

Enzymassay im Hochdurchsatz-Format**Eine Hochdurchsatz-Screeningmethode zur Bestimmung der Syntheseaktivität von Hydrolasen****

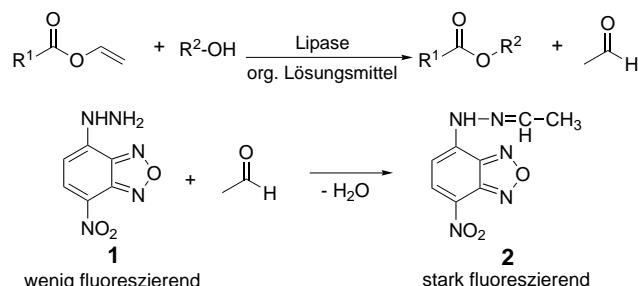
Monika Konarzycka-Bessler und Uwe T. Bornscheuer*

Lipasen und Esterasen sind vielseitige Biokatalysatoren und finden zunehmend Anwendung in der organischen Synthese.^[1] Das Hauptinteresse an diesen Enzymen beruht auf ihrer breiten Substratspezifität und besonders hohen Stabilität in organischen Lösungsmitteln, wodurch nicht nur Hydrolyse-, sondern auch Synthesereaktionen möglich sind. Unzählige Reaktionen wurden in organischen Medien durchgeführt, viele davon bereits kommerziell. Dazu gehört die Synthese von optisch reinen Synthesebausteinen, von Aroma- und Geruchsstoffen, modifizierten Lipiden, aber auch von einfachen Estern wie Myristylmyristat für kosmetische Anwendungen.

Aktive (und stereoselektive) Biokatalysatoren können in Hydrolysetests identifiziert werden, für die eine beträchtliche Zahl an nützlichen Hochdurchsatz-Methoden entwickelt wurde.^[2] Enzyme, die mit diesen Methoden identifiziert wurden, sind jedoch oft nicht für die gewünschte Synthesereaktion geeignet. Eine Alternative sind Veresterungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln in sehr kleinem Maßstab, für die der Umsatz (und die optische Reinheit) durch GC- oder HPLC-Analyse ermittelt wird. Eine breit angelegte Untersuchung einer großen Zahl von Enzymen und die Optimierung der Reaktionsbedingungen (Verwendung verschiedener Alkohole oder Acyldonoren, Lösungsmittel, Träger zur Immobilisierung, Temperatur) führen jedoch leicht zu mehreren hundert individuellen Versuchen und sind daher sehr zeitaufwändig.

Wir beschreiben nun ein neues Testsystem, das eine Bestimmung der Syntheseaktivität von Hydrolasen im Hochdurchsatz-Format erlaubt. Es basiert auf der Lipase- oder Esterase-katalysierten Umesterung eines Vinylesters mit einem Alkohol. Acetaldehyd, der dabei stöchiometrisch durch Keto-Enol-Tautomerie aus dem freigesetzten Vinylalkohol entsteht,^[3] reagiert *in situ* mit dem Hydrazin **1** unter Bildung des fluorogenen Derivates **2**, das durch Fluoreszenzmessung quantifiziert werden kann (Schema 1).

Entscheidend für den Erfolg ist die Wahl des Derivatisierungsreagens. Eine große Zahl an Verbindungen zum Abfangen flüchtiger Carbonylverbindungen ist bisher beschrieben

**Schema 1.** Modellreaktion zur Evaluierung des Testsystems.

worden, z.B. verwendet man in der Umweltanalytik oft Hydrazine wie das klassische Dinitrophenylhydrazin.^[4] Leider erfolgt die Derivatisierung häufig unter Bedingungen, die nicht mit einer Enzymreaktion vereinbar sind. Zusätzlich muss überschüssiges Reagens z.B. durch HPLC vom Produkt getrennt werden, um eine zuverlässige Quantifizierung zu ermöglichen. Wir identifizierten das kommerziell erhältliche 4-Hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (**1**, NBD-H)^[5] als geeignetes Reagens, da es nahezu keine, das entsprechende Hydrazon **2** dagegen sehr hohe Fluoreszenz zeigt (~300 bzw. ~30 000 relative Fluoreszenzeinheiten, RFU). Außerdem kann die Derivatisierung in organischen Lösungsmitteln bei moderaten Temperaturen erfolgen.^[6]

