Präparativ-enzymatische Darstellung von Heterooligosacchariden mit synthetischen und natürlichen Donoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Sven Schröder

aus Itzehoe

Hamburg 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 06. Februar 2004

für Lisa, Anna & Veronika

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Oktober 2003 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem danke ich für die überaus freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, den außergewöhnlich großen Forschungsfreiraum, sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mens agitat molem

Vergil

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl-
Benzol-d6	Hexadeuterobenzol
Bn	Benzyl-
br.	breit(es)
COSY	Correlated Spectroscopy
DAST	Dimethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DP	*D*egree of *P*olymerisation
E. coli	Eschericha coli
EE	Essigsäureethylester / Ethylacetat
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glc	Glucose
Glc*N*Ac	*N*-Acetylglucosamin
HMBC	Hetero Multiple Bond Coherence
HPAEC	High performance anion exchange chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
HMQC	Hetero Multiple Quantum Coherence
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
m_c	zentriertes Multiplett
MeOH	Methanol
MeOH-d4	Tetradeuteromethanol
i.Vak.	im Vakuum
PE	Petrolether
*p*NP	*para*-Nitrophenyl-
Py	Pyridin
t	Triplett
Tf	Trifluormethansulfonat
TMS	Trimethylsilyl-,
TOF	Time of flight
v	virtuell

1. Einleitung 9

1.1 Allgemeines zur enzymatischen Synthese 11

1.1.1 Glycosyltransferasen 11

1.1.2 Glycosylhydrolasen 12

1.1.3 Saccharidderivate als Nahrungsmittel-Bestandteile 16

1.2 Galactosidasen 21

1.2.1 Eingesetzte Galactosidasen 21

1.2.2 Spezifität der eingesetzten Galactosidasen im Überblick 21

1.2.3 Eingesetzte Akzeptoren 21

1.2.4 Eingesetzte Donoren 22

1.2.5 Nahrungsmittelzusätze durch enzymatische Galactosylierung 23

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung 25

3. Synthese von D-Galacto-, D-Fuco-, und L-Arabinopyranosyldonoren 26

3.1 Synthese verschiedener Glycosylfluoride 26

3.2 Synthese verschiedener *para*-Nitrophenyl-Donoren 31

3.3 Synthesen verschiedener *para*-Hydroxypyridinyl-Donoren 36

4. Transglycosylierungen mit neuen α-Galactosidasen 41

4.1 Galactosylierungen mit α-Galactosidase aus RAF-A 41

4.2 Galactosylierungen mit α-Galactosidase aus aGaB 58

5. Transglycosylierungen mit β-Galactosidase aus BgLT 63

6. Upscaling ausgesuchter Transglycosylierungsreaktionen mit β-Galactosidasen aus Bovine testes, *Bacillus circulans* und *Aspergillus oryzae*. 70

6.1 Untersuchungen zur β-Galactosidase aus Bovine testes. 70

6.2 Anwendung von β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* 76

6.3 Nutzung der β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* 79

7. Zusammenfassung / Summary 82

8. Experimenteller Teil 86

9. Gefahrenhinweise 148

10. Literatur 151

1. Einleitung

Die Kohlenhydrate stellen unter der enormen Vielfalt der Substanzen, neben den Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren eine der vier großen Naturstoffklassen dar, die die gesamte Biomasse unserer Erde ausmachen. [1,2,3] Kohlenhydrate sind von maßgeblicher Relevanz für alle Organismen, wobei ihnen auch hier wiederum eine beeindruckende Varianz an Aufgaben zuteil wird. Auf den ersten Blick triviale Eigenschaften wie die Bildung von Gerüstsubstanz für wirbellose Tiere, Mikroorganismen und Pflanzen werden von Kohlenhydraten in polymorpher Ausprägung (Cellulose, Chitin, Proteoglycane) geleistet. An dieser Stelle zeigt sich im Besonderen, dass Polymere auf Kohlenhydratbasis enormen physischen Anforderungen standhalten können. Weiterhin fällt ihnen als Energieträger eine zentrale Bedeutung zu, indem sie für zahlreiche Organismen in Form von kurz-, mittel- und langkettige Kohlenhydratspezies (Stärke, Glycogen), die Energieversorgung leisten. Auch das Grundgerüst der RNA, respektive DNA werden von dieser beinahe universell verwendbar anmutenden Substanzklasse gebildet.
Aber auch komplexere und filigranere Aufgaben werden von Saccharidderivaten in Form von komplexen Glycoproteinen oder Glycolipiden in nahezu allen Zellen geleistet. Dazu gehören Prozesse wie das Vermitteln von interzellulärer Kommunikation, [4,5,6] die Adhäsion von Viren und Bakterien,[7,8] die Ingression von Toxinen [9] aber auch das Initialisieren zellinterner Abläufe durch Enzyme und Hormone.

Die überaus komplexen Wirk- und Funktionsweisen von Glycokonjugaten bieten weitreichende Möglichkeiten des Eingriffs in biologische Prozesse. Gleichzeitig stellt sich die Herausforderung, durch die Synthese naturidentischer Strukturen zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge beizutragen, um schließlich Einfluss auf biologische und insbesondere pathologische Vorgänge zu nehmen.
Von ebenso großem Interesse ist aber auch der Aufbau von neuen Derivaten, die auf Saccharidstrukturen basieren. Hier reichen die Einsatzorte von der Pharmazie über die Nahrungsmittelindustrie bis in die Baustoffindustrie, die sich allesamt sowohl die Verfügbarkeit als auch die breite Anwendbarkeit der Kohlenhydrate zunutze machen. Von zentralem Interesse sind hier neuartige Zielsubstanzen oder Strukturen, die in ihren Eigenschaften herausragende Fähigkeiten haben. Die Grundlagenforschung stellt hier einen nicht zu unterschätzenden Bereich dar, der zu neuen Strukturen und

optimierten Methoden in so manchen Synthesebereichen führt. Selbst wenn sich die Strukturen zum momentanen Zeitpunkt einer pragmatischen Verwendung noch verschließen mögen, so kann ihnen in der Zukunft unter anderen Aspekten eine hohe Bedeutung zukommen.

Wie auch immer ein Zielmolekül geartet ist, so ist und bleibt die Synthese von Kohlenhydratstrukturen von hohem Interesse, sowie auch die Vergrößerung des Potenzials an Synthesemethoden. In den vergangenen Jahren haben mehr und mehr enzymatische Synthesetechniken Einzug in die Kohlenhydratchemie gefunden.[10,11] Vor dem Hintergrund einer komplexen Schutzgruppenstrategie, die bei der klassischen Synthese von Oligosacchariden unabdingbar ist und in diesem Zusammenhang zwangsläufig zu geringen Ausbeuten bei vielstufigen Synthese führen, erschließen sich durch Einsatz von Hydrolasen und Transferasen neue und effiziente Möglichkeiten beim Aufbau von Saccharidderivaten unter Umgehung der Widrigkeiten der klassischen Methoden. Unterstützung wird hier dem Kohlenhydratchemiker durch die Fortschritte der Biochemie und Molekularbiologie zuteil.

Die Klonierung von Enzymen und deren Expression in Mikroorganismen wie *Eschericha coli*, die mittlerweile auch im technischen Maßstab möglich sind, haben enzymatischen Synthesen zu einer echten Alternativen beim Aufbau von komplexen Saccharidstrukturen werden lassen.

Zwar hat die klassische Synthese beim Aufbau von komplexen Kohlenhydratstrukturen nicht an Bedeutung verloren, aber sie wird doch zunehmend durch enzymatische Methoden ergänzt. So sind nach wie vor Optimierung von Glycosylierungverfahren und effiziente Schutzgruppentechnik ein wichtiger Bestandteil der Kohlenhydratchemie an der auch enzymatische Synthesen partizipieren um beispielsweise Donoren mit guten Abgangsgruppen bereitzustellen.

1.1 Allgemeines zur enzymatischen Synthese

1.1.1 Glycosyltransferasen

Den Glycosyltransferasen obliegt *in vivo* der Aufbau komplexer Heterooligosaccharidstrukturen. [12] Es wird zwischen den Leloir und Nicht-Leloir-Transferasen differenziert. Die Synthese von *N*- und *O*-Glycoproteine sowie anderen Glycokonjugaten werden im Säugetier Metabolismus von Leloir-Transferasen übernommen. Glycosyldonoren der Leloir-Transferasen sind Nucleosiddiphosphate, während Nicht-Leloir-Transferasen Glycophosphate benötigen (Abb. 1).
Die Möglichkeit, hoch spezifische Oligosaccharide zu synthetisieren ergibt sich durch den Einsatz der so genannten Leloir-Transferasen. [13] Diese Transferasen sind in der Lage, Zuckermoleküle sowohl stereo- als auch regioselektiv auf einen Akzeptor zu übertragen.[14]

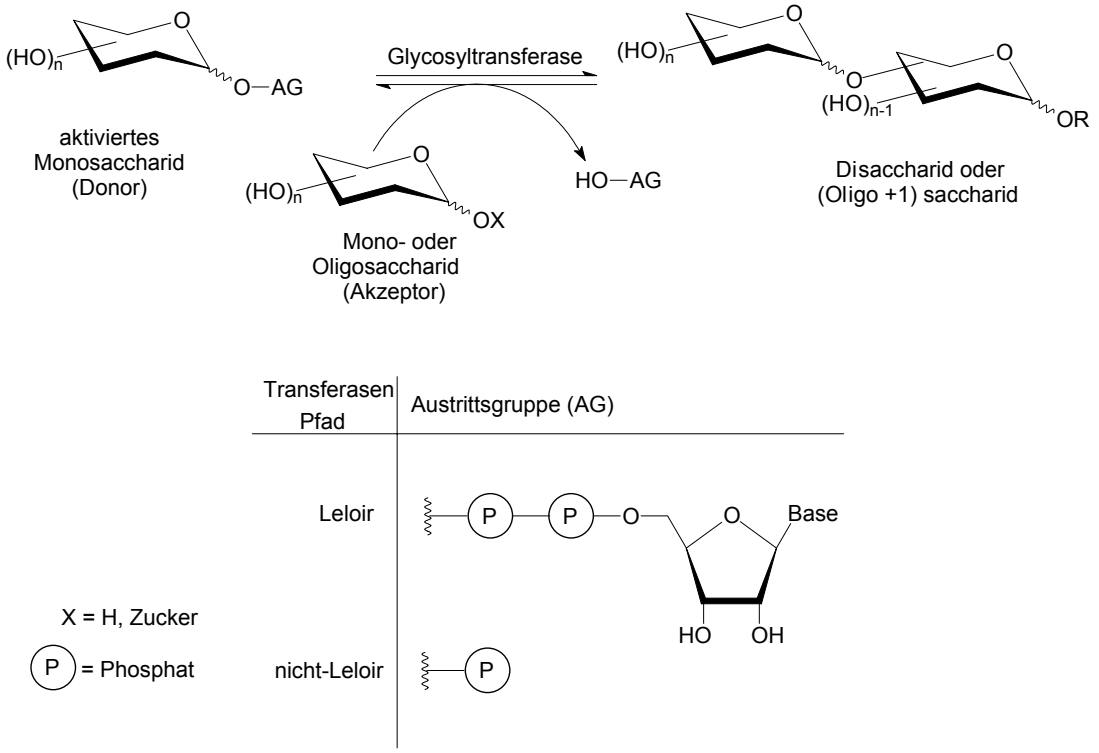


Abb. 1 Saccharidsynthese mit Leloir sowie Nicht-Leloir-Transferasen

Obwohl Transferasen substratspezifisch sind, ist es dennoch möglich *in vitro* modifizierte Donoren auf modifizierte Akzeptoren zu übertragen, was den Zugang zu einer enormen Vielfalt an möglichen Produkten eröffnet.
Obwohl transferkatalysierte Glycosylierungen mit relativ hohen Ausbeuten verlaufen, [15] sind nur relativ wenige dieser häufig membrangebundenen Proteine kommerziell verfügbar. Allerdings wird durch große Fortschritte in der Gentechnik und der Klonierung die Verfügbarkeit synthetisch nutzbarer, rekombinanter Glycosyltransferasen erhöht. Die Anwendungsbreite und auch die absolute Ansatzgröße ist sowohl durch die Verfügbarkeit der Nucleotidsaccharid-Donoren als auch durch die Cosubstrate eingeschränkt.

1.1.2 Glycosylhydrolasen

Glycosylhydrolasen oder auch Glycosidasen (EC 3.2), sind *in vivo* ubiquitär anzutreffende und überaus bedeutende Enzyme, die sowohl Oligo- und Polysaccharide zu ihren entsprechenden Monomeren, als auch Glycokonjugate an deren spezifischen Bindungsstelle zwischen Saccharid und Aglycon hydrolysieren. Vom relativ simplen Stärkeabbau, bis zum komplexen Glycoprotein-Trimming haben damit Glycosidasen für alle Organismen essentielle Funktionen.
Abhängig vom spezifischen Wirkmechanismus der einzelnen Glycosidase ergibt sich eine grundlegende Differenzierung in zwei Klassen: *exo*-Glycosidasen beginnen bei einem Polysaccharid mit dessen Spaltung vom nichtreduzierenden Ende her, während *endo*-Glycosidasen ein adäquates Substrat entlang der Polysaccharidkette, auch von einem zentralen Punkt spalten. [16] In der enzymatischen Oligosaccharidsynthese werden überwiegend *exo*-Glycosidasen eingesetzt, die unter Retention der anomeren Konfiguration das Donorsubstrat hydrolysieren.
Für das fundamentale Verständnis der katalytischen Eigenschaften von Glycosidasen sind sowohl Aufklärung des Mechanismus, als auch der Reaktionsverlauf am aktiven Zentrum unabdingbar und dies ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.
Über 60 Jahre lang, wurde sowohl die Enzymspezifität als auch die Enzymaktivität mit dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ erklärt, das dem, von Emil Fischer postulierten Konzept zugrunde liegt. [17] Sukzessive traten jedoch Widersprüche auf, die mit dem bis dato bekannten Konzept nicht in Einklang zu bringen waren. So konnte die nichtkompetitive Inhibierung damit erklärt werden, dass ein Inhibitor zwar die

Enzymaktivität senkt, nicht jedoch die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat beeinflusst. Da allein diese Tatsache in ihrer Erklärung nicht dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ genügte, führte es in einer Weiterentwicklung zur Induced-Fit-Theorie, die das Fischer-Postulat von der Passform (Fit) mit dem Konzept der Flexibilität verbindet.[18] Diese erweiterte Theorie umfasst die Komplementarität von Enzym und Substrat und führt das „Hand-in-Handschuh-Konzept“ eines innerhalb begrenzter Parameter verformbaren Enzyms ein.

Detaillierte mechanistische Betrachtungen setzen ein dreidimensionales Bild der Molekülgeometrie am katalytischen Zentrum voraus. Da die Kristallisation zum Zweck der Strukturbestimmung trotz vieler Bemühungen bei der Mehrheit der Enzyme bisher nicht gelungen ist, basieren viele reaktionsmechanistische Betrachtungen von Glycosidasen auf indirekten Erläuterungen wie Inhibitions- und Kinetikexperimenten. Mechanistische Betrachtungen, die sich nicht an letztgenannten Kriterien orientieren, basieren auf der Kristallstrukturanalyse des Hühnerei-Lysozyms, die durch Phillips *et al.* durchgeführt wurde. [19] Den Ergebnisse entsprechend erfolgt die enzymatische Glycosidhydrolyse analog der säurekatalysierten Hydrolyse.

Den Anfang der Glycosidhydrolyse macht die katalytisch wirkende Carboxylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms, die das Glycosid protoniert. Anschließend stabilisiert eine Carboxylatgruppe auf der gegenüberliegenden Seite der Zuckerringebene den vorangegangen generierten cyclischen, Oxocarbenium-artigen Übergangszustand unter Bildung einer kovalenten Bindung, bei einhergehender Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom. Im abschließenden Hydrolyseschritt wird das Saccharid durch den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls vom aktiven Zentrum des Enzyms abgelöst. (Abb. 2)

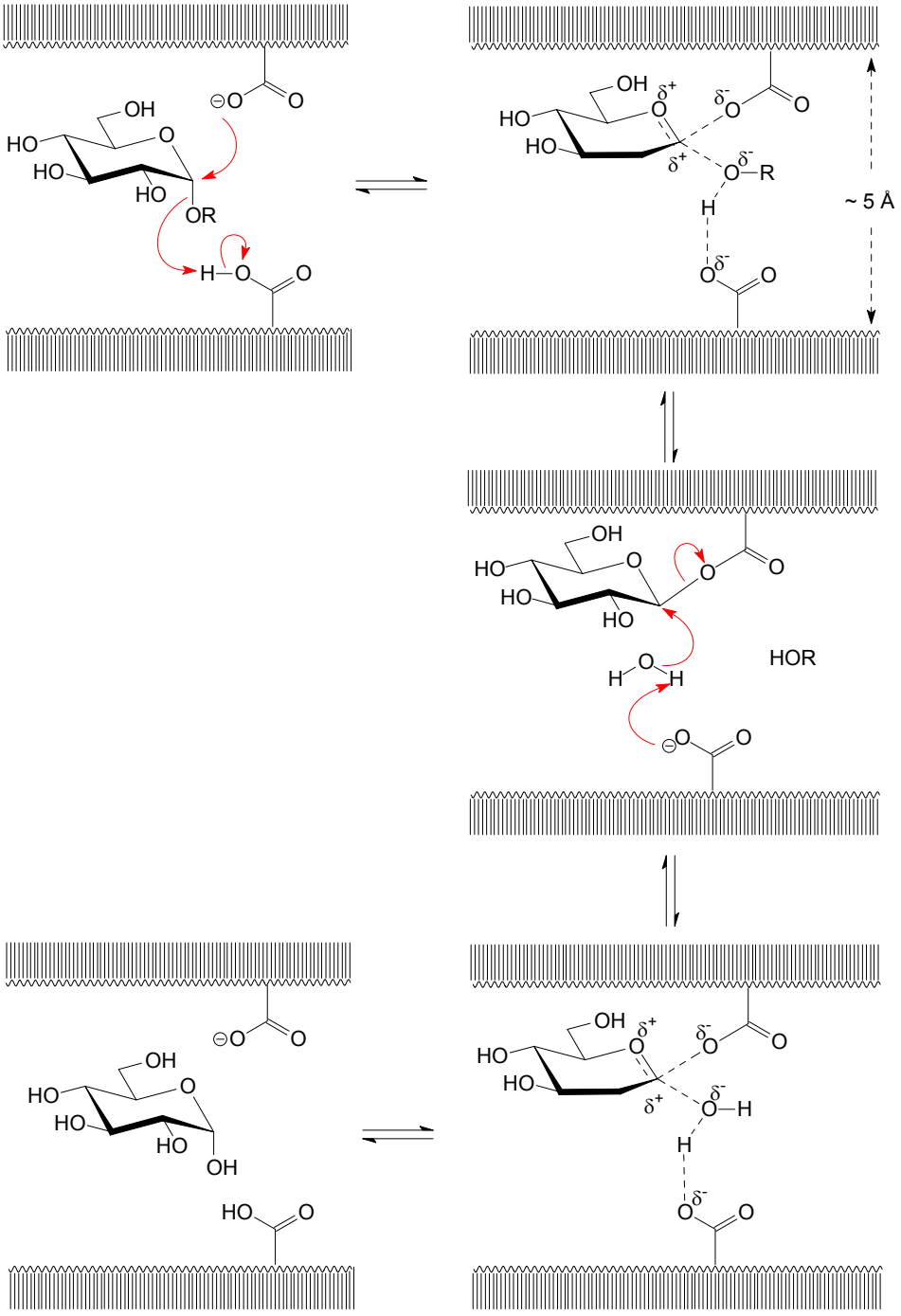


Abb. 2 Enzymatische Glycosidhydrolyse nach Phillips *et al.*

Zur Nutzung der Glycosidaseaktivität für Glycosidsynthesen sind zwei Prinzipien anwendbar (Abb. 3): bei der Reversen Hydrolyse wird unter den Bedingungen der thermodynamischen Kontrolle, die über die Temperatur oder die Akzeptorkonzentration gesteuert wird, das Reaktionsgleichgewicht maximal weit auf die Seite der Kondensationsprodukte verschoben.

Alternativ kann man sich der Transglycosylierung bedienen. Hierbei handelt es sich um eine kinetisch kontrollierte Reaktion, bei der ein aktivierter Glycosyldonor mit einer guten Austrittsgruppe unabdingbar ist.

