bei etwa -20 °C gelagert. Nach vollständiger Reaktion wird das Gemisch auf -23 °C gekühlt und mit 60 ml einer 10 %igen L(+)-Weinsäurelösung versetzt. Dabei gefriert die Wasserphase. Nach 30 Minuten wird das Kühlbad entfernt und die Mischung bei Raumtemperatur für weitere 60 Minuten gerührt, bis die Wasserphase klar wird. Die beiden Phasen werden im Scheidetrichter getrennt, die organische Phase mit 100 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeeengt.

Das zurückbleibende leicht gelb gefärbte, ölige Rohprodukt wird in 50 ml Diethylether aufgenommen und auf 0 °C gekühlt. Nach Zusatz von 50 ml 1 M Natronlauge wird 60 Minuten gerührt. Die beiden Phasen werden im Scheidetrichter getrennt, die wässrige Phase wird mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wird anschließend mit 50 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Das sich ausscheidende Epoxid wurde ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt (Katsuki und Sharpless, 1980; Barchi et al., 1984; Millar und Underhill, 1986, Pickenhagen und Brönner-Schindler, 1987; Rao et al., 1989; Cossy und Aclinou, 1990).

Ausbeute: 2.9 g (14.4 mmol, 90 %)

R_t GC 1: 40,08 min

R_t GC 2: 22,57 min

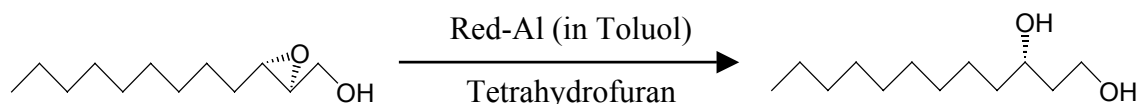
IR (V_{max}): cm^{-1} 3300-3100 (OH), 3030, 2940, 2910, 2820 (CH), 1450, 1370, 1230, 1020, 880, 810 (Epoxidring), 720.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.92 (d, $J = 12.5$, 1H, C-1H_a), 3.63 (d, $J = 12.5$, 1H, C-1H_b), 3.48 (dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 14.0$, 1H, C-2H), 2.95 (m, 1H, C-3H), 1.57 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 12.7$, 2H, C-4H₂), 1.26 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 61.8 (C-1), 58.3 (C-2), 50.6 (C-3), 32.0 (C-10), 31.6 (C-4), 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.9 (C-5), 22.6 (C-11), 14.0 (C-12).

HRGC-EI-MS (70 eV): m/z (%) 169 (3), 157 (1), 109 (11), 97 (100), 95 (31), 84 (26), 83 (89), 81 (38), 71 (58), 69 (92), 67 (48), 57 (83), 56 (68), 44 (49), 43 (81), 41 (80).

4.8.6 Darstellung von (*S*)-Dodecan-1,3-diol



2.9 g (14.4 mmol) (*2S,3S*)-2,3-Epoxy-dodecan-1-ol werden in 100 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann werden tropfenweise ca. 9 ml einer 65 %igen Lösung von Natrium-dihydrido-bis(2-methoxyethoxy)aluminat („Red-Al“, 28.8 mmol) in Toluol zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Das Gemisch wird für acht Stunden bei 0 °C gerührt und die Reaktion durch Zugabe

von 100 ml 10 %iger Salzsäure abgebrochen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert und die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet (Viti, 1982; Finan und Kishi, 1982; Ma et al, 1982; Katsuki und Martin, 1996). Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das gebildete (*S*)-Dodecan-1,3-diol mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Fließmittel Diethylether/Pentan, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 g (12.9 mmol, 89 %)

R_t GC 1: 45,46 min

IR (V_{max}): cm^{-1} 3600-3100 (OH), 2840 (CH), 1450, 1370, 1250, 1160, 900.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.85 (m, 3H, C-1H₂OH, C-3HOH), 2.37 (s br, 2H, OH), 1.70 (m, 2H, C-2H₂) 1.45 (m, 2H, C-4H₂), 1.29 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.1$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 71.8 (C-1), 61.4 (C-3), 38.2 (C-2), 37.7 (C-4), 31.5 (C-10), 29.6, 29.6, 29.5, 29.3 (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.3 (C-5), 22.8 (C-11), 13.9 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 220 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 220, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 220 [M+NH₄]⁺ (51), 203 [M+H]⁺ (100), 185 [M-H₂O+H]⁺ (67), 167 [M-2H₂O+H]⁺ (12).

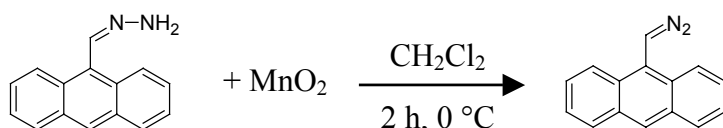
HRGC-EI-MS (70 eV): m/z (%) 202 (6), 157 (4), 155 (10), 111 (17), 109 (11), 97 (35), 95 (33), 83 (57), 81 (41), 75 (85), 71 (35), 69 (60), 67 (52), 57 (100), 55 (91), 45 (90), 43 (91), 41 (71)

4.9 CD-Spektroskopie der (*R*)-3-Hydroxysäuren

4.9.1 Darstellung von 9-Anthryldiazomethan (ADAM)

9-Anthryldiazomethan (ADAM) ist durch Oxidation von Anthrylaldehydhydrazon mit HgO (Nakaya et al., 1967; Gimple et al., 1997) oder MnO₂ (Goh und Gian, 1979; Hör et al., 1998) in guten Ausbeuten zugänglich.

Arbeitsvorschrift zur Synthese von 9-Anthryldiazomethan (ADAM) mit MnO₂:



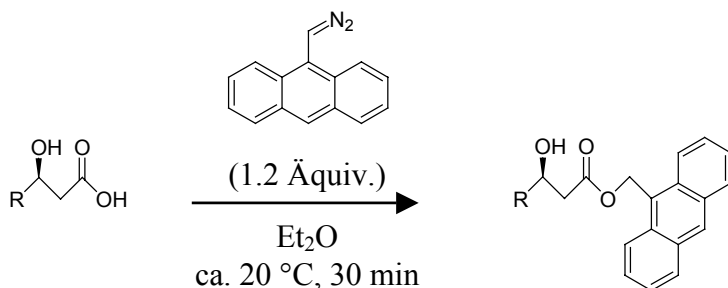
In einem trockenen 100 ml-Rundkolben werden 3.48 g Mangan (IV)oxid (40 mmol) und 2.20 g Anthrylaldehydhydrazon (10 mmol) in 50 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wird die Reaktionsmischung zwei Stunden gerührt. Dabei wird der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie (Fließmittel Diethylether/Pentan 1:1, UV-Detektion) kontrolliert. Anschließend wird der Reaktionsansatz abfiltriert und der Rückstand mit 60 ml Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, wobei die Wasserbadtemperatur 40 °C nicht überschreiten soll. Um verbliebenes Anthrylaldehydhydrazon zu entfernen, wird der Rückstand mehrmals mit Diethylether extrahiert. Nach erneutem Einengen des Extraktes am Rotationsverdampfer wird der Rückstand am Hochvakuum vollständig getrocknet. Man erhält das Produkt in Form von roten Kristallen.

Ausbeute: 1.98 g (9.1 mmol, 91 %)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.33 (s, 1H, Ar), 8.17 (d, $J = 8.84$ Hz, 2H, Ar), 8.01 (d, $J = 7.72$ Hz, 2H, Ar), 7.53 (t, $J = 7.43$ Hz, 2H, Ar), 7.49 (t, $J = 7.08$ Hz, 2H, Ar), 5.70 (s, 1H, CH).

4.9.2 Derivatisierung der 3-Hydroxysäuren in bichromophore Derivate

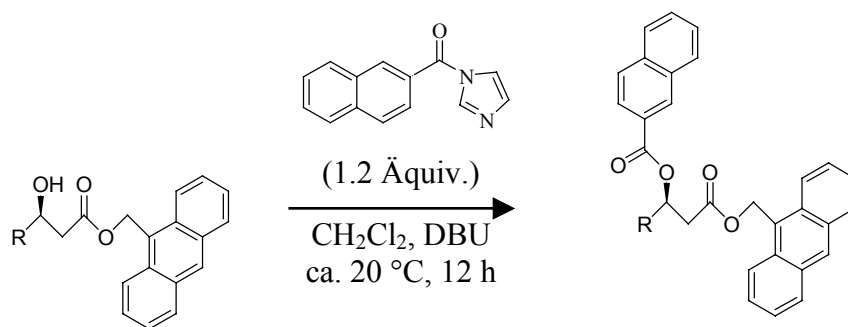
4.9.2.1 Derivatisierung der Carboxylfunktion mit 9-Anthryldiazomethan



Allgemeine Arbeitsvorschrift (Nimura und Kinoshita, 1980; Adam et al., 1998; Hör et al., 1998):

In einem trockenen, mit Argon gefüllten 10 ml-Rundkolben wird zu einer Lösung der 3-Hydroxysäure in 2.5 ml trockenem Diethylether tropfenweise eine Lösung von 9-Anthryldiazomethan (1.2 Äquiv.) in 2.5 ml trockenem Diethylether gegeben. Dabei ist Gasentwicklung sowie eine Entfärbung der intensiv orangeroten Lösung zu beobachten. Das Reaktionsgemisch wird 60 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) gerührt. Nach Einengen der Lösung am Rotationsdampfer (20 °C, 17 Torr) wird das Produkt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie mit einem Diethylether/Petrolether-Gemisch (1:1) in guten Ausbeuten (80-90 %) isoliert.

4.9.2.2 Derivatisierung der Hydroxyfunktion mit 2-Naphthoylimidazol



Allgemeine Arbeitsvorschrift (Adam et al., 1998; Hör et al., 1998):

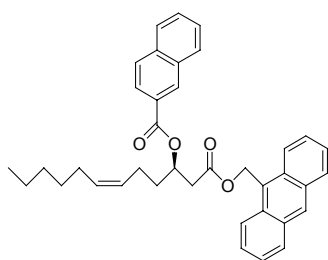
Die unter 4.9.2.1 erhaltenen Anthrylmethylester werden anschließend in einem trockenen, mit Argon gefüllten 10 ml-Rundkolben mit 2-Naphthoylimidazol (1.2 Äquiv.) und katalytischen Mengen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en (DBU) in 5 ml trockenem Dichlormethan behandelt und bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) 12 Stunden inkubiert. Nach Einengen der Lösung am Rotationsdampfer (20 °C, 17 Torr) wird das Produkt durch präparative Dünnschichtchromatographie mit einem Diethylether/Pentan-Gemisch (1:1) in guten Ausbeuten (70-80 %) isoliert.

4.9.3 Aufnahme der CD-Spektren

Für die Aufnahme der UV- und CD-Spektren werden die gereinigten bichromophoren Derivate in Acetonitril (spectroscopic grade) gelöst, so dass die Extinktion im Absorptionsmaximum zwischen 0.8 und 1.0 liegt. Mit Hilfe des bekannten Extink-

tionskoeffizienten des 9'-Anthrylmethylchromophors ($\epsilon_{254} = 140\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) kann die Konzentration der Lösung über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet werden. Die CD-Spektren werden von 400 bis 200 nm in 1 nm Schritten bei Raumtemperatur aufgenommen. Die erhaltenen Spektren stellen den Mittelwert aus vier Messungen dar.

9'-Methylanthyryl-(*R*)-3-(2''-naphtoyloxy)-dodec-Z6-enoat



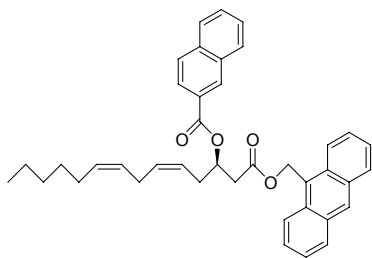
Ansatz: 10.0 mg (46.7 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar), 8.34 (d, $J = 8.4$, 1H, Ar), 8.04 (m, 3H, Ar), 7.88 (m, 3H, Ar), 7.52 (m, 6H, Ar), 6.25 (dd, $J_1 = 39.4$, $J_2 = 14.3$, 2H, ArCH₂), 5.41 (dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 17.8$, 1H, C-7H), 5.36 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 17.9$, 1H, C-6H), 5.11 (m, 1H, C-3H), 2.89 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 15.8$, 1H, C-2H_a), 2.78 (dd, $J_1 = 9.3$, $J_2 = 15.9$, 1H, C-2H_b), 2.14 (m, 2H, C-5H₂), 1.99 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 14.3$, 2H, C-8H₂), 1.83 (m, 2H, C-4H₂), 1.28 (m, 6H, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.87 (t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 254 nm (5.15), 241 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 253 nm (+ 34.2), 237 nm (- 31.9).

9'-Methylanthyryl-(*R*)-3-(2''-naphtoyloxy)-tetradecadi-Z5,Z8-enoat



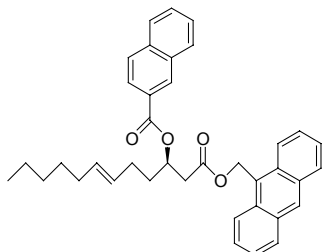
Ansatz: 19.8 mg (82.5 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (s, 1H, Ar), 8.52 (s, 1H, Ar), 8.33 (d, $J = 8.2$, 1H, Ar), 8.05 (m, 3H, Ar), 7.88 (m, 3H, Ar), 7.51 (m, 6H, Ar), 6.27 (dd, $J_1 = 47.7$, $J_2 = 22.4$, 2H, ArCH₂), 5.52 (dd, 1H, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.2$, C-6H), 5.42 (dd, 2H, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 18.2$, C-5H, C-9H), 5.33 (dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.9$, 1H, C-8H), 5.08 (1H, m, C-3H), 2.88 (dd, $J_1 = 2.9$, $J_2 = 16.3$, 1H, C-2H_a), 2.83 (t, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 7.2$, 2H, C-7H₂), 2.77 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.3$, 1H, C-2H_b), 2.66 (m, 2H, C-4H₂), 2.01 (dd, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 14.2$, 2H, C-10H₂), 1.30 (m, 6H, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.91 (t, $J_1 = 6.7$, $J_2 = 7.1$, 3H, C-14H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 255 nm (5.15), 238 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 254 nm (+ 19.7), 238 nm (- 16.9).

9'-Methylanthryl-(R)-3-(2''-naphthoxy)-dodec-E6-enoat

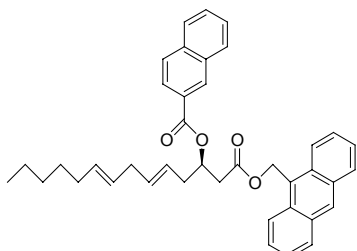


Ansatz: 1.0 mg (4.7 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.59 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar), 8.34 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 8.02 (m, 3H, Ar), 7.88 (m, 3H, Ar), 7.54 (m, 6H, Ar), 6.25 (dd, $J_1 = 46.2$, $J_2 = 21.8$, 2H, ArCH₂), 5.44 (m, 2H, C-6H, C-7H), 5.05 (m, 1H, C-3H), 2.93 (dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 16.2$, 1H, C-2H_a), 2.81 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_b), 2.13 (m, 2H, C-5H₂), 1.97 (dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 13.5$, 2H, C-8H₂), 1.79 (m, 2H, C-4H₂), 1.33 (m, 6H, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.89 (t, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 7.1$, 3H, C-12H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 255 nm (5.15), 239 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 253 nm (+ 41.2), 236 nm (- 31.4).

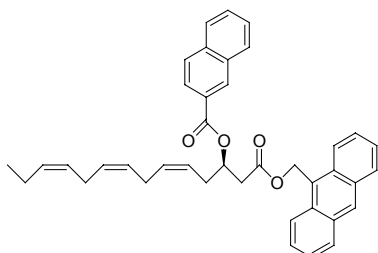
9'-Methylanthryl-(*R*)-3-(2''-naphtoyloxy)-tetradecadi-*E*5,*E*8-enoat

Ansatz: 4.3 mg (20.1 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.60 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar), 8.33 (d, $J = 8.5$, 1H, Ar), 8.04 (m, 3H, Ar), 7.89 (m, 3H, Ar), 7.53 (m, 6H, Ar), 6.23 (dd, $J_1 = 47.9$, $J_2 = 22.7$, 2H, ArCH₂), 5.58 (m, 2H, C-6H, C-8H), 5.41 (m, 2HC-5H, C-9H), 5.01 (1H, m, C-3H), 2.87 (dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.3$, 1H, C-2H_a), 2.79 (dd, $J_1 = 8.9$, $J_2 = 16.2$, 1H, C-2H_b), 2.72 (t, $J_1 = 5.8$, $J_2 = 5.2$, 2H, C-7H₂), 2.55 (m, 2H, C-4H₂), 1.96 (dd, $J_1 = 6.0$, $J_2 = 14.0$, 2H, C-10H₂), 1.29 (m, 6H, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (t, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 7.1$, 3H, C-14H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 255 nm (5.15), 240 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 254 nm (+ 29.2), 238 nm (- 34.1).

9'-Methylanthryl-(*R*)-3-(2''-naphtoyloxy)-tetradecatri-*Z*5,*Z*8,*Z*11-enoat

Ansatz: 11.6 mg (48.7 μmol)

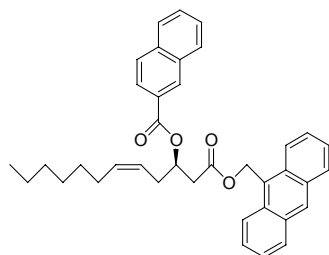
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.59 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar), 8.34 (d, $J = 8.7$, 1H, Ar), 8.04 (m, 3H, Ar), 7.88 (m, 3H, Ar), 7.50 (m, 6H, Ar), 6.26 (dd, $J_1 = 48.2$, $J_2 = 23.2$, 2H, ArCH₂), 5.51 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 18.0$, 2H, C-6H, C-11H), 5.39 (m, 4H, C-5H, C-8H, C-9H, C-12H), 5.12 (m, 1H, C-3H), 2.88 (dd, $J_1 = 3.1$, $J_2 = 16.5$, 1H, C-2H_a), 2.82 (dd,

$J_1 = 7.5$, $J_2 = 15.7$, 4H, C-7H₂, C-10H₂), 2.74 (1H, dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 16.1$, C-2H_b), 2.61 (m, 2H, C-4H₂), 2.02 (m, 2H, C-13H₂), 1.00 (3H, t, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 7.2$, C-14H₃).

UV (CH₃CN): λ_{\max} (lg ϵ) = 255 nm (5.15), 241 nm.

CD (CH₃CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 253 nm (+ 30.5), 238 nm (- 33.2).

9'-Methylanthryl-(R)-3-(2''-naphtoyloxy)-dodec-Z5-enoat



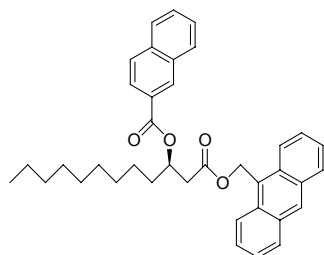
Ansatz: 14.0 mg (65.4 μmol)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (s, 1H, Ar), 8.52 (s, 1H, Ar), 8.36 (d, $J = 8.0$, 1H, Ar), 8.05 (m, 3H, Ar), 7.87 (m, 3H, Ar), 7.50 (m, 6H, Ar), 6.27 (dd, $J_1 = 38.2$, $J_2 = 13.1$, 2H, ArCH₂), 5.54 (dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.9$, 1H, C-6H), 5.36 (dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.4$, 1H, C-5H), 5.07 (m, 1H, C-3H), 2.85 (dd, $J_1 = 2.9$, $J_2 = 16.2$, 1H, C-2H_a), 2.78 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_b), 2.51 (m, 2H, C-4H₂), 1.97 (dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 13.9$, 2H, C-7H₂), 1.27 (m, 8H, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, 3H, C-12H₃).

UV (CH₃CN): λ_{\max} (lg ϵ) = 255 nm (5.15), 241 nm.

CD (CH₃CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 254 nm (+ 25.5), 238 nm (- 19.3).

9'-Methylanthryl-(R)-3-(2''-naphtoyloxy)-dodecanoat



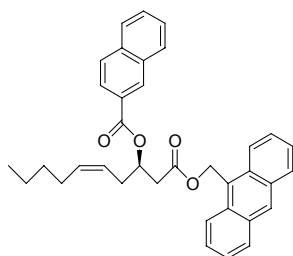
Ansatz: 7.5 mg (34.7 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58 (s, 1H, Ar), 8.50 (s, 1H, Ar), 8.35 (d, $J = 8.6$, 1H, Ar), 8.03 (m, 3H, Ar), 7.87 (m, 3H, Ar), 7.54 (m, 6H, Ar), 6.26 (dd, $J_1 = 48.7$, $J_2 = 23.7$, 2H, ArCH₂), 5.02 (m, 1H, C-3H), 2.79 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 16.2$, 1H, C-2H_a), 2.71 (dd, $J_1 = 9.3$, $J_2 = 16.1$, 1H, C-2H_b), 1.81 (m, 2H, C-4H₂), 1.29 (m, 14H, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.1$, 3H, C-12H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 255 nm (5.15), 239 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 253 nm (+ 34.6), 237 nm (- 34.2).

9`-Methylanthryl-(*R*)-3-(2``-naphtoyloxy)-dec-*Z*5-enoat



Ansatz: 20.4 mg (109.7 μmol)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.59 (s, 1H, Ar), 8.50 (s, 1H, Ar), 8.33 (d, $J = 7.9$, 1H, Ar), 8.02 (m, 3H, Ar), 7.89 (m, 3H, Ar), 7.55 (m, 6H, Ar), 6.25 (dd, $J_1 = 37.9$, $J_2 = 13.8$, 2H, ArCH₂), 5.53 (dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.9$, 1H, C-6H), 5.39 (dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.2$, 1H, C-5H), 5.05 (m, 1H, C-3H), 2.87 (dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 16.2$, 1H, C-2H_a), 2.77 (dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 16.4$, 1H, C-2H_b), 2.58 (m, 2H, C-4H₂), 2.01 (dd, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 13.2$, 2H, C-7H₂), 1.29 (m, 4H, C-8H₂, C-9H₂), 0.89 (t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.4$, 3H, C-10H₃).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 254 nm (5.15), 239 nm.

CD (CH_3CN): λ_{ext} ($\Delta\epsilon$) = 254 nm (+ 25.9), 237 nm (- 28.0).

Anhang A

Chromatographische und spektroskopische Kenndaten der isolierten 3-(*R*)-Hydroxysäuren

3-(*R*)-Hydroxy-Z6-dodecensäure [U1, 2b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 24,82 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 40,97 min

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.42 (1H, dd, *J*₁ = 7.2, *J*₂ = 17.9, *cis* C-7H), 5.35 (1H, dd, *J*₁ = 7.1, *J*₂ = 17.9, *cis* C-6H), 4.06 (1H, m, C-3H), 2.56 (1H, dd, *J*₁ = 3.2, *J*₂ = 16.0, C-2H_a), 2.47 (1H, dd, *J*₁ = 8.8, *J*₂ = 16.0, C-2H_b), 2.17 (2H, m, C-5H₂), 2.04 (2H, dd, *J*₁ = 7.2, *J*₂ = 14.3, C-8H₂), 1.62 (1H, m, C-4H_a), 1.51 (1H, m, C-4H_b), 1.33 (6H, m, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.89 (3H, t, *J*₁ = 6.8, *J*₂ = 7.1, C-12H₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 177.6 (C-1), 131.2 (C-7), 128.4 (C-6), 67.7 (C-3), 41.2 (C-2), 36.4 (C-4), 31.5 (C-10), 29.3 (C-9), 27.2 (C-8), 23.3 (C-5), 22.6 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 237 [M+Na]⁺, 232 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 232, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 232 [M+NH₄]⁺ (4), 215 [M+H]⁺ (28), 197 [M-H₂O+H]⁺ (26), 179 [M-2H₂O+H]⁺ (6), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (100), 137 [C₁₀H₁₉O-H₂O]⁺ (11).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* 427 [2M-H]⁻, 213 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 228 (1), 210 (3), 136 (18), 110 (11), 103 (16), 100 (22), 93 (16), 84 (32), 81 (37), 80 (30), 79 (36), 69 (40), 67 (44), 55 (70), 54 (44), 43 (75), 41 (100).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [U2, 2c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,13 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,92 min

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.1$, *cis* C-6H), 5.41 (2H, dd, $J_1 = 8.1$, $J_2 = 18.8$, *cis* C-5H, *cis* C-9H), 5.31 (1H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-8H), 4.10 (1H, m, C-3H), 2.80 (2H, t, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 7.2$, C-7H₂), 2.59 (1H, dd, $J_1 = 2.7$, $J_2 = 16.1$, C-2H_a), 2.49 (1H, dd, $J_1 = 9.4$, $J_2 = 15.9$, C-2H_b), 2.35 (1H, m, C-4H_a), 2.31 (1H, m, C-4H_b), 2.05 (2H, dd, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 14.1$, C-10H₂), 1.32 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 7.2$, C-14H₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 177.5 (C-1), 131.8 (C-5), 130.8 (C-9), 127.1 (C-8), 124.2 (C-6), 67.9 (C-3), 40.6 (C-2), 34.3 (C-4), 31.5 (C-12), 29.2 (C-11), 27.2 (C-10), 25.8 (C-7), 22.5 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 [M+Na]⁺, 258 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 [M+NH₄]⁺ (10), 241 [M+H]⁺ (95), 223 [M-H₂O+H]⁺ (100), 205 [M-2H₂O+H]⁺ (28), 181 [C₁₂H₂₁O]⁺ (88), 163 [C₁₂H₂₁O-H₂O]⁺ (61).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 [2M-H]⁻, 239 [M-H].