Als Modellreaktion wurde die Umesterung von Vinylalrat mit 1-Propanol in Mikrotiterplatten (MTP)^[7] in Gegenwart von NBD-H (**1**) gewählt, wobei mehrere Lipasen und Esterasen untersucht wurden. Abbildung 1 zeigt typische Zeitverläufe dieser Reaktion. Über Messung der Fluoreszenz kann somit der Reaktionsverlauf sehr einfach beobachtet werden. Obwohl die Reaktion in einem heterogenen System bestehend aus festem Enzym und flüssigen Reaktanten erfolgt, scheint dies die Bestimmung der Syntheseaktivität nicht zu beeinflussen. Sehr aktive Biokatalysatoren sind demnach Chirazyme L9 (RML, Lipase aus *Rhizomucor miehei*) und Chirazyme L2 (Lipase B aus *Candida antarctica*); Chirazyme L5 (Lipase A aus *C. antarctica*) und L6 (Lipase aus *Pseudomonas* sp.) zeigen moderate Syntheseaktivität; Esterase aus *Streptomyces diastatochromogenes* (SDE), Lipase aus *Aspergillus niger* (Amano A) und Lipase aus *Candida rugosa* (Amano AY) sind nahezu inaktiv.

Eine Berechnung des Umsatzes der jeweiligen Reaktionen war durch die Bestimmung einer Standardkurve (Abbildung 2) möglich, in der die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration des Hydratzons **2** korreliert wurde. Für sehr aktive Enzyme war diese Bestimmung weniger exakt,^[8] da der lineare Bereich der Standardkurve bei ca. 0.02 mM (>12 000 RFU) nicht weiter anstieg und der Umsatz über Regressionsanalyse bestimmt werden musste. Andererseits korrelieren die Daten in Abbildung 3 gut mit den über GC-Analysen ermittelten Umsätzen.

Zusätzlich erlaubt das hier vorgestellte Testformat Messungen auch in anderen organischen Lösungsmitteln wie *n*-Hexan oder Ether, die in Lipase- oder Esterase-katalysierten Reaktionen verwendet werden (Daten nicht gezeigt). Trotz der wenigen, oben genannten Einschränkungen ist dieser Assay sehr flexibel zur Bestimmung der Syntheseaktivität von

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, M. Konarzycka-Bessler
Institut für Chemie und Biochemie
Abt. Technische Chemie und Biotechnologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4346
E-mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

[**] Wir danken der Degussa AG (Projekthaus Biotechnologie und Business Unit Care Specialties) für finanzielle Unterstützung und Priv.-Doz. Dr. Uwe Karst, Universität Münster, für wertvolle Diskussionen.

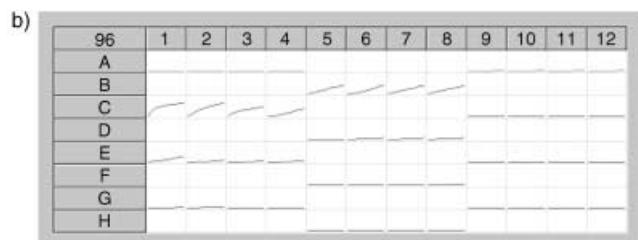
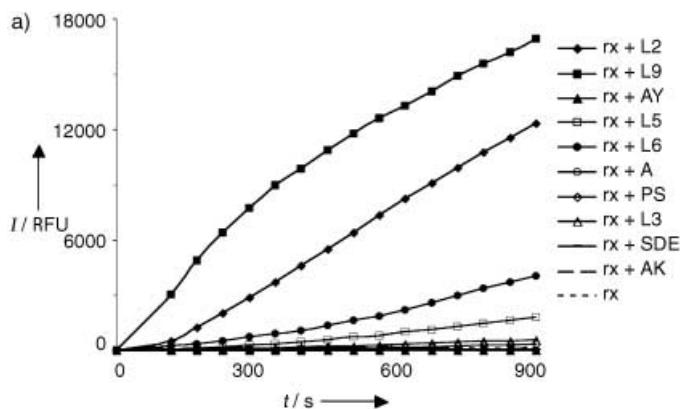