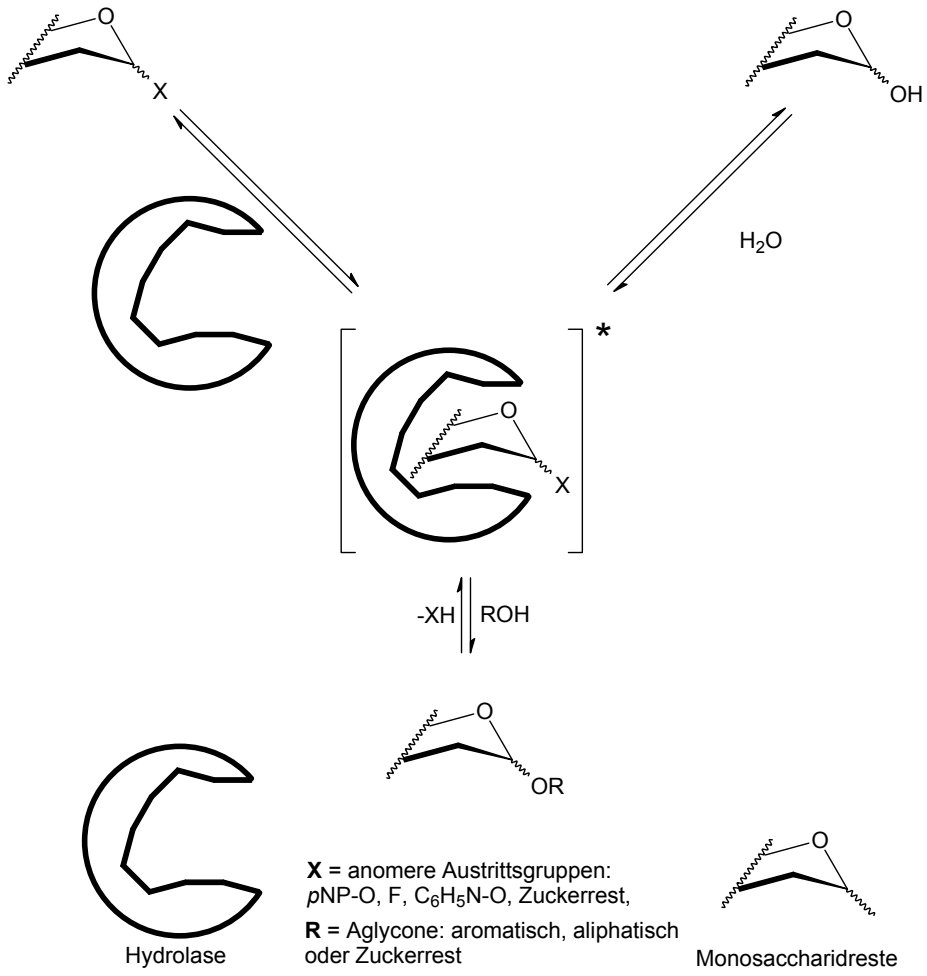


Abb. 3 Hydrolyse, Reverse Hydrolyse, Transglycosylierung

Der Donor wird bei Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes in die reaktive Spezies überführt, die wiederum nucleophil vom Akzeptorsubstrat angegriffen wird.

Glycosidasen haben den großen Vorteil, daß sie leicht handhabbar sind und im Gegensatz zu den Transferasen keine Kofaktoren brauchen. Sie besitzen eine gute bis sehr gute Regioselektivität, und die Kontrolle der absoluten Konfiguration der neu geknüpften Verbindung ist durch Wahl des spezifischen Enzyms (α- oder β-Glycosidase) möglich. Auch sind Glycosidasen relativ leicht zugänglich und

ausreichend stabil. Aktivierte Zuckereinheiten wie Glycosylfluoride oder Nitrophenylglycoside, sind kommerziell erhältlich oder können über eine geringe Zahl von Syntheseschritten erhalten werden. Ein zweifelsohne großer Nachteil ist die relativ geringe Ausbeute im Gegensatz zu Transferase-katalysierten Reaktionen. Allerdings lässt sich die Ausbeute häufig durch hohe Edukt-Konzentrationen erhöhen. Schwieriger gestaltet sich die Frage nach der Aufarbeitung des Produktgemisches. Wenn neben den Edukten auch noch Produkt-Isomere entstehen, ist häufig nur eine Trennung nach Polymerisationsgrad (DP) möglich. Die Trennung von Regioisomeren ist nur über aufwendige, chemische Stufen möglich und ist demzufolge kein adäquates Mittel für die Reindarstellung einer Zielverbindung. Vielmehr ist hier die Suche nach einer spezifischeren Glycosidase Erfolg versprechender.

Eine Notwendigkeit bei Transglycosylierungreaktionen ist die Minimierung der Hydrolyse. Hierzu bietet sich in einigen Fällen das Arbeiten mit organischen Cosolventien an. [20] Durch die limitierte Wasserlöslichkeit von Donorsystemen mit hydrophoben Abgangsgruppen wie *para*-Nitrophenol oder anderen, ähnlich strukturierten Spezies, bieten Cosolventien die Möglichkeit, einerseits die Donorkonzentration zu erhöhen und gleichzeitig die Konzentration an Hydrolyseprodukt zurückzudrängen, bei dem Wasser als Akzeptor fungiert. [21] Analoges gilt selbstverständlich auch für Akzeptor-Substrate die nicht oder nur äußerst schwer wasserlöslich sind (Terpenoide, Steroide). [22]

1.1.3 Saccharidderivate als Nahrungsmittel-Bestandteile

Der Einfluss von unverdaulichen Oligosacchariden auf die Mikroflora des Intestinaltraktes des Menschen und verschiedener Säugetiere wurde in zahlreichen Studien untersucht. [23] Diese Oligosaccharide sind im Allgemeinen aus Glucose, Galactose, oder Fructose-Monomeren aufgebaut. Nach diesen Untersuchungen zeigten bestimmte Oligosaccharide positive Effekte auf das Wachstum der erwünschten Bifidobakterien und eine Stärkung der Darmflora durch die Zurückdrängung pathogene Keime. Außerdem verringern bestimmte Oligosaccharide den pH-Wert im Darm durch eine Variation der Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Darmflora. [24,25] Modifizierte Nahrungsmittel, die unter Beimengung bestimmter, die Gesundheit fördernder Additive auf dem Markt sind

bezeichnet man als „functional food“. Lebensmittel unter dem Begriff „functional food“ bezeichnen eine Klasse, die nicht nur der Ernährung dient, sondern auch gesundheitsfördernde und im besten Fall auch therapeutische Eigenschaften hat. So werden z.B. Patienten, die unter einer starken Vermehrung von *Candida albicans* im Darm leiden, nicht nur mit fungiziden Medikamenten behandelt, sondern es wird auch eine gezielte Diät angesetzt, die präbiotisch wirksame Zusätze enthält. In den Kühlregalen der Supermärkte ist mittlerweile eine große Anzahl von Produkten vertreten, die mit präbiotischen Zusätzen versetzt sind.

Als präbiotisch werden Stoffe bezeichnet, die die für die Verdauung nützlichen Bakterien in ihrem Wachstum unterstützen. Zwei besonders bekannte Vertreter sind die Oligofructose und das Inulin. Für den Menschen sind sowohl die Oligofructose, als auch das Inulin unverdaulich.

Oligofructose: $2 \leq n \leq 6$ **1**

Inulin: $n \approx 30$ **2**

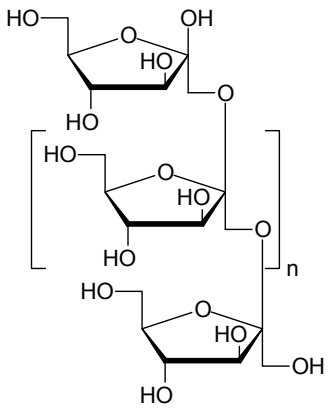


Abb. 4 Oligofructose und Inulin

Für die Bifidobakterien im Darm sind diese Stoffe aber eine Nährstoffquelle. Unter dem sensorischen Aspekt betrachtet, haben diese beiden Stoffe zusätzlich interessante Eigenschaften, da die Oligofructose leicht süßlich schmeckt. Noch interessanter ist Inulin, [26] das bei geringem Süßgeschmack, beim Einrühren in einen Joghurt ein Geschmacksgefühl entwickelt als esse man einen Sahnejoghurt selbst wenn es sich um einen Magermilchjoghurt handelt.

Ein weiterer Vorteil der präbiotischen Stoffe, ist daß sie dauerhaft die Darmflora positiv beeinflussen und daher nicht kontinuierlich über die Nahrung zugeführt werden müssen.

Aber auch mit anderen Zielsetzungen werden Kohlenhydratbestandteile in Lebensmitteln einer Veränderung unterzogen. Theoretisch wäre eine bessere Energiebilanz aus den für Menschen nicht verstoffwechselbaren Polysacchariden wie Cellulose durch eine enzymatische Vorbehandlung denkbar. Andererseits sind Substanzen, die süß schmecken, aber nicht kariogen sind, einen geringeren physiologischen Brennwert und eine ähnliche Süßkraft besitzen wie die klassische Saccharose, sehr weit verbreitet.

Als Referenz für Süßkraft dient eine Saccharose-Lösung. Hat eine Vergleichslösung mit einem anderen, süß schmeckenden Stoff bei halber Konzentration die gleiche Süßkraft, so ist seine eigene, spezifische Süßkraft doppelt so groß wie die von Saccharose.

Man unterscheidet zwischen Zuckeraustauschstoffen und Süßstoffen. Zuckeraustauschstoffe erreichen nicht ganz die Süßkraft der Saccharose. Hierzu zählen Stoffe wie Isomalt (Palatinit®), Mannit und Xylit. Sie werden im Gegensatz zu Saccharose und Glucose Insulin-unabhängig metabolisiert und sind deshalb für Diabetikerernährung indiziert.

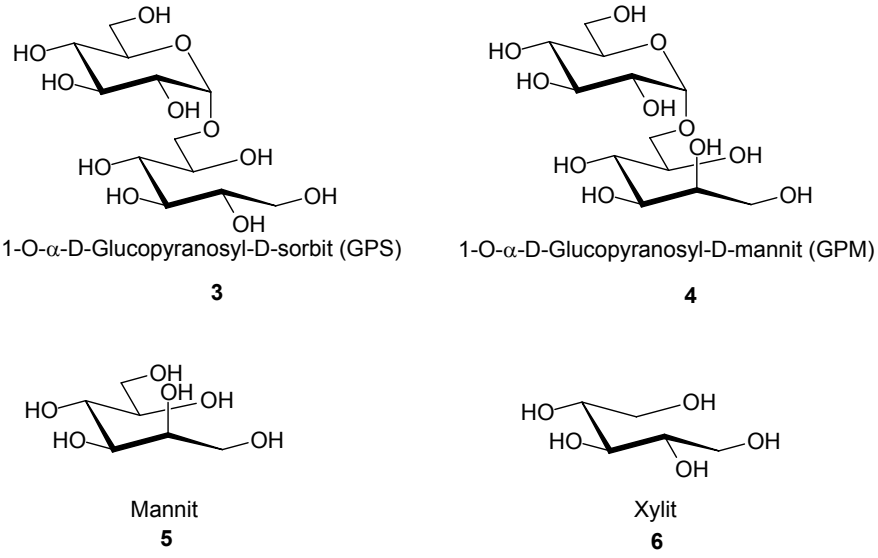
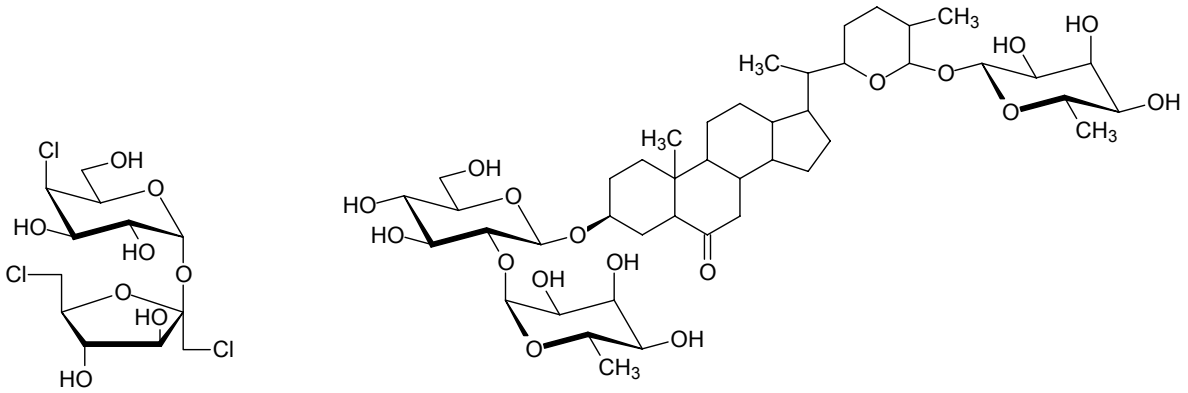


Abb. 5 Zuckeraustauschstoffe

Das Isomalt ist eine Mischung, die aus etwa gleichen Anteilen von 1-*O*-α-D-Glucopyranosyl-D-sorbit (GPS, Isomaltit) sowie 1-*O*-α-D-Glucopyranosyl-D-mannit (GPM) besteht. Isomalt findet als Zuckeraustauschstoff in Kaugummis, Karamell,

Marzipan und Nougat-Erzeugnissen Verwendung und ist deshalb eine Interessante Verbindung zur weiteren Derivatisierung.

Auf der anderen Seite gibt es Süßstoffe, die sehr hohe Süßkraft besitzen, wie etwa die Sucralose [1,6-Dichlor-1,6-didesoxy-β-D-fructofuranosyl)-4-chlor-4-desoxy-α-D-galactopyranosid], die 600mal süßer als Saccharose ist und durch kontrollierte Behandlung von Saccharose mit Sulfurylchlorid / Pyridin zugänglich ist. [27] Auf der anderen Seite stehen Naturstoffe wie das Osladin, welches einen natürlichen Süßstoff darstellt und aus dem Rhizom (einem Farn, *Polypodium vulgare*) gewonnen werden kann und sogar die 3000fache Süßkraft von Saccharose erreicht. [28]



Sucralose **7**

Osladin **8**

Abb. 6 Süßstoffe

Die beiden Süßstoffe **7** und **8** besitzen eine sehr große Süßkraft, sind jedoch in ihrem Metabolismus nicht ganz unbedenklich. Sucralose ist auf dem US-amerikanischen und kanadischen Markt bereits etabliert und hat auch durchaus positive Wirkung auf die Zahngesundheit, [29] jedoch ist eine Zulassung für das Osladin aufgrund seiner hämolytischen Wirkung eher unwahrscheinlich.

Das Feld der nicht kariogenen Zuckeraustauschstoffe und Süßstoffe hat bereits eine beachtliche Größe erreicht und stellt neben den präbiotischen Zusatzstoffen, einen großen Marktanteil an den so genannten „novel food“ Komponenten.

Aber auch gänzlich unverdauliche Zusatzstoffe wie z.B. die Polysaccharide Pektin, Alginat oder Carrageenan die aus verschiedenen Algenarten gewonnen werden

finden als Verdickungsmittel, Emulgatoren, Bierklärung (Fällung von Protein) und Geliermittel Verwendung. [30]

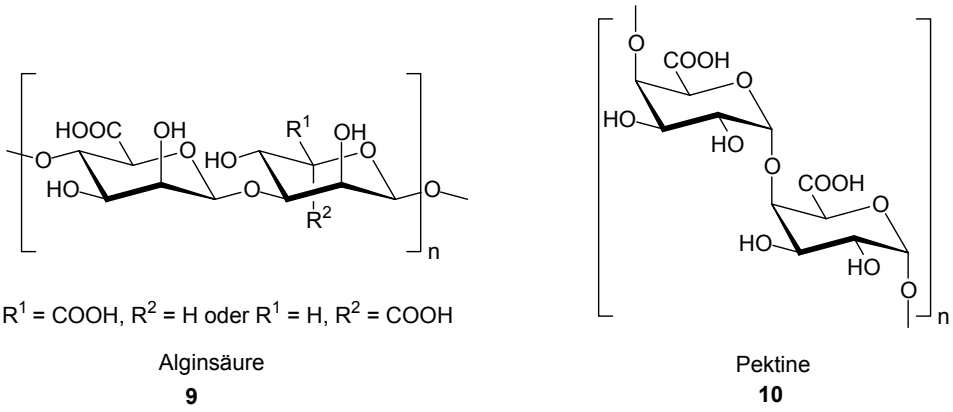


Abb. 7 Unverdauliche Zusatzstoffe aus Polysacchariden

Sie sind aber auch gerade wegen ihrer Quellfähigkeit als physiologisch nährwertarme Füllstoffe zur Unterstützung von Schlankheitskuren sehr gut geeignet und werden auch erfolgreich eingesetzt.

Gerade die sukzessiv auftretende Fehlernährung, die Zivilisationskrankheiten wie Adipositas, Verdauungsstörungen und nicht zuletzt Karies fördern, erzeugen auf der anderen Seite beim Verbraucher das Interesse an gesundheitsfördernden Nahrungsprodukten, die für die angesprochene Industrie einen sehr attraktiven und ökonomischen Sektor eröffnen.

1.2 Galactosidasen

In diesem Abschnitt werden die in der vorliegenden Arbeit zu diskutierenden Galactosidasen, Akzeptoren und Donoren, sowie das Potential der möglichen Produkte für Nahrungsmittelzusätze im Überblick diskutiert.

1.2.1 Eingesetzte Galactosidasen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transgalactosylierungen wurden sowohl mit α-Galactosidasen als auch mit β-Galactosidasen durchgeführt. Für die α-Glycosidsynthesen kamen Mutanten rekombinanter Enzyme (Synthasen) primär unbekannter Spezifität des Typs RAF-A sowie aGaB zum Einsatz. Bei Galactosidase aus RAF-A handelt es sich um einen Mutanten der Raffinase, die in der Zuckerindustrie eingesetzt wird. RAF-A ist ein Enzym, welches seine maximal Aktivität bei 37 °C erreicht. Bei der Galactosidase aGaB (*Bacillus stearothermophilus* KVE39) handelt es sich um ein thermophiles Enzym, dessen Aktivität bei 65 °C sein spezifisches Maximum erreicht. Bei der β-Glycosidsynthese kamen sowohl die bekannten β-Galactosidasen aus Rinderhoden (Bovine testes), *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* als auch die rekombinante β-Galactosidase BgLT unbekannter Spezifität aus *Thermus thermophilus* TH 125 zum Einsatz.

1.2.2 Spezifität der eingesetzten Galactosidasen im Überblick

Es wurden β-Hydrolasen bekannter Spezifität von Bovine testes, die selektiv β-(1→3) verknüpfte Strukturen bilden, sowie *Bac. circulans* die für β-(1→4) verknüpfte Spezies Präferenz zeigen und *Aspergillus oryzae* welche bevorzugt β-(1→6) galactosylierte Produkte generieren können eingesetzt.
Ein Kernpunkt dieser Arbeit ist die Aufklärung der Regiospezifität der diesbezüglich unbekannten Enzyme RAF-A, aGaB sowie BgLT. [31,32]

1.2.3 Eingesetzte Akzeptoren

Bei den eingesetzten Akzeptoren handelt es sich um Mono- und Disaccharide. Die dimeren Akzeptoren sind bereits Nahrungsmittelzusätze oder Intermediate in der Nahrungsmittelproduktion. Die eingesetzten Akzeptoren sind somit grundsätzlich lebensmitteltauglich und genügen GRAS (GRAS: „*g*eneral *r*egarded *a*s *s*afe). Diese

Akzeptoren sind: Saccharose (**11**), Isomalt (Palatinit®) (**12**), Isomaltulose (**13**). Ebenfalls wurden die α-Methylglycopyranoside der Glucose **14**, Galactose **15**, Mannose **16** sowie das Allyl-2-acetamido-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (**17**) eingesetzt (Abb. 8).

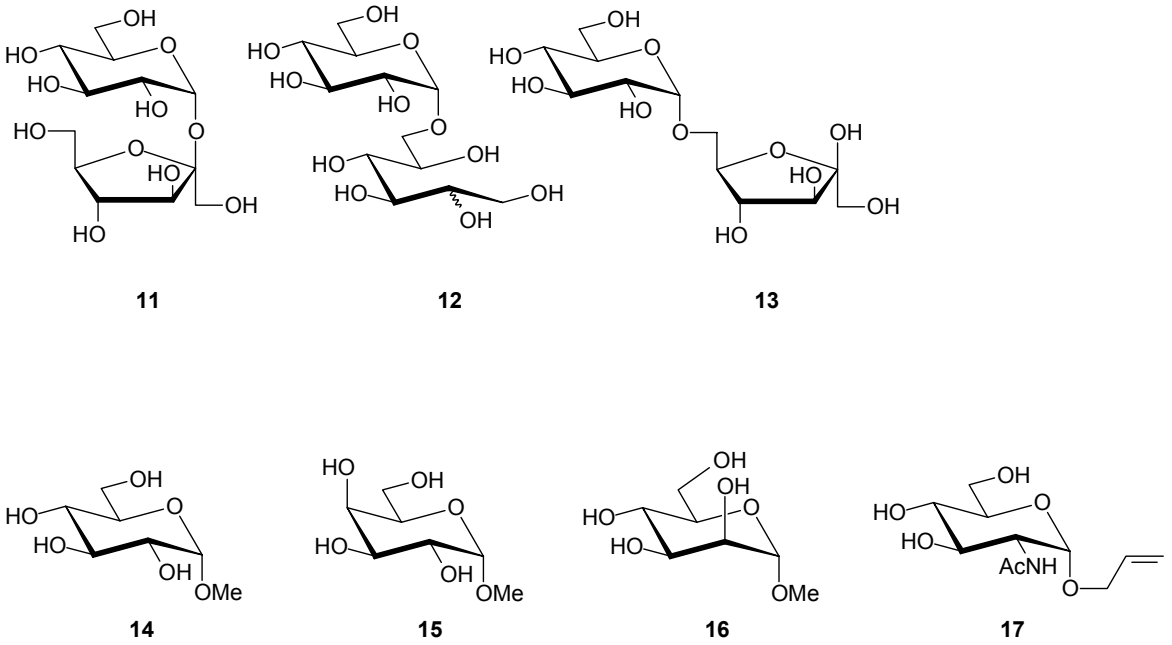


Abb. 8 Verwendete Akzeptorsubstrate

1.2.4 Eingesetzte Donoren

Neben den „natürlichen" Donoren Melibiose (**27**) für die α-Galactosidasen und Lactose (**28**) für die β-Galactosidasen kamen auch kommerziell erhältliche sowie synthetisch hergestellte Donoren zum Einsatz.

Es wird nicht der Anspruch erhoben, daß ein Teil der Donoren für die Produktion von Nahrungsmitteln geeignet ist. Vielmehr soll auch untersucht werden, welche Art von Donoren besonders leistungsfähig sind und sich somit eventuell für andere Produktsparten eignen.

Es handelt sich hierbei um verschiedene *para*-Nitrophenyl (*p*NP)-Derivate sowie Glycosylfluoride und 4-Pyridinol-Derivate (**18** – **26**).