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (1), 236 (1), 152 (7), 133 (7), 119 (11), 105 (27), 103 (53), 95 (18), 91 (20), 81 (38), 79 (45), 71 (54), 67 (65), 61 (29), 55 (61), 43 (100), 41 (82).

3-(*R*)-Hydroxy-Z7,Z10-hexadecadiensäure [U3]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 30,26 min

R_T GC 3 (Trennsäule 2): 31,76 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.37 (4H, m, C-7H, C-8H, C-10H, C-11H), 4.03 (1H, m, C-3H), 2.77 (2H, t, $J_1 = 5.9$, $J_2 = 6.3$, C-9H₂), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 2.9$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.47 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.7$, C-2H_b), 2.05 (4H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 14.3$, C-6H₂, C-12H₂), 1.52 (2H, m, C-4H₂), 1.32 (8H, m, C-5H₂, C-13H₂, C-14H₂, C-15H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, C-16H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.1 (C-1), 130.4 (C-7), 129.4 (C-11), 128.8 (C-10), 127.8 (C-8), 65.7 (C-3), 41.0 (C-2), 36.2 (C-4), 31.5 (C-14), 29.3 (C-13), 27.3 (C-12), 27.0 (C-6), 25.7 (C-9), 25.5 (C-5), 22.5 (C-15), 14.0 (C-16).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 291 [M+Na]⁺, 286 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 286, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 286 [M+NH₄]⁺ (11), 269 [M+H]⁺ (100), 251 [M-H₂O+H]⁺ (61), 233 [M-2H₂O+H]⁺ (22), 209 [C₁₄H₂₅O]⁺ (43), 191 [C₁₄H₂₅O-H₂O]⁺ (41).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 535 [2M-H]⁻, 381 [M+TFA-H]⁻, 267 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 282 (6), 264 (5), 154 (12), 133 (8), 123 (9), 119 (18), 111 (11), 103 (71), 95 (24), 94 (33), 91 (36), 83 (14); 81 (42), 79 (66), 71 (70), 69 (24), 67 (86), 55 (63), 43 (100), 41 (79).

3-(R)-Hydroxy-Z6,Z9-dodecadiensäure [1b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 23,03 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 41,91 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.39 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 17.0$, *cis* C-7H, *cis* C-9H), 5.30 (2H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 17.8$, *cis* C-6H, *cis* C-10H), 4.06 (1H, s br, C-3H), 2.80 (2H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 5.9$, C-8H₂), 2.57 (1H, d, $J = 16.8$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 16.8$, C-2H_b), 2.21 (2H, m, C-5H₂), 2.08 (2H, quin, C-11H₂), 1.62 (1H, m, C-4H_a), 1.53 (1H, m, C-4H_b), 0.98 (3H, t, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 7.7$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.7 (C-1), 132.1 (C-6), 129.2 (C-10), 128.8 (C-9), 127.1 (C-7), 67.7 (C-3), 41.1 (C-2), 36.4 (C-4), 25.6 (C-8), 23.3 (C-5), 20.6 (C-11), 14.2 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 235 [M+Na]⁺, 230 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 230, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 230 [M+NH₄]⁺ (7), 213 [M+H]⁺ (70), 195 [M-H₂O+H]⁺ (100), 177 [M-2H₂O+H]⁺ (11), 153 [C₁₀H₁₇O]⁺ (70), 135 [C₁₀H₁₇O-H₂O]⁺ (36).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 423 [2M-H]⁻, 211 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 226 (1), 208 (1), 152 (21), 134 (23), 119 (43), 108 (60), 105 (88), 103 (16), 95 (36), 93 (89), 91 (77), 81 (66), 80 (66), 79 (100), 71 (63), 67 (89), 55 (80), 43 (49), 41 (65).

3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8,Z11-tetradecatriensäure [1c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,38 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 47,60 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (2H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 17.8$, *cis* C-6H, *cis* C-11H), 5.37 (4H, m, C-5H, C-8H, C-9H, C-12H), 4.10 (1H, s br, C-3H), 2.82 (4H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 15.7$, C-7H₂, C-10H₂), 2.58 (1H, d, $J = 16.6$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 8.5$, $J_2 =$

16.1, C-2H_b), 2.33 (2H, m, C-4H₂), 2.08 (2H, quin, C-13H₂), 0.98 (3H, t, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 7.3$, C-14H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.9 (C-1), 132.2 (C-5), 131.6 (C-12), 128.9 (C-9), 127.5 (C-8), 126.9 (C-11), 124.5 (C-6), 67.9 (C-3), 40.6 (C-2), 34.5 (C-4), 25.8 (C-7), 25.6 (C-19), 20.6 (C-13), 14.2 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 261 [M+Na]⁺, 256 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 256, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 256 [M+NH₄]⁺ (20), 239 [M+H]⁺ (46), 221 [M-H₂O+H]⁺ (100), 203 [M-2H₂O+H]⁺ (42), 179 [C₁₂H₁₉O]⁺ (71), 161 [C₁₂H₁₉O-H₂O]⁺ (97).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 475 [2M-H]⁻, 237 [M-H].

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 234 (1), 178 (5), 160 (9), 145 (9), 133 (11), 131 (25), 117 (26), 105 (52), 103 (54), 95 (48), 91 (71), 81 (28), 79 (100), 71 (72), 67 (71), 61 (32), 55 (47), 43 (52), 41 (53).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5-tetradecensäure [3b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 29,42 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,22 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 17.7$, *cis* C-6H), 5.38 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 17.1$, *cis* C-5H), 4.07 (1H, s br, C-3H), 2.58 (1H, d, $J = 15.8$, C-2H_a), 2.47 (1H, dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 15.6$, C-2H_b), 2.30 (2H, m, C-4H₂), 2.04 (2H, dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 13.6$, C-7H₂), 1.29 (12H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 6.2$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.0 (C-1), 133.9 (C-6), 123.9 (C-5), 68.1 (C-3), 40.7 (C-2), 34.5 (C-4), 31.9 (C-12), 29.6 (C-10), 29.5 (C-9), 29.3 (C-8), 29.3 (C-11), 27.5 (C-7), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 [M+Na]⁺, 260 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 [M+NH₄]⁺ (10), 243 [M+H]⁺ (43), 225 [M-H₂O+H]⁺ (23), 207 [M-2H₂O+H]⁺ (11), 183 [C₁₂H₂₃O]⁺ (100), 165 [C₁₂H₂₃O-H₂O]⁺ (9).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 [2M-H]⁻, 241 [M-H].

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (1), 238 (3), 164 (13), 140 (8), 126 (8), 104 (18), 103 (100), 84 (40), 83 (20), 71 (86), 69 (35), 61 (49), 55 (71), 43 (73), 41 (69).

3-(R)-Hydroxy-Z5-dodecensäure [5b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,45 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 41,11 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, dd, J₁ = 7.4, J₂ = 18.0, *cis* C-6H), 5.38 (1H, dd, J₁ = 7.4, J₂ = 18.4, *cis* C-5H), 4.07 (1H, m, C-3H), 2.58 (1H, dd, J₁ = 3.1, J₂ = 16.4, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, J₁ = 8.8, J₂ = 16.5, C-2H_b), 2.30 (2H, m, C-4H₂), 2.04 (2H, dd, J₁ = 6.7, J₂ = 13.6, C-7H₂), 1.30 (8H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (3H, t, J₁ = 6.6, J₂ = 7.0, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.0 (C-1), 133.9 (C-6), 123.9 (C-5), 68.0 (C-3), 40.5 (C-2), 34.4 (C-4), 31.7 (C-10), 29.5 (C-8), 28.9 (C-9), 27.5 (C-7), 22.6 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 237 [M+Na]⁺, 232 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 232, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 232 [M+NH₄]⁺ (6), 215 [M+H]⁺ (25), 197 [M-H₂O+H]⁺ (16), 179 [M-2H₂O+H]⁺ (12), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (100), 137 [C₁₀H₁₉O-H₂O]⁺ (11).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* 427 [2M-H]⁻, 213 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 210 (5), 178 (4), 161 (3), 150 (7), 136 (10), 126 (18), 104 (14), 103 (100), 84 (30), 71 (70), 69 (45), 61 (30), 55 (55), 43 (90), 41 (32).

3-(R)-Hydroxy-decansäure [6b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 22,80 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 35,48 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.03 (1H, m, C-3H), 2.55 (1H, dd, J₁ = 3.0, J₂ = 16.5, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, J₁ = 8.9, J₂ = 16.6, C-2H_b), 1.54 (1H, m, C-4H_a), 1.44 (1H, m, C-4H_b), 1.28 (10H, m, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂), 0.88 (3H, t, J₁ = 6.6, J₂ = 7.0, C-10H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.8 (C-1), 68.2 (C-3), 40.5 (C-2), 36.7 (C-4), 31.8 (C-8), 29.5 (C-6), 29.2 (C-7), 25.5 (C-5), 22.6 (C-9), 14.0 (C-10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 211 [M+Na]⁺, 206 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 206, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 206 [M+NH₄]⁺ (3), 189 [M+H]⁺ (29), 171 [M-H₂O+H]⁺ (100), 153 [M-2H₂O+H]⁺ (97), 129 [C₈H₁₇O]⁺ (3), 111 [C₈H₁₇O-H₂O]⁺ (2).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 375 [2M-H]⁻, 187 [M-H].

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 170 (3), 153 (9), 152 (4), 127 (10), 111 (15), 110 (22), 103 (100), 101 (18), 84 (21), 74 (85), 71 (81), 69 (69), 61 (68), 59 (36), 57 (47), 55 (59), 43 (75), 41 (81).

3-(R)-Hydroxy-dodecansäure [6c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,33 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 40,67 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.04 (1H, m, C-3H), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 3.1$, $J_2 = 16.1$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.5$, C-2H_b), 1.55 (1H, m, C-4H_a), 1.44 (1H, m, C-4H_b), 1.27 (14H, m, C-5H₂, C-6H₂, C-7H₂, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.9 (C-1), 66.5 (C-3), 43.4 (C-2), 36.4 (C-4), 31.7 (C-10), 29.9, 29.5, 29.5, 29.3 (C-6, C-7, C-8, C-9), 25.4 (C-5), 22.6 (C-11), 14.0 (C-10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 239 [M+Na]⁺, 234 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 234, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 234 [M+NH₄]⁺ (86), 217 [M+H]⁺ (100), 199 [M-H₂O+H]⁺ (46), 181 [M-2H₂O+H]⁺ (24), 157 [C₁₀H₂₁O]⁺ (5), 139 [C₁₀H₂₁O-H₂O]⁺ (6).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 431 [2M-H]⁻, 215 [M-H].

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 212 (2), 181 (5), 180 (4), 163 (4), 155 (3), 138 (12), 110 (10), 104 (29), 103 (93), 97 (15), 96 (21), 83 (25), 74 (31), 71 (49), 69 (28), 57 (39).

3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [7b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,35 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 46,97 min

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.54 (1H, dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-6H), 5.41 (2H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 17.8$, *cis* C-5H, *cis* C-9H), 5.31 (1H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 17.0$, *cis* C-8H), 4.04 (1H, m, C-3H), 2.79 (2H, t, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 7.2$, C-7H₂), 2.56 (1H, dd, $J_1 = 2.9$, $J_2 =$

16.2, C-2H_a), 2.45 (1H, dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 16.2$, C-2H_b), 2.34 (1H, m, C-4H_a), 2.29 (1H, m, C-4H_b), 2.04 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 14.4$, C-10H₂), 1.32 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.2$, C-14H₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 176.8 (C-1), 131.8 (C-5), 130.8 (C-9), 127.1 (C-8), 124.3 (C-6), 67.9 (C-3), 40.7 (C-2), 34.5 (C-4), 31.5 (C-12), 29.3 (C-11), 27.2 (C-10), 25.8 (C-7), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 [M+Na]⁺, 258 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 [M+NH₄]⁺ (18), 241 [M+H]⁺ (44), 223 [M-H₂O+H]⁺ (67), 205 [M-2H₂O+H]⁺ (28), 181 [C₁₂H₂₁O]⁺ (100), 163 [C₁₂H₂₁O-H₂O]⁺ (75).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 [2M-H]⁻, 239 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (4), 236 (8), 162 (15), 152 (18), 133 (21), 119 (26), 105 (55), 103 (100), 95 (22), 91 (36), 81 (50), 79 (62), 71 (92), 67 (64), 61 (40), 55 (52), 43 (72), 41 (68).

3-(R)-Hydroxy-E6-dodecensäure [8b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,58 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 41,23 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.43 (2H, dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 22.2$, *trans* C-6H, *trans* C-7H), 4.04 (1H, m, C-3H), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.47 (1H, dd, $J_1 = 8.9$, $J_2 = 16.6$, C-2H_b), 2.12 (2H, m, C-5H₂), 1.97 (2H, dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 13.6$, C-8H₂), 1.61 (1H, m, C-4H_a), 1.53 (1H, m, C-4H_b), 1.31 (6H, m, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.0$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.5 (C-1), 131.6 (C-7), 129.0 (C-6), 67.6 (C-3), 40.9 (C-2), 36.3 (C-4), 32.5 (C-8), 31.4 (C-10), 30.8 (C-9), 25.3 (C-5), 22.5 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 237 [M+Na]⁺, 232 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 232, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 232 [M+NH₄]⁺ (3), 215 [M+H]⁺ (44), 197 [M-H₂O+H]⁺ (28), 179 [M-2H₂O+H]⁺ (3), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (100), 137 [C₁₀H₁₉O-H₂O]⁺ (5).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 427 [2M-H]⁻, 213 [M-H]⁻.

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 228 (2), 210 (5), 178 (7), 150 (16), 136 (55), 121 (27), 110 (11), 103 (16), 98 (18), 93 (49), 81 (70), 80 (80), 79 (100), 71 (51), 67 (76), 55 (90), 54 (58), 43 (88), 41 (79).

3-(*R*)-Hydroxy-*E5,E8*-tetradecadiensäure [8c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,93 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 46,77 min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.56 (2H, m, C-6H, C-8H), 5.40 (2H, m, C-5H, C-9H), 4.03 (1H, m, C-3H), 2.71 (2H, t, $J_1 = 5.9$, $J_2 = 5.2$, C-7H₂), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 16.1$, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.5$, C-2H_b), 2.25 (2H, m, C-4H₂), 1.98 (2H, dd, $J_1 = 6.1$, $J_2 = 13.8$, C-10H₂), 1.31 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 174.7 (C-1), 133.8 (C-5), 131.4 (C-9), 127.8 (C-8), 125.3 (C-6), 67.6 (C-3), 40.2 (C-2), 39.8 (C-4), 35.6 (C-7), 33.8 (C-10), 31.4 (C-12), 30.8 (C-11), 22.5 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 258 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (14), 241 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (76), 223 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (44), 205 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (24), 181 $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}]^+$ (100), 163 $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (58).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 $[\text{2M}-\text{H}]^-$, 239 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (2), 236 (2), 162 (10), 123 (8), 119 (10), 105 (26), 103 (100), 95 (16), 93 (13), 91 (20), 81 (33), 79 (39), 71 (73), 67 (55), 61 (34), 55 (40), 43 (68), 41 (72).

3-(*R*)-Hydroxy-*Z5*-tetradecensäure [12b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 30,77 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,37 min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.55 (1H, dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-6H), 5.37 (1H, dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.6$, *cis* C-5H), 4.05 (1H, s br, C-3H), 2.56 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.0$, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 15.8$, C-2H_b), 2.34 (2H, m, C-4H₂), 2.02 (2H, dd, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 13.9$, C-7H₂), 1.30 (12H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.4 (C-1), 133.6 (C-6), 123.7 (C-5), 67.7 (C-3), 40.4 (C-2), 34.2 (C-4), 31.6 (C-12), 29.6 (C-10), 29.5 (C-9), 29.3 (C-8), 29.2 (C-11), 27.8 (C-7), 22.8 (C-13), 14.1 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (18), 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (57), 225 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (26), 207 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (13), 183 $[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}]^+$ (100), 165 $[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (13).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (3), 238 (4), 164 (11), 140 (10), 126 (14), 104 (32), 103 (100), 84 (56), 83 (29), 71 (91), 69 (37), 61 (47), 55 (77), 43 (75), 41 (66).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5-tetradecensäure [13b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 31,22 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,41 min

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.54 (1H, dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-6H), 5.35 (1H, dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 17.3$, *cis* C-5H), 4.08 (1H, m, C-3H), 2.58 (1H, dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 15.8$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 16.2$, C-2H_b), 2.29 (2H, m, C-4H₂), 2.00 (2H, dd, $J_1 = 6.7$, $J_2 = 13.8$, C-7H₂), 1.30 (12H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.6 (C-1), 133.5 (C-6), 123.6 (C-5), 68.0 (C-3), 40.6 (C-2), 34.4 (C-4), 31.7 (C-12), 29.7 (C-10), 29.6 (C-9), 29.3 (C-8), 29.2 (C-11), 27.5 (C-7), 22.6 (C-13), 14.1 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (10), 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (48), 225 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (25), 207 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (15), 183 $[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}]^+$ (100), 165 $[\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (3), 238 (4), 164 (10), 140 (10), 126 (11), 104 (29), 103 (100), 84 (50), 83 (27), 71 (92), 69 (35), 61 (49), 55 (74), 43 (75), 41 (71).

3-(R)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [14b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,38 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 47,05 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 17.8$, *cis* C-6H), 5.40 (2H, dd, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-5H, *cis* C-9H), 5.32 (1H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 18.2$, *cis* C-8H), 4.04 (1H, s br, C-3H), 2.83 (2H, t, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 7.2$, C-7H₂), 2.56 (1H, dd, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 16.1$, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.4$, C-2H_b), 2.35 (1H, m, C-4H_a), 2.30 (1H, m, C-4H_b), 2.02 (2H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 14.2$, C-10H₂), 1.29 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.90 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.5 (C-1), 131.7 (C-5), 130.8 (C-9), 127.2 (C-8), 124.7 (C-6), 68.1 (C-3), 40.6 (C-2), 34.4 (C-4), 31.8 (C-12), 29.4 (C-11), 27.1 (C-10), 25.8 (C-7), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 [M+Na]⁺, 258 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 [M+NH₄]⁺ (10), 241 [M+H]⁺ (87), 223 [M-H₂O+H]⁺ (100), 205 [M-2H₂O+H]⁺ (32), 181 [C₁₂H₂₁O]⁺ (72), 163 [C₁₂H₂₁O-H₂O]⁺ (52).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 [2M-H]⁻, 239 [M-H].

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (1), 236 (3), 152 (10), 133 (10), 119 (12), 105 (35), 103 (58), 95 (19), 91 (24), 81 (45), 79 (46), 71 (52), 67 (72), 61 (25), 55 (74), 43 (96), 41 (100).

3-(R)-Hydroxy-Z5-dodecensäure [15b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,37 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 40,88 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.56 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 18.2$, *cis* C-6H), 5.37 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.0$, *cis* C-5H), 4.08 (1H, s br, C-3H), 2.58 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 16.3$, C-2H_b), 2.30 (2H, m, C-4H₂), 2.03 (2H, dd, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 13.6$, C-7H₂), 1.29 (8H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.3 (C-1), 133.9 (C-6), 123.9 (C-5), 68.0 (C-3), 40.6 (C-2), 34.4 (C-4), 31.7 (C-10), 29.5 (C-8), 29.0 (C-9), 27.5 (C-7), 22.6 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 237 [M+Na]⁺, 232 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 232, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 232 [M+NH₄]⁺ (2), 215 [M+H]⁺ (10), 197 [M-H₂O+H]⁺ (14), 179 [M-2H₂O+H]⁺ (14), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (100), 137 [C₁₀H₁₉O-H₂O]⁺ (34).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 427 [2M-H]⁻, 213 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 210 (1), 178 (3), 161 (3), 150 (4), 136 (13), 126 (10), 104 (14), 103 (100), 84 (27), 71 (88), 69 (29), 61 (49), 55 (58), 43 (83), 41 (52).

3-(R)-Hydroxy-Z7-dodecensäure [15c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 28,70 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,15 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.36 (2H, m, C-7H, C-8H), 4.04 (1H, s br, C-3H), 2.56 (1H, d, $J = 15.8$, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 15.8$, C-2H_b), 2.04 (4H, m, C-6H₂, C-9H₂), 1.50 (2H, m, C-4H₂), 1.28 (10H, m, C-5H₂, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.4 (C-1), 130.7 (C-8), 129.0 (C-7), 68.1 (C-3), 41.1 (C-2), 34.4 (C-4), 31.8 (C-12), 29.7 (C-10), 28.9 (C-11), 27.3 (C-9), 27.0 (C-6), 25.6 (C-5), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 [M+Na]⁺, 260 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 [M+NH₄]⁺ (29), 243 [M+H]⁺ (100), 225 [M-H₂O+H]⁺ (74), 207 [M-2H₂O+H]⁺ (23), 183 [C₁₂H₂₃O]⁺ (66), 165 [C₁₂H₂₃O-H₂O]⁺ (8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 [2M-H]⁻, 241 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (3), 238 (2), 183 (4), 164 (19), 138 (25), 129 (25), 116 (45), 110 (37), 109 (28), 103 (53), 96 (63), 95 (45), 82 (47), 81 (66), 68 (73), 67 (88), 55 (85), 54 (100), 43 (79), 41 (62).

3-(R)-Hydroxy-Z5-decensäure [16b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 21,15 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 36,36 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.0$, *cis* C-6H), 5.37 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-5H), 4.06 (1H, m, C-3H), 2.56 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.46 (1H, dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 16.4$, C-2H_b), 2.29 (2H, m, C-4H₂), 2.03 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 12.9$, C-7H₂), 1.31 (4H, m, C-8H₂, C-9H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.4$, C-10H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.8 (C-1), 133.7 (C-6), 123.9 (C-5), 68.0 (C-3), 40.6 (C-2), 34.4 (C-4), 31.7 (C-8), 27.1 (C-7), 22.3 (C-9), 13.8 (C-10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 209 [M+Na]⁺, 204 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 204, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 204 [M+NH₄]⁺ (9), 187 [M+H]⁺ (28), 169 [M-H₂O+H]⁺ (41), 151 [M-2H₂O+H]⁺ (18), 127 [C₈H₁₅O]⁺ (100), 109 [C₈H₁₅O-H₂O]⁺ (22).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 375 [2M-H]⁻, 185 [M-H].