Abbildung 1. a) Zeitverlauf der Lipase-katalysierten Umesterung von Vinyllaurat mit 1-Propanol in Isooctan mit der In-situ-Derivatisierung des gebildeten Acetaldehyds mit NBD-H unter Einsatz verschiedener Enzyme. rx = Kontrollen ohne Enzyme, L2–L9 = Chirazyme L2–L9, für andere Enzym-abkürzungen siehe Text und Experimentelles. b) Ergebnis des Auslesens der Mikrotiterplatten für diese Reaktionen. A1–A4 = Reaktantengemisch in Isooctan (Vinylaurat+1-Propanol, Kontrolle 1), A9–A12 = Reaktantengemisch in Isooctan mit NBD-H (Kontrolle 2), B5–B8 = Chirazyme L2, C1–C4 = Chirazyme L9, C9–C12 = Amano AY, D5–D8 = Chirazyme L5, E1–E4 = Chirazyme L6, E9–E12 = Amano A, F5–F8 = Amano PS, G1–G4 = Chirazyme L3, G9–G12 = SDE, H5–H8 = Amano AK.

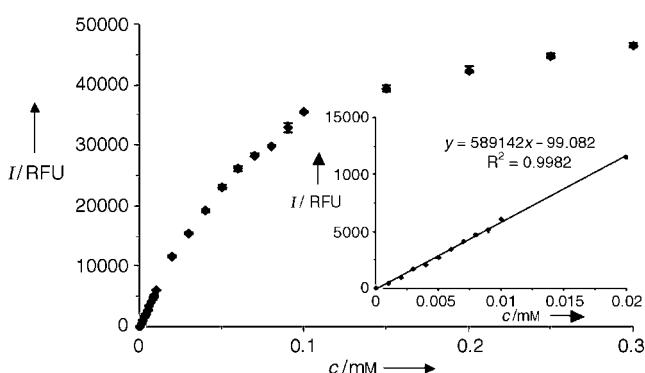


Abbildung 2. Standardkurve für **2**, bestimmt in Isooctan/1-Propanol (10:1). Der Einschub zeigt den linearen Bereich der Messungen.

Lipasen und Esterasen in einem Hochdurchsatz-Format einsetzbar und ermöglicht daher die rasche Identifizierung von aktiven Enzymen und/oder geeigneten Reaktionsbedingungen.

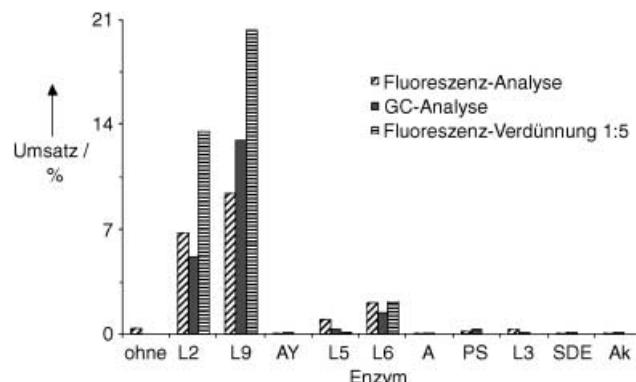


Abbildung 3. Vergleich des über Fluoreszenz- und GC-Analyse ermittelten Umsatzes. Für sehr aktive Enzyme wurde das Reaktionsgemisch zusätzlich fünffach verdünnt.

Experimentelles

Materialien: NBD-H (**1**) wurde von Fluka, alle anderen Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Reinheit von üblichen kommerziellen Herstellern bezogen. Für die Enzymreaktionen wurden zehn nicht immobilisierte Enzyme ausgewählt: Chirazyme L2 (CAL-B), L3 (CRL), L5 (CAL-A), L6 (PSL), L9 (RML); Amano PS (PCL), Amano A (ANL), Amano AK (PFL), Amano AY (CRL) und SDE.^[9]

Fluorimetrische Analysen wurden mit dem FLUOstar Galaxy von BMG Labtechnologies GmbH (Offenburg, Deutschland) durchgeführt, gaschromatographische mit einem Hewlett-Packard-GC (5890 Series II) an einer Permabond-FFAP-Säule (25 m × 0.25 mm, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) isothermal (140 °C) mit Wasserstoff als Trägergas.

Lipase-katalysierte Synthese von 1-Propyllaurat: 77.5 µL (0.3 mmol) Vinyllaurat, 22.5 µL (0.3 mmol) 1-Propanol und 900 µL Lösungsmittel (*n*-Hexan, Isooctan, Petrolether) wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1.5 mL) gegeben und 1 mg CAL-B (Chirazyme L9) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 900 U min⁻¹ und 60 °C geschüttelt. Proben wurden mit Chloroform verdünnt, an einem Vortex-Wirbelmischer durchmischt, zentrifugiert und gaschromatographisch analysiert.