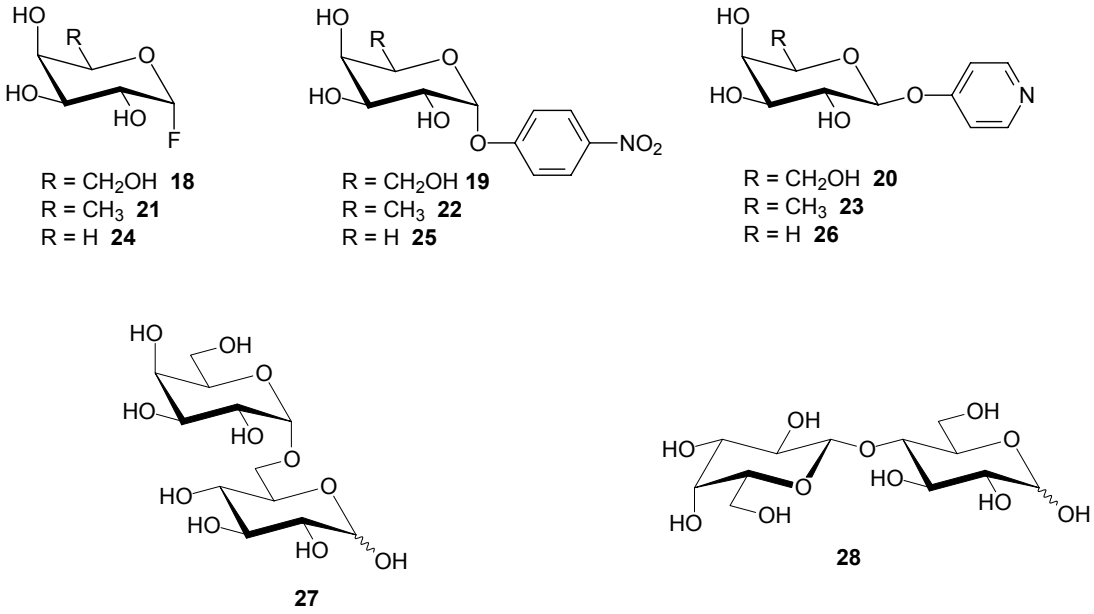


Abb. 9 Verwendete Donorsubstrate für α- und β-Hydrolasen

In der Hinsicht auf eine spätere Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie kommt den Donoren, die keine toxischen Austrittsgruppen besitzen, eine große Bedeutung zu. Neben den natürlichen Donoren Melibiose und Lactose, kann man auch die Fluorid-Derivate als tauglich für Nahrungsmittel ansehen, weil sich das frei werdende Fluorid mit Calciumionen relativ leicht aus dem Reaktionsansatz entfernen läßt.

1.2.5 Nahrungsmittelzusätze durch enzymatische Galactosylierung

Die Galactooligosaccharide stellen bei der Sondierung präbiotischer Nahrungsmittelzusätze besonders interessante Spezies dar, [33,34] nachdem gefunden worden war, dass die Galactooligosaccharide das Wachstum der Bifidobakterien in ganz besonderem Maße unterstützen und fördern. [35,36,37,38] Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich zweifelsohne ein großes Potential solcher Galactooligosaccharide ableiten, die schon auf Nahrungsmittel Kohlenhydraten basieren. Damit dürften zahlreiche bereits existenten Mono-, Di- und Trisaccharide durch eine selektive Galactosylierung, eine potentielle Aufwertung bezüglich ihrer präbiotischen Eigenschaften erfahren. [39,40,41]

Auf dem Wege zu den besagten Produkten, stellt sich die Frage nach dem Vorgehen, um die gewünschten Zielsubstanzen zu erreichen. Bei der Zielsetzung, für

Nahrungsmittel brauchbare Substanzen zu gewinnen, wird der Synthesemethodik eine besondere Fokussierung zuteil. Eine klassisch organisch-chemische Galactosylierung scheidet wegen der großen Anzahl und der Komplexität der Reaktionsschritte aus, zumal die Toxizität der eingesetzten Substanzen (Solventien, Katalysatoren, Derivate) selbst wenn sie nur in Spuren vorhanden sein sollten, den gesundheitlichen Nutzen der Zielverbindung in Frage stellen würden.

Aus dem vorher angeführten Gründen ist eine enzymatische Synthese das Mittel der Wahl, da in vergangenen Jahren Synthesestrategien unter Verwendung von Enzymen etabliert wurden. [42,43,44,45] Bei der Beurteilung der vorliegenden Möglichkeiten —Einsatz von Galactosyltransferasen oder Galactosylhydrolasen— scheiden die Transferasen allein schon wegen der hohen Kosten aus. So sind die Galactosylhydrolasen, sofern sie Transferaseeigenschaften zeigen, [46] gerade im Hinblick auf eine spätere industrielle Anwendung die Enzyme der Wahl.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

In den vergangen Jahren haben Nahrungsmittelzusätze, angelsächsisch „food-additives“ und „food-supplements“, die durch ihre spezifischen Charakteristika die Eigenschaften des Nahrungsmittels dem sie zugesetzt sind entscheidend verbessern sollen, erheblich an Bedeutung gewonnen. Die Eigenschaften dieser Stoffe sind sehr vielfältig, und reichen von sensorische Verbesserungen der Produkte bis hin zu gesundheitsfördernden Funktionen.

Gerade auf dem Gebiet der „functional-food“ Produkte, also solchen die gesundheitsfördernd sind, gab es einige interessante und neue Produkte. Im Speziellen seien hier Eigenschaften wie bifidogen, präbiotisch und anti-kariogen angemerkt. Besonders bekannt in diesem Kontext sind Stoffe wie die Oligofructose und das Inulin.

Präbiotisch wirksame Oligosaccharide bestehen im Allgemeinen aus Glucose-, Galactose- und Fructoseeinheiten. Ihre Besonderheit zeichnet sich in der Variation der glycosidischen Bindungen aus, die nicht durch intestinale Enzyme gespalten werden können (im Gegensatz zu Oligosacchariden wie zum Beispiel Stärke), und die somit als Nahrungsmittel für die Darmbakterien dienen können. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Untersuchung neuer Enzyme bezüglich ihrer Regiospezifität und der anschließenden enzymatischen Synthese von neuen Oligosacchariden, die auf Kohlenhydraten basieren, die bereits in Lebensmitteln Verwendung finden. Zu untersuchen sind α-Galactosidasen wie RAF-A und aGaB, sowie β-Galactosidasen aus BgLT hinsichtlich Ihrer Regiospezifität. Darüberhinaus werden auch β-Galactosidasen aus Rinderhoden (Bovine testes), *Bacillus circulans* und *Aspergillus oryzae* eingesetzt, die bezüglich ihrer Regiospezifität bekannt sind. Mit diesen Galactosidasen sollen sowohl neue Kohlenhydrate synthetisiert, als auch bekannte Synthesen optimiert und upscaling (Ansatzvergrößerung) betrieben werden.

Ein weiterer Punkt betrifft die Synthese und Verwendung neuer Donoren, die die natürlichen Donoren (Lactose, Melibiose) als mögliche Alternativen ergänzen. Im Zentrum stehen hier vor allem die α-Galactosylfluoride, aber auch *para*-Nitrophenyl-glycoside und β-Pyridinylgalactoside sollen bezüglich ihres Donorpotentials untersucht werden

3. Synthese von D-Galacto-, D-Fuco-, und L-Arabino-pyranosyldonoren

In diesem Kapitel wird die Darstellung verschiedener α- und β-konfigurierter Donorsubstrate beschrieben.

3.1 Synthese verschiedener Glycosylfluoride

In diesem Abschnitt wird die Synthese sowie die verschiedenen Aspekte beim Einsatz der Glycosylfluoriddonoren erörtert

Neben den verbreitet eingesetzten *para*-Nitrophenylglycosiden kommt den Glycosylfluoriden ein stetig steigendes Interesse zu.

Gerade wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit im Gegensatz zu den *para*-Nitrophenylglycosiden und nicht zuletzt wegen der hinreichenden Stabilität in wässriger Lösung und der guten Fluorid-Abgangsgruppe sind sie geeignete Donorsubstrate.

Einzig die ursprüngliche Synthesemethode der Fluoride, die durch Einwirken von wasserfreiem Fluorwasserstoff [47] auf den jeweiligen acetylierten Zucker bestand, barg ein nicht unerhebliches Risiko. Mittlerweile wurde diese Methode durch den Einsatz von HF / Pyridin-Lösungen substituiert. [48] (Abb. 10) Ein alternatives Reagenz zur Darstellung von Glycosylfluoriden stellt DAST (Dimethylamino-schwefeltrifluourid) dar [49]. Aber auch durch Behandlung von Glycosylbromiden oder Chloriden mit Silbertetrafluoroboraten sind Glycosylfluoride zugänglich. [50]

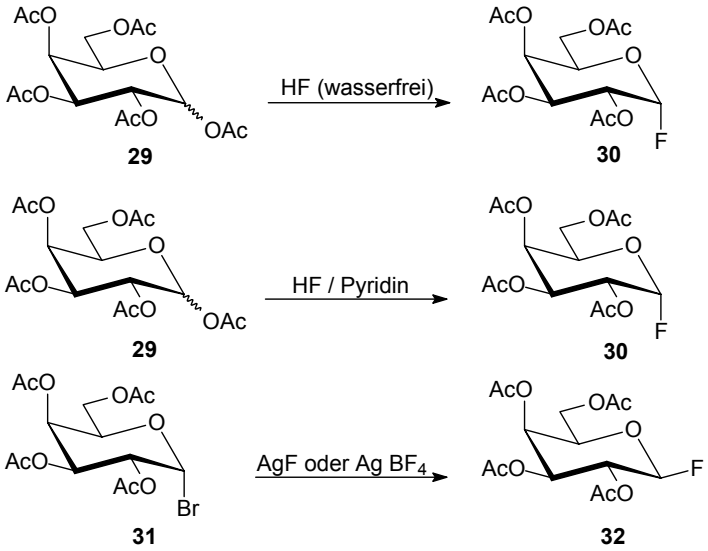


Abb. 10 Unterschiedliche Methoden der Galactosylfluoridsynthese

Unter Einsatz von HF / Pyridin bildet sich das thermodynamisch stabile Produkt, welches im Fall von D-Hexopyranosen das α-Anomer ist. [50]
Glycosylfluoride sind reaktive Spezies, dies gilt besonders wenn sie an ein aktives Zentrum in einem Enzym gebunden werden. Das „kleine“ Fluorid (Tab. 1) ist vergleichbar in seinem sterischen Anspruch mit einer Hydroxylgruppe. [51,52]

Element	Bindungslänge C-X [Å]	van der Waals Radius [Å]
H	1.09	1.20
O	1.43	1.40
F	1.37 – 1.42	1.35

Tabelle 1 Bindungslängen und van der Waals Radii ausgewählter Elemente [51,53]

Die Glycosylfluoride sind die einzigen Glycosylhalogenide, die stabil genug sind, entschützt in Wasser gelöst zu werden, ohne daß ein nennenswerter Teil spontan hydrolysiert. Für eine längere Lagerung ist es am Besten, die Fluoride als per-*O*-acetylierte Verbindung zu deponieren.

α-Fluoride sind in wässriger Lösung über Tage stabil, besonders bei niedrigen Temperaturen. β-Fluoride hingegen sind weniger stabil, das gilt ganz besonders für die der Galactose.
Untersuchungen haben gezeigt, daß beispielsweise das β-D-Glucopyranosylfluorid in einer 1M $NaClO_4$-Lösung bei 50 °C, eine vierzigfach höhere Hydrolyse als das α-Anomer zeigt. [54] Ebenso hat die Wahl des Puffers einen großen Einfluss auf die Stabilität der Fluoride. Genannt seinen an dieser Stelle stark basische und saure Puffer, welche merklich die spontane Hydrolyse beschleunigen. [55]
Glycosylfluoride sind aber aufgrund folgender Eigenschaften von ganz besonderer Bedeutung: Zum einen benötigen sie keine saure Katalyse [56] und zum anderen sind Fluoride in wässriger Lösung bereits aktivierte Nucleophile. [57] Diese beiden Erkenntnisse waren der Grund für weitergehende Untersuchungen. Hierbei wurden verschiedene Glycosidasemutanten, die sich in geringem Maße in ihrer spezifischen Aminosäuresequenz unterschieden, mit Glycosylfluoriden umgesetzt. [58] Im Mittelpunkt stand hier die Untersuchung des Hydrolyseverhaltens der Mutanten gegenüber einfachen *O*-Glycosiden, die eine saure Katalyse benötigen und Glycosylfluoriden die keine saure Katalyse benötigen, zu untersuchen. Findet ein Aktivitätsverlust zu Ungunsten des Substrats, welches saure Katalyse benötigt statt, so wird auf der anderen Seite der Glycosyltransfer für nicht sauer katalysierten (z.B. Glycosylfluoride) Substrattransfer verbessert. [59,60]

Für die Wahl von Fluorid-Donoren in der enzymatischen Synthese sprechen mehrere Faktoren. Glycosylfluoride sind verhältnismäßig leicht darzustellen gut wasserlöslich und sind im Gegensatz zu den oft verwendeten *para*-Nitrophenylglycosiden toxikologisch weit weniger bedenklich. Bei der Darstellung der Fluoride wurde zunächst auf eine literaturbekannte Synthese zurückgegriffen (Abb. 11). Hierbei wird das peracetylierte α-D-Galactopyranosylchlorid mit Silbertetrafluoroborat in trockenem Diethylether mit HF / Pyridin, zum das Tetra-*O*-acetyl-α-fluorid der Galactose **30** umgesetzt. [61] Leider konnten nur sehr geringe Ausbeuten von 41 % auf der vorletzten Stufe erreicht werden.

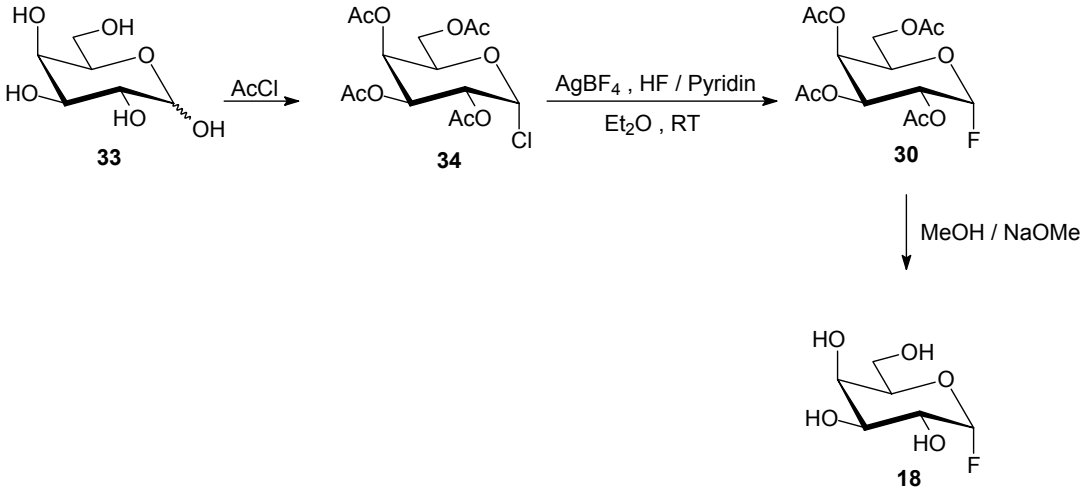


Abb. 11 Ein möglicher Syntheseweg zur Darstellung von α-Galactopyranosylfluorid

Dieser Syntheseweg ist wegen der Gesamtausbeute über drei Stufen nicht der günstigste. Somit schied auch der Weg über das α-Bromid aus, da hier ähnliche Unwegsamkeiten in Aussicht standen. [62] Um das Schutzgruppen-freie Fluorid **18** in guten Ausbeuten zu erhalten und unter Umgehung labiler Zwischenprodukte, wird auf eine Methode von Sharma und Eby zurückgegriffen. [63] Die vorangehende Acetylierung der Galactose sollte mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat erfolgen, da hier nach Kristallisation ausschließlich das β-Acetat erhalten wird, was sich wiederum im weiteren Vorgehen positiv auf die Gesamtausbeute des α-Fluorids auswirkt. Allerdings wird auch die ursprüngliche Methode variiert, in der die per-*O*-actylierte Verbindung in Methylenchlorid / Toluol gelöst und erst im Anschluss mit der HF / Pyridin Lösung versetzt wird. Vielmehr wird das Edukt direkt in dem Fluorierungsmittel gelöst und 3 h bei Raumtemperatur unter Luftausschluss gerührt (Abb. 11). Dieses Vorgehen führt zu besseren Ausbeuten, die circa 10 - 15 % über denen der ursprünglichen Methode liegen.

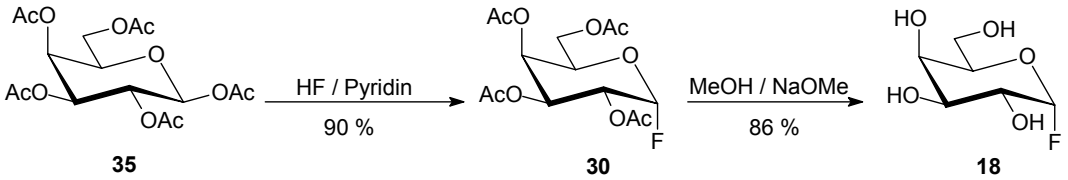


Abb. 12 Effizienteste Methode der α-Galactosylfluorid-Synthese

Das per-*O*-acetylierte Fluorid **30** konnte bei Einsatz der eigenen Methode in sehr guten Ausbeuten von 90 % isoliert werden. Es wurde ausschließlich das thermodynamisch bevorzugte α-Fluorid erhalten. Signifikant ist das Aufspaltungsmuster der H-1 und H-2 Protonen der fluorierten Verbindung, mit einer charakteristischen $^{2}J_{H\text{-}F}$-Kopplung von ca. 55 Hz bzw. einer $^{3}J_{H\text{-}F}$-Kopplung von ca. 24 Hz. [64]

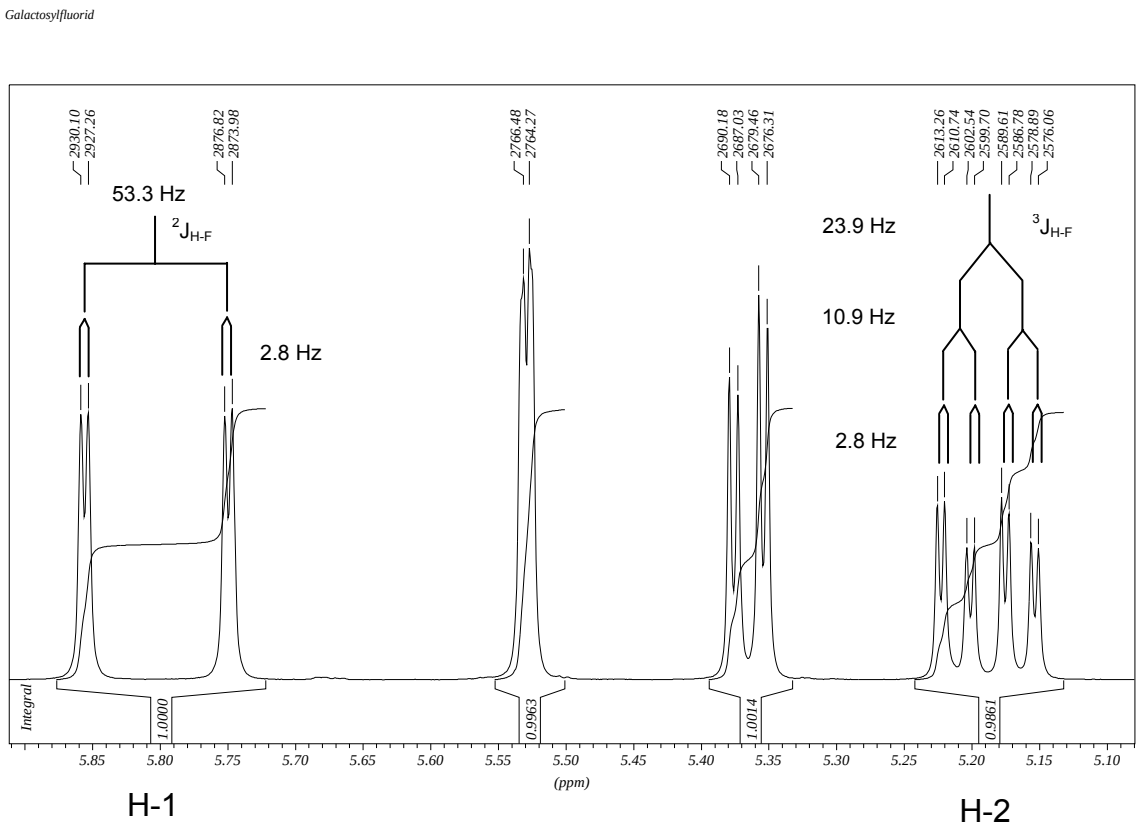


Abb. 13 Ausschnitt aus dem ^{1}H-NMR des per-*O*-acetylierten α-Galactosylfluorids **30**

Auf dem gleichen Wege sind auch die Fluoride der D-Fucose **21** als 6-Desoxy Analogon der D-Galactose, sowie auch der L-Arabinose **24** als Pentose-Analogon der D-Fucose respektive D-Galactose zugänglich.