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 182 (3), 150 (6), 133 (3), 122 (8), 108 (17), 103 (100), 84 (14), 71 (77), 69 (21), 61 (43), 55 (53), 43 (79), 41 (33).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5-dodecensäure [17b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,77 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 41,23 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-6H), 5.38 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-5H), 4.06 (1H, m, C-3H), 2.59 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.49 (1H, dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.5$, C-2H_b), 2.31 (2H, m, C-4H₂), 2.04 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 13.6$, C-7H₂), 1.30 (8H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-12H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.4 (C-1), 133.9 (C-6), 123.8 (C-5), 67.9 (C-3), 40.3 (C-2), 34.4 (C-4), 31.7 (C-10), 29.5 (C-8), 29.0 (C-9), 27.5 (C-7), 22.5 (C-11), 14.0 (C-12).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 237 [M+Na]⁺, 232 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 232, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 232 [M+NH₄]⁺ (3), 215 [M+H]⁺ (29), 197 [M-H₂O+H]⁺ (44), 179 [M-2H₂O+H]⁺ (18), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (100), 137 [C₁₀H₁₉O-H₂O]⁺ (9).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 427 [2M-H]⁻, 213 [M-H].

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 210 (2), 178 (2), 161 (3), 150 (4), 136 (12), 126 (8), 104 (21), 103 (100), 84 (24), 71 (75), 69 (25), 61 (34), 55 (53), 43 (89), 41 (51).

3-(R)-Hydroxy-Z5-octensäure [18b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): entfällt
R_T GC 3 (Trennsäule 1): 30,72 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-6H), 5.35 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 18.2$, *cis* C-5H), 4.08 (1H, m, C-3H), 2.60 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.49 (1H, dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.5$, C-2H_b), 2.31 (2H, m, C-4H₂), 2.05 (2H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 14.5$, C-7H₂), 0.97 (3H, t, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 7.7$, C-8H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.8 (C-1), 135.5 (C-6), 123.3 (C-5), 68.0 (C-3), 40.5 (C-2), 34.3 (C-4), 20.7 (C-7), 14.0 (C-8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 181 [M+Na]⁺, 176 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 176, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 176 [M+NH₄]⁺ (44), 159 [M+H]⁺ (100), 141 [M-H₂O+H]⁺ (79), 123 [M-2H₂O+H]⁺ (12), 99 [C₆H₁₁O]⁺ (27), 81 [C₆H₁₁O-H₂O]⁺ (6).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 315 [2M-H]⁻, 157 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 172 (2), 154 (14), 123 (7), 111 (8), 103 (100), 95 (26), 94 (41), 81 (26), 79 (23), 71 (93), 70 (28), 61 (38), 55 (57), 43 (81), 41 (59).

3-(R)-Hydroxy-Z5-octensäure [19b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): entfällt
R_T GC 3 (Trennsäule 1): 30,77 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 18.0$, *cis* C-6H), 5.36 (1H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-5H), 4.08 (1H, m, C-3H), 2.60 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 16.5$, C-2H_a), 2.50 (1H, dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 16.5$, C-2H_b), 2.31 (2H, m, C-4H₂), 2.04 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 14.2$, C-7H₂), 0.98 (3H, t, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 7.4$, C-8H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.4 (C-1), 135.4 (C-6), 123.4 (C-5), 67.9 (C-3), 40.5 (C-2), 34.3 (C-4), 20.7 (C-7), 14.0 (C-8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 181 $[M+Na]^+$, 176 $[M+NH_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 176, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 176 $[M+NH_4]^+$ (37), 159 $[M+H]^+$ (100), 141 $[M-H_2O+H]^+$ (81), 123 $[M-2H_2O+H]^+$ (24), 99 $[C_6H_{11}O]^+$ (35), 81 $[C_6H_{11}O-H_2O]^+$ (8).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 315 $[2M-H]^-$, 157 $[M-H]^-$.

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 172 (3), 154 (12), 123 (7), 111 (4), 103 (92), 95 (18), 94 (34), 81 (16), 79 (15), 71 (100), 70 (23), 61 (39), 55 (50), 43 (82), 41 (41).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [24b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,62 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 46,14 min

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.57 (1H, dd, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 18.2$, *cis* C-6H), 5.43 (2H, dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 18.4$, *cis* C-5H, *cis* C-9H), 5.32 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-8H), 4.04 (1H, m, C-3H), 2.82 (2H, t, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 7.2$, C-7H₂), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 16.2$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 16.1$, C-2H_b), 2.32 (1H, m, C-4H_a), 2.29 (1H, m, C-4H_b), 2.02 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 14.0$, C-10H₂), 1.30 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.88 (3H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.2$, C-14H₃).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 177.2 (C-1), 132.0 (C-5), 130.9 (C-9), 127.3 (C-8), 124.4 (C-6), 68.1 (C-3), 40.5 (C-2), 34.4 (C-4), 31.6 (C-12), 29.3 (C-11), 27.0 (C-10), 25.7 (C-7), 22.5 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 $[M+Na]^+$, 258 $[M+NH_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 $[M+NH_4]^+$ (14), 241 $[M+H]^+$ (88), 223 $[M-H_2O+H]^+$ (100), 205 $[M-2H_2O+H]^+$ (26), 181 $[C_{12}H_{21}O]^+$ (74), 163 $[C_{12}H_{21}O-H_2O]^+$ (55).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 $[2M-H]^-$, 239 $[M-H]^-$.

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (2), 236 (4), 152 (7), 133 (9), 119 (13), 105 (31), 103 (63), 95 (23), 91 (27), 81 (47), 79 (49), 71 (54), 67 (63), 61 (25), 55 (78), 43 (100), 41 (85).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5,Z8-tetradecadiensäure [25b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 27,68 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 46,07 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.55 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 18.2$, *cis* C-6H), 5.41 (2H, dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 18.5$, *cis* C-5H, *cis* C-9H), 5.32 (1H, dd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 18.0$, *cis* C-8H), 4.05 (1H, m, C-3H), 2.80 (2H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.2$, C-7H₂), 2.58 (1H, dd, $J_1 = 3.1$, $J_2 = 16.0$, C-2H_a), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 9.4$, $J_2 = 16.2$, C-2H_b), 2.33 (1H, m, C-4H_a), 2.29 (1H, m, C-4H_b), 2.04 (2H, dd, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 14.0$, C-10H₂), 1.30 (6H, m, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.8 (C-1), 131.8 (C-5), 130.8 (C-9), 127.2 (C-8), 124.4 (C-6), 68.0 (C-3), 40.5 (C-2), 34.4 (C-4), 31.5 (C-12), 29.2 (C-11), 27.2 (C-10), 25.7 (C-7), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 [M+Na]⁺, 258 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 [M+NH₄]⁺ (14), 241 [M+H]⁺ (82), 223 [M-H₂O+H]⁺ (100), 205 [M-2H₂O+H]⁺ (22), 181 [C₁₂H₂₁O]⁺ (66), 163 [C₁₂H₂₁O-H₂O]⁺ (52).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 [2M-H]⁻, 239 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (2), 236 (2), 152 (6), 133 (10), 119 (14), 105 (27), 103 (60), 95 (18), 91 (28), 81 (45), 79 (46), 71 (49), 67 (72), 61 (20), 55 (69), 43 (100), 41 (71).

3-(*R*)-Hydroxy-Z5-tetradecensäure (vgl. Kapitel 3.4.2.6)

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 31,18 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 45,52 min

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.54 (1H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 17.9$, *cis* C-6H), 5.37 (1H, dd, $J_1 = 7.4$, $J_2 = 17.4$, *cis* C-5H), 4.04 (1H, m, C-3H), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 3.3$, $J_2 = 15.9$, C-2H_a), 2.45 (1H, dd, $J_1 = 8.9$, $J_2 = 15.5$, C-2H_b), 2.28 (2H, m, C-4H₂), 2.01 (2H, dd, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 13.9$, C-7H₂), 1.31 (12H, m, C-8H₂, C-9H₂, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.6$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 177.7 (C-1), 133.7 (C-6), 124.1 (C-5), 68.0 (C-3), 40.4 (C-2), 34.5 (C-4), 31.7 (C-12), 29.7 (C-10), 29.6 (C-9), 29.3 (C-8), 29.2 (C-11), 27.6 (C-7), 22.5 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 $[M+Na]^+$, 260 $[M+NH_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 $[M+NH_4]^+$ (17), 243 $[M+H]^+$ (34), 225 $[M-H_2O+H]^+$ (28), 207 $[M-2H_2O+H]^+$ (16), 183 $[C_{12}H_{23}O]^+$ (100), 165 $[C_{12}H_{23}O-H_2O]^+$ (19).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 $[2M-H]^-$, 241 $[M-H]$.

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (4), 238 (7), 164 (10), 140 (9), 126 (9), 104 (32), 103 (100), 84 (49), 83 (28), 71 (91), 69 (45), 61 (57), 55 (86), 43 (77), 41 (75).

Anhang B

Chromatographische und spektroskopische Kenndaten der weiteren isolierten Hydroxysäuren

8-(*R*)-Hydroxy-*Z*5-tetradecensäure [28b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 25,85 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 47,66 min

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.53 (1H, m, C-5H), 5.47 (1H, m, C-6H), 3.63 (1H, m, C-8H), 2.35 (2H, t, *J*₁ = 7.4, *J*₂ = 7.4, C-2H₂), 2.21 (2H, t, *J*₁ = 6.3, *J*₂ = 6.8, C-7H₂), 2.12 (2H, dd, *J*₁ = 7.2, *J*₂ = 14.4, C-4H₂), 1.71 (2H, m, C-3H₂), 1.45 (2H, m, C-9H₂), 1.28 (8H, m, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.88 (3H, t, *J*₁ = 7.0, *J*₂ = 7.0, C-14H₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 179.0 (C-1), 131.5 (C-5), 126.6 (C-6), 71.6 (C-8), 36.8 (C-9), 35.2 (C-7), 33.3 (C-2), 31.8 (C-12), 29.3 (C-11), 26.6 (C-4), 25.6 (C-10), 24.5 (C-7), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): *m/z* 265 [M+Na]⁺, 260 [M+NH₄]⁺.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU *m/z* 260, -12 eV, positiver Modus): *m/z* (%) 260 [M+NH₄]⁺ (6), 243 [M+H]⁺ (33), 225 [M-H₂O+H]⁺ (100), 207 [M-2H₂O+H]⁺ (22).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): *m/z* 483 [2M-H]⁻, 241 [M-H]⁻.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): *m/z* (%) 256 (1), 238 (3), 164 (6), 142 (41), 111 (25), 110 (100), 97 (33), 95 (11), 87 (30), 82 (87), 74 (86), 69 (53), 68 (79), 67 (42), 57 (24), 55 (85), 43 (83), 41 (79).

8-(*R*)-Hydroxy-*Z*5-tetradecensäure [29b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a): 26,47 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 47,75 min

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.54 (1H, m, C-5H), 5.47 (1H, m, C-6H), 3.67 (1H, m, C-8H), 2.34 (2H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.4$, C-2H₂), 2.18 (1H, t, $J_1 = 6.5$, $J_2 = 6.7$, C-7H₂), 2.10 (2H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 14.3$, C-4H₂), 1.69 (2H, m, C-3H₂), 1.46 (2H, m, C-9H₂), 1.32 (8H, m, C-10H₂, C-11H₂, C-12H₂, C-13H₂), 0.90 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 177.6 (C-1), 131.3 (C-5), 126.1 (C-6), 71.6 (C-8), 36.8 (C-9), 35.7 (C-7), 33.2 (C-2), 31.9 (C-12), 29.3 (C-11), 26.0 (C-4), 25.4 (C-10), 24.1 (C-3), 22.6 (C-13), 14.0 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 265 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 260, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (12), 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (41), 225 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (100), 207 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (27).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 483 $[\text{2M}-\text{H}]^-$, 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 256 (1), 238 (2), 164 (5), 142 (33), 111 (21), 110 (100), 97 (27), 95 (11), 87 (25), 82 (82), 74 (85), 69 (53), 68 (69), 67 (34), 57 (19), 55 (85), 43 (87), 41 (72).

9-(S)-Hydroxy-Z5,E7-tetradecadiensäure[30b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), UV-Detektion: 25,62 min

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), ELSD-Detektion: 25,78 min

R_T GC 3 (Trennsäule 2): 29,66 min

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 6.51 (1H, dd, $J_1 = 10.9$, $J_2 = 15.1$, C-7H), 6.00 (1H, dd, $J_1 = 10.9$, $J_2 = 11.1$, C-6H), 5.65 (1H, dd, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 15.0$, C-8H), 5.39 (1H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 11.0$, C-5H), 4.14 (1H, dt, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.8$, C-9H), 2.29 (2H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.2$, C-2H₂), 2.12 (2H, dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 14.3$, C-4H₂), 1.58 (4H, m, C-3 H₂, C-10H₂), 1.32 (6H, m, C-11H₂ bis C-13H₂), 0.90 (3H, t, $J_1 = 6.8$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3): δ 178.7 (C-1), 136.6 (C-8), 131.7 (C-5), 128.7, 126.7 (C-6, C-7), 72.9 (C-9), 37.9 (C-10), 34.6 (C-2), 31.6 (C-12), 26.7 (C-4), 25.1 (C-3), 24.5 (C-11), 22.4 (C-13), 13.8 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z % 263 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (23), 258 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100).

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -8 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (18), 240 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{NH}_4]^+$ (21), 223 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (100), 205 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (10).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z (%) 479 $[\text{2M}-\text{H}]^-$ (100), 239 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (75).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (2), 236 (9), 162 (5), 151 (18), 140 (12), 133 (16), 123 (19), 109 (17), 107 (17), 105 (41), 99 (100), 95 (24), 91 (32), 81 (38), 79 (38), 71 (60), 67 (26), 55 (35), 43 (52), 41 (28).

11-(S)-Hydroxy-Z7,E9-hexadeciensäure [30c]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), UV-Detektion: 28,52 min

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), ELSD-Detektion: 28,69 min

R_T GC 3 (Trennsäule 2): 33,77 min

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 6.48 (1H, dd, $J_1 = 11.1$, $J_2 = 15.0$, C-9H), 5.95 (1H, dd, $J_1 = 11.0$, $J_2 = 11.1$, C-8H), 5.59 (1H, dd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 15.1$, C-10H), 5.41 (1H, dd, $J_1 = 6.9$, $J_2 = 11.1$, C-7H), 4.15 (1H, dt, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 7.9$, C-11H), 2.30 (2H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.1$, C-2H₂), 2.17 (2H, dd, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 14.1$, C-6H₂), 1.56 (4H, m, C-3 H₂, C-12H₂), 1.30 (10H, m, C-4H₂, C-5H₂, C-13H₂ bis C-15H₂), 0.87 (3H, t, $J_1 = 7.0$, $J_2 = 7.1$, C-16H₃).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ 179.0 (C-1), 135.8 (C-10), 132.4 (C-7), 128.1, 125.3 (C-8, C-9), 72.9 (C-11), 37.2 (C-12), 34.3 (C-2), 31.7 (C-14), 29.0 (C-5), 28.4 (C-4), 27.3 (C-6), 25.1 (C-3), 24.5 (C-13), 22.6 (C-15), 14.0 (C-16).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z % 291 [M+Na]⁺ (95), 286 [M+NH₄]⁺ (100).

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 286, -8 eV, positiver Modus): m/z (%) 286 [M+NH₄]⁺ (12), 268 [M-H₂O+NH₄]⁺ (23), 251 [M-H₂O+H]⁺ (100), 233 [M-2H₂O+H]⁺ (7).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z (%) 535 [2M-H]⁻ (86), 267 [M-H]⁻ (100).

HRGC-EI-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 282 (2), 264 (15), 207 (9), 179 (8), 161 (16), 151 (13), 136 (23), 133 (25), 109 (19), 107 (20), 105 (23), 99 (100), 95 (40), 93 (47), 91 (66), 81 (53), 79 (67), 71 (69), 67 (59), 55 (69), 43 (76), 41 (55).

8-(R)-Hydroxy-Z3,E5-tetradeciensäure [31b]

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), UV-Detektion: 25,22 min

R_T HPLC 1 (Gradient 1a), ELSD-Detektion: 25,37 min

R_T GC 3 (Trennsäule 1): 48,76 min

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 6.33 (dd, $J_1 = 11.4$, $J_2 = 14.5$, 1H, C-5H), 6.17 (dd, $J_1 = 10.9$, $J_2 = 11.0$, 1H, C-4H), 5.78 (dd, $J_1 = 7.9$, $J_2 = 15.1$, 1H, C-6H), 5.51 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 11.2$, 1H, C-3H), 3.68 (1H, m, C-8H), 3.27 (2H, d, $J = 5.0$, C-2H₂), 2.24 (2H, m, C-

7H₂), 1.46 (2H, m, C-4H₂), 1.28 (8H, m, C-10H₂ bis C-13H₂), 0.89 (3H, t, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 7.0$, C-14H₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 176.3 (C-1), 132.5 (C-6), 131.6 (C-4), 127.8 (C-5), 120.3 (C-3), 71.2 (C-8), 40.8 (C-7), 36.9 (C-9), 32.9 (C-2), 31.8 (C-12), 29.3 (C-11), 25.6 (C-10), 22.6 (C-13), 14.1 (C-14).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, positiver Modus): m/z 263 [M+Na]⁺ (18), 258 [M+NH₄]⁺ (100).

ESI-MS/MS (Loop-Injektion, DAU m/z 258, -12 eV, positiver Modus): m/z (%) 258 [M+NH₄]⁺ (17), 241 [M+H]⁺ (42), 223 [M-H₂O+H]⁺ (100), 205 [M-2H₂O+H]⁺ (26).

ESI-MS (Loop-Injektion, Fullscan, negativer Modus): m/z 479 [2M-H]⁻ (96), 239 [M-H]⁻ (100).

HRGC-EL-MS (70 eV) (Methylester): m/z (%) 254 (2), 236 (2), 154 (9), 125 (52), 111 (37), 95 (27), 82 (37), 81 (38), 79 (43), 71 (52), 69 (43), 67 (100), 61 (31), 55 (78), 43 (87), 41 (72).

Anhang C

Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse (ee-Werte) der isolierten 3-(*R*)-Hydroxysäuren mittels MDGC

Verbindung	Temperaturprogramm Ofen 2 ^{a,b,c}	ee-Wert ^d
[U1,2b]	100 °C (18 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	94 % (<i>R</i>)
[U2,2c]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	88 % (<i>R</i>)
[U3]	100 °C (24 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	84 % (<i>R</i>)
[1b]	100 °C (18 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	90 % (<i>R</i>)
[1c]	100 °C (22 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	90 % (<i>R</i>)
[3b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[5b]	100 °C (16 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	96 % (<i>R</i>)
[6b]	100 °C (16 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	96 % (<i>R</i>)
[6c]	100 °C (18 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	84 % (<i>R</i>)
[7b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[8b]	100 °C (16 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	92 % (<i>R</i>)
[8c]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[12b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[13b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[14b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	88 % (<i>R</i>)
[15b]	100 °C (18 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	96 % (<i>R</i>)
[15c]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	88 % (<i>R</i>)
[16b]	100 °C (14 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	98 % (<i>R</i>)
[17b]	100 °C (16 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	92 % (<i>R</i>)
[18b]	100 °C (14 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	98 % (<i>R</i>)
[19b]	100 °C (14 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	94 % (<i>R</i>)
[24b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	88 % (<i>R</i>)
[25b]	100 °C (20 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)
[3.4.2.6]	100 °C (16 min isotherm) –2 °C/min – 200 °C	86 % (<i>R</i>)

a: Temperaturprogramm Ofen 1: 100 °C – 10 °C/min – 240 °C (10 min isotherm)

b: Säule Ofen 1: J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25$ m)

c: Säule Ofen 2: 30 % 2,3-Diethyl-6-*tert*-butyl-dimethylsilyl- β -cyclodextrin in PS 086 (25 m x 0.25 mm, $d_f = 0.15$ μ m)

d: Zur Bestimmung der Elutionsreihenfolge: siehe Kapitel 3.4

Literaturverzeichnis

- Adam, W.; Lazarus, M.; Saha-Möller, C.R.; Schreier, P.; Enantioselective α -Hydroxylation of Carboxylic Acids with Molecular Oxygen Catalyzed by the α -Oxidation Enzyme System of Young Pea Leaves (*Pisum sativum*): A Substrate Selectivity Study; *TetrahedronAssym.*, **1996**, *7*, 2287-2292.
- Adam, W.; Boland, W.; Hartmann-Schreier, J.; Humpf, H.U.; Lazarus, M.; Saffert, A.; Saha-Möller, C.R.; Schreier, P.; α -Hydroxylation of Carboxylic Acids with Molecular Oxygen Catalyzed by the α -Oxidase of Peas (*Pisum sativum*): A Novel Biocatalytic Synthesis of Enantiomerically Pure (*R*)-2-Hydroxy Acids; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998a**, *120*, 11044-11048.
- Adam, W.; Lazarus, M.; Schmerder, A.; Humpf, H.U.; Saha-Möller, C.R.; Schreier, P.; Synthesis of Optically Active α -Hydroxy Acids by Kinetic Resolution Through Lipase-Catalyzed Enantioselective Acetylation; *Eur. J. Org. Chem.*, **1998b**, *9*, 2013-2018.
- Adam, W.; Lukacs, Z.; Viebach, K.; Humpf, H.U.; Saha-Möller, C.R.; Schreier, P.; Microscale Determination of the Absolute Configuration of α -Aryl-Substituted Alcohols by the CD Exciton Chirality Method; *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 186-190.
- Afonso, C.M.; Barros, M.T.; Godinho, L.; Maycock, C.D.; A Useful Method for Preparing Optically Active Secondary Alcohols: A Short Enantiospecific Synthesis of (*R*)- and (*S*)-Sulcatol; *TetrahedronLett.*, **1989**, *30*, 2707-2708.
- Aggarwal, S.K.; Kinter, M.; Fitzgerald, R.L.; Herold, D.A.; Mass Spectrometry of Trace Elements in Biological Samples; *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **1994**, *31*, 35-87.
- Akakabe, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T.; Enantioselective α -Hydroperoxylation of Long-Chain Fatty Acids with Crude Enzyme of Marine Green Alga *Ulva pertusa*; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 1137-1140.
- Akakabe, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T.; α -Oxidation of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids in the Marine Green Alga *Ulva pertusa*; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 2680-2681.
- Akakabe, Y.; Matsui, K.; Kajiwara, T.; Enantioselective 2-Hydroperoxylation of Long-Chain Fatty Acids in Marine Algae; *Fish. Sci.*, **2001**, *67*, 328-332.

- Alborn, H.T.; Turlings, T.C.J.; Jones, T.H.; Stenhagen, G.; Loughrin, J.H.; Tumlinson, J.H.; An Elicitor of Plant Volatiles from Beet Armyworm Oral Secretion; *Science*, **1997**, 276, 945-949.
- Alphey, L.; *DNA-Sequenzierung*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1998**.
- Amaya, Y.; Arakawa, H.; Takiguchi, M.; Ebina, Y.; Yokota, S.; Mori, M.; A Noncleavable Signal for Mitochondrial Import of 3-Oxoacyl-CoA Thiolase; *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 14463-14470.
- Andersen Borge, G.I.; Slinde, E.; Nilsson, A.; Fatty Acid alpha-Oxidation of Tetradecylthioacetic Acid and Tetradecylthiopropionic Acid in Cucumber (*Cucumis sativus*); *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1394, 158-168.
- Andersen Borge, G.I.; Vogt, G.; Nilsson, A.; Intermediates and Products Formed During Fatty Acid α -Oxidation in Cucumber (*Cucumis sativus*); *Lipids*, **1999**, 34, 661-673.
- Andrews, A.R.; Possible Cause of Anomalies in the Oxidation-Fermentation Test; *J. Appl. Bacteriol.*, **1976**, 41, 493-496.
- Anke, H.; Morales, P.; Sterner, O.; Assay of the Biological Activities of Two Fatty Acid Derivatives Formed in the Edible Mushrooms *Cantharellus cibarius* and *C. tubaeformis* as a Response to Injury; *Planta Med.*, **1996**, 62, 181-183.
- Aoyama, T.; Souri, M.; Kamijo, T.; Ushikubo, S.; Hashimoto, T.; Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Oxidase is a Rate-Limiting Enzyme in Very-Long-Chain Fatty Acid β -Oxidation System; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 201, 1541-1547.
- Asbi, A.; Wie, L.S.; Steinberg, M.P.; Effect of pH on the Kinetics of Soybean Lipoxygenase-1; *J. Food Sci.*, **1989**, 54, 1594-1600.
- Asker, D.; Otha, Y.; Production of Canthaxanthin by Extremely Halophilic Bacteria; *J. Biosci. Bioeng.*, **1999**, 88, 617-621.
- Assaf, S.; Hadar, Y.; Dosoretz, C.G.; Biosynthesis of 13-Hydroperoxylinoleate, 10-Oxo-8-decenoic Acid, and 1-Octen-3-ol from Linoleic Acid by a Mycelial-Pellet Homogenate of *Pleurotus pulmonarius*; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2173-2178.
- Atlas, R.M.; Brown, A.E.; Dobra, K.W.; Miller, L.; *Experimental Microbiology – Fundamentals and Applications*; MacMillan Publ. Company, New York, **1984**.