Synthese und Fluoreszenz von **2**: 20.3 mg (0.104 mmol) **1** wurden in 4 mL Dichlormethan in einem Rundkolben gelöst, 12 µL (0.213 mmol) Acetaldehyd hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur in Stickstoffatmosphäre im Dunkeln gerührt. Anschließend wurden erneut 0.213 mmol Acetaldehyd hinzugefügt und die Reaktion weitere 20 min fortgeführt. Nach Entfernen von überschüssigem Lösungsmittel wurde das Rohprodukt aus Benzol/Cyclohexan (1:1) kristallisiert und ergab **2** (12.5 mg, 54.4 %) **2**, was durch NMR-Spektroskopie und ein Fluoreszenzspektrum bestätigt werden konnte. Für die Standardkurve wurde eine 0.3 mM Stammlösung von **2** in Isooctan/1-Propanol (10:1, v/v) hergestellt und anschließend im Konzentrationsbereich von 0.001–0.25 mM verdünnt. 150 µL der jeweiligen Lösung wurden in eine MTP überführt und diese mit Klebeband verschlossen. Die Fluoreszenz wurde bei 45 °C, einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen (Verstärkung 0). Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt.

Bestimmung der enzymatischen Syntheseaktivität in der MTP: Da ein genaues Abwiegen der kleinen Mengen an festen Enzymen (ca. 0.01–0.02 mg) sehr schwierig ist, wurde eine bekannte Menge Enzym in Phosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM) gelöst, in eine MTP überführt und gefriergetrocknet. Anschließend wurde ein Gemisch aus Vinyllaurat (15 µmol), 1-Propanol (150 µmol) und NBD-H in organischem Lösungsmittel (Methanol, 1-Propanol, *n*-Hexan, Isooctan, Petrolether oder DMSO) hinzugefügt, die Platten (Gesamtvolumen: 150 µL pro Vertiefung) wurden mit Klebeband verschlossen.

sen und in das Fluorimeter (Schütteln bei 45 °C und 170 U min⁻¹) gegeben und der Anstieg der Fluoreszenz wie oben beschrieben verfolgt. Zur Kontrolle diente das gleiche Format, allerdings ohne Zugabe von Enzym bzw. wurde NBD-H nur mit Enzym oder Lösungsmittel inkubiert. Zur Vermeidung einer unerwünschten Hydrolyse durch Wasser empfiehlt es sich, alle Reaktanten und Lösungsmittel vor der Reaktion über aktiviertem Molekularsieb zu trocknen.

Eingegangen am 8. Juli 2002,
veränderte Fassung am 25. Oktober 2002 [Z19674]

Stichwörter: Enzymkatalyse · Hochdurchsatz-Screening ·
Hydrazone · Lipasen · Umesterungen

-
- [1] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4. Aufl., Springer, Berlin, **2000**.
 - [2] a) M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4329–4333; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4201–4204; b) F. Badalassi, D. Wahler, G. Klein, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4233–4236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4067–4070; c) L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4560–4561; L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2324–2331; d) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310; e) D. Wahler, J. L. Reymond, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 152–158.
 - [3] Y. F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200–7205.
 - [4] M. Vogel, A. Büldt, U. Karst, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 781–791.
 - [5] H. Koizumi, Y. Suzuki, *J. Chromatogr.* **1988**, *457*, 299–307.
 - [6] NBD-H reagiert sehr schnell mit Aldehyden, aber nicht mit Ketonen. Zusätzlich fluoreszieren die von Ketonen (z.B. Aceton, Acetophenon) abgeleiteten Hydrazone deutlich weniger. Folglich ist die Verwendung von Acyldonoren wie Isopropenylacetat wenig sinnvoll.
 - [7] Um ein Verdunsten des sehr flüchtigen Acetaldehyds zu vermeiden, empfehlen wir die Verwendung von mit Klebeband verschlossenen MTPs. Die Fluoreszenz sollte bevorzugt von der Oberseite der MTP gemessen werden, um Störungen durch Enzympartikel zu vermeiden.
 - [8] Die Abweichungen der Messdaten können auch durch den Zeitaufwand für die GC-Probenvorbereitung bedingt sein, da das Entfernen des Enzyms durch Zentrifugieren einige Minuten beansprucht.
 - [9] V. Khalameyzer, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 101–104.
-