Auch bei diesen Synthesen wird ausschließlich das thermodynamisch stabilisierte Produkt in Form des per-*O*-acetylierten α-Fucosylfluorids **37** beziehungsweise β-Arabinosylfluorids **39** in Ausbeuten von 69 % beziehungsweise 67 % erhalten. (Abb. 14)

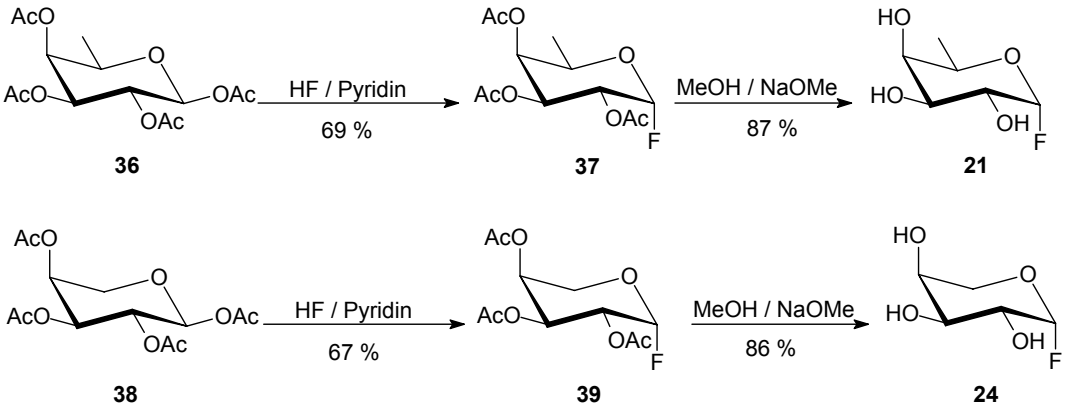


Abb. 14 Synthese des D-Fucosyl- **21** bzw. L-Arabinosylfluorids **24**.

Die Deacetylierung der Fluoride wird für alle per-*O*-acetylierten Glycosylfluoride in methanolischer Methanolat-Lösung bei pH = 8 mit Ausbeuten von 86 – 89 % durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass die nach der Deacetylierung resultierenden, sehr festen, amorphen, farblosen Feststoffe sich wesentlich besser handhaben lassen, wenn sie kurz in kaltem Wasser aufgenommen und abschließend lyophilisiert werden.

Die ungeschützten Glycosylfluoride sind unter Feuchtigkeitsausschluss bei -20 °C einige Wochen haltbar. Sicherer ist die Lagerung der acetylierten Fluoride, die je nach Bedarf in kleineren Mengen deacetyliert werden sollten.

3.2 Synthese verschiedener *para*-Nitrophenyl-Donoren

Nitrophenylglycoside werden in der enzymatischen Synthese häufig eingesetzt. Allerdings sind *p*NP-Glycoside relativ schlecht wasserlöslich, und das freiwerdende *para*-Nitrophenol ist vom Produktgemisch nach erfolgter enzymatischer Reaktion nur durch Extraktion mit Essigester abtrennbar. Vor allem ist die Toxizität der Austrittsgruppe mit dem Ziel, die dargestellten Strukturen für Nahrungsmittel zugänglich zu machen, nur bedingt vereinbar.

Allerdings steht dem gegenüber, dass das *para*-Nitrophenylaglycon eine sehr gute Austrittsgruppe darstellt und *p*NP-Glycoside bei vielen Hydrolasen-vermittelten Reaktionen, gute bis sehr gute Ausbeuten aufweisen. Weiterhin lässt sich die betreffende Reaktion durch die intensive Farbe des freiwerdenden *para*-Nitrophenols

photometrisch gut verfolgen, um so bei Bedarf essentielle Rückschlüsse auf die Kinetik der Reaktion zuzulassen.

Somit sind die *para*-Nitrophenylglycoside wertvolle Donorsubstrate bei der Untersuchung neuer Hydrolasen und deren Donorspezifität. Das α-pNP-Galactosid (**19**) ist kommerziell verfügbar, allerdings relativ teuer. Somit stellte sich die Frage nach einer möglichst schnellen und preiswerten Synthese.

Das α-*p*NP-Anomer ist aus dem peracetylierten Glycosylhalogenid nicht durch Phasentransferkatalyse [65] oder Koenigs-Knorr Reaktion [66] zugänglich ist, da diese Reaktionstypen ausschließlich das kinetisch begünstigte β-Produkt bilden. Da auch eine Fischer-Glycosylierung bisher nicht zur Lösung des Problems beitragen konnte, scheint die Trichloracetimidat-Methode nach R.R. Schmidt et al. viel versprechend. [67] Als wichtig bleibt noch zu erwähnen, daß die angestrebten 1,2-*cis*-Glycoside ausschließlich durch Einsatz nicht nachbargruppenaktiver Substituenten wie z.B. Benzylgruppen erreicht werden können. Im Falle von Nachbargruppen mit einer Acylgruppe werden 1,2-*trans*-Produkte gebildet.

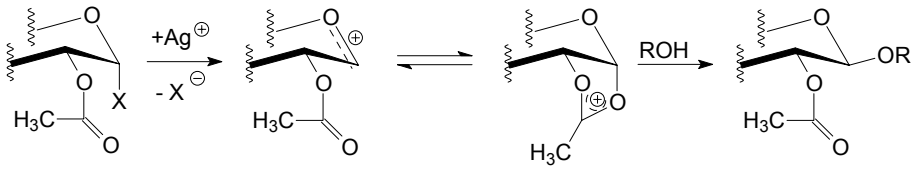


Abb. 15 Mechanismus der Koenigs-Knorr-Reaktion unter Beteiligung eines nachbargruppenaktiven Substituenten

Für die erste Synthesesequenz wird die Trichloracetimidat-Methode nach R. R. Schmidt angewandt um das α-*p*NP-Galactosid zu synthetisieren. Durch den Einsatz unterschiedlich starker Basen lassen sich selektiv α- oder β-Imidate herstellen. [68] Das thermodynamisch begünstigte α-Imidat lässt sich unter Verwendung starker Basen wie Natriumhydrid oder 1,8 Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) darstellen, während sich das für den vorliegenden Fall benötigte β-Imidat durch die schwache Base Kaliumcarbonat unter kinetischer Reaktionskontrolle formiert.

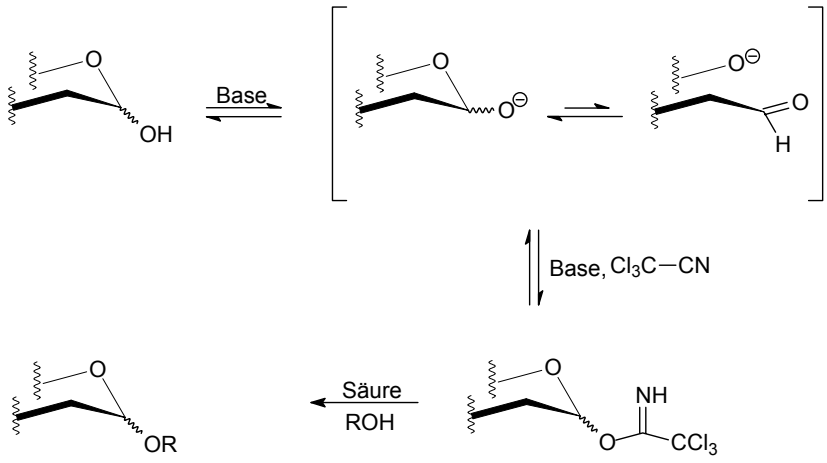


Abb. 16 Prinzipieller mechanistischer Ablauf der Trichloracetimidat-Methode

Um die 1-Position der Galactose zu einem späteren Zeitpunkt für die Trichloracetimidat-Gruppe frei zu bekommen war es notwendig, ein temporäres Glycosid zu synthetisieren. Diese sollte hinreichend robust sein und eine anschließende Benzylierung mit Natriumhydrid überstehen, und sich dann milde entfernen zu lassen. So fiel die Wahl auf das Allylglycosid **40** welches durch Lösen der Galactose **33** in Allylalkohol unter Zugabe von katalytischen Mengen BF_3*Et_2O und anschließendem Refluxieren bei 120 °C für 2 Stunden mit 81 % Ausbeute zugänglich ist. [69,70] (Abb. 17)

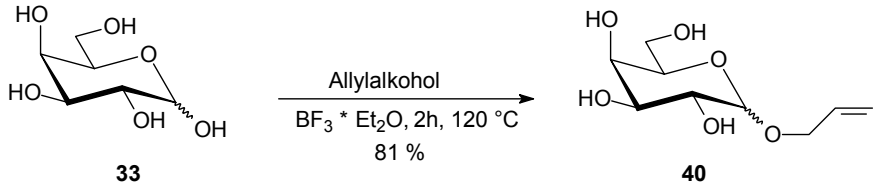


Abb. 17 Allylgalactosidsynthese

Im weiteren Verlauf wird das erhaltene Allylgalactosid **40** in DMF mit Natriumhydrid und Benzylchlorid in Ausbeuten von 63 % perbenzyliert. Um schließlich das Allyl-Aglycon abzuspalten, wird das Edukt **41** im ersten Schritt in DMSO gelöst und mit Kalium-*tert*-butylat versetzt wobei eine Allyl-Propenylumlagerung auftritt. Im zweiten Schritt wird mit HCl in Aceton zum 1-OH freien 2,3,4,6 Tetra-*O*-benzylgalactosid **42** mit 45 % Ausbeute umgesetzt. [71]

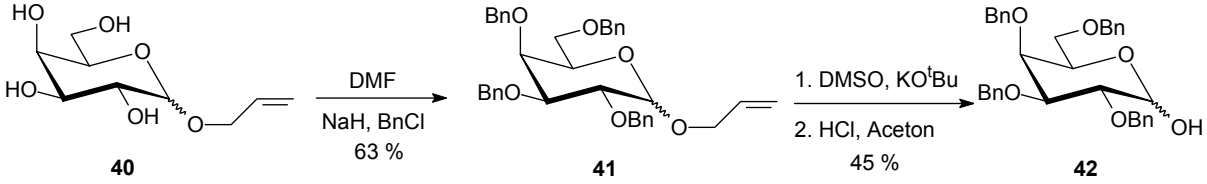


Abb. 18 Darstellung des 1-OH freien Tetra-*O*-benzylgalactosids **42**

Die so erhaltene tetra-*O*-benzylierte Galactose **42** mit freier anomerer OH-Gruppe wird mit Kaliumcarbonat und Trichloracetonitril in absolutem Methylenchlorid unter Argon über 2 Stunden zum β-Trichloracetimidat **43** in Ausbeuten von 56 % umgesetzt. [67] Hilfreich bei der Aufarbeitung des Imidats **43** ist, daß das erstrebte β-Produkt ausgezeichnet aus Diethylether / Pentan kristallisiert. Diese Tatsache macht somit eine unter Umständen diffizile Trennung des empfindlichen Imidats vom in geringen Mengen parallel entstandenen α-Produkt **44** überflüssig.

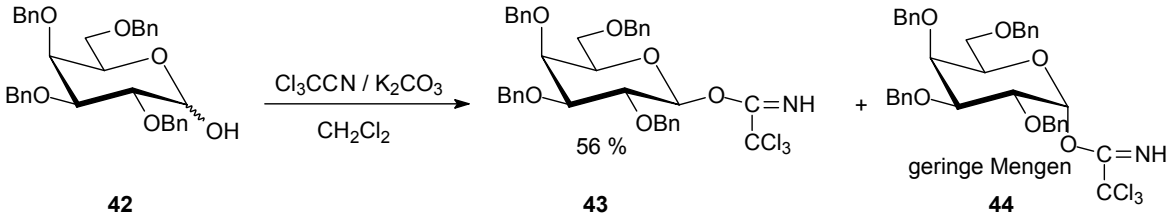


Abb. 19 Trichloracetimidatsynthese mit nachbargruppeninaktiven Substituenten

In der Folge wird das β-Imidat **43** mit TMS-Triflat und *para*-Nitrophenol mit 75 % zum gewünschten, perbenzylierten α-pNP-Galactosid **44** umgesetzt, [72] welches nach Abspaltung der Benzylgruppen mit Pd / C und Wasserstoff das α-*p*NP-Galactosid **19** mit 85 % Ausbeute ergibt. [73,74]

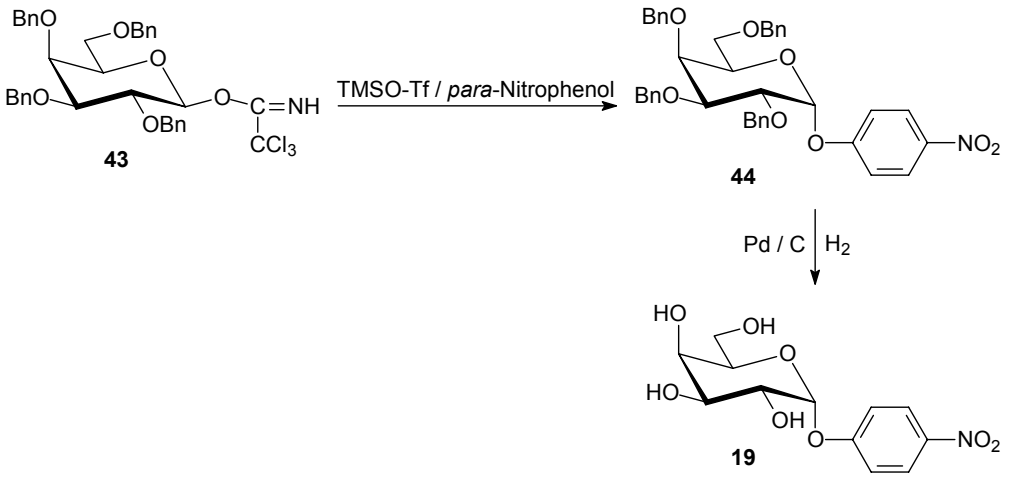


Abb. 20 Synthese des α-*p*NP-Galactosids **19**

Das auf diesem Wege erhaltene *p*NP-Galactosid **19** lässt sich hervorragend als Donorsubstrat für α-Hydrolasen verwenden. Auf dem gleichen Weg sind sicher auch *p*NP-D-Fuco- und *p*NP-L-Arabinoglycoside zugänglich. Allerdings ist der gesamte Syntheseweg aufwendig und führt über die fünf Stufen nur zu einer Gesamtausbeute von ca. 15 %.

Da die Ausbeute von 15 % über fünf Stufen nicht zufrieden stellend war, wurde nach einem einfacheren und schnelleren Weg gesucht, die gewünschten α-*p*NP-Glycoside zugänglich zu machen.

Es bedarf grundsätzlich der thermodynamischen Reaktionskontrolle um α-Glycoside zu synthetisieren. Dies führte schließlich zu der Idee, auf eine andere literaturbekannte Methode zurückzureifen. Beschrieben ist die Umsetzung der, per-*O*-acetylierten Galactose mit *para*-Nitrophenol in Gegenwart eines Überschusses an Bortrifluorid-Etherat [75] oder Zinntetrachlorid [76] wobei hauptsächlich das α-*p*NP-Galactosid entsteht. Diese Methode konnte erfolgreich auf die Acetate der D-Fucose und L-Arabinose übertragen werden. (Abb. 21)

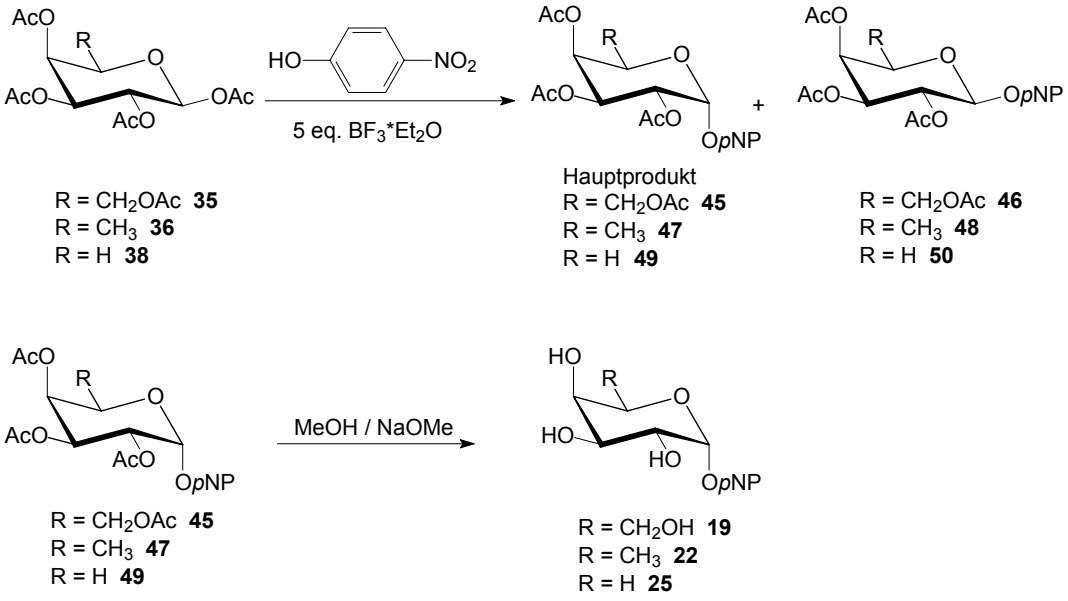


Abb. 21 Ausbeuteoptimierte Synthese der *p*NP-Glycoside

Die im Unterschuss entstehenden Nebenprodukte lassen sich chromatographisch an Kieselgel vom Hauptprodukt separieren. Nach erfolgter Trennung des Anomerengemisches werden nach Deacetylierung die *para*-Nitrophenylglycoside der D-Galactose **19**, D-Fucose **22** sowie L-Arabinose **25** erhalten.

Diese letztere Methode ist erstaunlich simpel und bis auf das Hindernis der Anomerentrennung nützlich, um schnell und preiswert α-*p*NP-Glycoside zugänglich zu machen.

3.3 Synthesen verschiedener *para*-Hydroxypyridinyl-Donoren

Auf der Suche nach neuen Donorsubstraten für Hydrolasen gehören Faktoren wie gute Transfereigenschaften und gute Wasserlöslichkeit zu den bedeutenden Eigenschaften. Aus diesem Grund fiel ein Augenmerk auf die *p*-Hydroxypyridinylglycoside, weil die Hydroxypyridinyl-Gruppe bessere Wasserlöslichkeit als die para-Nitrophenyl-Gruppe aufweist und Fukase *et al.* bereits 1999 zeigten, dass das 3-Nitro-2-pyridinyl-galactosid (**50**) gute Donoreigenschaften besitzt. [77]

In Anknüpfung an diese Ergebnisse war es interessant zu untersuchen, ob die guten Donoreigenschaften des Pyridinols erhalten bleiben, wenn die Nitrogruppe unterschlagen wird. Ziel war, sowohl das α- als auch das β-Anomer zugänglich zu machen. (Abb. 22)

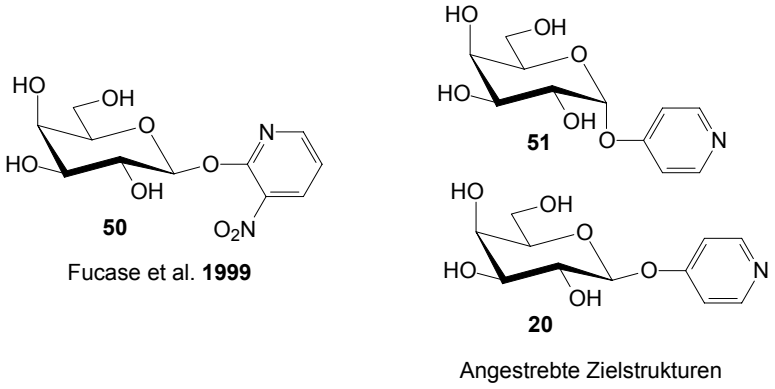


Abb. 22 Pyridinyl-Zielstrukturen

Beabsichtigt war zunächst die Synthese des α-Glycosids **51**, was sich allerdings als schwierig herausstellte. Im Gegensatz zu den Galacto- **19**, respektive Fuco- **22** und Arabinosyl-*para*-nitrophenylglycosiden **25** stellte sich der basische Pyridin-Stickstoff bei der Synthese der Pyridinylglycoside als Hindernis heraus, weil Säure-Katalyse nicht möglich war. Unter keinen der unter Abb. 23 aufgezeigten Reaktionsbedingungen gelang die Herstellung des α-Hydroxypyridinylgalactosids **51**. Dabei war es irrelevant, ob es sich bei dem Edukt um eine Acetyl-, Benzyl-, oder OH-freie Galactosylspezies handelte.

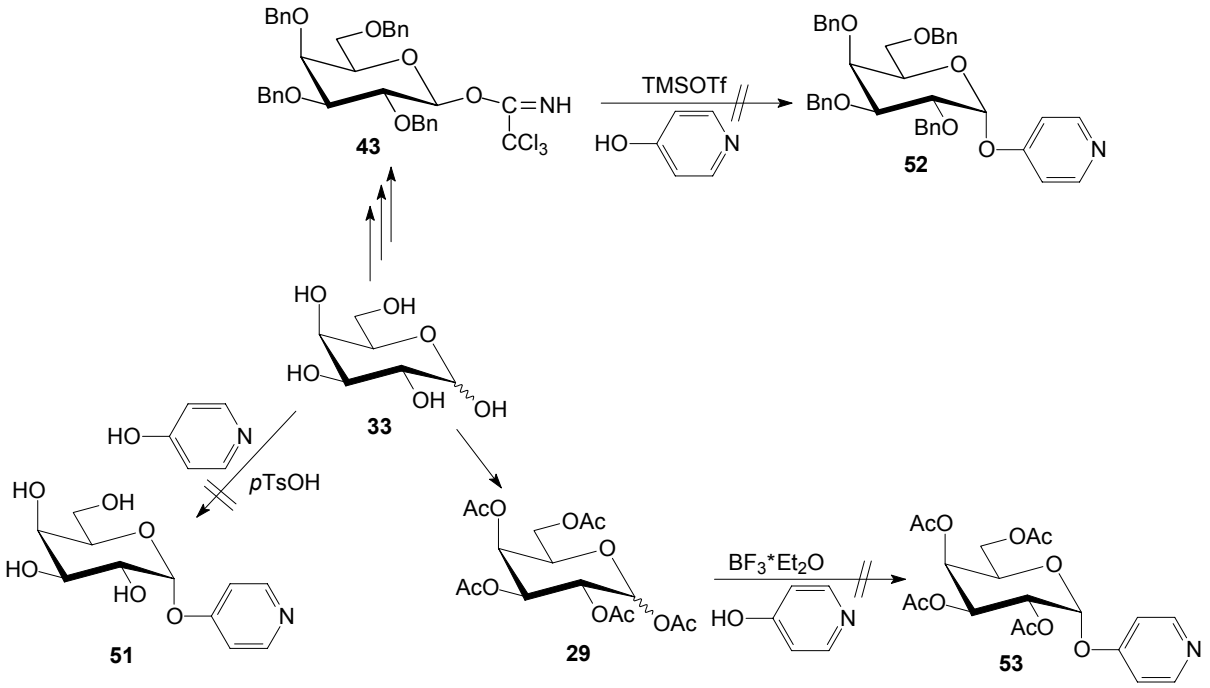


Abb. 23 Versuche zur Synthese von α-Pyridinylgalactosid

Weiterhin war es nicht von Belang, ob die jeweilige spezifische Lewis- respektive Brønstedt-Säure in katalytischen Mengen, in äquivalenten Mengen oder gar im Überschuss der Reaktionsmischung zugefügt wurde. Es war unter diesen Bedingungen nicht möglich, die Zielverbindung zu erreichen.