- Atlas, R.M.; Parks, L.C.; *Handbook of Microbiological Media*; CRC Press, Boca Raton, **1993**.
- Avigan, J.; Steinberg, D.; Gutman, A.; Mize, C.E.; Milne, G.W.; Alpha-Decarboxylation, an Important Pathway for Degradation of Phytanic Acid in Animals; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, *24*, 838-844.
- Axelrod, B.; Lipoxygenases; *Adv. Chem. Ser.*, **1974**, *136*, 324-348.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T.M.; Laakso, S.; Lipoxygenase from Soybean; *Meth. Enzymol.*, **1981**, *71*, 441-451.
- Babudri, F.; Fiandanese, V.; Marchese, G.; Punzi, A.; Novel Synthetic Approach to (S)-Coriolic Acid; *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 327-331.
- Bailey, M.E.; Haas, H.B.; New Methods for Resolution of Enantiomorphs. 1. Rectification; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, *63*, 1969-1970.
- Barchi, J.J.; Moore, R.E.; Patterson, G.M.L.; Acutiphycin and 20,21-Didehydroacutiphycin, New Antineoplastic Agents from the Cyanophyte *Oscillatoria acutissima*; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8193-8197.
- Barrow, R.A.; Hemscheidt, T.; Liang, J.; Paik, S.; Moore, R.T.; Tius, M.A.; Total Synthesis of Cryptophycins, Revision of the Structures of Cryptophycin A and C; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 2479-2490.
- Basavaiah, D.; Bharathi, T.K.; Towards Chiral Reformatsky Reagents; *Syn. Comm.* **1989**, *19*, 2035-2039.
- Basse, G.; Lorenz, M.G.; Wackernagel, W.; A Biological Assay for the Sensitive and Quantifiable Detection of Extracellular Microbial DNAses; *J. Microbiol. Methods*, **1994**, *20*, 137-147.
- Bauer, S.T.; The Preparation of Fatty Acid Chlorides; *Oil and Soap*, **1946**, *28*, 1-5.
- Baur, C.; Grosch, W.; Untersuchung über den Geschmack von Di-, Tri- und Tetrahydroxyfettsäuren; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1977**, *165*, 82-84.
- Beadle, F.R.; Gallen, C.C.; Conway, R.S.; Waterson, R.M.; Enoyl Coenzyme A Hydratase Activity in *Escherichia coli*. Evidence for Short and Long Chain Specific Enzymes and Study of their Associations; *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 4387-4395.
- Beever, H.; Microbodies in Higher Plants; *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1979**, *30*, 159-193.

- Beppu, T.; Genetic Organization of *Acetobacter* for Acetic Acid Fermentation; *Antonie vanLeeuwenhoek*, **1994**, *64*, 121-135.
- Berg, P.; Acyl Adenylates: An Enzymic Mechanism of Acetate Activation; *J. Biol. Chem.*, **1956**, *222*, 991-1013.
- Berger, R.G.; Dettweiler, G.; Kollmannsberger, H.; Drawert, F.; The Peroxisomal Dienoyl-CoA- Reductase Pathway in Pineapple Fruit; *Phytochem.*, **1990**, *29*, 2069-2073.
- Berger, R.G.; *AromaBiotechnology*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1995**.
- Bergey, D.H.; Holt, J.G.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; 9. Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore, **1994**.
- Berwick, P.G.; β -Lactam and Aminoglykoside Production from *Streptomyces*; *J. Appl. Bacteriol.*, **1988**, *64*, 9-15.
- Beuerle, T.; (R)-Octan-1,3-diol und verwandte Verbindungen: Vorkommen – Biogenese – Metabolismus, *Dissertationsschrift*, Universität Würzburg, **1999**.
- Beuerle, T.; Engelhard, S.; Bicchi, C.; Schwab, W.; Isolation, Identification and Enantioselective Synthesis of Octane-1,3-7-triol: Determination of its Absolute Configuration; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 35-40.
- Bild, G.S.; Ramadoss, C.S.; Axelrod, B.; Effect of Substrate Polarity on the Activity of Soybean Lipoxygenases Isoenzymes; *Lipids*, **1977**, *12*, 732-735.
- Binks, P.R.; Nicklin, S.; Bruce, N.C.; Degradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) by *Stenotrophomonasmaltophilia* PB1; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, *61*, 1318-1322.
- Binstock, J.F.; Schulz, H.; Fatty Acid Oxidation Complex from *Escherichia coli*; *Meth. Enzymol.*, **1981**, *71*, 403-411.
- Biot, M.; Phenomenes de polarsation successive, observes dans des fluides homogenes; *Bull. Soc. Philomath. Paris*, **1815**, *3*, 190-192.
- Bisswanger, H.; *Enzymkinetik – Theorie und Methoden*; 2. völlig neu bearb. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, **1994**.
- Black, P.N.; Characterization of a *FadL*-Specific Fatty Acid Binding in *Escherichia coli*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, *1046*, 97-105.

- Black, P.N.; DiRusso, C.C.; Metzger, A.K.; Heimert, T.L.; Cloning, Sequencing, and Expression of the *FadD* Gene of *Escherichia coli* Encoding Acyl Coenzyme A Synthetase; *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 25513-25520.
- Black, P.N.; DiRusso, C.C.; Molecular and Biochemical Analysis of Fatty Acid Transport, Metabolism, and Gene Regulation in *Escherichia coli*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1210*, 123-145.
- Black, T.H.; The Preparation and Reactions of Diazomethane; *Aldrichimica Acta*, **1983**, *16*, 3-10.
- Blaine Metting Jr., F.; *Soil Microbiology Ecology*; Marcel Dekker Inc., New York, **2000**.
- Blee, E.; Phytooxylipins and Plant Defense Reactions; *Prog. Lipid Res.*, **1998**, *37*, 33-72.
- Blin-Perrin, C.; Molle, D.; Dufosse, L.; Le-Quere, J.L.; Viel, C.; Mauvais, G.; Feron, G.; Metabolism of Ricinoleic Acid into γ -Decalactone: β -Oxidation and Long Chain Acyl Intermediates of Ricinoleic Acid in the Genus *Sporidiobolus sp.*; *FEMSMicrobiol. Lett.*, **2000**, *18*, 69-74.
- Bode, K.; Hooks, M.A.; Couee, I.; Identification, Separation and Characterization of Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Involved in Mitochondrial β -Oxidation in Higher Plants; *Plant Physiol.*, **1999**, *119*, 1305-1314.
- Bollet, C.; Davin-Regli, A.; de Micco, P.; A Simple Method for Selective Isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from Environmental Samples; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, *61*, 1653-1654.
- Brash, A.R.; Ingram, C.D.; Harris, T.M.; Analysis of a Specific Oxygenation Reaction of Soybean Lipoxygenase-1 with Fatty Acids Esterified in Phospholipids; *Biochemistry*, **1987**, *26*, 5465-5471.
- Breitmeier, E.; Jung, G.; *Organische Chemie II*; 1. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, **1983**.
- Bria, M.; Watkin, P.; The 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Tool for Structural Determination of Organic Compounds; *Actual. Chim.*, **1997**, *2*, 24-35.
- Briggs, G.E.; Haldane, J.B.S.; A Note on the Kinetics of Enzyme Action; *Biochem J.*, **1925**, *19*, 338-339.
- Brodowsky, I.D.; Oliw, E.H.; Metabolism of 18:2(n-6), 18:3 (n-3), 20:4 (n-6) and 20:5(n-3) by the Fungus *Gaeumannomyces graminis*: Identification of Metabolites

- formed by 8-Hydroxylation and by w2 and w3 Oxygenation; *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1124, 59-65.
- Brodowsky, I.D.; Hamberg, M.; Oliw, E.H.; A Linoleic Acid (8*R*)-Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase of the Fungus *Gaeumannomyces graminis*; *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 14738-14745.
- Brown, H.C.; Krishnamurthy, S.; Forty Years of Hydride Reduction; *Tetrahedron*, **1979**, 35, 567-607.
- Brown, V.I.; Lowbury, E.J.; Use of an Improved Cefrimid Agar Medium and Other Culture Methods for *Pseudomonasaeruginosa*; *J. Clin. Pathol.*, **1965**, 18, 752-756.
- Bruins, A.P.; Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization; *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794, 345-357.
- Butte, W.; Rapid Method for the Determination of Fatty Acid Profiles from Fats and Oils Using Trimethylsulfonium Hydroxide for Transesterification; *J. Chromatogr.*, **1983**, 261, 142-145.
- Campa, A.; Salim-Hanna, M.; Cilento, G.; α -Oxidase Activity in Plants as Promotor of Electronic Energy; *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 49, 349-354.
- Capdevila, J.H.; Wei, S.; Helvig, C.; Falck, J.R.; Belosludtsev, Y.; Truan, G.; Graham-Lorence, S.E.; Peterson, J.A.; The Highly Stereoselective Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cytochrome P450-BM-3; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 22663-22671.
- Cardellina, J.H.; Moore, R.E.; Malyngic Acid, A New Fatty Acid from *Lynghyamajuscula*; *Tetrahedron*, **1980**, 36, 993-996.
- Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; Overview of the Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Interfacing Systems in Food Analysis: Naturally Occuring Substances in Food; *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794, 263-297.
- Cartwright, C.D.; Thompson, I.P.; Burns, R.G.; Degradation and Impact of Phthalate Plasticizers on Soil Microbial Communities; *Environ. Toxicol. Chem.*, **2000**, 19, 1253-1261.
- Cassidy, M.B.; Lee, H.; Trevors, J.T.; Environmental Applications of Immobilized Microbiol Cells: A Review; *J. Ind. Microbiol.*, **1996**, 16, 79-101.
- Chace, D.H.; Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory; *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 445-477.

- Chan, H.W.S.; Soya-Bean Lipoxygenase: An Iron-Containing Dioxygenase; *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, *327*, 32-35.
- Chanama, S.; Comparative 16S rRNA Sequence Analysis; *Thai. J. Health Res.*, **1999**, *13*, 107-117.
- Chatulet, M.; Chabanon, D.G.; Marty, N.; Epidemiological Typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by PCR; *J. Clin. Microbiol.*, **1995**, *33*, 912-914.
- Chaudhuri, P.; Singh, S.D.; Modified Methods for Simple and Rapid Detection of Bacterial Deoxyribonuclease Production; *J. Microbiol. Methods*, **1992**, *61*, 307-311.
- Cheetham, P.S.J.; The Use of Biotransformations for the Production of Flavors and Fragrances; *Trends Biotechnol.*, **1993**, *35*, 478-488.
- Cheetham, P.S.J.; Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours. In: *Biotechnology of Aroma Compounds* (Hrsg.: Berger, R.G.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1996**, 3-49.
- Chirumamilla, R.R.; Marchant, R.; Nigam, P.; Captopril and its Synthesis from Chiral Intermediates; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2001**, *76*, 123-127.
- Cho, N.C.; Kanghwa, J.; Deok, Y.; Purification and Characterization of Polyol Dehydrogenase from *Gluconobacter melanogensus*; *Han. San. Hak.*, **1990**, *23*, 172-178.
- Christie, W.W.; Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids; *Lipids*, **1998**, *33*, 343-353.
- Chu, C.H.; Schulz, H.; 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase is a Peroxisomal Enzyme and Therefore Not Involved in Mitochondrial Fatty Acid Oxidation; *FEBS Lett.*, **1985**, *185*, 129-134.
- Chudinova, V.V.; Chudinov, M.V.; Eremin, S.V.; Alekseev, S.M.; Preparative Separation and ¹H NMR Identification of Products of Linoleic Acid Autoxidation; *Bioorg. Khim.*, **1995**, *21*, 545-553.
- Clapp, C.H.; Banerjee, A.; Rotenberg, S.A.; Inhibition of Soybean Lipoxygenase 1 by N-Alkylhydroxylamines; *Biochemistry*, **1985**, *24*, 1826-1830.
- Coates, W.M.; Corrigan, J.R.; Pyridine Dichromate as an Oxidising Agent; *Chem. Ind.* **1969**, *44*, 1594.
- Cohen, N.; Eichel, W.F.; Lopresti, R.J.; Neukom, C.; Saucy, G.; Synthetic Studies on (2*R*,4'*R*,8'*R*)- α -tocopherol. An Alternative Synthesis of (2*R*,6*R*)-(+)-2,6,10-Tri-

- methylundecan-1-ol, a Key Side Chain Synthone; *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 3512-3515.
- Colon, G.E.; Nguyen, T.T.; Jetten, M.S.M.; Sinskey, A.J.; Stephanopoulos, G.; Production of Isoleucine by Overexpression of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* Threonine Producer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, *43*, 482-488.
- Cooper, T.G.; Beevers, H.; β -Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm; *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 3514-3520.
- Corey, E.J.; Schmidt, G.; Useful Procedures for the Oxidation of Alcohols Involving Pyridinium Dichromate in Aprotic Media; *Tetrahedron Lett.* **1979**, *5*, 399-402.
- Corey, E.J.; d'Alarcao, M.; Matsuda, S.P.T.; A New Irreversible Inhibitor of Soybean Lipoxygenase; Relevance to Mechanism; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 3585-3588.
- Cossy, J.; Aclinou, P.; Isolation and Total Synthesis of the Major Constituent of the Roots of *Centaurea incana*: Aplotaxene; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 7615-7618.
- Cote, R.J.; Gherna, R.L.; Nutrition and Media. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Hrsg.: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R.), Am. Soc. Microbiol., Washington, **1994**, 155-178.
- Croes, K.; Casteels, M.; De Hoffmann, E.; Mannaerts, G.P.; Van Veldhoven, P.; α -Oxidation of 3-Methyl-Substituted Fatty Acids in Rat Liver. Production of Formic Acid instead of CO₂, Cofactor Requirements, Subcellular Localization and Formation of a 2-Hydroxy-3-methacryl-CoA Intermediate; *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *240*, 674-683.
- Croes, K.; Casteels, M.; Dieuaide-Noubhani, M.; Mannaerts, G.P.; Van Veldhoven, P.; Stereochemistry of the α -Oxidation of 3-Methyl-Branched Fatty Acids in Rat Liver; *J. Lipid Res.*, **1999**, *40*, 601-609.
- Cronin, D.A.; Caplan, P.J.; Application of GC/MS to Identification of Flavor Compounds in Foods. In: *Application of Mass Spectrometry in Food Science* (Hrsg.: Gilbert, J.), Elsevier Appl. Sci., London, **1987**, 1-71.
- Cuebas, D.; Schulz, H.; Evidence for a Modified Pathway of Linoleate Degradation. Metabolism of 2,4-Decadienoyl Coenzyme A; *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 14140-14144.
- Dale, J.A.; Dull, D.L.; Mosher, H.S.; α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic Acid, a Versatile Reagent for the Determination of Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines; *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 2543-2549.

- Danheiser, R.L.; Casebier, D.S.; Huboux, A.H.; Total Synthesis of Aegyptinones A and B; *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 4844-4848.
- D'Auria, M.; De Mico, A.; D'Onofrio, F.; Scettri, A.; Pyridinium Dichromate in Organic Chemistry: A New Synthesis of Enediacarbonyl Compounds; *Synthesis* **1985**, *10*, 988-990.
- De Duve, C.; Baudhuin, P.; Peroxisomes (Microbodies and Related Particles); *Physiol. Rev.*, **1966**, *46*, 323-357.
- De Hoffmann, E.; Tandem Mass Spectrometry: A Primer; *J. Mass. Spectrom.*, **1996**, *31*, 129-137.
- Demain, A.L.; Microbial Biotechnology; *Trends Biotechnol.*, **2000**, *18*, 26-31.
- Denton, M.; Kerr, K.G.; Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*; *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, *11*, 57-80.
- De Santis, G.; Jones, J.B.; Chemical Modification of Enzymes for Enhanced Functionality; *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 324-330.
- De Waard, P.; van der Wal, H.; Huijberts, G.N.M.; Eggink, G.; Heteronuclear NMR Analysis of Unsaturated Fatty Acids in Poly(3-hydroxyalkanoates). Study of β -Oxidation in *Pseudomonasputida*; *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 315-319.
- Diczfalusy, U.; β -Oxidation of Eicosanoids; *Prog. Lipid Res.*, **1994**, *33*, 403-428.
- Dingermann, T.; *Gentechnik – Biotechnik*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- Distefano, M.D.; Kuang, H.; Qi, D.; Mazgary, A.; The Design of Protein-Based Catalysts Using Semisynthetic Methods; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, *8*, 459-466.
- Dommes, V.; Luster, W.; Cvetanovic, M.; Kunau, W.H.; Purification by Affinity Chromatography of 2,4-Dienoyl-CoA Reductases from Bovine Liver and *Escherichia coli*; *Biochemistry*, **1982**, *125*, 335-341.
- Dommes, V.; Kunau, W.H.; 2,4-Dienoyl Coenzyme A Reductases from Bovine Liver and *Escherichia coli*. Comparison of Properties; *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 1781-1788.
- Downing, D.T.; Ahren, D.G.; Bachtta, M.; Enzyme Inhibition by Acetylenic Compounds; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1970**, *40*, 218-223.

- Drancourt, M.; Bollet, C.; Raoult, D.; *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an Opportunistic Human Pathogen in Africa; *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1997**, *47*, 160-163.
- Drancourt, M.; Bollet, C.; Carlioz, A.; Martelin, R.; Gayral, J.P.; Raoult, D.; 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates; *J. Clin. Microbiol.*, **2000**, *38*, 3623-3630.
- Drauz, K.; Waldmann, H.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; VCH-Verlag, Weinheim, **1995**.
- Duronio, R.J.; Knoll, L.J.; Gordon, J.I.; Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase Gene (FAA1) and Assessment of its Role in Protein N-Myristoylation; *J. Cell Biol.*, **1992**, *117*, 515-529.
- Dworkin, M., Foster, J.W.; Experiments with Some Microorganisms which Utilize Ethane and Hydrogen; *J. Bacteriol.*, **1958**, *75*, 592-603.
- Eaton, S.; Bartlett, K.; Pourfarzam, M.; Mammalian Mitochondrial β -Oxidation; *Biochem J.*; **1996**, *320*, 345-357.
- English, N.; Hughes, V.; Wolf, C.R.; Common Pathways of Cytochrome P450 Gene Regulation by Peroxisome Proliferators and Barbiturates in *Bacillus megaterium* ATCC14581; *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 26836-26841.
- English, N.; Palmer, C.N.A.; Alworth, W.L.; Kang, L.; Hughes, V.; Wolf, C.R.; Fatty Acid Signals in *Bacillus megaterium* are Attenuated by Cytochrome P-450-Mediated Hydroxylation; *Biochem. J.*, **1997**, *327*, 363-368.
- Esaki, N.; Ito, S.; Blank, W.; Soda, K.; Biotransformation of Oleic Acid by *Micrococcus luteus* Cells; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, *58*, 319-321.
- Esterbauer, H.; Grosch, E.; Isomere Trihydroxy-octadecensäuren in Bier: Beweis für ihr Vorkommen und ihre quantitative Bestimmung; *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **1977**, *164*, 255-259.
- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*; 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, **1997**.
- Fabre, C.E.; Blanc, P.J.; Goma, G.; Production of Benzaldehyde by Several Strains of *Ischnoderma benzoinum*; *Sci. Aliment.*, **1996**, *16*, 61-68.
- Fabritius, D.; Schäfer, H.J.; Steinbüchel, A.; Biotransformation of Linoleic Acid with the *Candida tropicalis* M25 Mutant; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, *48*, 83-87.

- 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.
- Fales, H.M.; Jaouni, T.M.; Babashak, J.F.; Simple Device for Preparing Ethereal Diazomethane without Resorting to Codistillation; *Anal. Chem.*, **1973**, *45*, 2302-2303.
- Farfan, M.J.; Martin-Rendon, E.; Calderon, I.L.; Effect of Gene Amplification on Threonine Production by Yeast; *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*, 667-674.
- Fauconnier, M.L.; Marlier, M.; An Efficient Procedure for the Production of Fatty Acid Hydroperoxides from Hydrolyzed Flax Seed Oil and Soybean Lipoxygenase; *Biotechnol. Tech.*, **1996**, *10*, 839-844.
- Feigenbaum, J.; Schulz, H.; Thiolasases of *Escherichia coli*: Purification and Chain Length Specificities; *J. Bacteriol.*, **1975**, *122*, 407-411.
- Fenton, J.J.; Harsch, H.H.; Klein, D.; Production of Volatile Nitrogenous Compounds from the Degradation of Streptomycin by *Pseudomonas maltophilia*; *J. Bacteriol.*, **1973**, *116*, 1267-1272.
- Feron, G.; Bonnarme, P.; Durand, A.; Prospects for the Microbial Production of Food Flavors; *Trends Food Sci. Technol.*, **1996**, *7*, 285-293.
- Fiechter, A.; Bioreactor Evaluation and Bioprocess Development; In: *Bioflavour '95* (Hrsg.: Etievant, P.; Schreier, P.), INRA, Paris, **1995**, 389-392.
- Finan, J.M.; Kishi, Y.; Reductive Ring Openings of Allyl-Alcohol Epoxides; *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2719-2722.
- Finkmann, W.; Altendorf, K.; Stackebrandt, E.; Lipski, A.; Characterization of N_2O -Producing Xanthomonas-like Isolates from Biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephistis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov.; *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **2000**, *50*, 273-282.
- Finocchiaro, G.; Ito, M.; Tanaka, K.; Purification and Properties of Short Chain Acyl-CoA, Medium Chain Acyl-CoA, and Isovaleryl-CoA Dehydrogenases from Human Liver; *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 7982-7989.
- Fong, J.C.; Schulz, H.; Purification and Properties of Pig Heart Crotonase and the Presence of Short Chain and Long Chain Enoyl Coenzyme A Hydratases in Pig and Guinea Pig Tissues; *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 542-547.

- Frank, H.; Nicholson, G.J.; Bayer, E.; Chirale Polysiloxane zur Trennung von optischen Antipoden; *Angew. Chem.*, **1978**, *90*, 396-397.
- Friebolin, H.; *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*; 3. überarb. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- Fringuelli, F.; Piermatti, O.; Pizzo, F.; Enantioselective Synthesis of β -Hydroxy Acids via Chiral Enolates of Carboxylic Acids and Esters; *Recent Res. Dev. Org. Chem.*, **1997**, *1*, 123-136.
- Fritz, I.B.; Marquis, N.R.; The Role of Acylcarnitine Esters and Carnitine Palmityltransferase in the Transport of Fatty Acyl Groups Across Mitochondrial Membranes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1965**, *54*, 1226-1233.
- Fuijo, T.; Nishi, T.; Ito, S.; Maruyama, A.; High Level Expression of XMP Aminase in *Escherichia coli* and its Application for the Industrial Production of 5'-Guanylic Acid; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, *48*, 693-698.
- Fulco, A.J.; P450BM-3 and Other Inducible Bacterial P450 Cytochromes: Biochemistry and Regulation; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1991**, *31*, 177-203.
- Fukui, T.; Shiomi, N.; Doi, Y.; Expression and Characterization of (*R*)-Specific Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by *Aeromonas caviae*; *J. Bacteriol.*, **1998**, *180*, 667-673.
- Funk Jr., M.O.; Alteneder, A.W.; A New Class of Lipoxygenase Inhibitor. Polyunsaturated Fatty Acids Containing Sulfur; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *114*, 937-943.
- Funk Jr., M.O.; Andre, J.C.; Otsuki, T.; Oxygenation of *trans* Polyunsaturated Fatty Acids by Lipoxygenase Catalysis; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5375-5376.
- Galliard, T.; Degradation of Acyl Lipids; In: *The Biochemistry of Plant Lipids: Structure and Function* (Hrsg.: Stumpf, P.K.), Academic Press, New York, **1980**, 107-116.
- Galliard, T.; Matthew, J.A.; The Enzymic Formation of Long-Chain Aldehydes and Alcohols by α -Oxidation of Fatty Acids in Extracts of Cucumber Fruit (*Cucumis sativa*); *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *424*, 26-35.
- Gardner, H.W.; Weisleder, D.; Hydroperoxides from Oxidation of Linoleic and Linolenic Acids by Soybean Lipoxygenase: Proof of the *trans*-11 Double Bond; *Lipids*, **1972**, *7*, 191-193.

- Gardner, H.W.; Recent Investigations in the Lipoxygenase Pathway of Plants; *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1084*, 221-239.
- Gardner, H.W., Hou, C.T.; All (*S*) Stereoconfiguration of 7,10-Dihydroxy-8(*E*)-Octadecenoic Acid from Bioconversion of Oleic Acid by *Pseudomonasaeruginosa*; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, *76*, 1151-1156.
- Gaskell, S.J.; Electrospray: Principles and Practice; *J. Mass Spectrom.*, **1997**, *32*, 677-688.
- Gaskell, S.J.; Mass Spectrometric Characterization of Biomolecules; *Adv. Mass Spectrom.*, **1998**, *14*, 317-342.
- Gatfield, I.L.; Bioreactors for Industrial Production of Flavors: Use of Enzymes; In: *Bioformation of Flavours* (Hrsg.: Patterson, R.L.S.; Charlwood, B.V.; MacLeod, G.; Williams, A.A.) Royal Soc. Chem., Cambridge, **1992**, 171-185.
- Gatfield, I.L.; Enzymatic and Microbial Generation of Flavours; *World Ingred.*, **1996**, *40*, 31-35.
- Gawronski, J.; Determination of Absolute and Relative Configuration by Chiroptical Methods; In: *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry*, Vol. E21a, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, **1995**, 499-533.
- Geiss, H.K.; Piotrowski, H.D.; Hingst, V.; Evaluation of API 20 NE in Routine Diagnostics of Nonfermenting Gram-negative Rod-Shaped Bacteria; *Zbl. Bakt. Hyg. A*, **1985**, *259*, 35-42.
- Gerwick, W.H.; Structure and Biosynthesis of Marine Algal Oxylipins; *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1211*, 243-255.
- Gibian, M.J.; Papathanasiou, H.; Inactivation of Soybean Lipoxygenase by Desferrioxamine and Ferene S. Removal of the Iron; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1987**, *64*, 643.
- Gimple, O.; Schreier, P.; Humpf, H.U.; A New Exciton-Coupled Circular Dichroism Method for Assigning the Absolute Configuration in α - and β -Hydroxy Carboxylic Acids; *Tetrahedron Asymmetry*, **1997**, *8*, 11-14.
- Ghisla, S.; Thorpe, C.; Massey, V., Mechanistic Studies with General Acyl-CoA Dehydrogenases and Butyryl-CoA Dehydrogenase: Evidence for the Transfer of the β -Hydrogen to the Flavin Position N(5) as a Hydride; *Biochemistry*, **1984**, *23*, 3154-3161.
- Goh, S.H.; Gian, H.L.; Reactivity of Triplet-State Nitrophenylcarbenes towards *cis*-Butene; *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1979**, *6*, 1625-1628.

- Golinelli-Pimpaneau, B.; Novel Reactions Catalysed by Antibodies; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 697-708.
- Grechkin, A.N.; Kuramshin, R.A.; Latypov, S.K.; Safonova, Y.Y.; Gafarova, T.E.; Ilyasov, A.V.; Hydroperoxides of α -Ketols. Novel Products of the Plant Lipoxygenase Pathway. *Eur. J. Biochem.*, **1991**, *199*, 451-457.
- Grechkin, A.; Recent Developments in Biochemistry of the Plant Lipoxygenase Pathway; *Prog. Lipid Res.*, **1998**, *37*, 317-352.
- Greville, G.D.; Tubbs, P.K.; The Catabolism of Long Chain Fatty Acids in Mammalian Tissues; *Biochemistry*, **1968**, *4*, 155-212.
- Griffiths, W.J.; Jonsson, A.P.; Liu, S.; Rai, D.K.; Wang, Y.; Electrospray and Tandem Mass Spectrometry in Biochemistry; *Biochem. J.*, **2001**, *355*, 545-561.
- Groot, P.H.E.; Scholte, H.R.; Hulsman, W.C.; Fatty Acid Activation: Specificity, Localization and Function; *Adv. Lipid Res.*, **1976**, *14*, 75-126.
- Groves, J.T.; Watanabe, Y.; Reactive Iron Porphyrin Derivatives Related to the Catalytic Cycles of Cytochrome P-450 and Peroxidase. Studies of the Mechanism of Oxygen Activation; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 8443-8452.
- Gühnemann-Schäfer, K.; Engeland, K.; Linder, D.; Kindl, H.; Evidence for Domain Structures of the Trifunctional Protein and the Tetrafunctional Protein Acting in Glyoxysomal Fatty Acid β -Oxidation; *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *226*, 909-915.
- Guo, L.; Lim, K.B.; Gunn, J.S.; Bainbridge, B.; Darveau, R.P.; Hackett, M.; Miller, S.I.; Regulation of Lipid A Modifications by *Salmonellatyphimurium* Virulence genes *phoP-phoQ*; *Science*, **1991**, *276*, 250-253.
- Gurvitz, A.; Wabnegger, L.; Yagi, A.I.; Binder, M.; Hartig, A.; Ruis, H.; Hamilton, B.; Dawes, I.W.; Hiltunen, J.K.; Rottensteiner, H.; Fuction of Human Mitochondrial 2,4-Dienoyl-CoA Reductase and Rat Monofunctional Δ^3 - Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase in β -Oxidation of Unsaturated Fatty Acids; *Biochem. J.*, **1999**, *344*, 903-914.
- Guyot, J.P.; Calderon, M.; Morlon-Guyot, J.; Effect of pH-Control on Lactic Acid Fermentation of Starch by *Lactobacillusmanihotivorans* LMG 180810T; *J. Appl. Microbiol.*, **2000**, *88*, 176-182.
- Hacene, H.; Daoudi-Hamdad, F.; Bhatnagar, T.; Baratti, J.C.; Lefebvre, G.; H107, a New Aminoglycoside Anti-*Pseudomonas* Antibiotic Produced by a New Strain of *Spirillospora*; *Microbios*, **2000**, *102*, 69-77.

- Häring, D.; Schüler, E.; Adam, W.; Saha-Möller, C.R.; Schreier, P.; Semisynthetic Enzymes in Asymmetric Synthesis: Enantioselective Reduction of Racemic Hydroperoxides Catalyzed by Seleno-Subtilisin; *J.Org. Chem.*, **1999**, *64*, 832-835.
- Haffner, T.; Tressl, R.; Biosynthesis of (*R*)-gamma-Decalactone in the Yeast *Sporobolomyces odoratus*; *J. Agric. Food. Chem.*, **1996**, *44*, 1218-1223.
- Hagedorn, S.; Kaphammer, B.; Microbial Biocatalysis in the Generation of Flavor and Fragrance Chemicals; *Annu.Rev.Microbiol.*, **1994**, *48*, 773-800.
- Hagishita, T.; Yoshida, T.; Izumi, Y.; Mitsunaga, T.; Efficient L-Serine Production from Methanol and Glycine by Resting Cells of *Methylobacterium* sp. Strain MN43; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1996**, *60*, 1604-1607.
- Hamada, T.; Sugushita, M.; Fukushima, Y.; Fukase, T.; Motai, H.; Continuous Production of Soy Sauce by a Bioreaktor System; *Proc. Biochem.*, **1991**, *26*, 39-45.
- Hamberg, M.; Samuelsson, B.; On the Specificity of the Oxygenation of Unsaturated Fatty Acids Catalyzed by Soybean Lipoxidase; *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 355-377.
- Hamberg, M.; Herman, C.A.; Herman, R.P.; Novel Biological Transformations of 15-*L_S*-Hydroperoxy-5,8,11,13-Eicosatetraenoic Acid; *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, *877*, 447-457.
- Hamberg, M.; Trihydroxyoctadecenoic Acids in Beer: Qualitative and Quantitative Analysis; *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*, 1568-1572.
- Hamberg, M.; Gardner, H.W.; Oxylin Pathway to Jasmonates: Biochemistry and Biological Significance; *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1165*, 1-18.
- Hamberg, M.; Pathway in the Biosynthesis of Oxylin in Plants; *J. Lipid Mediators*, **1993**, *6*, 375-384.
- Hamberg, M.; Hamberg, G.; 15(*R*)-Hydroxylinoleic Acid, an Oxylin from Oat Seeds; *Phytochem.*, **1996**, *42*, 729-732.
- Hamberg, M.; Sanz, A.; Castresana, C.; α -Oxidation of Fatty Acids in Higher Plants; *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 24503-24513.
- Hammonds, S.J.; Antibiotic Resistance Profiling; *Methods Mol. Biol.*, **1995**, *46*, 1-4.
- Hansen, H.S.; Jensen, J.; von Wettstein-Knowles, P.; Apparent in vivo Retroconversion of Dietary Arachidonic to Linoleic Acid in Essential Fatty Acid-Deficient Rats; *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, *878*, 284-287.

- Harada, N.; Chen, S.M.L., Nakanishi, K.; Quantitative Definition of Exciton Chirality and the Distant Effect in the Exciton Chirality Method; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 5345-5352.
- Harada, N.; Nakanishi, K.; *Circular Dichroic Spectroscopy: Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*; University Science Books; Mill Valley, **1983**.
- Harada, T.; Tai, A.; Yamamoto, Y.; Ozaki, H.; Izumi, Y.; Characterization of the Surface of Asymmetrically Modified Nickel Catalyst. An Approach for the Development of Highly Effective Enantioface-Differentating (Asymmetric) Hydrogenation Catalyst; *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **1981**, *7*, 364-375.
- Hartmann, D.; Philipp, R.; Schmadel, K.; Birktoft, J.; Banaszak, L.J.; Trommer, W.E.; Spatial Arrangement of Coenzyme and Substrates Bound to *L*-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase as Studied by Spin-Labeled Analogs of NAD⁺ and CoA; *Biochemistry*, **1991**, *30*, 2782-2790.
- Hartmeier, W.; Coimmobilization of Enzymes and Whole Cells; *Food Biotechnol.*, **1990**, *4*, 399-407.
- Hasegawa, J.; Nagashima, N.; Production of Chiral β -Hydroxy Acids and its Application in Organic Synthesis; In: *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.; Patel, R.), Marcel Dekker, New York, **2000**, 343-363.
- Hashimoto, S.; Ozaki, A.; Whole Microbial Cell Processes for Manufacturing Amino Acids, Vitamins or Ribonucleotides; *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 604-608.
- Hashimoto, T.; Peroxisomal β -Oxidation Enzymes; *Cell Biochem. Biophys.*, **2000**, *32*, 63-72.
- Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Matsui, K.; Yamaguchi, M.; Product Specificity in an Entire Series of (ω -6Z, ω -9Z)-C₁₃~C₂₀-Dienoic Acids and -Dienols; *Z. Naturforsch.*, **1989**, *44c*, 64-70.
- Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Matsui, K.; Ogura, M.; Studies on the Substrate Specificity of Soybean Lipxygenase-1 Using an Entire Series of (ω 3Z, ω 6Z, ω 9Z)-C₁₂~C₂₂-Trienoic Acids and -Trienols; *Z. Naturforsch.*, **1990**, *45c*, 1161-1164.
- Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Matsui, K.; Reaction Specificity of Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase. In: *Progress in Flavour Precursor Studies*. (Hrsg.: Schreier, P.; Winterhalder, P.) Allured Publishing Corp., Carol Stream II, **1993**, 151-170.
- Hayes, D.G.; The Catalytic Activity of Lipases Toward Hydroxy Fatty Acids - A Review; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, *73*, 543-549.

- He, X.Y.; Yang, S.Y.; Schulz, H.; Inhibition of Enoyl-CoA Hydratase by Long-Chain L-3-Hydroxyacyl-CoA and its Possible Effect on Fatty Acid Oxidation; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, 298, 527-531.
- Heikes, D.L.; Jensen, S.R.; Heming-Jones, M.E.; Purge and Trap Extraction with GC-MS Determination of Volatile Organic Compounds in Table-Ready Foods; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2869-2875.
- Henry, M.F.; Cronan, J.E.; *Escherichia coli* Transcription Factor that Both Activates Fatty Acid Synthesis and Represses Fatty Acid Degradation; *J. Mol. Biol.*, **1991**, 222, 843-849.
- Herderich, M.; Schreier, P.; LC-MS/MS in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik; *GIT Fachz. Lab.*, **1996**, 40, 841-845.
- Hercovici, J.; Egron, M.J.; Antonakis, K.; New Oxidative Systems for Alcohols: Molecular Sieves with Chromium-(VI)-Reagents; *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1982**, 9, 1967-1973.
- Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J., Demuynck, C., Biosynthesis of 4Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccaromyces rouxii*; *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 1357-1360.
- Hilvert, D.; Critical Analysis of Antibody Catalysis; *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 751-793.
- Hitchcock, C.; James, A.T.; Degradation of Fatty Acids by Plant Tissue; *Biochem. J.*, **1964**, 93, 22-23.
- Hitchcock, C.; James, A.T.; The Mechanism of α -Oxidation in Leaves; *Biochim. Biophys. Acta*, **1966**, 116, 413-424.
- Hitchcock, C.; Morris, L.J.; James, A.T.; Stereochemistry of α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. Configuration of Biosynthetic Long-Chain 2-Hydroxy-Acids; *Eur. Biochem. J.*, **1968a**, 3, 473-475.
- Hitchcock, C.; Morris, L.J.; James, A.T.; Stereochemistry of α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. Isotope Competition Experiments; *Eur. J. Biochem.*, **1968b**, 3, 419-421.
- Hitchcock, C.; Rose, A.; Stereochemistry of α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. Configuration of Biosynthetic Long-Chain 2-Hydroxy-Acids; *Biochem. J.*, **1971**, 125, 1155-1156.
- Hoch, U.; Humpf, H.U.; Schreier, P.; Saha-Möller, C.R.; Adam, W.; Configurational Assignment of Optically Active Hydroperoxy Homoallylic Alcohols and the

- Corresponding Diols by Circular Dichroism and Multidimensional Gas Chromatography; *Chirality*, **1997**, 9, 69-74.
- Hör, K.; Gimple, O.; Schreier, P.; Humpf, H.U.; Absolute Configurational Assignment of Acyclic Hydroxy Carboxylic Acids: A New Strategy in Exciton-Coupled Circular Dichroism; *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 322-325.
- Holden, D.A.; Ringsdorf, H.; Haubs, M.; Photosensitive Monolayers. Photochemistry of Long-Chain Diazo and Azide Compounds at the Air-Water Interface; *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 4531-4536.
- Holman, R.T.; Egwim, P.O.; Christie, W.W.; Substrate Specificity of Soybean Lipoxidase; *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 1149-1151.
- Hou, C.T.; Production of 10-Ketostearic Acid from Oleic Acid by *Flavobacterium* sp. Strain DS5 (NRRL B-14859); *Appl. Environ. Microbiol.*, **1994a**, 60, 3760-3763.
- Hou, C.T.; Conversion of Linoleic Acid to 10-Hydroxy-12(Z)-Octadecenoic Acid by *Flavobacterium* sp. (NRRL B-14859); *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1994b**, 71, 975-978.
- Hou, C.T.; Production of Hydroxy Fatty Acids from Unsaturated Fatty Acids by *Flavobacterium* sp. DS5 Hydratase, a C-10 Positional and *cis* Unsaturation-Specific Enzyme; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, 72, 1265-1270.
- Hou, C.T.; Bagby, M.O.; Production of a New Compound, 7,10-Dihydroxy-8-(E)-Octadecenoic Acid from Oleic Acid by *Pseudomonas* sp. PR3; *J. Ind. Microbiol.*, **1991**, 7, 123-130.
- Hou, C.T.; Bagby, M.O.; 10-Hydroxy-8(Z)-Octadecenoic Acid, an Intermediate in the Bioconversion of Oleic Acid to 7,10-Dihydroxy-8(E)-Octadecenoic Acid; *J. Ind. Microbiol.*, **1992**, 9, 103-107.
- Hou, C.T.; A Novel Compound, 12,13,17-Trihydroxy-9(Z)-Octadecenoic Acid, from Linoleic Acid by a New Microbial Isolate *Clavibacter* sp. ALA2; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 1359-1362.
- Hoye, R.C.; Braun, P.; Synthesis and ¹H NMR Analysis of α -Methoxy- α -difluoromethylphenylacetic Acid Derivatives of Secondary Alcohols for Determination of Absolute Stereochemistry; In: *Book of Abstracts, 213th ACS National Meeting*, San Francisco, **1997**, 438.
- Huang, S.; Van Veldhoven, P.P.; Asselberghs, S.; Eyssen, H.J.; de Hoffmann, E.; Mannaerts, G.P.; Comparison of Fatty Acid α -Oxidation by Rat Hepatocytes and Liver Microsomes Fortified with NADPH, Fe³⁺ and Phosphate; *Lipids*, **1994**, 29, 671-678.

- Huang, X.; Rickman, B.H.; Borhan, B.; Berova, N.; Nakanishi, K.; Zinc Porphyrin Tweezer in Host-Guest Complexation: Determination of Absolute Configurations of Diamines, Amino Acids, and Amino Alcohols by Circular Dichroism; *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 6185-6186.
- Huerta, F.F.; Backvall, J.E.; Enantioselective Synthesis of β -Hydroxy Acids Derivatives via a One-Pot Aldol Reaction – Dynamic Kinetic Resolution; *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 1209-1212.
- Hugh, R.; Leifson, E.; The Taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram-Negative Bacteria; *J. Bacteriol.*, **1953**, *66*, 24-26.
- Hugh, R.; Ryschenkow, E.; *Pseudomonasmaltophilia*, an Alcaligines-like Species; *J. Gen. Microbiol.*, **1961**, *26*, 123-132.
- Hultman, T.; Stahl, S.; Hornes, E.; Uhlen, M.; Direct Solid Phase Sequencing of Genomic and Plasmid DNA Using Magnetic Beads as Solid Support; *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 4937-4946.
- Humble, M.W.; King, A.; Phillips, I.; APIZYM: A Simple Rapid System for the Detection of Bacterial Enzymes; *J. Clin. Path.*, **1977**, *30*, 275-277.
- Humpf, H.U.; Berova, N.; Nakanishi, K.; Jarstfer, M.B.; Poulter, C.D.; Allylic and Homoallylic Exciton Coupling CD: A Sensitive Method for Determining the Absolute Stereochemistry of Natural Products; *J. Org. Chem.*, **1995**, *53*, 267-275.
- Humphreys, G.O.; Hancock, I.C.; Meadow, P.M.; Synthesis of the HydroxyAcids in Lipid A of *Pseudomonasaeruginosa*; *J. Gen. Microbiol.*, **1972**, *71*, 221-230.
- Huth, W.; Alves, F.; Mitochondrial Acetyl-CoA Acetyltransferase in Various Organs from Rat: Form Patterns and Coenzyme A-Mediated Modification; *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, *830*, 274-281.
- Iacazio, G.; Langrand, G.; Baratti, J.; Buono, G.; Triantaphylides, C.; Preparative, Enzymatic Synthesis of Linoleic Acid (13S)-Hydroperoxide Using Soybean Lipoxygenase-1; *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1690-1691.
- Ichikawa, A.; Takanshi, H.; Ooi, T.; Kusumi, T.; Absolute Configuration of Some Hydroxy-fatty Acids Produced by the Insect Genus *Laccifer*; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, *61*, 881-883.
- Ikeda, M.; Ozaki, A.; Katsumata, R.; Phenylalanine Production by Metabolically Engineered *Corynebacteriumglutamicum* with the *pheA* Gene of *Escherichiacoli*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1993**, *39*, 318-323.

- Ikeda, M.; Katsumata, R.; Hyperproduction of Tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the Modified Pentose Pathway; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, *65*, 2497-2502.
- Ikeda, Y.; Okamura-Ikeda, K.; Tanaka, K.; Purification and Characterization of Short-Chain, Medium-Chain, and Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase from Rat Liver Mitochondria. Isolation of the Holo- and Apoenzymes and Conversion of the Apoenzyme to the Holoenzyme; *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 1311-1325.
- Ikeda, Y.; Keese, S.M.; Fenton, W.A.; Tanaka, K.; Biosynthesis of Four Rat Liver Mitochondrial Acyl-CoA Dehydrogenases: *in vitro* Synthesis, Import into Mitochondria, and Processing of their Precursors in a Cell-Free System and in Cultured Cells; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1987**, *252*, 662-674.
- Imamura, S.; Ueda, S.; Mizugaki, M.; Kawaguchi, A.; Purification of the Multienzyme Complex for Fatty Acid Oxidation from *Pseudomonas fragii* and Reconstitution of the Fatty Acid Oxidation System; *J. Biochem.*, **1990**, *107*, 184-189.
- Imhof, R.; Bosset, J.O.; Relationship between Micro-Organisms and Formation of Aroma Compounds in Fermented Dairy Products; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1994**, *198*, 267-276.
- Indo, Y.; Yang-Feng, T.; Glassberg, R.; Tanaka, K.; Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of cDNAs Encoding Human Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase and Assignment of the Location of its Gene (ACADL) to Chromosome 2; *Genomics*, **1991**, *11*, 609-620.
- Isaac, S.; Jennings, D.; *Kultur von Mikroorganismen*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- Ishikawa, M.; Mikami, Y.; Usukara, J.; Iwasaki, H.; Shinagawa, H.; Morikawa, K.; Reconstitution, Morphology and Crystallization of Fatty Acid β -Oxidation Multi-enzyme Complex from *Pseudomonas fragii*; *Biochem. J.*, **1997**, *328*, 825-820.
- Ito, H.; Sato, K.; Matsui, K.; Sano, K.; Enei, H.; Hirose, Y.; Molecular Breeding of a *Brevibacterium lactofermentum* L-Phenylalanine Producer Using a Cloned Prephenate Dehydratase Gene; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, *33*, 190-195.
- Izai, K.; Uchida, Y.; Orii, T.; Yamamoto, S.; Hashimoto, T.; Novel Fatty Acid β -Oxidation Enzymes in Rat Liver Mitochondria. I. Purification and Properties of Very-Long-Chain-Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase; *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 1027-1033.
- Jäger, K.E.; Reetz, M.T.; Directed Evolution of Enantioselective Enzymes for Organic Chemistry; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; **2000**, *4*, 68-73.

- Jahn, K.; Jahn, K.; Massenspektrometrie – Kopplungstechniken mit der Chromatographie; *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1997**, *45(Suppl.)*, 29-37.
- Jansen, G.A.; Mihalik, S.J.; Watkins, P.A.; Jakobs, C.; Moser, H.W.; Wanders, R.J.A.; Characterization of Phytanoyl-Coenzyme A Hydroxylase in Human Liver and Activity Measurements in Patients with Peroxisomal Disorders; *Clin. Chim. Acta*, **1998**, *271*, 203-211.
- Jansen, G.A.; Verhoeven, N.M.; Denis, S.; Romeijn, G.J.; Jakobs, C.; ten Brink, H.J.; Wanders, R.J.A.; Phytanic Acid α -Oxidation: Identification of 2-Hydroxyphytanoyl-CoA Lyase in Rat Liver and its Localization in Peroxisomes; *Biochim. Biophys. Acta*, **1999a**, *1440*, 176-182.
- Jansen, G.A.; Ferdinandusse, S.; Hogenhout, E.M.; Verhoeven, N.M.; Jakobs, C.; Wanders, R.J.A.; Phytanoyl-CoA Hydroxylase Deficiency: Enzymological and Molecular Basis of Classical Refsum Disease; *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999b**, *486*, 371-376.
- Jansen, G.A.; Hogenhout, E.M.; Ferdinandusse, S.; Waterham, H.R.; Ofman, R.; Jakobs, C.; Skjedahl, O.H.; Wanders, R.J.A.; Human Phytanoyl-CoA Hydroxylase: Resolution of the Gene Structure and the Molecular Basis of Refsum's Disease; *Hum. Mol. Genet.*, **2000a**, *9*, 1195-1200.
- Jansen, G.A.; Denis, S.; Verhoeven, N.M.; Jakobs, C.; Wanders, R.J.A.; Phytanic Acid α -Oxidation in Man: Identification of 2-Hydroxyphytanoyl-CoA Lyase, a Peroxisomal Enzyme with Normal Activity in Zellweger Syndrome; *J. Inher. Metab. Dis.*, **2000b**, *23*, 421-424.
- Jansen, G.A.; van den Brink, D.M.; Ofman, R.; Draghici, O.; Dacremont, G.; Wanders, R.J.A.; Identification of Pristanal Dehydrogenase Activity in Peroxisomes: Conclusive Evidence That the Complete Phytanic Acid α -Oxidation Pathway is Localized in Peroxisomes; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, *283*, 674-679.
- Janssens, L.; De Pooter, H.L.; Schamp, N.M.; Vandammen, E.J.; Production of Flavours by Microorganisms; *Proc. Biochem.*, **1992**, *27*, 195-215.
- Jaspars, M.; Computer Assisted Structure Elucidation of Natural Products Using Two-Dimensional NMR Spectroscopy; *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 241-248.
- Jennings, K.R.; MS/MS-Instrumentation; *Proc. Phytochem. Soc. Eur.*, **1996**, *40*, 25-43.
- Jin, Y.; Lipscomb, D.J.; Probing the Mechanism of C-H Activation: Oxidation of Methylcubane by Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b; *Biochemistry*, **1999**, *38*, 6178-6186.