Aufgrund der Unwegsamkeiten des α-Syntheseweges wurden Aktivitäten zur Darstellung des β-Analogon begonnen, von dem aus eine Anomerenumwandlung in das α-Anomers möglich sein könnte. Bei der Synthese des β-Hydroxypyridinylgalactosids **20** wurde eine Koenigs-Knorr Variante des von Fucase *et al.* beschriebenen Wegs zu Nitropyridinylglycosiden angewandt. [77] Hierbei wird aus der Galactose **33** zuerst die α-Acetobromgalactose **31** mit 52 % Ausbeute synthetisiert. Im Anschluss wird 4-Hydroxypyridin aus alkalischer Lösung mit $AgNO_3$ als Silbersalz **55** gefällt. Nach Umsetzung des α-Bromgalactosids **31** mit dem Silberpyridinolat **55** in Acetonitil / DMF 10:1 und abschließender Deacetylierung konnte das β-Hydroxypyridinylgalactosid **20** in 44 %iger Ausbeute zugänglich gemacht werden. (Abb. 24)

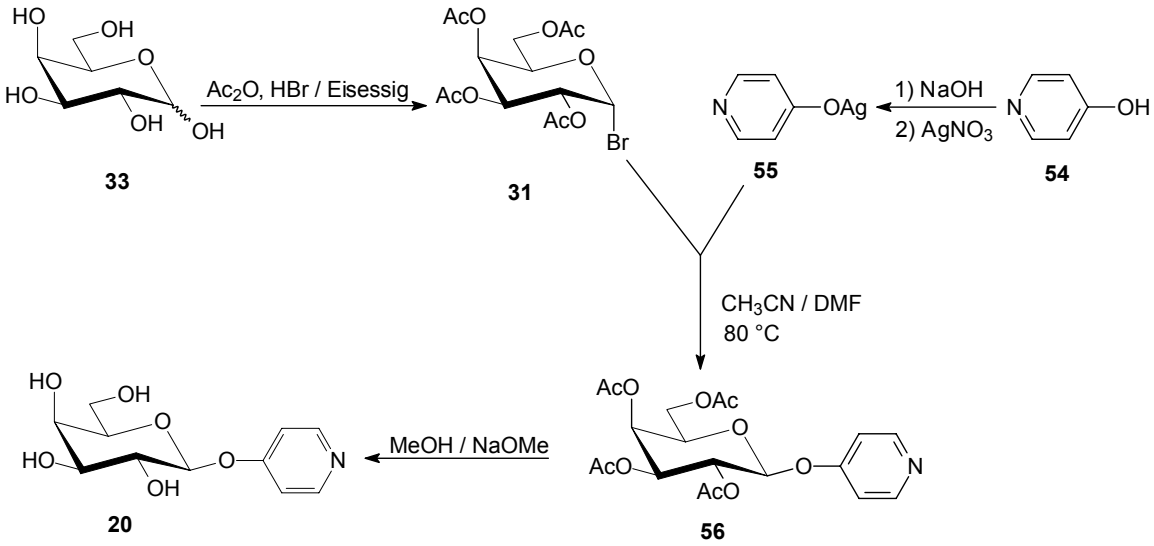


Abb. 24 Synthese des Pyridinyl-β-D-galactopyranosids **20**

Unter gleichen Reaktionsbedingungen wurden sowohl das β-D-Hydroxypyridinylfucosid **23** als auch das α-L-Hydroxypyridinylarabinosid **26** in Ausbeuten von 41 %, respektive 38 % dargestellt (Abb. 25).

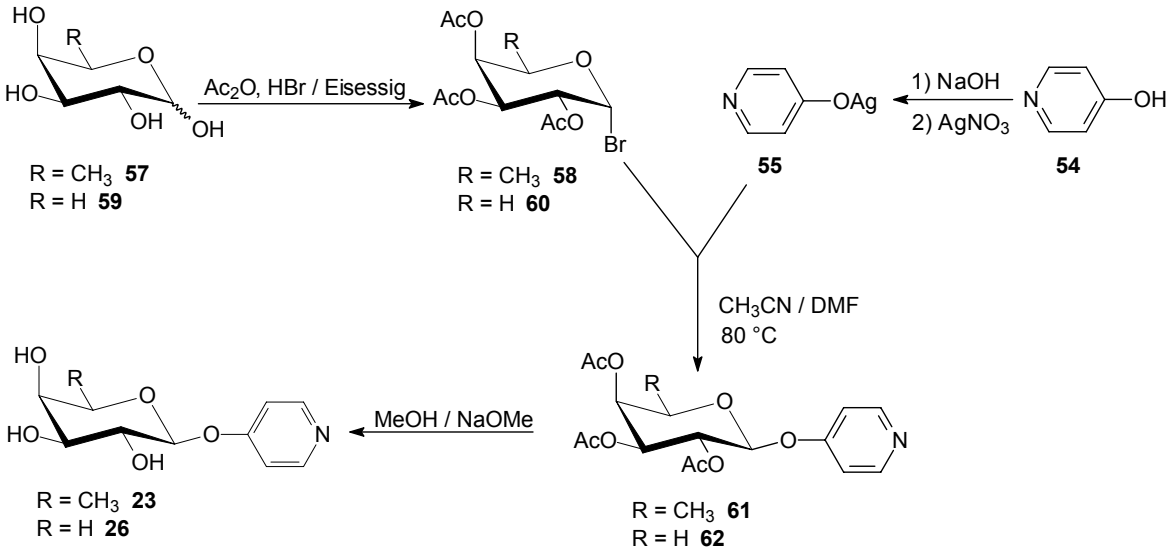


Abb. 25 Darstellung des Pyridinyl-β-D-fucopyranosids **23** sowie des Pyridinyl-α-L-arabinopyranosids **26**

Nachdem die Synthese des β-Pyridinylgalactosids **20**, β-Pyridinylfucosids **23** sowie des α-Pyridinylarabinosids **26** gelungen war, sollte nochmals versucht werden die

jeweiligen Anomeren der dargestellten Verbindung zugänglich zu machen, da diese als potentiell gute Donorsubstrate für die eingesetzten α-Galactosidasen in Frage kämen.

Die Synthese der Zielstrukturen war weder über Lewis-Säure Katalyse, Trichloracetimidat- noch über eine Fischer-Glycosylierung möglich (Abb. 21). Aus diesem Grund schien eine von Hanessian und Lou publizierte *in situ* Anomerisierung eines 2-Methoxypyridinylglucosids (Abb. 26) die Lösung des vorliegenden Problems zu versprechen. [78] Hierbei wurde das Pyridinyl-tetra-*O*-acetyl-β-D-glycosid **56** mit $HgBr_2$ in Xylol bei 130 °C nach 5 Stunden in das α-Anomer überführt.

Auf das eigene Syntheseproblem angewandt, führte die Reaktion nicht zu dem erwünschten α-Produkt (Abb. 27).

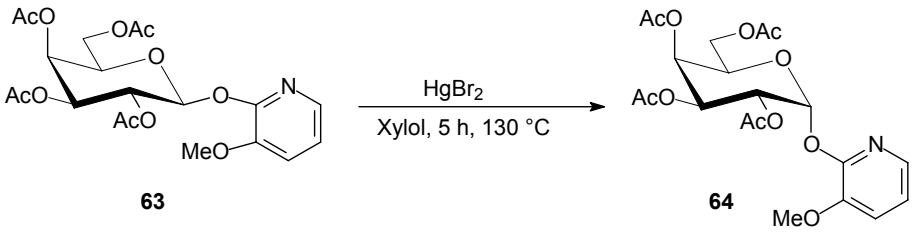


Abb. 26 *In situ* Anomerisierung nach Hanessian *et al.* [78]

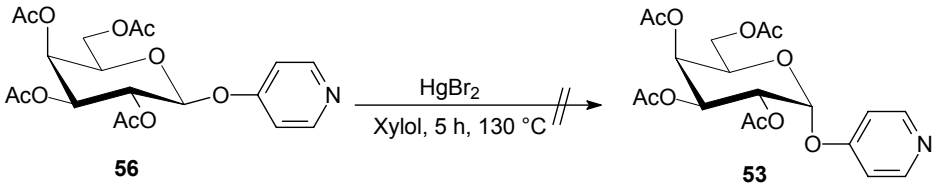


Abb. 27 Versuch zur Umkehrung der anomeren Konfiguration

Es scheint nicht ohne erheblichen Aufwand möglich, die α-Pyridinylgalactoside bzw. die Fucoside, respektive β-Arabinoside darzustellen. Aus diesem Grund war es nicht möglich, diese Donorsubstrate bezüglich ihres Transferverhaltens zu untersuchen.

4. Transglycosylierungen mit neuen α-Galactosidasen

In diesem Kapitel werden die enzymatischen Synthesen mit den beiden neuen α-Galactosidasen RAF-A und aGaB beschrieben.

4.1 Galactosylierungen mit α-Galactosidase aus RAF-A

Die α-Galactosidase aus RAF-A wurde von dem Arbeitskreis R. Mattes, Stuttgart zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine genetisch manipulierte, aus *Escherichia coli* exprimierte α-Hydrolase. Die charakteristischen Eigenschaften von RAF-A bezüglich seiner Regiospezifität bei Transferasereaktionen sind lediglich im Ansatz durch Kinetikuntersuchungen erforscht worden. [79]

An dieser Stelle wurde nun untersucht, in wieweit sich mit diesem spezifischen Enzym neue, potentiell bifidogene oder mit anderen positiven Eigenschaften behaftete oligomere Saccharide synthetisieren lassen. Bei diesen Untersuchungen sind zwar auch klassische Donoren wie *p*NP-Galactosid **19** zum Einsatz gekommen, überwiegend wurde jedoch das Fluorid der Galactose sowie Melibiose **27** eingesetzt. Im weiteren Verlauf wurden dann auch Derivate des 6-Desoxy-Derivats (D-Fucose) sowie des Pentose-Analogons (L-Arabinose) auf das jeweilige Donorpotential untersucht.

Die ersten Transgalactosylierungen wurden mit Methyl-α-D-glucopyranosid **14** durchgeführt, weil die resultierenden Produkte einfacher zu charakterisieren sind und im Falle von auftretenden Regioisomerengemischen eine Strukturaufklärung einfacher machen. Im weiteren Verlauf wurden dann auch Di- und Trisaccharide als Akzeptorsubstrate eingesetzt.

Ein pH-Wert von 6.5 hat sich als am günstigsten für die Transgalactosylierungs-reaktionen mit RAF-A herausgestellt. Des Weiteren werden alle Reaktionen unter RAF-A Katalyse in einem durch Phosphatpuffer stabilisierten System durchgeführt. Als Donoren kamen sowohl Glycosylfluoride, Melibiose als auch *p*NP-Glycoside zum Einsatz. Normalerweise werden Donor und Akzeptor im Verhältnis 2.5 : 1 eingesetzt. Bei allen Ansätzen mit den Fluoriden, wird ein 0.3 mmolarer KH_2PO_4/K_2HPO_4 – Puffer zur Anwendung gebracht, weil bei hydrolytischer Spaltung HF freigegeben wird. Bei allen anderen Donorsubstraten wurde ein 0.1 mmolarer Puffer derselben Zusammensetzung verwandt. Die Temperatur beträgt bei allen Ansätzen 37 °C. Die Separation der Produkte von den Edukten erfolgte an einer Biogel® P-2-Säule. Bei

Substraten mit geringer polareren Eigenschaften wie den D-Fucose- und L-Arabinose-Derivaten wird die Trennung an Sephadex® LH-20 durchgeführt.
Die Untersuchung der α-Galactosidase aus RAF-A begann mit der Galactosylierung von Methyl-α-D-glucopyranosid **14**. Bei der Transgalactosylierung dieses Akzeptors **14** wurde mit einer Gesamtausbeute von 19 % ein Disaccharidgemisch erhalten (Abb. 28). Dieses wiederum bestand aus einem Regioisomerengemisch zweier Einzelkomponenten, welches nach Peracetylierung durch NMR-Spektroskopie komplett aufgeklärt werden konnte.

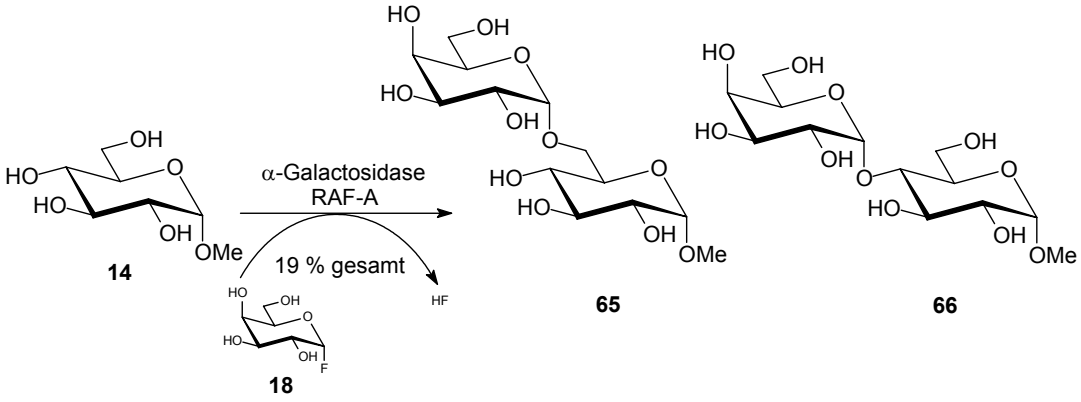


Abb. 28 Galactosylierung des Methyl-α-D-glucopyranosids **14** unter RAF-A Katalyse mit Galactosylfluorid **18**

Als Hauptkomponenten wurde das α(1→6) galactosylierte Disaccharid **65** in 71 % und das α(1→4) galactosyliertem Produkt **66** mit 29 % gebildet.
Eine Auftrennung der einzelnen Komponenten war weder an Biogel® P2 im freien Zustand, noch an Kieselgel mit den acetylierten Verbindung möglich.
Als interessanten Aspekt stellte sich die Frage, ob es möglich ist den analogen 6-Desoxyzucker zur D-Galactose (D-Fucose) mit der Galactosidase aus RAF-A synthetisch einzubinden. L-Fucose gehört als Bestandteil von Glycokonjugaten und Polysacchariden zu den am häufigsten vorkommenden Desoxyzuckern [80,81]. Aber auch D-Fucose hat gerade für Lebensmittel sensorisch interessante Eigenschaften und führt zu einer Verbesserung des Geschmacks. [82]
Nach Synthese des D-Fucosylfluorids **21** wurde dieses als Donor mit Methyl-α-D-glucopyranosid **14** als Akzeptor eingesetzt.

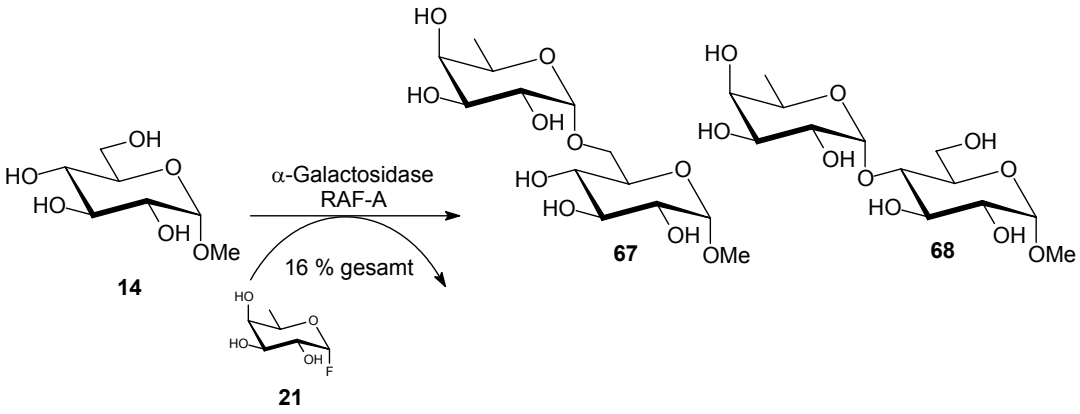


Abb. 29 Galactosylierung des Akzeptors **14** unter RAF-A Katalyse mit Fucosylfluorid **21**

Hier gelang die Fucosylierung des Akzeptors **14** mit Hilfe von RAF-A in einer Gesamtausbeute von 16 %. Auch hier entsteht wie schon mit dem Donor Galactosylfluorid ein Gemisch mit sehr ähnlichen Prioritäten bei der Verteilung auf die einzelnen Regioisomere. Das α(1→6) fucosylierte Disaccharid **67** entsteht als Hauptprodukt mit einem Anteil von 71 %, gefolgt von der α(1→4) fucosylierten Verbindung **68** mit 29 %. (Abb. 29)

Auch die L-Arabinose, als stereochemisches Pentose-Analogon der D-Galactose, hat ansprechende, lebensmittelrelevante Eigenschaften. So wurde bereits über die Vorteile von L-Arabinose in Tiernahrung berichtet. [83,84] Auch für die menschliche Ernährung hat L-Arabinose interessante Eigenschaften, da sie nicht über den Insulinweg metabolisiert wird. Daher sind bereits verschiedene, diätische Nahrungsmittel wie Säfte, Kekse etc. mit Arabinose in der Entwicklung. [85]

So ließ sich auch die L-Arabinose nach Überführung in ihr entsprechendes β-Fluorid, als Donorsubstrat erfolgreich mit RAF-A auf das Methyl-α-D-glucopyranosid **14** transferieren (Abb. 30).

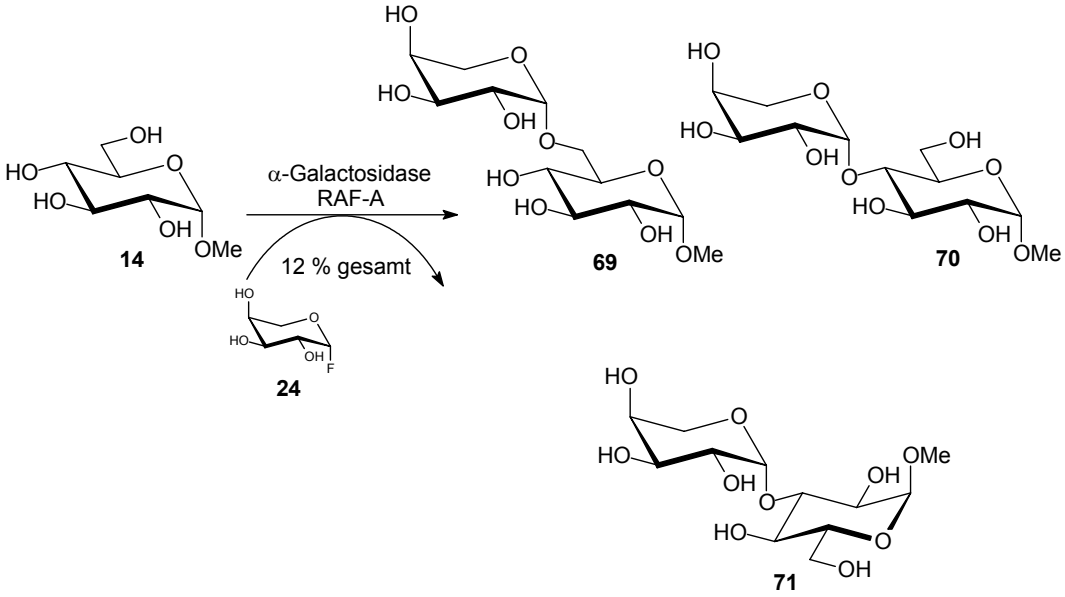


Abb. 30 Reaktion des Methyl-α-D-glucopyranosids **14** unter RAF-A Katalyse mit Arabinosylfluorid **24**

Mit dem Donorsubstrat L-Arabinose entsteht unter Katalyse von RAF-A, wie schon zuvor mit D-Fucose und D-Galactose ein Regioisomerengemisch mit ähnlicher Verteilung der Regioisomere wie bei D-Fucose. Allerdings entsteht hier noch ein weiteres Regioisomer. (Abb. 30) Die Gesamtausbeute liegt mit 12 % leicht unter denen der vorangegangenen Transglycosylierungsreaktionen mit Galactosylfluorid **18** bzw. Fucosylfluorid **21**. Hier fanden sich neben den 65 % für die α(1→6) substituierte Verbindungen **69** noch die α(1→4) und die α(1→3) arabinosylierte Verbindungen **70** und **71** zu je 23 % und 12 % vom Gesamtprodukt.

Unter Einsatz von Methyl-α-D-galactopyranosid **15** als Akzeptor und dem Donor Galactosylfluorid **18** entstand ausschließlich das α(1→6) galactosylierte Disaccharid **72** in einer Ausbeute von 21 %.