- Jin, S.J.; Tserng, K.Y.; Metabolic Origins of Unsaturated Dicarboxylic Acids; *Biochemistry*, **1990**, *29*, 8540-8547.
- Johnsen, K.; Nielsen, P.; Diversity of *Pseudomonas* Strains Isolated with King's B and Gould' S1 Agar Determined by Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction, 16S rDNA Sequencing and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Characterization; *FEMSMicrobiol. Lett.*, **1999**, *173*, 155-162.
- Johnson, J.V.; Yost, R.A.; Tandem Mass Spectrometry for Trace Analysis; *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 758A-768A.
- Jung, K.; Hany, R.; Rentsch, D.; Storni, T.; Egli, T.; Witholt, B.; Characterization of New Bacterial Copolyesters Containing 3-Hydroxyoxoalkanoates and Acetoxy-3-hydroxyalkanoates; *Macromolecules*, **2000**, *33*, 8571-8575.
- Kajiwara, T.; Yoshikawa, H.; Saruwatari, T.; Hatanaka, A.; Kawai, T.; Ishihara, M.; Tsuneya, T.; Enzymic Formation of Unsaturated Long Chain Aldehydes in *Ulva pertusa*; *Phytochem.*, **1988**, *27*, 1643-1645.
- Kajiwara, T.; Yoshikawa, H.; Matsui, K.; Hatanaka, A.; Kawai, T.; Specificity of the Enzyme System Producing Long Chain Aldehydes in the Green Alga, *Ulva pertusa*; *Phytochem.*, **1989**, *28*, 407-409.
- Kajiwara, T.; Hatanaka, A.; Matsui, K.; Tomoi, T.; Idohara, T.; Properties of a Long Chain Aldehyde-Forming Enzyme in the Marine Green Alga *Ulvapertusa*; *Phytochem.*, **1994**, *35*, 55-57.
- Kam, W.; Kumaran, K.; Landau, B.R.; Contribution of omega-Oxidation to Fatty Acid Oxidation by Liver of Rat and Monkey; *J. Lipid Res.*, **1978**, *19*, 591-600.
- Karagounis, G.; Lippold, G.; Gaschromatographische Spaltung racemischer Verbindungen; *Naturwissenschaften*, **1959**, *46*, 145.
- Karakhanov, R.A.; Odintsova, T.I.; Yakovlev, V.B.; Rodin, A.P.; Selective Catalytic Hydrogenation of Double Bonds in Unsaturated Furan Ketones; *React. Kinet. Catal. Lett.* **1987**, *33*, 219-221.
- Karlson, P.; *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*; 14. neubearb. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, **1994**.
- Karmakar, B.; Vohra, R.M.; Nandanwar, H.; Sharma, P.; Gupta, K.G.; Sobti, R.C.; Rapid Degradation of Ferulic Acid via 4-Vinylguajacol and Vanillin by a Newly Isolated Strain of *Bacillus coagulans*; *J. Biotechnol.*; **2000**, *80*, 195-202.

- Katayama, A.; Fujie, K.; Characterization of Soil Microbiota with the Quinone Profile; *Soil Biochem.*, **2000**, *10*, 303-347.
- Katsuki, T.; Sharpless, B.K.; The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974-5976.
- Katsuki, T.; Martin, V.S.; Asymmetric Epoxidation of Allylic Alcohols: The Katsuki-Sharpley Epoxidation Reaction; *Organic Reactions*, **1996**, *48*, 1-299.
- Kawai, F.; Bacterial Degradation of Acrylic Oligomers and Polymers; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1993**, *39*, 382-385.
- Kawasaki, K.; Yokota, A.; Tomita, F.; Enzymatic Synthesis of L-Tryptophan by *Enterobacter aerogenes* Tryptophanase Highly Expressed in *Escherichia coli* and some Properties of the Purified Enzyme; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1995**, *59*, 1938-1943.
- Kawasaki, W.; Matsui, K.; Akakabe, Y.; Itai, N.; Kajiwara, T.; Long-Chain Aldehyde-Forming Activity in Tobacco Leaves; *Phytochem.*, **1998**, *49*, 1565-1568.
- Kebarle, P.; Ho, Y.; On the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. In: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Hrsg.: Cole, R.B.), Wiley, New York, **1997**, 3-63.
- Kebarle, P.; A Brief Overview of the Present Status of the Mechanisms Involved in Electrospray Mass Spectrometry; *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 804-817.
- Keck, G.E.; Boden, E.P.; Wiley, M.R.; Total Synthesis of (+)-Colletodiol: New Methodology for the Synthesis of Macrolactones; *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 896-906.
- Kelle, R.; Leufer, B.; Brunzema, C.; Weuster-Botz, D.; Krämer, R.; Wandrey, C.; Reaction Engineering Analysis of L-Lysine Transport by *Corynebacterium glutamicum*; *Biotechnol Bioeng.*, **1996**, *51*, 40-50.
- Kemp, T.R.; Characterization of some New C₁₆ and C₁₇ Unsaturated Fatty Aldehydes; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1975**, *52*, 300-302.
- Kennedy, A.C.; Gewin, V.L.; Soil Microbial Diversity: Present and Future Considerations; *Soil Sci.*, **1997**, *162*, 607-617.
- Kim, M.R.; Sok, D.E.; Irreversible Inhibition of Soybean Lipoxygenase-1 by Hydroperoxy Acids as Substrates; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, *288*, 270-275.

- Kim, H.; Gardner, H.W.; Hou, C.T.; 10(*S*)-Hydroxy-8(*E*)-Octadecenoic Acid, an Intermediate in the Conversion of Oleic Acid to 7,10-Dihydroxy-8(*E*)-Octadecenoic Acid; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000a**, *77*, 95-99.
- Kim, H.; Kuo, T.; Hou, C.T.; Production of 10,12-Dihydroxy-8(*E*)-Octadecenoic Acid, an Intermediate in the Conversion of Ricinoleic Acid to 7,10,12-Trihydroxy-8(*E*)-Octadecenoic Acid by *Pseudomonasaeruginosa* PR3; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2000b**, *24*, 167-172.
- Kindl, H.; Fatty Acid Degradation in Plant Peroxisomes: Function and Biosynthesis of the Enzymes Involved; *Biochimie*, **1993**, *75*, 225-230.
- King, D.L.; Klein, B.P.; Effect of Flavonoids and Related Compounds on Soybean Lipoxxygenase-1 Activity; *J. Food Sci.*, **1987**, *52*, 220-221.
- Kirsch, T.; Loffler, H.G., Kindl, H.; Plant Acyl-CoA Oxidase. Purification, Characterization, and Monomeric Apoprotein; *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 8570-8575.
- Klein, J.; Ziehr, H.; Immobilization of Microbial Cells by Absorption; *J. Biotechnol.*, **1990**, *16*, 1-15.
- Knippers, R.; *Molekulare Genetik*; 6., neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- Kobayashi, Y.; Matsumio, M.; First Total Synthesis of Grahamimycin A; *J. Org. Chem.*; **2000**, *65*, 7221-7224.
- Kock, J.L.F.; Jansen van Vuuren, D.; Botha, A.; van Dyk, M.S.; Coetzee, D.J.; Botes, P.J.; Shaw, N.; Friend, J.; Ratledge, C.; Roberts, A.D.; Nigam, S.; The Production of Biologically Active 3-Hydroxy-5,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid (3-HETE) and Linoleic Acid Metabolites by *Dipodascopsis*; *System. Appl. Microbiol.*, **1997**, *20*, 39-49.
- Kock, J.L.F.; Venter, P.; Linke, D.; Schewe, T.; Nigam, S.; Biological Dynamics and Distribution of 3-Hydroxy Fatty Acids in the Yeast *Dipodascopsis uninucleata* as Investigated by Immunofluorescence Microscopy. Evidence for a Putative Regulatory Role in the Sexual Reproductive Cycle; *FEBS Letters*, **1998**, *427*, 345-348.
- Koda, Y.; The Role of Jasmonic Acid and Related Compounds in the Regulation of Plant Development; *Int. Rev. Cytol.*, **1992**, *135*, 155-199.
- Koeduka, T.; Matsui, K.; Akakabe, Y.; Kajiwara, T.; Molecular Characterization of Fatty Acid α -Hydroperoxide-Forming Enzyme (α -Oxygenase) in Rice Plants; *Biochem. Soc. Trans.*, **2000**, *28*, 765-768.

- König, T.; Anwendung der Aromastoffanalytik zur Qualitätskontrolle von Lebensmitteln, *Dissertationsschrift*, Universität Würzburg, **1998**.
- König, W.A.; Lutz, S.; Wenz, G.; Modifizierte Cyclodextrine - Neue, hochemantio-selektive Trennphasen für die Gaschromatographie; *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 989-990.
- Kohno, M.; Enatsu, M.; Kugimiya, W.; Cloning of Genomic DNA of *Rhizopus niveus* Lipase and Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *Biosci. Bio technol. Biochem.*, **1998**, *62*, 2425-2427.
- Komatsubara, S.; Amino Acids: Genetically Engineered *Serratia marcescens*; In: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications* (Hrsg.: Murooka, Y.; Imanaka, T.), Marcel Dekker, New York, **1994**, 467-484.
- Koritala, S.; Hosie, L.; Hesseltine, C.W.; Bagby, M.O.; Microbial Conversion of Oleic Acid to 10-Hydroxystearic Acid; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; **1989**, *32*, 299-304.
- Koritala, S.; Bagby, M.O.; Microbial Conversion of Linolenic Acids to Unsaturated Fatty Acids; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1992**, *69*, 575-578
- Krämer, R.; Genetic and Physiological Approaches for the Production of Amino Acids; *J. Biotechnol.*, **1996**, *45*, 1-21.
- Krammer, G., Bernreuther, A.; Schreier, P.; Multidimensionale Gas-Chromatographie; *GIT Fachz. Lab.*, **1990**, *3*, 306-312.
- Krings, U.; Abraham, B.; Berger, R.G.; Plant Impact Volatiles from Higher Fungi – A Biotechnological Perspective; *Perf. Flavor*, **1995**, *20*, 79-86.
- Krings, U.; Berger, R.G.; Biotechnological Production of Flavors and Fragrances; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, *49*, 1-8.
- Kriwacki, R.W.; Pitner, T.P.; Current Aspects of Practical Two-Dimensional (2D) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Applications to Structure Elucidation; *Pharm. Res.*, **1989**, *6*, 531-554.
- Kühn, H.; Holzhütter, H.G.; Schewe, T.; Hiebsch, C.; Rapoport, S.M.; The Mechanism of Inactivation of Lipxygenases by Acetylenic Fatty Acids; *Eur. J. Biochem.*, **1984**, *139*, 577-583.
- Kühn, H.; Sprecher, H.; Brash, A.R.; On Singular or Dual Position Specificity of Lipxygenases; *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 16300-16305.

- Kühn, H.; Eggert, L.; Zabolotsky, O.A.; Myagkova, G.I.; Schewe, T.; Keto Fatty Acids Not Containing Doubly Allylic Methylenes are Lipoxygenase Substrates; *Biochemistry*, **1991**, *30*, 10269-10273.
- Kunau, W.H.; Dommès, P.; Degradation of Unsaturated Fatty Acids. Identification of Intermediates in the Degradation of *cis*-4-Decenoyl-CoA by Extracts of Beef Liver Mitochondria; *Eur. J. Biochem.*, **1978**, *91*, 533-544.
- Kunau, W.H.; Bühne, S.; De la Garza, M.; Kionka, C.; Mateblowski, M.; Schultzborchard, U.; Thieringer, R.; Comparative Enzymology of β -Oxidation; *Biochem. Soc. Trans.*, **1988**, *16*, 418-420.
- Kunau, W.H.; Dommès, V.; Schulz, H.; β -Oxidation of Fatty Acids in Mitochondria, Peroxisomes, and Bacteria: A Century of Continued Progress; *Prog. Lipid Res.*, **1995**, *34*, 267-342.
- Kuo, T.M.; Manthey, L.K.; Hou, C.T.; Fatty Acid Bioconversion by *Pseudomonas aeruginosa* PR3; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1998**, *75*, 875-879.
- Lampe, A.S.; van der Reijden, T.J.K.; Evaluation of Commercial Test Systems for the Identification of Nonfermenters; *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **1984**, *3*, 301-305.
- Lane, D.J.; 16S/23S rRNA Sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Hrsg.: Stackebrand, E.; Goodfellow, M.), Wiley Chichester, New York, **1991**, 115-175.
- Langner, A.; Giessler, A.J.; Bekemeier, H.; Vergleich der Wirksamkeit von Lipoxygenaseinhibitoren an Thrombozyten- und Leukozytenlipoxygenase von Ratten; *Pharmazie*, **1987**, *42*, 351.
- Lasch, J.; *Enzymkinetik. Eine Einführung für Biochemiker, Mediziner, Biologen, Chemiker und Pharmazeuten*; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1987**.
- Laties, G.G.; Hoelle, C.; The α -Oxidation of Long-Chain Fatty Acids as a Possible Component of the Basal Respiration of Potato Slices; *Phytochem.*, **1967**, *6*, 49-57.
- Lau, S.M.; Brantley, R.K.; Thorpe, C.; The Reductive Half-Reaction in Acyl-CoA-Dehydrogenase from Pig Kidney: Studies with Thiooctanoyl-CoA and Oxooctanoyl-CoA Analogues; *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5089-5095.
- Lazarow, P.B.; De Duve, C.; A Fatty Acyl-CoA Oxidizing System in Rat Liver Peroxisomes. Enhancement by Clofibrate, a Hypolipidemic Drug; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1976**, *73*, 2043-2046.

- Lazarow, P.B.; Different Chain Length Specificities of Peroxisomal and Mitochondrial Enoyl-CoA Hydratases; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1981**, *206*, 342-345.
- Lazarus, M.; α -Oxidase, Glykolatoxidase und Lipase - Biokatalysatoren zur Darstellung optisch aktiver α -Hydroxysäuren, *Dissertationsschrift*, Universität Würzburg, **1998**.
- Lee, J.B.; Downie, I.M.; Sugar Esters-IV: The Preparation of Chloroesters under Essentially-Neutral Conditions; *Tetrahedron*, **1967**, *23*, 359-363.
- Lee, N.A.; Clark, D.P.; A Natural Isolate of *Pseudomonasmaltophilia* which Degrades Aromatic Sulfonic Acids; *FEMSMicrobiol.Lett.*, **1993**, *107*, 151-155.
- Leighton, F., Bergseth, S.; Rortveit, T.; Christiansen, E.N.; Bremer, J.; Free Acetate Production by Rat Hepatocytes During Peroxisomal Fatty Acid and Dicarboxylic Acid Oxidation; *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 10347-10350.
- Li, J.X.; Schulz, H.; 4-Bromo-2-octenoic Acid Specifically Inactivates 3-Ketoacyl-CoA Thiolase and thereby Fatty Acid Oxidation in Rat Liver Mitochondria; *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5995-6000.
- Li, J.; Smeland, T.E.; Schulz, H.; D-3-Hydroxyacyl Coenzyme A Dehydrarase from Rat Liver Peroxisomes. Purification and Characterization of a Novel Enzyme Necessary for the Epimerization of 3-Hydroxyacyl-CoA Thioesters; *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 13629-13634.
- Liang, J.F.; Li, Y.T.; Yang, V.C.; Biomedical Application of Immobilized Enzymes; *J. Pharm. Sci.*, **2000**, *89*, 979-990.
- Liang, X.; Thorpe, C.; Schulz, H.; 2,4-Dienoyl-CoA Reductase from *Escherichia coli* is a Novel Iron-Sulfur Flavoprotein that Functions in Fatty Acid β -Oxidation; *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, *380*, 373-379.
- Liese, A., Filho, M.V.; Production of Fine Chemicals using Biocatalysis; *Curr. Opinion Chem. Biol.*, **1999**, *10*, 595-603.
- Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.; *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- Lim, M.H.; Lee, Y.J.; Goh, Y. M.; Nam, W.; Kim, C.; Hydroxylation of Aliphatic Hydrocarbons with *m*-Chloroperbenzoic Acid Catalyted by Electron-Deficient Iron (III) Porphyrin Complexes; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999**, *72*, 707-713.

- Luo, M.J.; He, X.Y., Sprecher, H.; Schulz, H.; Purification and Characterization of the Trifunctional β -Oxidation Complex from Pig Heart Mitochondria; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, *304*, 266-271.
- Luo, M.J.; Smeland, T.E.; Shoukry, K.; Schulz, H.; $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -Dienoyl-CoA-Isomerase from Rat Liver Mitochondria. Purification and Characterization of a New Enzyme Involved in the β -Oxidation of Unsaturated Fatty Acids; *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 2384-2388.
- Luzzio, F.A.; Guziec, F.S.; Recent Applications of Oxichromiumamine Complexes as Oxidants in Organic Synthesis. A Review; *Org. Prep. Proc. Int.* **1988**, *20*, 533-584.
- Ma, P.; Martin, V.S.; Masamune, S.; Sharpless, K.B.; Viti, S.B.; Synthesis of Saccharides and Related Polyhydroxylated Natural Products. 2. Simple Deoxaalditols; *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1378-1380.
- Marcus, A.; Vannesland, B.; Stern, J.R.; Enzymic Transfer of Hydrogen. VII. Reaction Catalyzed by β -Hydroxybutyryl Dehydrogenase; *J. Biol. Chem.*, **1958**, *233*, 722-726.
- Markovetz, A.J.; Stumpf, P.K.; Hammarström, S.; Fat Metabolism in Higher Plants. LIII. Characterization of the Product of the Peanut α -Oxidation System; *Lipids*, **1972**, *7*, 159-164.
- Martin, R.O.; Stumpf, P.K.; Fat Metabolism in Higher Plants. XII. α -Oxidation of Long-Chain Fatty Acids; *J. Biol. Chem.*, **1959**, *234*, 2548-2554.
- Masterson, C.; Wood, C.; Mitochondrial β -Oxidation of Fatty Acids in Higher Plants; *Physiol.Plant.*, **2000**, *109*, 217-224.
- Masui, H.; Kondo, T.; Kojima, M.; An Antifungal Compound, 9,12,13-Trihydroxy-(E)-10-Octadecenoic Acid, from *Colocasia antiquorum* Inoculated with *Ceratocystis fimbriata*; *Phytochem.*, **1989**, *28*, 2613-2615.
- Matsunaga, I.; Kusunose, E.; Yano, I.; Ichihara, K.; Separation and Partial Characterization of Soluble Fatty Acid α -Hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *201*, 1554-1560.
- Matsunaga, I.; Yamada, M.; Kusunose, E.; Nishiuchi, Y.; Yano, I.; Ichihara, K.; Direct Involvement of Hydrogen Peroxide in Bacterial Acid α -Hydroxylation of Fatty Acid; *FEBS Lett.*, **1996**, *386*, 252-254.

- Matsunaga, I.; Yokotani, N.; Gotoh, O.; Kusunose, E.; Yamada, M.; Ichihara, K.; Molecular Cloning and Expression of Fatty Acid α -Hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*; *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 23592-23596.
- Matsunaga, I.; Yamada, M.; Kusunose, E.; Miki, T.; Ichihara, K.; Further Characterization of Hydrogen Peroxide-Dependent Fatty Acid α -Hydroxylase from *Sphingomonas paucimobilis*; *J. Biochem.*, **1998a**, *124*, 105-110.
- Matsunaga, I.; Sumimoto, T.; Kusunose, E.; Ichihara, K.; Phytanic Acid α -Hydroxylation by Bacterial Cytochrome P450; *Lipids*, **1998b**, *33*, 1213-1216.
- Matsunaga, I.; Sumimoto, T.; Ueda, A.; Kusunose, E.; Ichihara, K.; Fatty Acid-Specific, Regiospecific and Stereospecific Hydroxylation by Cytochrome P450 (CYP152B1) from *Sphingomonas paucimobilis*: Substrate Structure Required for α -Hydroxylation; *Lipids*, **2000**, *35*, 365-371.
- Matson, R.S.; Hare, R.S.; Fulco, A.J.; Characteristics of a Cytochrome P-450-Dependent Fatty Acid ω -2 Hydroxylase from *Bacillus megaterium*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, *487*, 487-494.
- Maxam, A.M.; Gilbert, W.; A New Method for Sequencing DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 560-564.
- Maxam, A.M.; Gilbert, W.; Sequencing End-Labelled DNA with Base-Specific Cleavages; *Meth. Enzymol.*, **1980**, *65*, 499-560.
- Mc Donalds, W.C.; Erickson, M.D.; Abraham, B.M.; Robbat, A., Jr.; Developments and Applications of Field Mass Spectrometers; *Environ. Sci. Technol.*, **1994**, *28*, 336A-343A.
- Mc Garry, J.D.; Foster, D.W.; Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production; *Ann. Rev. Biochem.*; **1980**, *49*, 395-420.
- Mc Garry, J.D.; Leatherman, G.F.; Foster, D.W.; Carnitine Palmitoyltransferase I. The Site of Inhibition of Hepatic Fatty Acid Oxidation by Malonyl-CoA; *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 4128-4136.
- Mc Luckey, S.A.; Wells, J.M.; Mass Analysis at the Advent of the 21st Century; *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 571-606.
- Merrit, C., Jr.; Robertson, D.H.; Techniques of Analysis of Flavors: Gas Chromatography and Mass Spectrometry; *Dev. Food Sci.*, **1982**, *3A*, 49-78.
- Miyazawa, S.; Furuta, S.; Osumi, T.; Hashimoto, T.; Ui, N.; Properties of Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA Thiolase from Rat Liver; *J. Biochem.*, **1981**, *90*, 511-519.

- Michaelis, L.; Menten, M.L.; Die Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Zeitschrift*, **1913**, 49, 333-369.
- Middleton, B.; Oxoacyl-Coenzyme A Thiolases of Animal Tissues; *Biochem. J.*, **1973**, 132, 717-730.
- Miersch, O.; Günther, T.; Fritsche, W.; Sembdner, G.; Jasmonates from Different Fungal Species; *Nat. Prod. Lett.*, **1993**, 2, 293-299.
- Millar, J.G.; Underhill, E.W.; Synthesis of Chiral Bis-Homoallylic Epoxides. A New Class of Lepidopteran Sex Attractants; *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4726-4728.
- Mittendorf, V.; Robertson, E.J.; Leech, R.M.; Krüger, N.; Steinbüchel, A.; Poirier, Y.; Synthesis of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using Intermediates of Peroxisomal Fatty Acid β -Oxidation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 13397-13402.
- 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.
- Miura, Y.; Fulco, A.J.; ω -1, ω -2 and ω -3 Hydroxylation of Long-Chain Fatty Acids, Amides and Alcohols by a Soluble Enzyme System from *Bacillus megaterium*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, 388, 305-317.
- Miura, Y.; Kondo, K.; Saito, T.; Shimada, H.; Fraser, P.D.; Misawa, N.; Production of Carotenoids Lycopene, β -Carotene and Astaxanthin in the Food Yeast *Candida utilis*; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 1226-1229.
- Mize, C.E.; Avigan, J.; Steinberg, D.; Pittman, R.C.; Fales, H.M.; Milne, G.W.; A Major Pathway for the Mammalian Oxidative Degradation of Phytanic Acid; *Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, 176, 720-739.
- Morbach, S.; Sahn, H.; Eggeling, L.; Use of Feedback-Resistant Threonine Dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to Increase Carbon Flux Towards L-Isoleucine; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**, 61, 4315-4320.
- Mori, H.; Iida, A.; Fuijo, T.; Teshiba, S.; A Novel Process of Inosine 5'-Monophosphate Production Using Overexpressed Guanosine/Inosine Kinase; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, 48, 693-398.
- Mori, K.; Takigawa, T.; Matsou, T.; Synthesis of Optically Active Forms of Ipsdienol and Ipsenol. The Pheromone Components of IPS Bark Beetles; *Tetrahedron*, **1979**, 35, 933-940.

- Mori, K.; Nagano, E.; Pheromone Synthesis; CXXVII. A New Synthesis of the Enantiomers of Grandisol and Lineatin; *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, *4*, 341-344.
- Morris, L.J.; Hitchcock, C.; The Stereochemistry of α -Oxidation of Fatty Acids in Plants. The Stereochemistry of Biosynthesis of Long-Chain 2-HydroxyAcids; *Eur. J. Biochem.*, **1968**, *4*, 146-148.
- Müller, K.D.; Husmann, H.; Nalik, H.P.; Schomburg, G.; Trans-Esterification of Fatty Acids from Microorganisms and Human Blood Serum by Trimethylsulfonium Hydroxide (TMSH) for GC Analysis; *Chromatographia*, **1990**, *30*, 245-248.
- Murray, R.G.E.; Doetsch, R.N.; Robinow, C.F.; Determinative and Cytological Light Microscopy. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Hrsg.: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R.), Am. Soc. Microbiol., Washington, **1994**, 21-41.
- Mutschler, E.; *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; 5. völlig neu bearbeitete Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1986**.
- Nadkarni, S.R.; Patel, M.V.; Chatterjee, S.; Vijayakamur, E.K.S.; Desikan, K.R.; Blumbach, J.; Ganguli, B.N.; Balhimycin, a New Glycopeptide Antibiotic Produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022: Taxonomy, Production, Isolation and Biological Activity; *J. Antibiot.*, **1994**, *47*, 334-341.
- Nakanishi, K.; Berova, N.; The Exciton Chirality Method; In: *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Hrsg.: Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R.), VCH Publishers, New York, **1994**, 361-398.
- Nakata, T.; Schmid, G.; Vranesic, B.; Okigawa, M.; Smith-Palmer, T.; Kishi, Y.; A Total Synthesis of Lasalocid A; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2933-2935.
- Nakaya, T.; Tomomoto, T.; Imoto, M.; Syntheses and Reactions of 9-Anthryldiazomethane and α -Naphthyldiazomethane; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1967**, *40*, 691-692
- Nakayama, K.; Ushijima, M.; D-Malic Acid Production from Maleic Acid Using Microorganism: Screening of Microorganism; *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*, 271-282.
- Navaratnam, S.; Feiters, M.C.; Al-Hakim, M.; Allen, J.C.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J.F.G.; Iron-Environment in Soybean Lipoxygenase-1; *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, *956*, 70-76.
- Nelson, D.R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J.J.; Feyereisen, R.; Waxman, D.J.; Waterman, M.R.; Gotoh, O.; Coon, M.J.; Estabrook, R.W.; Gunsalus, I.C.;

- Nebert, D.W.; P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature; *Pharmacogenetics*, **1996**, *6*, 1-42.
- Nesme, X.; Vaneechouette, M.; Orso, S.; Hoste, B.; Swings, J.; Diversity and Genetics Relatedness within Genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* Using Restriction Endonuclease Site Differences of PCR-Amplified 16S rRNA Gene; *System. Appl. Microbiol.*, *1995*, *18*, 127-135.
- Newcomb, E.H.; Stumpf, P.K.; Fatty Acid Synthesis and Oxidation in Peanut Cotyledons; In: *Phosphorus Metabolism* (Hrsg.: Mc Elroy, W.D.; Glass, B.), The John Hopkins Press, Baltimore, **1952**, 291-300.
- Niessen, W.M.A.; LC-MS and CE-MS Strategies in Impurity Profiling; *Chimia*, **1999a**, *53*, 478-483.
- Niessen, W.M.A.; State-of-the-Art in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; *J. Chromatogr. A*, **1999b**, *856*, 179-197.
- Nigam, S.; Deva, R.; Ciccoli, R.; Kock, L.; Schwewe, T.; Arachidonic Acid Metabolism and Formation of Oxylipins in *Candida albicans*. Pharmacological Implications; International Symposium on Non-Mammalian Eicosanoids and Bioactive Lipids, Abstract Book, **2000**, 29.
- Nimura, N.; Kinoshita, T.; Fluorescent Labeling of Fatty Acids with 9-Anthryldiazomethane (ADAM) for High Performance Liquid Chromatography; *Anal. Lett.*, **1980**, *13*, 191-202.
- Noda, A.; Aoyagi, S.; Machinaga, N.; Kibayashi, C.; Total Synthesis of (-)-Vermiculine; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 8237-8240.
- Nomura, T.; Ogata, H.; Distribution of Prostaglandins in the Animal Kingdom; *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *431*, 127-131.
- Norman, D.J.; Chase, A.R.; Hodge, N.C.; Stall, R.E., Differentiation of Three Species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using Cellular Fatty Acid Analyses; *Europ. J. Plant Physiol.*, **1997**, *103*, 687-693.
- Nüesch, J.; Physiologische und biochemische Aspekte industrieller Fermentationsprozesse; *Path. Microbiol.*, **1969**, *34*, 158-194.
- Nuhn, P.; Büge, A.; Köhler, T.; Lettau, H.; Schneider, R.; Trends bei der Entwicklung von Lipoxygenase-Hemmern; *Pharmazie*, **1991**, *46*, 81-88.

- Nunn, W.D.; Two-Carbon Compounds and Fatty Acids as Carbon Sources. In: *Escherichia coli / Salmonella typhimurium* (Hrsg.: Neidhardt, F.C.) Am. Soc. Microbiol., Washington, **1987**, 285-301.
- Okazaki, K.; Tan, H.; Fukui, S.; Kubota, I.; Kamriyo, T.; Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Oxidase Multigene Family of the Yeast *Candida tropicalis*: Nucleotide Sequence of a Third Gene and its Protein Product; *Gene*, **1987**, 58, 37-44.
- O'Brian, W.J.; Frerman, F.E.; Evidence for a Complex of Three β -Oxidation Enzymes in *Escherichiacoli*; *J. Bacteriol.*, **1977**, 132, 532-540.
- Olive, D.M.; Bean, P.; Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms; *J. Clin. Microbiol.*, **1999**, 37, 1661-1669.
- Oliver, C.F.; Modi, S.; Primrose, W.U.; Lian, L.Y.; Roberts, G.C.K.; Engineering the Substrate Specificity of *Bacillus megaterium* Cytochrome P-450 BM3: Hydroxylation of Alkyl Trimethylammonium Compounds; *Biochem. J.*, **1997**, 327, 537-544.
- Oliw, E.H.; Oxygenation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cytochrome P450 Monooxygenases; *Prog. Lipid Res.*, **1994**, 33, 329-354.
- Oliw, E.H.; Bylund, J.; Herman, C.; Bisallylic Hydroxylation and Epoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cytochrome P450; *Lipids*, **1996**, 31, 1003-1021.
- Omura, T.; Ishimura, Y.; Fujii-Kuriyama, Y. (Hrsg.), Cytochrom P-450; 2. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, **1993**.
- Omura, T.; Forty Years of Cytochrome P450; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 266, 690-698.
- Onken, J.; Berger, R.G.; Der Lichtstredetektor (ELSD) in der Lebensmittelanalytik; *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*; **1998**, 94, 287-292.
- Onken, J.; Rehbock, B.; El-Saharty, Y.S.; Berger, R.G.; Lichtstredetektor (ELSD) - Kopplungen in der Lebensmittel und Bioanalytik; *GIT Spez. Chromatogr.*, **1998**, 18, 84-85.
- Opara, A.E.; Read, G.; The Direct Synthesis of β -Hydroxy Acids by a Modified Reformatskii Reaction; *Chem. Comm.*, **1969**, 12, 679.
- Osumi, T.; Hashimoto, T.; Acyl-CoA Oxidase of Rat Liver: A New Enzyme for Fatty Acid Oxidation; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1978**, 83, 479-485.

- Osumi, T.; Hashimoto, T.; Purification and Properties of Mitochondrial and Peroxisomal 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase from Rat Liver; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1980**, *203*, 372-383.
- Osumi, T.; Hashimoto, T.; Peroxisomal β -Oxidation of Rat Liver. Copurification of Enoyl-CoA Hydratase and 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1979**, *89*, 580-584.
- Osumi, T.; Hashimoto, T.; The Inducible Fatty Acid Oxidation System in Mammalian Peroxisomes; *TIBS*, **1984**, *9*, 317-319.
- Overath, P.; Raufuss, E.M.; The Induction of the Enzymes of Fatty Acid Degradation in *Escherichia coli*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *29*, 28-33.
- Ozasa, H.; Furuta, S.; Miyazawa, S.; Osumi, T.; Hashimoto, T.; Mori, M.; Miura, S.; Tatibana, M.; Biosynthesis of Enzymes of Rat Liver Mitochondrial β -Oxidation; *Eur. J. Biochem.*, **1984**, *144*, 453-458.
- Palosaari, P.M.; Kilponen, J.M.; Sormunen, R.T.; Hassinen, I.E.; Hiltunen, J.K.; Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerases. Characterization of the Mitochondrial Isoenzymes in the Rat; *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 3347-3353.
- Palleroni, N.J.; Bradbury, J.F.; *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonasmaltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983; *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1993**, *43*, 606-609.
- Palmer, T.; *Understanding Enzymes*; Ellis Horwood Ltd., Chichester, **1981**.
- Pande, S.V.; Parvin, R.; Characterization of Carnitine Acylcarnitine Translocase System of Heart Mitochondria; *J. Biol. Chem.*, **1976**, *251*, 6683-6691.
- Pang, Z.; Sterner, O.; Cibacic Acid, a New Fatty Acid Derivative Formed Enzymatically in Damaged Fruit Bodies of *Cantharelluscibarius* (Cantherelle); *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1233-1235.
- Paige, L.A.; Zheng, G.Q.; deFrees, S.A.; Cassady, J.M.; Geahlen, R.L.; Metabolic Activation of 2-Substituted Derivatives of Myristic Acid to Form Potent Inhibitors of Myristoyl CoA:Protein N-Myristoyltransferase; *Biochemistry*, **1990**, *29*, 10566-10573.
- Patnaik, R.; Spitzer, R.G.; Liao, J.C.; Pathway Engineering for Production of Aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of Stoichiometric Analysis by Independent Modulation of AroG, TktA and Pps Activities; *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *46*, 361-370.

- Paul, E.A.; Soil Biology and Biochemistry. In: *Handbook of Soil Science* (Hrsg.: Sumner, M.E.) CRC Press, Boca Raton, Florida, **2000**, C1-C10.
- Pawar, S.; Schulz, H.; The Structure of the Multienzyme Complex of Fatty Acid Oxidation from *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 3894-3899.
- Peladan, F.; Monteil, H.; Identification of *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Alcaligenes* with the API 20 NE System; *Path. Biol.*, **1988**, 36, 187-192.
- Perkins, J.B.; Sloma, A.; Hermann, T.; Theriault, K.; Zachgo, E.; Erdenberger, T.; Hannett, N.; Chatterjee, P.; Williams, W.V.; Rufo, G.A.; Hatch, R.; Pero, J.; Genetic Engineering of *Bacillus subtilis* for the Commercial Production of Riboflavin; *J. Ind. Biotechnol.*, **1999**, 22, 8-18.
- Phale, P.S.; Mahajan, M.C.; Vaidyanathan, C.S.; A Pathway for Biodegradation of 1-Naphthoic Acid by *Pseudomonas maltophilia* CSU89; *Arch. Microbiol.*, **1995**, 163, 42-47.
- Piancatelli, G.; Scettri, A.; D'Auria, M.; Pyridinium Chlorochromate: A Versatile Oxidant in Organic Synthesis; *Synthesis* **1982**, 4, 245-258.
- Pickenhagen, W.; Brönnner-Schindler, H.; Enantioselective Synthesis of (+)- and (-)-*cis*-2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathiane and their Olfactive Properties; *Helv. Chim. Acta* **1987**, 67, 947-952.
- Pietzsch, W. Schwabe, K.H.; Melchior, K., Gruppe, R.; Lipoxigenase-inhibitory Azomethines and Benzylhydrazones. II Effect of Phenylsubstituted Azomethines on the Antigen-induced Contractions of Guinea-Pig Lung Parenchymal Strips and Jejunum Segments; *Agent Actions* **1991**, 32, 142-143.
- Pistorius, E.K.; Axelrod, B.; Iron, an Essential Component of Lipoxigenase; *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 3181-3186.
- Pohl, C.H.; Botha, A.; Kock, J.L.F.; Coetzee, D.J.; Botes, P.J.; Schewe, T.; Nigam, S.; Oxylipin Formation in Fungi: Biotransformation of Arachidonic Acid to 3-Hydroxy-5,8-tetradecadienoic Acid by *Mucor genevensis*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 253, 703-706.
- Poppe, L.; Novak, L.; *Selective Biocatalysis. A Synthetic Approach*; VCH-Verlag, Weinheim, **1994**.
- Pollack, F.C.; Berger, R.G.; Geosmin and Related Volatiles in Bioreactor-Cultures *Streptomyces citreus* CBS 109, 60; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, 62, 1295-1299.

- Porter, T.D.; Coon, M.J.; Cytochrome P450. Multiplicity of Isoforms, Substrates and Regulation Mechanisms; *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 13469-13472.
- Powell, P.J.; Thorpe, C.; 2-Octynoyl Coenzyme A is a Mechanism-Based Inhibitor of Pig Kidney Medium-Chain Acyl Coenzyme A Dehydrogenase: Isolation of the Target Peptide; *Biochemistry*, **1988**, *27*, 8022-8028.
- Pramanik, A.; Pawar, S.; Antonian, E., Schulz, H.; Five Different Enzymatic Activities are Associated with the Multienzyme Complex of Fatty Acid Oxidation from *Escherichiacoli*; *J. Bacteriol.*, **1979**, *137*, 469-473.
- Rao, R.; Krishna, P.R.; Yadov, J.S.; Stereoselective Synthesis of (9Z,15Z)-(11S,12S,13S)-11-Hydroxy-12,13-Epoxy-Octadecadienoic Acid: A Constituent of Rice Plant Infected with Rice Blast Disease; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1669-1670.
- Reddy, J.K.; Mannaerts, G.P.; Peroxisomal Lipid Metabolism; *Ann. Rev. Nutr.*, **1994**, *14*, 343-370.
- Rehbock, B.; Gansser, D.; Berger, R.G.; Analysis of Oxylipins by High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection and Particle Beam-Mass Spectrometry; *Lipids*, **1997**, *32*, 1003-1010.
- Reiser, S.E.; Mitsky, T.A.; Gruys, K.J.; Characterization and Cloning of an (*R*)-specific *trans*-2,3-Enoylacyl-CoA-Hydratase from *Rhodospirillum rubrum* and Use of this Enzyme for PHA Production in *Escherichia coli*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2000**, *53*, 209-218.
- Rele, D.; Zhao, N.; Nakanishi, K.; Berova, N.; Acyclic 1,2/1,3-Mixed Pentols. Synthesis and General Trends in Bichromophoric Exciton Coupled Circular Dichroism Spectra; *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 2759-2776.
- Ren, Q.; Sierro, N.; Witholt, B.; Kessler, B.; FabG, an NADPH-dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonasaeruginosa*, Provides Precursors for Medium-chain-length Poly-3-Hydroxyalkanoates Biosynthesis in *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, 2978-2981.
- Rickman, B.H.; Matile, S.; Nakanishi, K.; Berova, N.; A Two-Step Chemical / Chiroptical Method for Determining Absolute Configurations of α -Hydroxy Acids; *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 5041-5064.
- Roberts, S.M.; Preparative Biotransformations: The Employment of Enzymes and Whole Cells in synthetic Organic Chemistry; *J. Chem Soc. Perkin. Trans.*, **1998**, *1*, 157-169.

- Roberts, S.M.; Wiggins, K.; Casy, G.; *Preparative Biotransformations. Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, Wiley and Sons, Chichester, **1992**.
- Rock, C.O.; Jackowski, S.; Pathways for the Incorporation of Fatty Acids into Phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 12720-12724,
- Römpf – Lexikon der Chemie; Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- Rosenberg, M.; Mikova, H.; Kristofikova, L.; Production of L-Tartaric Acid by Immobilized Bacterial Cells of *Nocardia tartaricans*; *Biotechnol. Lett.*, **1999**, *21*, 491-495.
- Rosenblum, B.B.; Lee, L.G.; Spurgeon, S.L.; Khan, S.H.; Menchen, S.M.; Heiner, C.R.; Chen, S.M.; New Dye-Labeled Terminators for Improved DNA Sequencing Patterns. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4500-4504.
- Ross, A.; Schügerl, K.; Tetracycline Production by *Streptomyces aureofaciens*: The Time Lag of Production; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1988**, *29*, 174-180.
- Rotenberg, S.A.; Grandizio, A.M.; Selzer, A.t.; Clapp, C.H.; Inactivation of Soybean Lipoxygenase-1 by 12-Iodo-cis-9-octadecenoic Acid; *Biochemistry*, **1988**, *27*, 8813-8818.
- Roth, M.; Gutsche, B.; Herderich, M.; Humpf, H.U.; Schreier, P.; Dioxygenation of Long-Chain Alkadien(trien)yl Phenols by Soybean Lipoxygenase; *J. Agric. Food. Chem.*, **1998**, *46*, 2951-2956.
- Ruettinger, R.T.; Fulco, A.J.; Epoxidation of Unsaturated Fatty Acids by a Soluble Cytochrome P-450-Dependent System from *Bacillus megaterium*; *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 5728-5734.
- Saffert, A.; Hartmann-Schreier, J.; Schön, A.; Schreier, P.; A Dual Function α -Dioxygenase-Peroxidase and NAD⁺ Oxidoreductase Active Enzyme from Germinating Pea Rationalizing α -Oxidation of Fatty Acids in Plants; *Plant Physiol.*, **2000**, *123*, 1545-1551.
- Salim-Hanna, M.; Campa, A.; Cilento, G.; The α -Oxidase System on Young Pea Leaves (*Pisum sativum*) as Generator of Electronically Excited States. Excitation in the Dark under Natural Conditions; *Photochem. Photobiol.*, **1987**, *45*, 849-854.
- Salim-Hanna, M.; Campa, A.; Cilento, G.; α -Oxidation of α -Hydroxy Fatty Acids in Rat Brain. Possible Involvement of an α -Peroxy Lactone; *Lipids*, **1989**, *24*, 750-752.

- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.; DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 5463-5467.
- Sanz, A.; Moreno, J.I.; Castresana, C.; PIOX, a New Pathogen-Induced Oxygenase with Homology to Animal Cyclooxygenase; *Plant Cell*, **1998**, *10*, 1523-1537.
- Sarris, J.; Latrasse, A.; Production of Odoriferous gamma-Lactones by *Fusarium poae*; *Agric. Biol. Chem.*, **1985**, *49*, 3227-3230.
- Scheller, G.; Jäger, E.; Hoffmann, B.; Schmitt, M.; Schreier, P.; Soybean Lipoxygenase: Substrate Structure and Product Selectivity; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 1768-1774.
- Schepers, L.; Casteels, M.; Verheyden, K.; Parmentier, G.; Asselberghs, S.; Eyssen, H.J.; Mannaerts, G.P.; Subcellular Distribution and Characteristics of Trihydroxycoprostanoyl-CoA Synthetase in Rat Liver; *Biochem. J.*, **1989**, *257*, 221-229.
- Schewe, T.; Rapport, S.M.; Kühn, H.; Enzymology and Physiology of Reticulocyte Lipoxygenase: Comparison with Other Lipoxygenases; *Adv. Enzymol.*, **1986**, *58*, 191-272.
- Schildknecht, H.; Koob, K.; Myrmicacin, das erste Insekten Herbizid; *Angew. Chem.*, **1971**, *83*, 110.
- Shirane, N.; Sui, Z.; Peterson, J.A.; Ortiz de Montellano, P.R.; Cytochrome P450_{BM-3} (CYP102): Regiospecificity of Oxidation of ω -Unsaturated Fatty Acids and Mechanism-Based Inactivation; *Biochemistry*, **1993**, *32*, 13732-13741.
- Schlegel, H.G.; *Allgemeine Mikrobiologie*; 7. überarb. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, **1992**.
- Schmitz, F.J.; Berning, T.; Willers, R.; Reinhart, H.P.; Comparison of the Micronaut System with the API Test and with the Agar Diffusion Method in the Identification and Susceptibility Testing of Various Enterobacteriaceae and Non-Fermenting Bacteria; *Klin. Labor*, **1996**, *42*, 609-619.
- Schneider, C.; Schreier, P.; Humpf, H.U.; Exciton-Coupled Circular Dichroism (ECCD) in Acyclic Hydroxylated Dienes: A Sensitive Method for the Direct Stereochemical Assignment of Lipoxygenase Products; *Chirality*, **1997a**, *9*, 563-567.
- Schneider, C.; Schreier, P.; Herderich, M.; Analysis of Lipoxygenase-Derived Fatty Acid Hydroperoxides by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry; *Lipids*, **1997b**, *32*, 331-336.

- Schneider, C.; Amberg, A.; Feurle, J.; Roß, A.; Roth, M.; Toth, G.; Schreier, P.; 2-[(4'-Hydroxy-3'-methoxy)-phenoxy]-4-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-8-hydroxy-6-oxo-3-oxabicyclo[3.3.0]-7-octene: Unusual Product of the Soybean Lipoxygenase-Catalyzed Oxygenation of Curcumin; *J. Mol. Catal. B.: Enzym*, **1998**, *4*, 219-227.
- Schomburg, G.; Two-Dimensional Gas-Chromatography: Principles, Instrumentation, Methods; *J. Chromatogr. A*, **1995**, *703*, 309-325.
- Schreier, P.; Bernreuther, A.; Huffer, M.; *Analysis of Chiral Organic Molecules. Methodology and Applications*; Walter de Gruyter, Berlin, **1995**.
- Schreier, P.; Enzymes and Flavour Biotechnology. In: *Biotechnology of Aroma Compounds* (Hrsg.: Berger, R.G.), Springer-Verlag, Berlin, **1997**, 51-72.
- Schröder, F.; Induzierte chemische Abwehr bei Pflanzen; *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 1271-1274.
- Schulz, H.; Long Chain Enoyl Coenzyme A Hydratase from Pig Heart; *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 2704-2709.
- Schulze, B.; Wubbolts, M.G.; Biocatalysis for Industrial Production of Fine Chemicals; *Curr. Opinion Chem. Biol.*, **1999**, *10*, 609-615.
- Schurig, V.; Resolution of Enantiomers and Isotopic Compositions by Selective Complexation Gas Chromatography on Metal Complexes; *Chromatographia*, **1980**, *13*, 263-270.
- Schurig, V.; Weber, R.; Derivatization-free Enantiomer Separation of Chiral Alcohols and Ketones by High Resolution Complexation Gas Chromatography; *Angew. Chem.*, **1983**, *95*, 797-798.
- Schurig, V.; Gaschromatographische Enantiomerentrennung an metallkomplexfreien Stationärphasen; *Angew. Chem.*, **1984**, *96*, 733-752.
- Schurig, V.; Current Methods for Determination of Enantiomeric Composition. Part 3. Gas Chromatography on Chiral Stationary Phases; *Kontakte*, **1986**, *1*, 3-22.
- Schurig, V.; Enantiomer Analysis by Complexation Gas Chromatography. Scope, Merits and Limitations; *J. Chromatogr.*, **1988**, *441*, 135-153.
- Schurig, V.; Nowotny, H.P.; Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Cyclo-dextrinderivaten; *Angew. Chem.*, **1990**, *102*, 969-986.