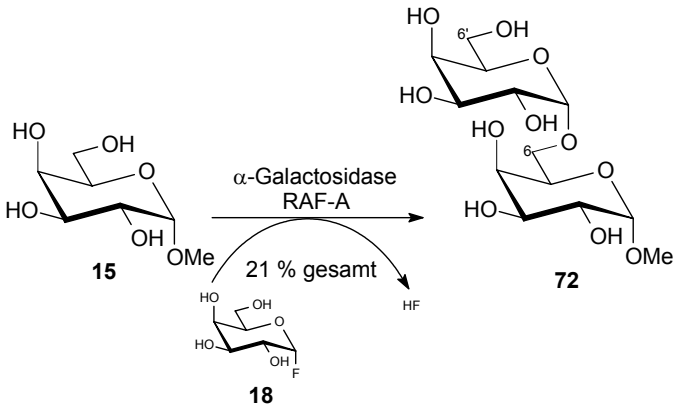


Abb. 31 Galactosylierung des Methylgalactosids **15** unter RAF-A Katalyse mit Galactosylfluorid **72**

Es gab keine Anzeichen für Regioisomerenbildung beim Produkt. Die axiale 4-OH-Gruppe hat offensichtlich in diesem Fall die Selektivität des Enzyms RAF-A zugunsten der 6-Position verschoben. Die Glycosylierung der 6-Position eines Saccharids führt zu einer signifikanten Tieffeldverschiebung des spezifischen ^{13}C-Kerns. Deutlich ist in Abb. 32 erkennbar, dass der substituierte C-6 Kohlenstoff von normalerweise ~ 61 ppm im Ausgangsmaterial um ca. 5 ppm beim 6-*O*-Glycosid zum Tieffeld verschoben ist, was die 1→6 Substitution des Akzeptorsubstrats dokumentiert.

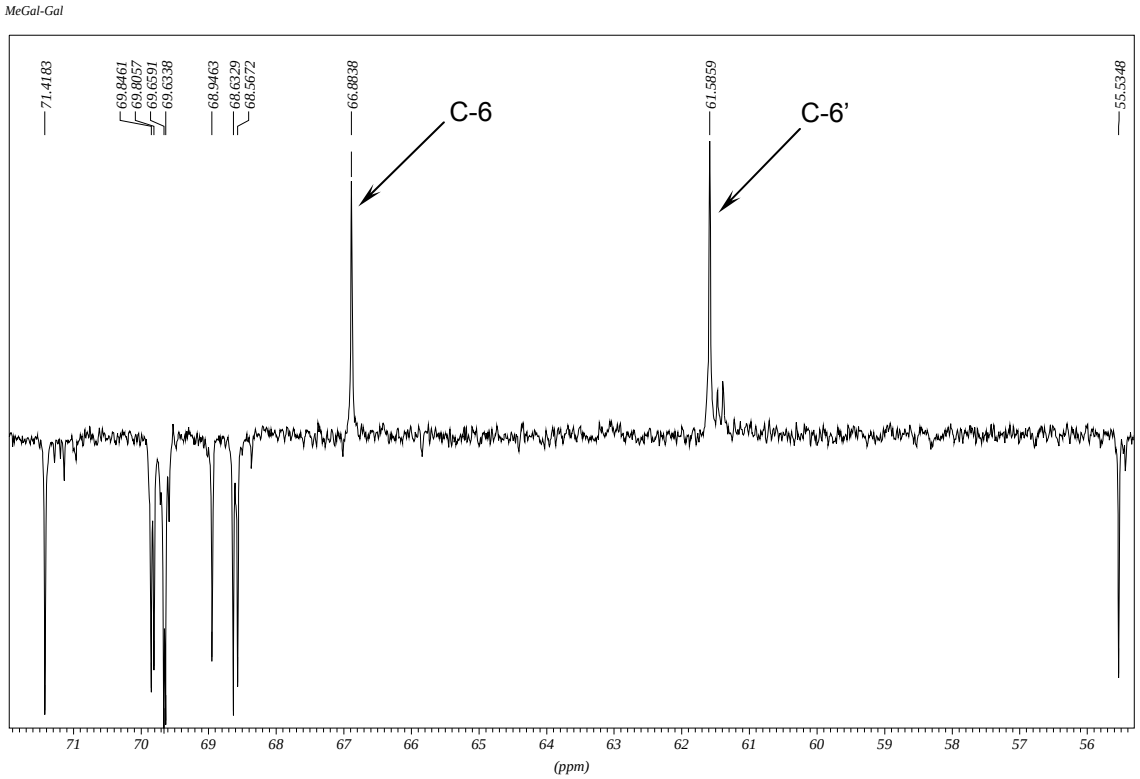


Abb. 32 ^{13}C-Spektrum des Disaccharids **72**

Ähnlich wie schon Methyl-α-D-galactopyranosid **15** zeigt sich auch Methyl-α-D-mannopyranosid **16** als Akzeptor. Hier entsteht ebenfalls nur das α(1→6) galactosylierte Mannosid **73** in Ausbeuten von 20 %.

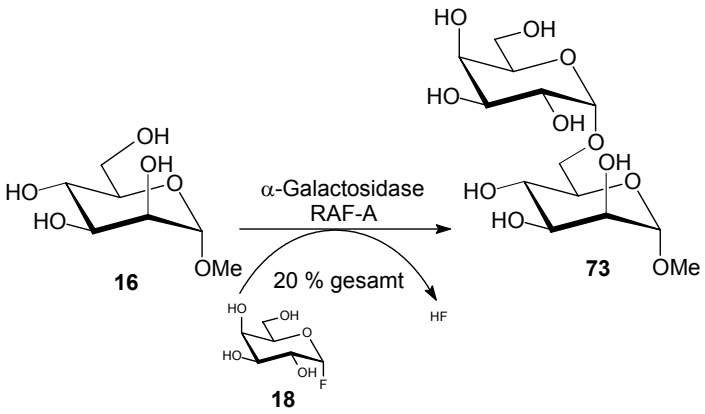


Abb. 33 Galactosylierung des Akzeptors **16** unter RAF-A Katalyse mit Galactosylfluorid **18**

Man könnte annehmen, dass sich auch an dieser Stelle der Einfluss einer axialen OH-Gruppe zeigt. Obgleich diese in diesem Fall an der 2-Position lokalisiert ist, hat sie offensichtlich entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung und verhindert hier wie schon mit dem Methyl-α-D-galactopyranosid **15** die Bildung von weiteren Regioisomeren wie es bei dem Akzeptor **14** geschehen ist.

Ein selektiv 6-*O*-acetyl geschütztes Methyl-α-D-glucopyranosids **74** als Akzeptor läßt sich elegant in einem Schritt unter Katalyse einer Lipase aus Schweineleber mit Vinylacetat in Pyridin erhalten.[86] Mit diesem Derivat sollte die Selektivität des Enzyms RAF-A zu beeinflussen sein.
Tatsächlich wird bei der Glycosylierung nur das 4-*O*-galactosylierte Glucosids **75** erhalten. Zwar sank die Gesamtausbeute auf 12 % (Abb. 34) im Gegensatz zu 19 % mit dem 6-*O*-ungeschützten Akzeptor **14**, allerdings erhielt man keine weiteren Regioisomere. Vor allem gelang die Galactosylierung regioselektiv in der normalerweise nicht begünstigten 4-Position. Es war somit möglich, das bei dem 6-*O*-ungeschützten Methyl-α-D-glucopyranosid **14** entstandene Regioisomerengemisch durch selektive Protektion der Hauptsubstitutions-Position in ein Produkt umzulenken.

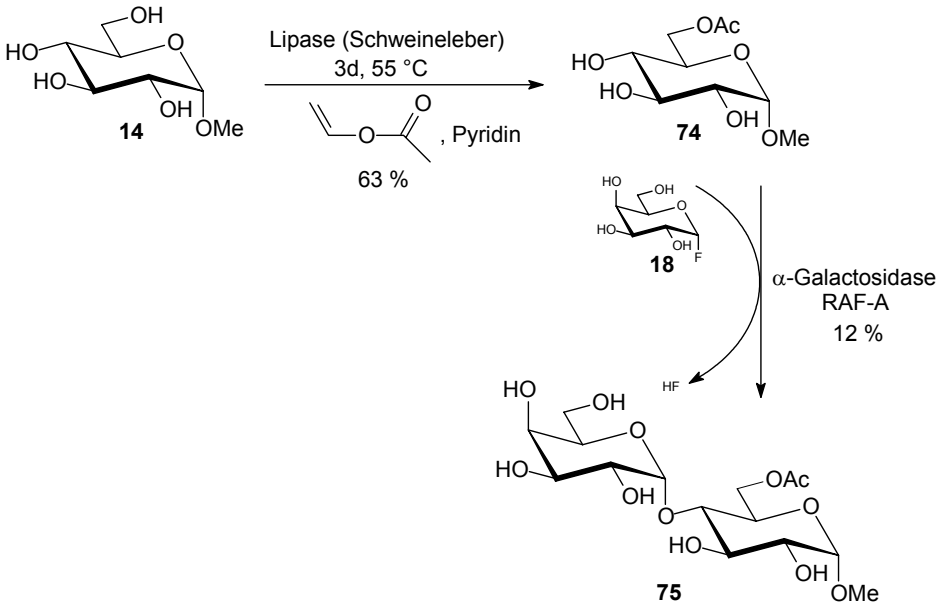


Abb. 34 Selektive Protektion der 6-*O*-Akzeptorposition mit anschließender Galactosylierung, unter RAF-A Katalyse

Ein ebenfalls eingesetztes Methyl-6-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosid **76** welches analog zum Glucosid **74** mit Lipase selektiv acetyliert wurde, konnte nicht transgalactosyliert werden. (Abb.35). Offensichtlich verhindert die axiale 4-OH-Gruppe eine eventuell mögliche Substitution der 3-OH Position des Akzeptorsubstrats. Die 2-Position scheint weder in diesem noch in den vorangegangenen Fällen eine mögliche Substitutionsposition zu sein.

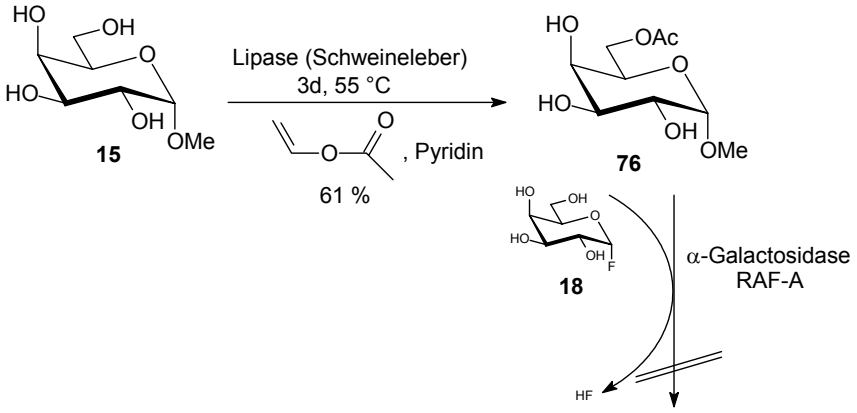


Abb. 35 Versuch zur Umsetzung mit Galactosylfluorid **18** unter RAF-A Katalyse eines selektiv 6-*O* geschützten Methyl-α-D-galactopyranosids **76**

Eine hydrophobe Verbindung, wie das Methyl-4,6-*O*-benzyliden-α-D-glucopyranosid **77**, wäre ein interessantes Akzeptorsubstrat, da hier die 3-Position der Glucose für eine potentielle Galactosylierung frei ist. Unter „normalen“ Bedingungen ist dies Derivat nicht in Wasser löslich. Auch die Zugabe von Cosolventien wie Acetonitril oder Dimethylsulfoxid führten zu keiner entscheidenden Verbesserung der Akzeptorkonzentration, was allerdings durch die Zugabe des Tensids Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween® 80) gelang. Allerdings war unter diesen Bedingungen keine Galactosylierung des Akzeptorsubstrats möglich (Abb.36).

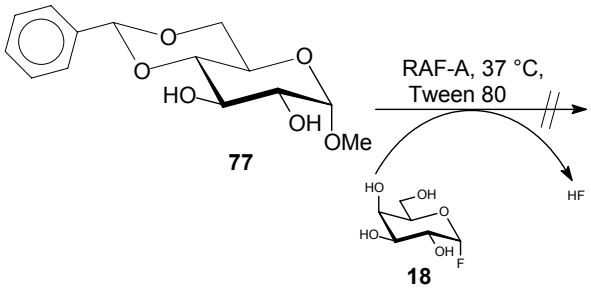


Abb. 36 Versuch zur enzymatischen Umsetzung eines lipophilen Akzeptors **77** in tensidhaltiger Lösung

Beim Einsatz von Saccharose **11** als Akzeptorsubstrat, wird mit verschiedenen Galactosyldonoren wie Galactosylfluorid **18**, Melibiose **27** oder *p*NP-Galactose **19** unter RAF-A Katalyse nur α(1→6) substituiertes Produkt erhalten (Abb. 37). Die Ausbeuten lagen mit dem Donor **19** bei 17 %, gefolgt von 15.4 % Ausbeute für die Umsetzung mit dem Fluorid **18**, respektive 7 % mit Melibiose **27** (Tab. 2). Im Gegensatz zu dem Methyl-α-D-glucopyranosid **14** Akzeptor wurden keine weiteren Regioisomere detektiert. Das Akzeptorsubstrat Saccharose führt an dieser Stelle zu einer Erhöhung der Regioselektivität des Enzyms RAF-A gegenüber simpleren Akzeptoren wie dem α-Methylglucosid.

Donorsubstrat	Ausbeute an 6-*O*-galactosylierter Saccharose (Raffinose, **78**)
α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**)	15.4 %
*p*NP-α-D-galactopyranosid (**19**)	17 %
Melibiose (**27**)	7 %

Tabelle 2

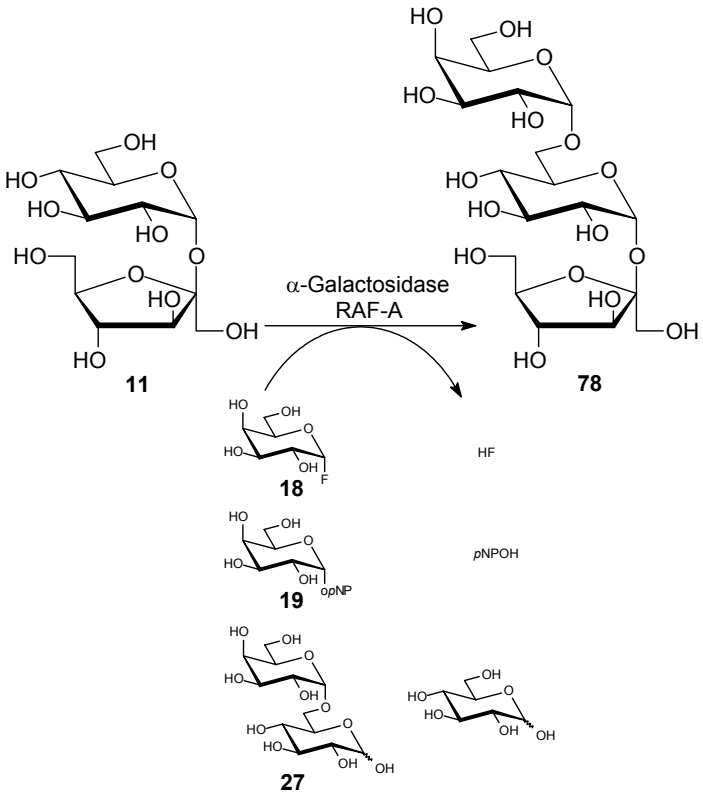


Abb. 37 Galactosylierung der Saccharose **11** unter RAF-A Katalyse mit drei verschiedenen Donoren

Unter Katalyse von RAF-A war ebenfalls eine Umsetzung des α-D-Fucopyranosylfluorids **21** mit Saccharose (**11**) als Akzeptor möglich. Hierbei erfolgte, wenn auch in einer sehr geringen Ausbeuten von 2 %, eine Transfucosylierung auf die 6-*O*-Position des Saccharoseakzeptors (Abb. 38). Mit dem α-*p*NP-Fucosid **22** konnte allerdings keine Umsetzung zu einem Produkt erreicht werden.

Interessant ist an dieser Stelle, daß das Fucosylfluorid **21** nicht jedoch das *p*NP-Fucosid **22** von der Hydrolase RAF-A auf die 6-*O*-Position des Akzeptors transferiert wird. Das *p*NP-Fucosid **22** wird lediglich hydrolysiert was an der starken Gelbfärbung der Reaktionslösung erkennbar war.

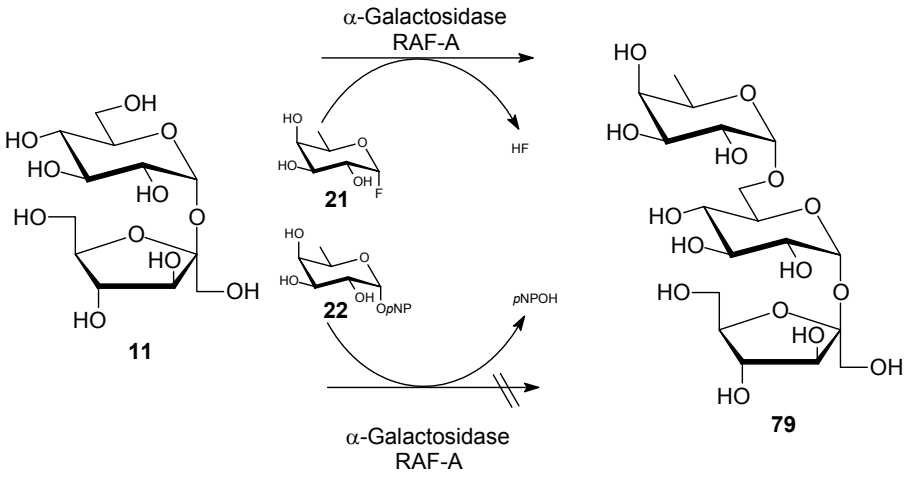


Abb. 38 Transglycosylierungsreaktion von Saccharose **11** mit dem Fucosyl-Donor **21** durch das Enzym RAF-A

Analog zum Akzeptor **14** sollte auch die Möglichkeit des Transfers von β-Arabinosylfluorid **24** auf den Akzeptor Saccharose **11** unter RAF-A Katalyse geprüft werden. Leider konnte hier keine Produktbildung beobachtet werden (Abb. 39). Mit dem ebenfalls eingesetzten *para*-Nitrophenyl-glycosid **25** der Arabinose konnte wie schon mit dem Fluorid **24** kein Produkt isoliert werden.

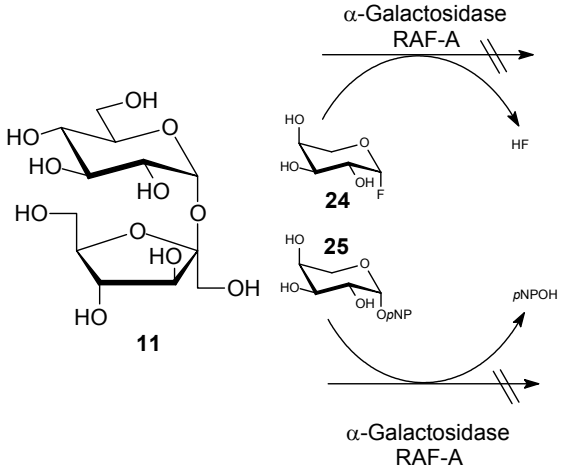


Abb. 39 Versuche zur RAF-A-katalysierten Arabinosylierung von Saccharose

Als ein weiterer sehr interessanter Akzeptor wurde Isomalt **12**, ein Zuckeralkohol und Zuckeraustauschstoff, der durch Hydrierung des Disaccharids Isomaltulose

(Palatinose®) zugänglich und in Nahrungsmittel bereits weit verbreitet ist, in die Untersuchungen mit einbezogen.

Beim Einsatz von Isomalt **12** als Akzeptorsubstrat konnte wie schon bei der Saccharose das entsprechende 6-*O*-galactosylierte Isomalt isoliert werden. Die Donorsubstrate zeigten lediglich in den Ausbeuten (Tab. 3), nicht jedoch in der Regiospezifität bezüglich des Produktes Differenzen (Abb. 40).

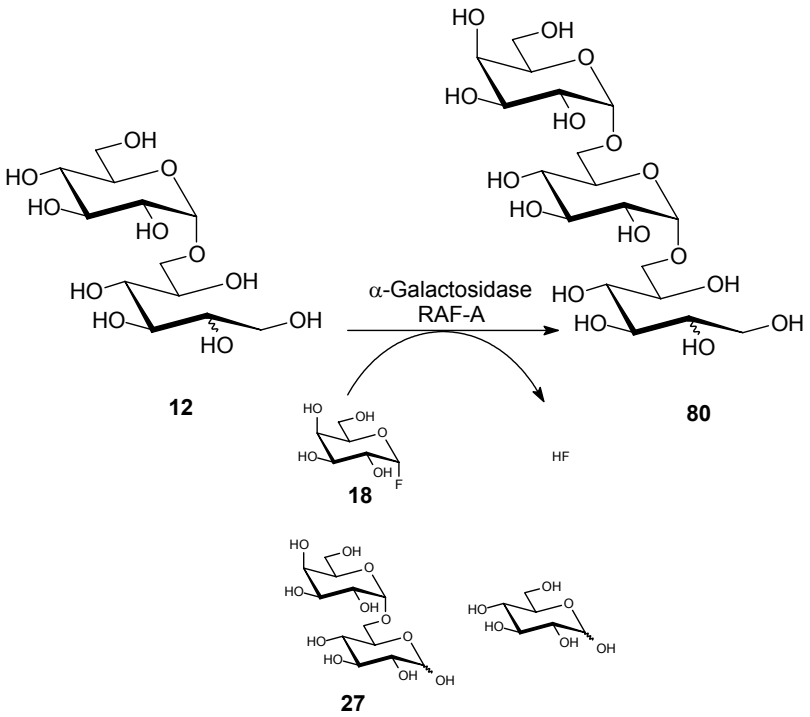


Abb. 40 Galactosylierung des Isomalts **12** unter RAF-A Katalyse mit Galactosyldonoren **18**, **27**

Donorsubstrat	Ausbeute an 6-*O*-galactosylierter Isomaltulose **80**
α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**)	17 %
Melibiose (**27**)	9 %

Tabelle 3

Weiterhin wurden sowohl *p*NP-Fucopyranosid **22** sowie Fucosylfluorid **21** als auch *p*NP-Arabinopyranosid **25** und Arabinosylfluorid **24** mit Isomalt umgesetzt.