- Schwab, W.; Scheller, G.; Gerlach, D.; Schreier, P.; Identification of 3-Hydroxyoctyl- β -D-Glucoside and Absolute Configuration of Free and Bound Octane-1,3-diol in Apple Fruit; *Phytochem.*, **1989**, 28, 157-160.
- Schwartz, D.P.; Rady, A.H.; Castaneda, S.; The Formation of Oxo- and Hydroxy-Fatty Acids in Heated Fats and Oils; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1994**, 71, 441-444.
- Schweizer, E.; Fettsäuresynthesen – Funktionsstrategien eines Multienzyms; *Naturwissenschaften*, **1996**, 83, 347-358.
- Schwerdt, G.; Huth, W.; Turnover and Transformation of Mitochondrial Acetyl-CoA Acetyltransferase into CoA-Modified Forms; *Biochem. J.*; **1993**, 292, 915-919.
- Seebach, D.; Züger, M.F.; Giovannini, F. Sonnleitner, B.; Fiechter, A.; Preparative Microbiological Reduction of β -Oxo Esters with *Thermoanaerobium brockii*; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **1984**, 96, 155-156.
- Seitz, E.W.; Fermentation Production of Pyrazines and Terpenoids for Flavors and Fragrances. In: *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients* (Hrsg.: Gabelman, A.), Wiley, New York, **1994**, 95-134.
- Shine, W.E.; ; Stumpf, P.K.; Fat Metabolism in Higher Plants. Recent Studies on Plant α -Oxidation Systems; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, 162, 147-157.
- Shirley, M.A.; Murphy, R.C.; Metabolism of Leukotriene B₄ in Isolated rat Hepatocytes. Involvement of 2,4-Dienoyl-Coenzyme A Reductase in Leukotriene B₄ Metabolism; *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 16288-16295.
- Shoukry, K.; Schulz, H.; Significance of the Reductase-dependent Pathway for the β -Oxidation of Unsaturated Fatty Acids with Odd-numbered Double Bonds; *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 6892-6899.
- Sides, A.; Robards, K.; Helliwell, S.; Developments in Extraction Techniques and Their Application to Analysis of Volatiles in Food; *Trends Anal. Chem.*, **2000**, 19, 322-329.
- Singh, H.; Poulos, A.; Distinct Long Chain and Very Long Chain Fatty Acid CoA Synthetases in Rat Liver Peroxisomes and Microsomes; *Arch. Biochem. Biophys.*, 1988, 266, 486-495.
- Slessor, K.N.; Kaminski, L.A.; King, G.G.S.; Winston, M.L.; Semiochemicals of the Honeybee Queen Mandibular Glands; *J. Chem. Ecol.*, **1990**, 16, 851-860.

- Smibert, R.M.; Krieg, N.R.; Phenotypic Characterization. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology* (Hrsg.: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R.); Am. Soc. Microbiol., Washington, **1994**, 607-654.
- Smithrud, D.B.; Benkovic, S.J.; The State of Antibody Catalysis; *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1997**, 8, 459-466.
- Snatzke, G.; Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I; *Chem. Unserer Zeit*, **1981**, 15, 78-87.
- Snatzke, G.; Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil II; *Chem. Unserer Zeit*, **1981**, 16, 160-168.
- Socol, C.R.; Pinheiro, L.I.; Krefta, A.A.W.; Microbiol Degradation of Pesticides in Soil: A Bibliographic Review; *Pesticidas*, **1995**, 5, 1-18.
- Spaapen, L.J.M.; Verhagen, J.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J.F.G.; The Effect of Modification of Sulfhydryl Groups in Soybean Lipoxygenase-1; *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 618, 153-162.
- Spencer, R.C.; The Emergence of Epidemic, Multiple-Antibiotic-Resistant *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* and *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*; *J. Hospital Infection*, **1995**, 30, 453-464.
- Stewart, J.D.; A Chemist's Perspective on the Use of Genetically Engineered Microbes as Reagents for Organic Synthesis; *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1997**, 14, 67-143.
- Stoffel, W.; Ceasar, H.; Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, V. Zur β -Oxidation der Mono- und Polyenfettsäuren. Der Mechanismus der enzymatischen Reaktionen an Δ^{2cis} -Enoyl-CoA-Verbindungen; *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1965**, 341, 76-83.
- Stolyhwo, A.; Martin, M.; Guiochon, G.; Analysis of Lipid Classes with the Evaporative Light Scattering Detector; *J. Liquid Chrom.*, **1987**, 10, 1237-1253.
- Strube, R.E.; Ethyl *tert.*-Butyl Malonate. In: *Organic Synthesis Collective Volume 4* (Hrsg.: Dauben, W.G.); Wiley, New York, **1963**, 417-419.
- Stryer, L.; *Biochemie*; 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1996**.
- Stumpf, P.K.; Fatty Acid Metabolism in Plants; In: *Lipid Metabolism* (Hrsg.: Wakil, S.), Academic Press, New York, **1970**, 79-106.

- Su, C.; Brodowsky, I.D.; Oliw, E.H.; Studies on Linoleic Acid ω -Dioxygenase and Hydroperoxide Isomerase of the Fungus *Gaeumannomyces graminis*; *Lipids*, **1995**, *30*, 43-50.
- Su, J.J.; Kafkewitz, D.; Utilization of Toluene and Xylenes by a Nitrate-reducing Strain of *Pseudomonasmaltophilia* under Low Oxygen and Anoxic Conditions; *FEMS Microbiol.Ecol.*, **1994**, *15*, 249-257.
- Swings, J.; de Vos, P.; van den Mooter, M.; de Ley, J.; Transfer of *Pseudomonasmaltophilia* Hugh 1981 to the Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonasmaltophilia* (Hugh 1981) comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1983**, *33*, 409-423.
- Tabor, S.; Richardson, C.C.; A Single Residue in DNA Polymerases of the *Escherichia coli* DNA Polymerase I Family is Critical for Distinguishing between Deoxy- and Dideoxynucleotides; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 6339-6343.
- Tait, B.D.; Dyer, R.D.; Auerbach, B.J.; Bornemeier, D.; Guilds-Zamarka, L.; Oxender, M.; Roth, B.D.; Trivedi, B.K.; Cornicelli, J.A.; Catechol Based Inhibitors of 15-Lipoxygenase; *Bioorg. Med. Chemistry Lett.*, **1996**, *6*, 93-96.
- Tamura, T.; Oki, Y.; Yoshida, A.; Kuriyama, T.; Kawakami, H.; Inoue, H.; Inagaki, K.; Tanaka, H.; Noncompetitive, Reversible Inhibition of Aminoacylase-1 by a Series of L- α -Hydroxyl and L- α -Fluoro Fatty Acids: Ligand Specificity of *Aspergillus oryzae* and Porcine Kidney Enzymes; *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, *379*, 261-266.
- Tamura, Y.; Nishino, M.; Ohmachi, T.; Asada, Y.; N-Carbamoyl-L-Cysteine as an Intermediate in the Bioconversion from, D,L-2-Amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic Acid to Cysteine by *Pseudomonas* sp. ON-4a; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, *62*, 2226-2229.
- Thorpe, C.; Acyl-CoA-Dehydrogenase from Pig Kidney; *Meth. Enzymol.*, **1981**, *71*, 366-374.
- Tischer, W.; Wedekind, F.; Immobilized Enzymes: Methods and Applications; *Top. Curr. Chem.*, **1999**, *200*, 95-126.
- Tomlinson, M.J.; Sasaki, T.A.; Wilkins, C.L.; Applications of Multidimensional-Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared-Mass Spectrometry; *Mass Spectrom. Rev.*, **1996**, *15*, 1-14.
- Toth, G.; Roth, M.; Weckerle, B.; Schreier, P.; Structural Elucidation of Two Novel Products from the Soybean Lipoxygenase-Catalysed Dioxygenation of Curcumin; *Magn. Reson. Chem.*, **2000**, *38*, 51-54.

- Truan, G.; Peterson, J.A.; Thr 268 in Substrate Binding and Catalysis in P450BM-3; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, *349*, 53-64.
- Truan, G.; Komandla, M.R.; Falck, J.R.; Peterson, J.A.; P450BM-3: Absolute Configuration of the Primary Metabolites of Palmitic Acid; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *366*, 192-198.
- Truu, J.; Talpsep, E.; Heinaru, E.; Stottmeister, U.; Wand, H.; Heinaru, A.; Comparison of API 20NE and Biolog GN Identification Systems Assessed by Techniques of Multivariate Analyses, *Jou. Microbiol. Methods*, **1999**, *36*, 193-201.
- Tsai, S.C.; Herndon, J.H.; Uhlendorf, B.W.; Fales, M.H.; Mize, C.E.; The Formation of alpha-Hydroxy Phytanic Acid from Phytanic Acid in Mammalian Tissues; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *28*, 571-577.
- Tsai, S.C.; Steinberg, D.; Avigan, J.; Fales, H.M.; Studies on the Stereospecificity of Mitochondrial Oxidation of Phytanic Acid to α -Hydroxy Phytanic Acid; *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 1091-1097.
- Tserng, K.Y.; Jin, S.J.; NADPH-dependent Reductive Metabolism of *Cis*-5-Unsaturated Fatty Acids. A Revised Pathway for the β -Oxidation of Oleic Acid; *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 11614-11620.
- Tserng, K.Y.; Jin, S.J.; Chen, L.S.; Reduction Pathway of *cis*-5-Unsaturated Fatty Acids in Intact Rat Liver and Rat Heart Mitochondria: Assessment with Stable-Isotope-Labeled Substrates; *Biochem. J.*, **1996**, *313*, 581-588.
- Tyrrell, M.; Advances in Natural Flavors and Materials; *Perf. Flavor*, **1995**, *20*, 13-21.
- Uchida, Y.; Izai, K.; Orii, T.; Hashimoto, T.; Novel Fatty Acid β -Oxidation Enzymes in Rat Liver Mitochondria. II. Purification and Properties of Enoyl-Coenzyme A (CoA) Hydratase / 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase / 3-Ketoacyl-CoA- Thiolase Trifunctional Protein; *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 1034-1041.
- Valentine, A.M.; LeTadic-Biadatti, M.H.; Toy, P.H.; Newcomb, M.; Lippard, S.J.; Oxidation of Ultrafast Radical Clock Substrate Probes by the Soluble Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath); *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 10771-10776.
- Van Aalten, D.M.; DiRusso, C.C.; Knudsen, J.; The Structural Basis of Acyl Coenzyme A-Dependent Regulation of the Transcription Regulator *FadR*; *EMBO J.*, **2001**, *20*, 2041-2050.
- Van den Bosch, H.; Schutgens, R.B.; Wanders, R.J.; Tager, J.M.; Biochemistry of Peroxisomes; *Ann. Rev. Biochem.*, **1992**, *61*, 157-197.

- Van der Stelt, M.; Nieuwenhuizen, W.F.; Veldink G.A.; Vliegthart, J.G.F.; Dioxygenation of N-linoleyl Amides by Soybean Lipoxygenase-1; *FEBS Letters*, **1997**, *411*, 287-290.
- Van Dyk, M.S.; Kock, J.L.F.; Botha, A.; Hydroxy Long-Chain Fatty Acids in Fungi; *World J. Microbiol. Biotech.*, **1994**, *10*, 495-504.
- Vanhanen, S.; West, M.; Kroon, J.T.M.; Lindner, N.; Casey, J.; Cheng, Q.; Elborough, K.M.; Slabas, A.R.; A Consensus Sequence for Long-chain Fatty-Acid Alcohol Oxidases from *Candida* Identifies a Family of Genes Involved in Lipid ω -Oxidation in Yeast with Homologues in Plants and Bacteria; *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 4445-4452.
- Vanhove, G.F.; Van Veldhoven, P.P.; Fransen, M.; Denis, S.; Eyssen, H.J.; Wanders, R.J.; Mannaerts, G.P.; The CoA Esters of 2-Methylbranched Fatty Acids and of the Bile Acids Intermediates Di- and Trihydroxycoprostanic Acids are Oxidized by One Single Peroxisomal Branched Chain Acyl-CoA Oxidase in Human Liver and Kidney; *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 10335-10344.
- Van Veldhoven, P.P.; Vanhove, G.F.; Asselberghs, S.; Eyssen, H.J.; Mannaerts, G.P.; Substrate Specificities of Rat Liver Peroxisomal Acyl-CoA Oxidases: Palmitoyl-CoA Oxidase (Inducible Acyl-CoA Oxidase), Pristanoyl-CoA Oxidase (Non-Inducible Acyl-CoA Oxidase), and Trihydroxycoprostanoyl-CoA Oxidase; *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 20065-20074.
- Van Veldhoven, P.P.; Croes, K.; Asselberghs, S.; Herdewijn, P.; Mannaerts, G.P.; Peroxisomal β -Oxidation of 2-Methylbranched Acyl-CoA Esters: Stereospecific Recognition of the *2S*-Methyl Compounds by Trihydroxycoprostanoyl-CoA Oxidase and Pristanoyl-CoA Oxidase; *FEBS Lett.*, **1996**, *388*, 80-84.
- Veenhuis, M.; Harder, W.; Microbodies in Yeasts: Structure, Function and Biogenesis; *Microbiol. Sci.*, **1988**, *5*, 347-351.
- Veldink, G.A.; Vliegthart, J.G.F.; Boldingh, J.; Plant Lipoxygenases; *Prog. Chem. Fats other Lipids*, **1977**, *15*, 131-166.
- Veldink, G.A.; Vliegthart, J.G.F.; Lipoxygenases, Nonheme Iron-Containing Enzymes; *Adv. Inorg. Biochem.*, **1984**, *6*, 139-161.
- Veldink, G.A.; Vliegthart, J.G.F.; Substrates and Products of Lipoxygenase Catalysis. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 9, *Structure and Chemistry* (Part B); Elsevier, Amsterdam, **1991**, 559-589.
- Venter, P.; Kock, J.L.F.; Sravan, Kumar, G.; Botha, A.; Coetzee, D.J.; Botes, P.J.; Bhatt, R.K.; Falck, J.R.; Schewe, T.; Nigam, S.; Production of *3R*-Hydroxy-

- polyenoic Fatty Acids by the Yeast *Dipodascopsis uninucleata*; *Lipids*, **1997**, *32*, 1277-1283.
- Ventosa, A.; Nieto, J.J.; Biotechnological Applications and Potentialities of Halophilic Microorganisms; *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, *11*, 85-94. 0
- Verhoeven, N.M.; Wanders, R.J.A.; Schor, D.S.M.; Jansen, G.A.; Jakobs, C.; Phytanic Acid α -Oxidation: Decarboxylation of-2-Hydroxyphytanoyl-CoA to Pristanic Acid in Human Liver; *J. Lipid Res.*, **1997a**, *38*, 2062-2070.
- Verhoeven, N.M.; Schor, D.S.M.; Ten Brink, H.J.; Wanders, R.J.A.; Jakobs, C.; Resolution of the Phytanic Acid α -Oxidation Pathway: Identification of Pristanal as Product of the Decarboxylation of-2-Hydroxyphytanoyl-CoA; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997b**, *237*, 33-36.
- Verhoeven, N.M.; Schor, D.S.M.; Previs, S.F.; Brunenraber, H.; Jakobs, C.; Stable Isotope Studies of Phytanic Acid α -Oxidation: *in vivo* Production of Formic Acid; *Eur. J. Pediatr.*, **1997c**, *156*, 83-87.
- Verhoeven, N.M.; Wanders, R.J.A.; Poll-The, B.T.; Saudubray, J.M.; Jakobs, C.; The Metabolism of Phytanic Acid and Pristanic Acid in Man: A Review; *J. Inher. Metab. Dis.*, **1998**, *21*, 697-728.
- Voet, D.; Voet, J.G.; *Biochemie*; 1. korr. Aufl., VCH-Verlag, Weinheim, **1994**.
- Viti, S.M.; Regioselective Reduction of 2,3-Epoxy Alcohols; *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4541-4544.
- Wada, F.; Usami, M.; Studies on Fatty Acid ω -Oxidation. Antiketogenic Effect and Gluconeogenicity of Dicarboxylic Acids; *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, *487*, 261-268.
- Waleria-Aleixo, A.; Kroon, E.G.; Campos, M.A.S.; Margutti-Pinto, M.E.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; Heteroduplex Mobility Assay for Rapid, Sensitive and Specific Detection of Mycobacteria; *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **2000**, *36*, 225-235.
- Wallach, D.P.; Brown, V.R.; A Novel Preparation of Human Platelet Lipoxygenase. Characteristics and Inhibition by a Variety of Phenyl Hydrazones and Comparison with Other Lipoxygenases; *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, *663*, 361-372.
- Wallen, L.L.; Benedict, R.G.; Jackson, R.W.; The Microbiological Production of 10-Hydroxystearic Acid from Oleic Acid; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1962**, *99*, 249-253.

- Wanders, R.J.A.; Van Roermund, C.W.T.; Studies on Phytanic Acid α -Oxidation in Rat Liver and Cultured Human Skin Fibrioblasts; *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1167*, 345-350.
- Wanders, R.J.A.; Peroxisomes, Lipid Metabolism, and Human Disease; *Cell Biochem. Biophys.*, **2000**, *32*, 89-106.
- Wang, H.Y.; Baxter, C.F.; Schulz, H.; Regulation of Fatty Acid β -Oxidation in Rat Heart Mitochondria; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, *289*, 274-280.
- Waterson, R.M.; Hill, R.L.; Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase). Catalytic Properties of Crotonase and its Possible Regulatory Role in Fatty Acid Oxidation; *J. Biol. Chem.*, **1972**, *247*, 5258-5265.
- Watkins, P.A.; Howard, A.E.; Mihalik, S.J.; Phytanic Acid must be Activated to Phytanoyl-CoA Prior to its α -Oxidation in Rat Liver Peroxisomes; *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1214*, 288-294.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J.; 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study; *J. Bacteriol.*, **1991**, *173*, 697-703.
- Welsh, F.W.; Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production. In: *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients* (Hrsg.: Gabelman, A.), Wiley, New York, **1994**, 1-16.
- Wendisch, D.A.W.; Nuclear Magnetic Resonance in Industry; *Appl. Spectrosc. Rev.*, **1993**, *28*, 165-229.
- Wierenga, W.; Skulnick, H.I.; General, Efficient, One-Step Synthesis of β -Keto Esters; *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 310-311.
- Wiesler, W.T.; Nakanishi, K.; Relative and Absolute Configurational Assignments of Acyclic Polyols by Circular Dichroism. 1. Rationale for a Simple Procedure Based on the Exciton Chirality Method; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 9205-9013.
- Wiseman, J.S.; Nichols, J.S.; Ketones as Electrophilic Substrates of Lipooxygenase; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, *154*, 544-549.
- Withers, S.J.; Piggott, J.R.; The Study of Flavor Releases Using Gas Chromatography Mass Spectrometry; *Spectroscop. Eur.*, **1998**, *10*, 22-23.
- Wolthers, B.G.; Kraan, G.P.B.; Clinical Applications of Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Steroids; *J. Chromatogr. A.*; **1999**, *843*, 247-274.

- Wong, L.L.; Cytochrome P450 Monooxygenases; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1988**, *2*, 263-268.
- Woods, C.R.; Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R.; Whole-Cell Repetitive Element Sequence Based Polymerase Chain Reaction Allows Rapid Assessment of Clonal Relationships of Bacterial Isolates; *J. Clin. Microbiol.*, **1993**, *31*, 1927-1931.
- Wysocki, V.H.; Triple Quadrupole Mass Spectrometry. In: *Mass Spectrometry in the Biological Sciences* (Hrsg.: Gross, M.L.), Kluwer, Dordrecht, **1992**, 59-77.
- Yamamoto, S.; Mammalian Lipoxygenase: Molecular Structure and Functions; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1128*, 117-131.
- Yamauchi, K.; Tanabe, T.; Kinoshita, M.; Trimethylsulfonium Hydroxide: A New Methylating Agent; *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 638-639.
- Yang, X.Y., Schulz, H.; Elzinga, M., Yang, S.Y.; Nucleotide Sequence of the Promotor and the *FadBA* Operon and Primary Structure of the Multifunctional Fatty Acid Oxidation Protein from *Escherichiacoli*; *Biochemistry*, 1991, *30*, 6788-6795.
- Yano, I.; Furukawa, Y.; Kusunose, M.; Conversion of Palmitic Acid to α -Hydroxypalmitic Acid in *Corynebacterium simplex* [*Arthrobacter simplex*]; *Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, *187*, 166-168.
- Yano, I.; Furukawa, Y.; Kusunose, M.; 2-Hydroxy Fatty Acid-Containing Phospholipid of *Arthrobacter simplex*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1970**, *210*, 105-115.
- Yano, I.; Furukawa, Y.; Kusunose, M.; The α -Oxidation of Long-Chain Fatty Acids in Cell-Free Extracts from *Arthrobacter simplex*; *Biochim. Biophys. Acta*, **1971**, *239*, 513-516.
- Yao, J.D.C.; Conly, J.M.; Krajden, M.; Molecular Typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by DNA Macrorestriction Analysis and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis; *J. Clin. Microbiol.*, **1995**, *33*, 2195-2198.
- Yeom, H.; Sligar, S.G.; Li, H.; Poulos, T.L.; Fulco, A.J.; The Role of Thr268 in Oxygen Activation of Cytochrome P450_{BM-3}; *Biochemistry*, **1995**, *34*, 14733-14740.
- Yoshinaga, F.; Prolin; *Prog. Ind. Microbiol.*, **1986**, *224*, 117-120.
- Youngs, C.G.; Epp, A.; Craig, B.M.; Sallans, H.R.; Preparation of Long-Chain Fatty Acid Chlorides; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1956**, *34*, 107-108.
- Zissi, U.S.; Lyberatos, G.C.; Kinetics of Growth and Aniline Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*; *Water Environ. Res.*, **1999**, *71*, 43-49.

Publikationsliste

A. Publikationen

- Weil, K.; Gruber, P.; Heckel, F.; Harmsen, D.; Schreier, P.; Selective (*R*)-3-Hydroxylation of Fatty Acids by *Stenotrophomonas maltophilia*; *Lipids*, **2001**, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Weil, K.; Humpf, H.U.; Schwab, W.; Schreier, P.; Absolute Configuration of 3-Hydroxy Acids formed by *Stenotrophomonas maltophilia*: Application of Multidimensional Gas Chromatography and Circular Dichroism Spectroscopy; *Chirality*, **2001**, im Druck.

B. Vorträge

- Weil, K.; Mikrobielle Hydroxylierung von Fettsäuren; *Seminar für Diplomanden und Doktoranden im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 347* (Selektive Reaktionen Metall-aktivierter Moleküle), Würzburg, 16. November 1999.

C. Posterbeiträge

- Schüler, E.; Häring, D.; Weil, K.; Schreier, P.; Seleno-Subtilasen und Seleno-Trypsine: Neue semisynthetische Peroxidasen für die organische Synthese; *4. Doktorandensymposium des Sonderforschungsbereiches 347* (Selektive Reaktionen Metall-aktivierter Moleküle), Würzburg, 28.-30. April 1999.
- Weil, K.; Gruber, P.; Heckel, F.; Schwab, W.; Schreier, P.; Selective Hydroxylation of Fatty Acids by *Stenotrophomonas maltophilia*; *International Symposium on Non-Mammalian Eicosanoids and Bioactive Lipids*, Berlin, 29.-31. Mai 2000.
- Lukacs, Z.; Saha-Möller, C.R.; Adam, W.; Weil, K.; Schreier, P.; Enantioselective Reduction of Racemic Hydroperoxides and Asymmetric CH Oxidation of Hydro-

carbons by Microorganisms; *Sonderforschungsbereich 347: IV. Symposium "Selective Reactions of Metal-Activated Molecules"*, Würzburg, 20.-22 September 2000.

- Weil, K.; Gruber, P.; Heckel, F.; Schreier, P.; Selective Microbial Hydroxylation of Fatty Acids; *Sonderforschungsbereich 347: IV. Symposium "Selective Reactions of Metal-Activated Molecules"*, Würzburg, 20.-22 September 2000.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „3-(*R*)-Hydroxysäuren als Produkte selektiven Fettsäureabbaus - Studien zur β -Oxidation in *Stenotrophomonas maltophilia*“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder 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

.....
(Kerstin Weil)