Allerdings war mit diesen Donoren keine Produktbildung zu verzeichnen (Abb. 41). Im Gegensatz zu Saccharose und Methyl-α-D-glucopyranosid **14** wurde Isomalt **12** von RAF-A nicht als adäquates Akzeptorsubstrat angenommen.

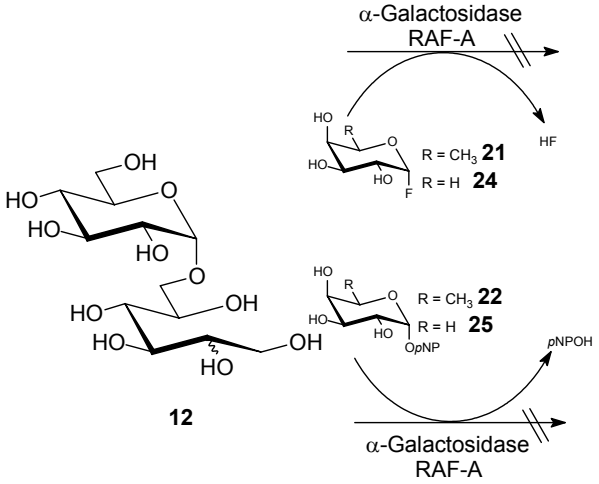


Abb. 41 Versuche zur Fucosylierung und Arabinosylierung von Isomalt mit dem Enzym RAF-A

Beim Einsatz von Isomaltulose **13** zeigte sich wieder das bekannte Transfermuster (Abb. 42). Mit den eingesetzten Galactosyldonoren α-Galactosylfluorid **18** und Melibiose **27** wird das 6-*O*-galactosylierte Trisaccharid isoliert. Die Ausbeuten sind noch etwas geringer als mit Isomalt (Tab. 4).

Donorsubstrat	Ausbeute an 6-*O*-galactosylierter Isomaltulose **81**
α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**)	12 %
Melibiose **27**	8 %

Tabelle 4

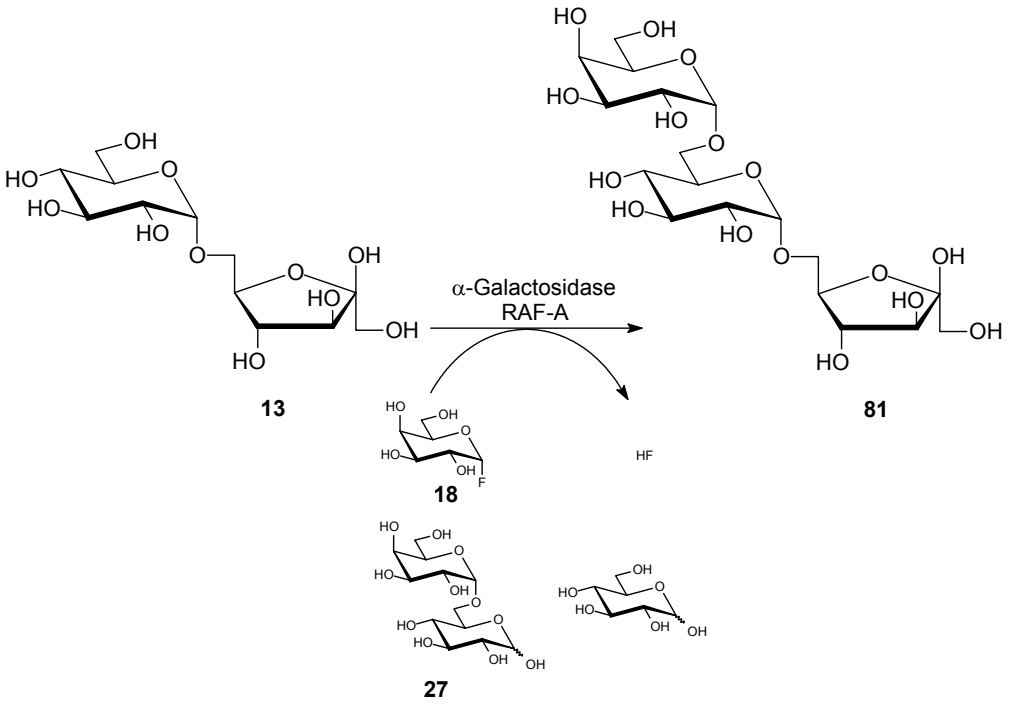


Abb. 42 Galactosylierung der Isomaltulose **13** unter RAF-A Katalyse

Ein Transfer von D-Fucose respektive L-Arabinose läßt sich mit den entsprechenden Donorsubstraten nicht realisieren. Wie schon beim Isomalt **12** katalysiert RAF-A die Übertragung der beiden 6-*O*-Desoxy- respektive Pentose-Analoga nicht.

Hydrolase-katalysierte Reaktionen sind nicht nur für den Nahrungsmittelsektor interessant, sondern finden auch in anderen chemischen Teilbereichen Verwendung. Unter bestimmten Voraussetzungen kann die Galactosidase RAF-A auch für den immunologischen Sektor interessant werden.

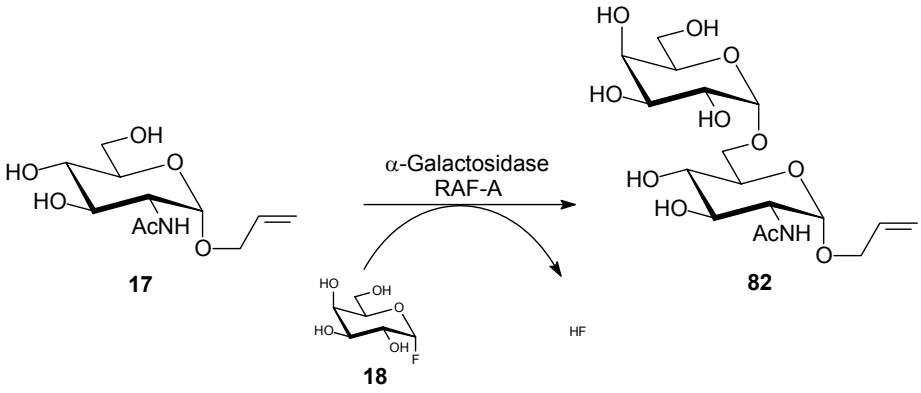
So stellt beispielsweise das Ratten-NKR-P1 Lektin [87] (natural killer receptor protein 1) ein zuckerbindendes Protein mit hoher Affinität gegenüber Calcium und einfachen Kohlenhydraten dar und ist mit dem C-Typ Tierlektin verwandt. [88] Unter Immunologen herrscht großes Interesse die Rezeptorfunktion der NKR-P1 Zellen sowie deren Struktur-Funktions-Wechselwirkung aufzuklären.

Neue synthetische Chitooligomere die als potentielle Liganden die Kohlenhydratbindungsstellen des NKR-P1 erfassen und Erklärungen für die untypische Reaktivität dieser Proteine im Vergleich zu anderen calciumbindenden

Tierlektinen liefern könnten, wurden bereits von U. Gambert *et al.* mit der β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* dargestellt. [89]

Um zu untersuchen, ob die Galactosidase aus RAF-A auch zur Synthese von Chitooligomeren in Frage kommt, werden auch Umsetzungen mit Allyl-α-*N*-acetylglucosamid **17** durchgeführt. Um eine weitere Umsetzung des entstandenen Produktes zu gewährleisten wurde bewusst das Allylglycosid gewählt, da dieses sich in einer anschließenden Synthesesequenz hervorragend weiter umsetzten lässt und leicht aus *N*-Acetylglucosamin zugänglich ist.

Die Umsetzung des Allyl-*N*-glucosaminids **17** mit Galactosylfluorid **18** unter RAF-A Katalyse erfolgte mit einer Ausbeute von 5.2 % zum 6-*O*-galactosylierte Disaccharid.



17 **18** **82**

Abb. 43 Galactosylierung des α-Allyl-*N*-acetylglucosaminids **17** unter RAF-A Katalyse mit Galactosylfluorid **18**

Auch mit dem Donor α-Fucosylfluorid **18** konnte unter RAF-A Katalyse das 6-*O*-fucosylierte Produkt **83** synthetisiert werden, wenn auch nur in einer Ausbeute von 3.4 %. (Abb. 44)

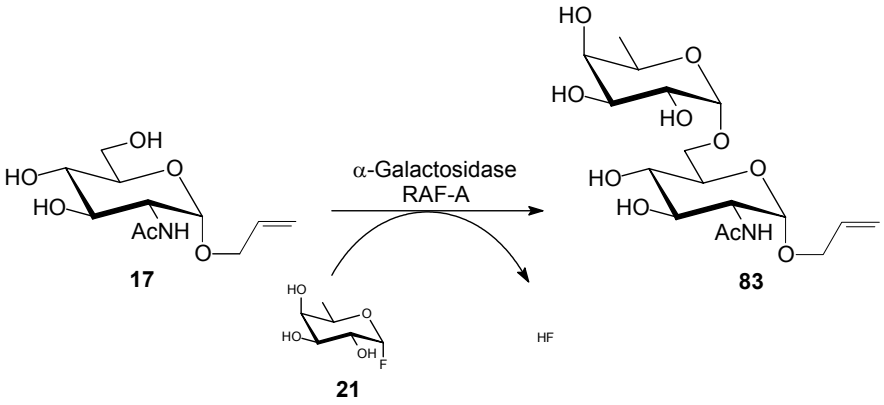


Abb. 44 Fucosylierung des Acetylglucosaminids **17** unter RAF-A Katalyse mit Fucosylfluorid **21**

Die bei der Umsetzung mit der α-Galactosidase aus RAF-A erzielten Ausbeuten fallen mit 5.2 % und 3.4 % gering aus, es zeigen sich allerdings neue, interessante Perspektiven zur Synthese eventuell immunologisch interessanter Strukturen, die anderweitig bestimmt werden sollen.

Für die analytische Trennung aller komplexen Oligomere, sind spezielle HPLC-Säulen und damit einhergehend besondere Methoden der Messung erforderlich. Die Erkennung der OH-freien Zucker konnte ausschließlich über einen refraktometrischen (RI) Detektor geschehen, da keine UV-aktiven Substituenten vorhanden sind. Zur Separation der Produktgemische wurden Ionentauscher-Säulen der Firma Merck verwendet, die mit Natrium-, Calcium- oder Bleiionen beladen sind. Diese Säulen mit dem Markennamen „Polysphere®“ wurden mit destilliertem Wasser als mobile Phase, bei einer Temperatur von 90 °C benutzt. Die speziell für die Trennung von Zuckern entwickelten Säulen, sind in der Lage die Produktgemische nach Polymerisationsgrad (DP = *D*egree of *P*olymerisation) zu trennen.

Die präparative Trennung der Produkte von den Edukten erfolgte an Biogel® P2 oder Sephadex® LH 20. Alle erhaltenen Strukturen ließen sich NMR-spektroskopisch gut durch den signifikanten Tieffeldshift der jeweils substituierten C-6 Kohlenstoffe (Abb. 32) identifizieren. Die unsubstituierten Saccharide weisen eine chemische Verschiebung von ca. 60 – 61 ppm für ihre unsubstituierten C-6 Kohlenstoffe auf, welche bei Substitution um ca. 5 ppm zum Tieffeld verschoben werden. Deshalb

lässt sich gerade in einem DEPT-Experiment eine 6-*O*-Substitutution relativ leicht erkennen.

Die Regioselektivität des Enzyms RAF-A erwies sich als sehr hoch. Lediglich das Methyl-α-D-glucopyranosid **14** zeigte bei der Produktbildung ein weiteres Regioisomer neben dem Hauptprodukt **65**. Bemerkenswert bei dem Enzym RAF-A ist, dass neben den D-Galactose Donoren auch die Fluoride der D-Fucose und L-Arabinose als Donorsubstrate akzeptiert werden. Interessanterweise wurden dagegen die *para*-Nitrophenylderivate der D-Fucose und L-Arabinose nicht als Donorsubstrat angenommen. So führt die augenscheinlich höhere Akzeptorspezifität von RAF-A bezüglich der Donorsubstrate D-Fucose und L-Arabinose dazu, dass schon bei Isomalt ein Transfer der Fucose und Arabinose nicht mehr beobachtet werden kann, während Galactose problemlos übertragen wird.

Mit diesen spezifischen Merkmalen ist die Galactosidase aus RAF-A eine synthetisch interessante Hydrolase, die nicht nur eine Reihe natürlicher und künstlicher Donorsubstrate akzeptiert, sondern bedingt auch D-Fucosylfluorid und L-Arabinosylfluorid transferiert. Einer Verwendung der RAF-A Hydrolase zur Herstellung neuer Oligosaccharide zeigt viel versprechende Möglichkeiten auf. Gerade die Herstellung neuer, lebensmitteltechnisch interessanter Saccharide bekäme weitere ansprechende Aspekte.

4.2 Galactosylierungen mit α-Galactosidase aus aGaB

Die Galactosidase aus aGaB ist eine thermophile α-Hydrolase die vom Arbeitskreis R. Mattes aus Stuttgart zur Verfügung gestellt wurde. Zur Gewinnung des Enzyms wurden das klonierte Isogen aGaB aus *Bacillus stearothermophilus* KVE 36 in *e. coli* exprimiert. [79,90,91] Die Galactosidase aus aGaB hat ihr Temperaturoptimum bei 65 °C und benötigt mit *p*NP-Galactopyranosid als Donorsubstrat einen 0.1 molaren Kaliumphosphatpuffer (KH_2PO_4 / K_2HPO_4) pH = 6.5. Wie schon bei der Galactosidase aus RAF-A war die Regioselektivität der Galactosidase aGaB unter Transgalactosylierungsbedingungen unbekannt. aGaB wurde mit gleicher Zielsetzung wie die Galactosidase aus RAF-A untersucht.

Als Akzeptorsubstrate kamen Mono- und Disaccharide zum Einsatz, um die Regiospezifität des Enzyms zu untersuchen. Bei den eingesetzten Donorsubstraten handelte es sich sowohl um *para*-Nitrophenylglycoside, Glycosylfluoride als auch um Melibiose.

Die Umsetzung des Methylglucosids **14** mit den Galactosyldonoren Galactosylfluorid **18**, *p*NP-Galactopyranosid **19** sowie Melibiose **27** unter Katalyse von aGaB ergab ausschließlich die α(1→6)-galactosylierte Verbindung **65**. Im Gegensatz zu RAF-A entstanden keine weiteren Regioisomere (Abb. 45). Das Maximum an Ausbeute betrug mit *p*NP-Galactopyranosid **19** 22 %, Melibiose 15 % und dem Galactosylfluorid lediglich 9 %. Ein möglicher Grund für die schlechteren Ausbeuten mit dem Galactosylfluorid ist möglicherweise die hohe Reaktionstemperatur von 65 °C, die vermutlich zu gesteigerter Hydrolyse des Fluorids führt.

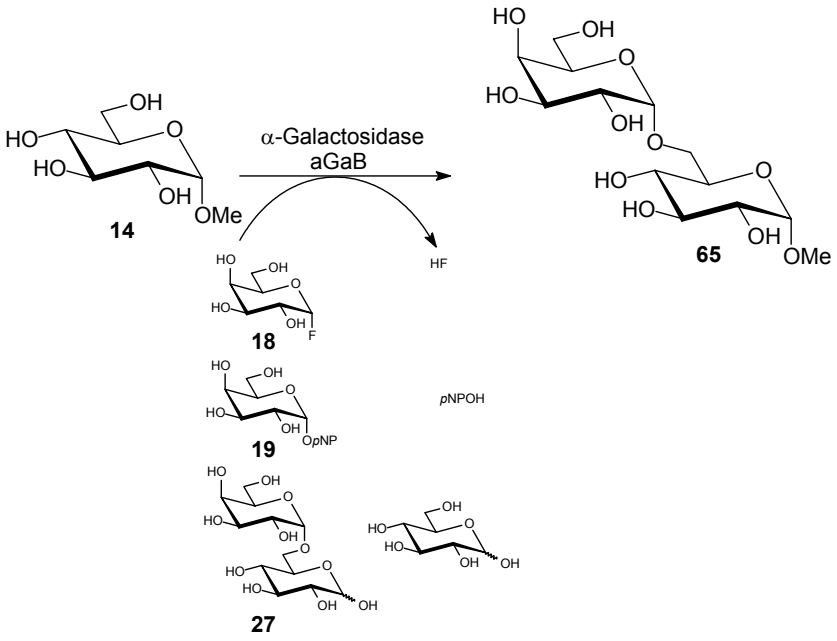


Abb. 45 Galactosylierung des Methylglucosids **14** unter aGaB Katalyse mit drei verschiedenen Donoren

Die Versuche, auch die Donoren der D-Fucose sowie L-Arabinose mit Hilfe von aGaB zu übertragen waren nicht erfolgreich. Weder die Fluoridderivate der D-Fucose respektive L-Arabinose, noch deren *para*-Nitrophenylglycoside wurden auf das Akzeptorsubstrat Methylglucosid **14** transferiert. (Abb. 46)

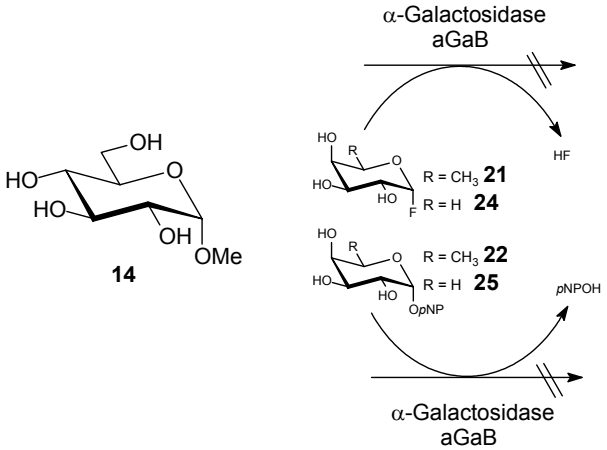


Abb. 46 Versuche zur Fucosylierung und Arabinosylierung des Methylglucosids **14** mit dem Enzym aGaB

Hier zeigte sich, dass eine Transferreaktion unter aGaB-Katalyse mit den 6-Desoxyderivaten der D-Galactose, wie mit RAF-A eingeschränkt möglich, nicht durchführbar war. Aus diesem Befund könnte man ableiten, dass die Donorsubstratspezifität des Enzyms aGaB höher als die von RAF-A ist.

Unter Verwendung von Saccharose als Akzeptorsubstrat zeigte sich wie schon bei der Reaktion mit Methylglucosid **14** die Präferenz des Enzyms aGaB für die Etablierung einer α(1→6) Bindung zum Akzeptorsubstrat. So konnte unter Katalyse des Enzyms aGaB und den Donorsubstraten Galactosylfluorid **18** bzw. Melibiose **27**, als Produkt Raffinose **78** isoliert werden (Tab.5).
Es zeigte sich wie schon bei dem Akzeptor Methylglucosid, keine weiteren Regioisomere bei der Produktbildung. (Abb. 47)

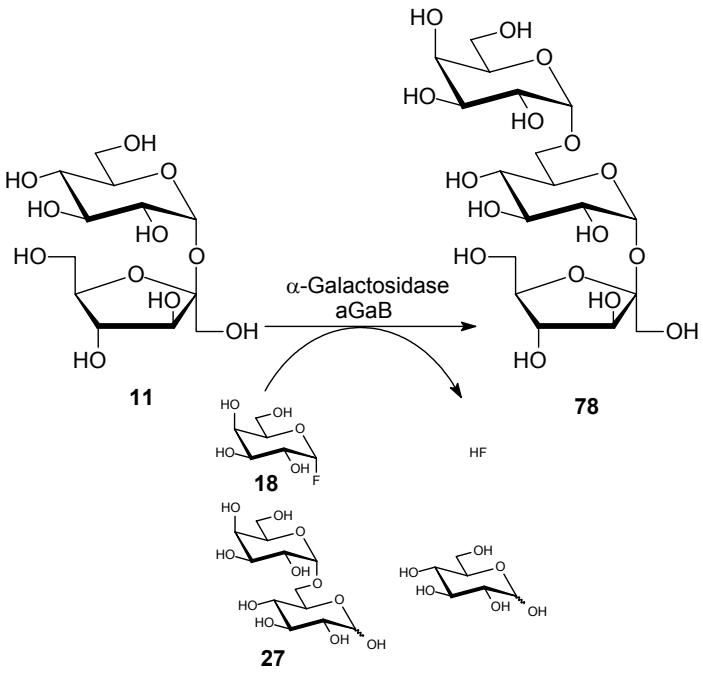


Abb. 47 Galactosylierung der Saccharose **11** unter aGaB-Katalyse mit den Donoren **18** und **27**

Donorsubstrat	Ausbeute an 6-*O*-galactosylierter Saccharose (Raffinose, **78**)
α-Galactopyranosylfluorid (**18**)	3.4 %
Mellibiose (**27**)	9 %

Tabelle 5 Ausbeute an Raffinose **78** durch α-Galactosylierung von Saccharose

Die Reaktion von Isomalt **12** mit den Donoren Galactosylfluorid oder Melibiose unter Katalyse von aGaB führte erwartungsgemäß zu dem 6-*O*-galactosyliertem Isomalt **80** in Ausbeuten von 6 % für den Fluoriddonor **18** und 12 % für Melibiose **27** (Abb. 48).

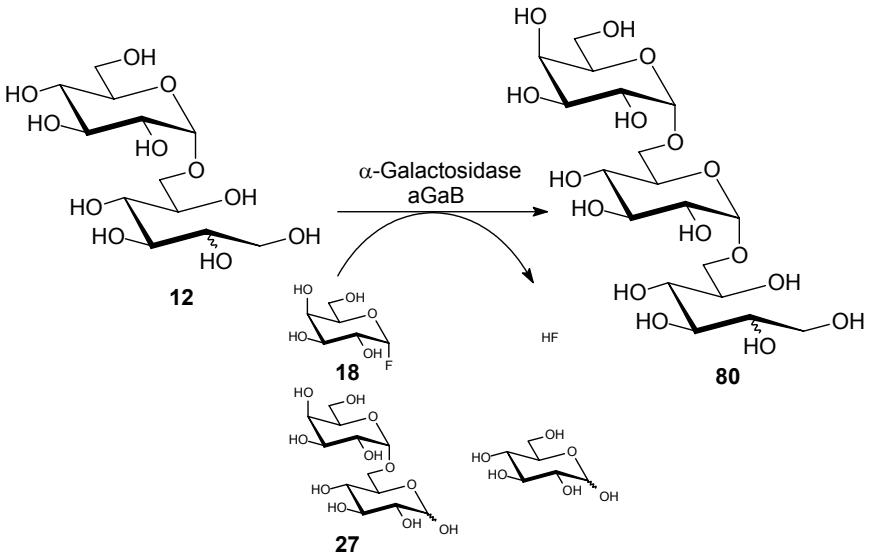


Abb. 48 Galactosylierung des Isomalts **12** unter aGaB Katalyse mit den Donoren **18** und **17**

In gleicher Weise verläuft die Reaktion mit dem Akzeptor Isomaltulose **13**. Hierbei entsteht das Trisaccharid **81** durch den Einsatz von Galactosylfluorid **18** oder Melibiose **27** unter Transgalactosylierungsbedingungen mit aGaB in Ausbeuten von 7 % bzw. 13 %. (Abb. 49)

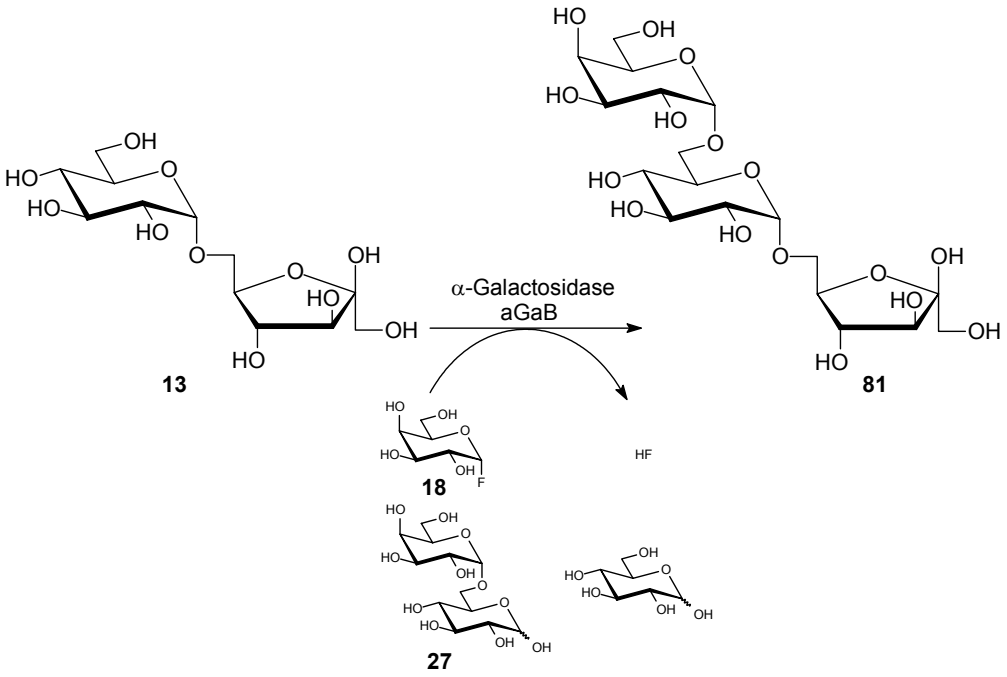


Abb. 49 Galactosylierung der Isomaltulose **13** unter aGaB Katalyse mit den Donoren **18** und **27**

Die Umsetzungen mit der thermophilen α-Galactosidase aGaB führten durchweg zu den gleichen Produkten wie mit dem Enzym RAF-A. Allerdings sind die Ausbeuten mit Mellibiose etwas besser als mit RAF-A. Dem stehen die wiederum geringere Ausbeuten mit Galactosylfluorid **18** gegenüber.

Der entscheidende Unterschied zu RAF-A ist die angesprochene höhere Donorsubstratspezifität und damit einhergehend das Unvermögen der Hydrolase, auch D-Fucosyl- respektive L-Arabinosyldonoren auf ein adäquates Akzeptorsubstrat zu transferieren. Resümierend ist festzustellen, daß aGaB selektiver und damit weniger universell verwendbar ist als RAF-A.

5. Transglycosylierungen mit β-Galactosidase aus BgLT

Bei dem Enzym BgLT handelt es sich um eine thermophile β-Galactosidase unbekannter Spezifität aus *Thermus thermophilus* TH 125. [92] Dieses Enzym wurde wie schon RAF-A und aGaB vom Arbeitskreis R. Mattes, aus Stuttgart zur Verfügung gestellt. Die β-Hydrolase BgLT wurde einer eingehenden Untersuchung unterworfen, da ein Substitut für die Synthesen mit der β-Galactosidase aus Bovine testes gesucht wurde.

Die β-Galactosidase aus Bovine testes, ist ihrerseits in der Lage unter Transgalactosylierungsbedingungen β(1→3) Bindungen zu verschiedenen Akzeptorsubstraten zu etablieren. Die Galactosidase aus Rinderhoden ist kommerziell erhältlich, allerdings sehr kostspielig. Da unter ökonomischen Aspekten Synthesen mit Bovine testes im präparativen Maßstab zu kostspielig sind, wurde von Hedbys *et al.* [93] eine Methode zur Gewinnung des Rohenzyms aus Bovine testes entwickelt, die den Arbeiten von Distler und Jourdan [94] zugrunde liegt. Diese Methode ermöglicht die Gewinnung der rohen β-Galactosidase aus Rinderhoden, die präparativen Ansprüchen genügt. Allerdings ist auch die Gewinnung dieses Rohenzyms relativ umständlich, da verschiedenen Faktoren wie schnelle Verarbeitung nach Schlachtung und das Lebensalter der Tiere (am Besten nicht jünger als 20 Monate) eine entscheidende Rolle bei der Enzymgewinnung spielen.

Um die genannten Hindernisse zu umgehen, wurde nach einem Substitut gesucht, welches ebenfalls β-(1→3) Bindungen zu einem potentiellen Akzeptorsubstrat etabliert, aber leichter und in größeren Mengen zugänglich ist.

Bei den Untersuchungen zur Regioselektivität der BgLT-Hydrolase wurden die Donoren Lactose **28** und β-Pyridinylgalactosid **20** eingesetzt. Auch das klassische β-*p*NP-Galactosid **85** kam bei der ersten Umsetzung mit dem Akzeptor Methylglucosids **14** unter Katalyse von BgLT zum Einsatz.

Die Umsetzung des Modellakzeptors α-Methylglucopyranosid **14** erfolgte mit den Donorsubstraten β-Pyridinylgalactosid **20**, Lactose **28** und β-*p*NP-Galactopyranosid **85** unter Katalyse des thermophilen Enzyms BgLT. Hierbei wurde ausschließlich das 3-*O*-galactosylierte Methylglucosid **84** isoliert. Die Ausbeuten liegen zwischen 13 % und 27 % und sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Donorsubstrat	Methyl β-D-galactopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosid (**84**)
β-Pyridinylgalactopyranosid (**20**)	27 %
Lactose (**28**)	13 %
β-*p*NP-Galactopyranosid (**85**)	23%

Tabelle 6

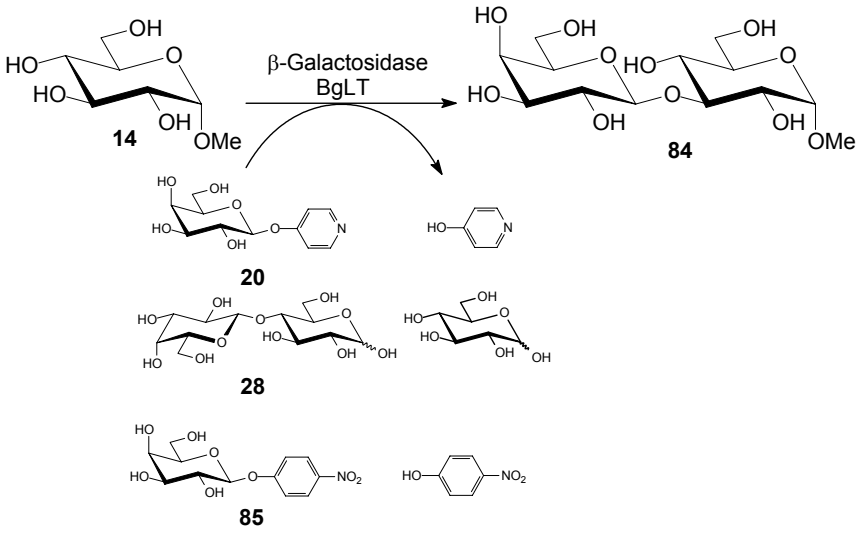


Abb. 50 Selektive 3-*O*-galactosylierung von **14** unter BgLT Katalyse

Durch die Reaktion von Saccharose mit dem Donor β-Pyridinylgalactosid **20** unter BgLT-Katalyse ließ sich eine hervorragende Ausbeute von 31 % der 3-*O*-galactosylierten Saccharose **86** isolieren. Mit dem Donor Lactose ließen sich unter identischen Bedingungen lediglich 12 % der Verbindung **86** gewinnen (Abb. 51).

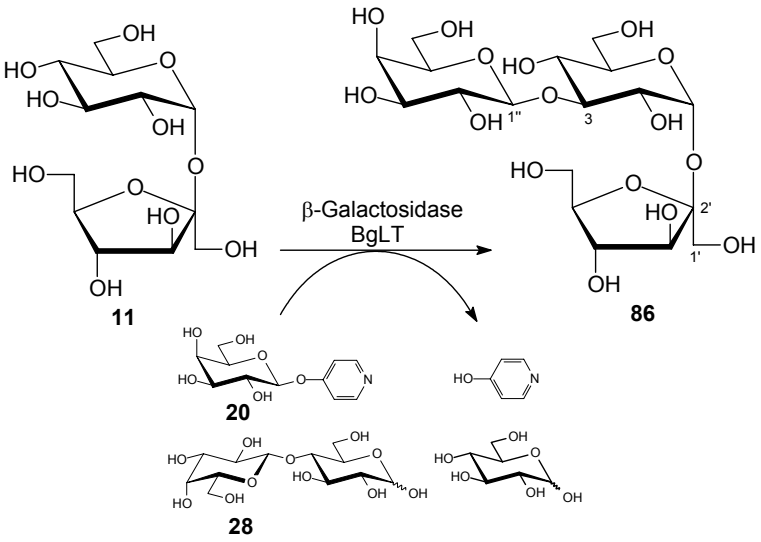


Abb. 51 Selektive 3-*O*-Galactosylierung der Saccharose **11** unter BgLT Katalyse

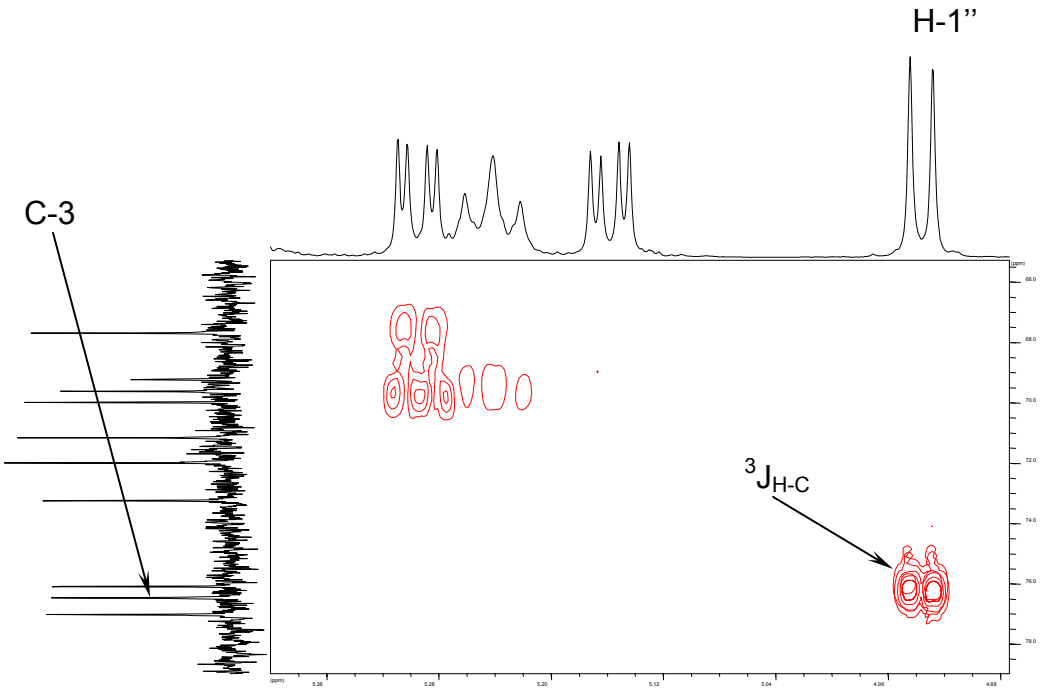


Abb. 52 Auschnitt aus dem HMBC-Spektrum des peracetylierten Produktes **86** zur Illustration der neu entstandenen β-(1→3) Bindung zum Akzeptorsubstrat Saccharose

Zur eindeutigen Aufklärung der neu etablierten Bindung zum Akzeptorsubstrat, wurde das Produkt **86**, wie auch viele andere OH-freie Produkte, im Zuge dieser

Untersuchungen peracetylierert. Dies hat einerseits den Vorteil, daß die Linienverbreiterungen durch die dann substituierten OH-Gruppen wegfallen und andererseits durch die Anisotropie der Acetat-Gruppen die Protonensignale der Kohlenhydratringe besser separiert werden. Der illustrierte Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der acetylierten Verbindung **86** in Abb. 52 zeigt eine $^{3}J_{H\text{-}C}$ Kopplung zwischen dem C-3 Kohlenstoff des Akzeptors und dem H-1'' Protons der übertragenen Galactoseeinheit und liefert den eindeutigen Beweis einer neuen β-(1→3)-Bindung zum Akzeptorsubstrat **11**.

Die β-Galactosidase aus BgLT ist in der Lage funktionalisierte D-Fucose hier in Form des Pyridinylfucosids **23** regioselektiv mit einer Ausbeute von 2.6 % auf das Akzeptorsubstrat Saccharose zu übertragen.

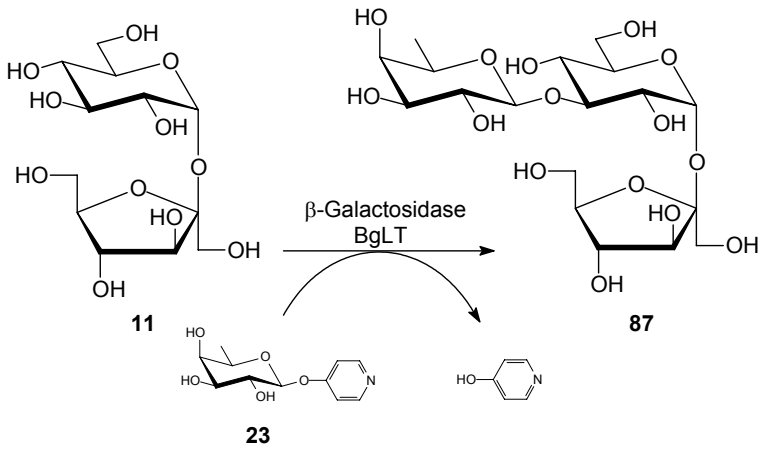


Abb. 53 Fucosylierung der Saccharose **11** unter BgLT Katalyse mit Pyridinylfucosid **23**

Unter gleichen Bedingungen gelang sogar die Umsetzung der Saccharose mit dem Pyridinylarabinosid **26** unter Katalyse von BgLT und es ergab sich in einer Ausbeute von 3.0 % das Trisaccharid **88** (Abb. 54) was sowohl durch NMR, als auch durch MALDI-TOF Experimente (Abb. 55) untermauert werden konnte. Damit eröffnen sich interessante Syntheseaspekte zur Übertragung von D-Galactose Analoga mit der thermophilen Hydrolase BgLT.

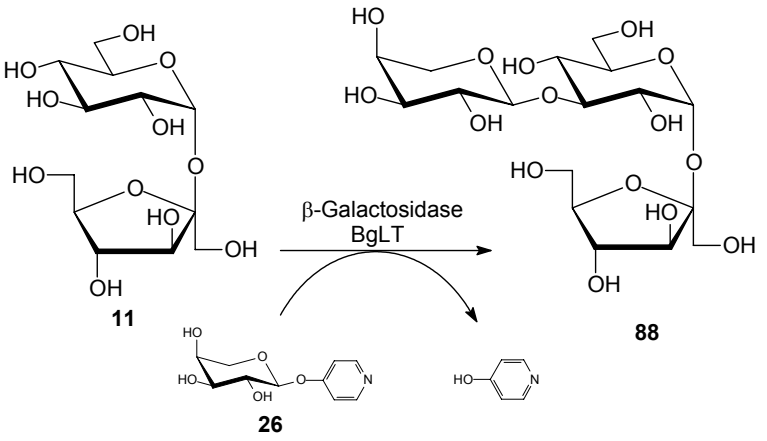


Abb. 54 Arabinosylierung der Saccharose **11** unter BgLT Katalyse mit dem Pyridinylarabinosid **26**.

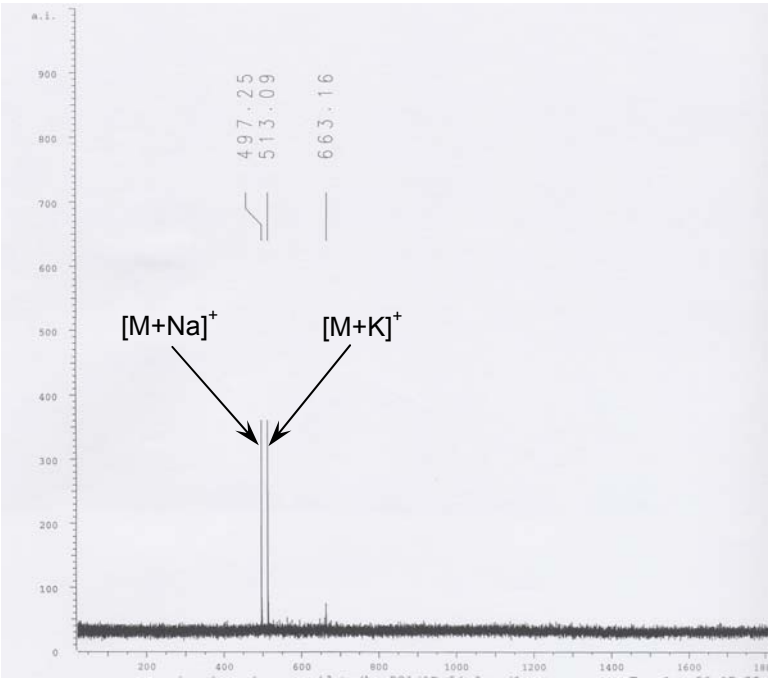


Abb. 55 MALDI-TOF Spektrum der arabinosylierten Saccharose **88**

Bei weiteren Untersuchungen war das 3-*O*-galactosylierte Isomalt **89** ebenfalls durch Umsetzung mit den Donoren Pyridinylgalactosid oder Lactose unter Katalyse von BgLT in Ausbeuten von 11.2 % und 8.8 % zugänglich (Abb. 56).

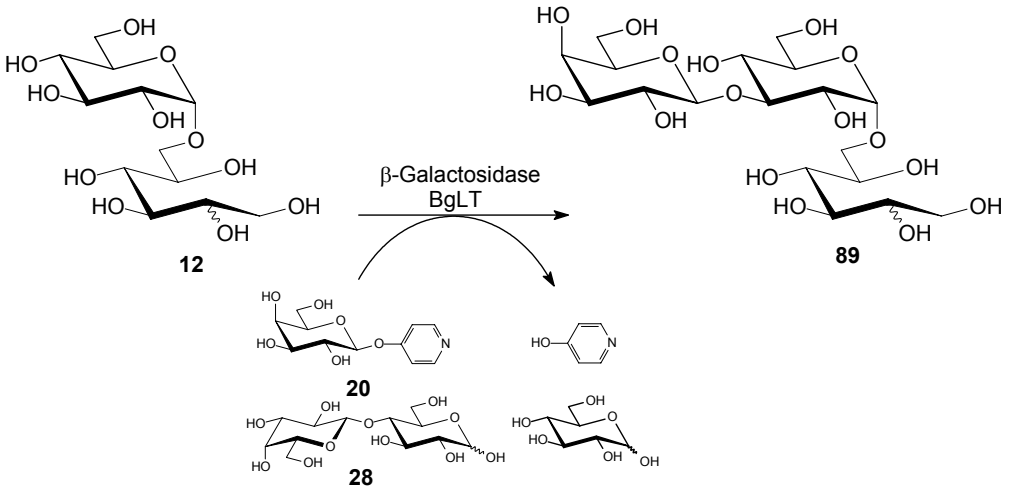


Abb. 56 Galactosylierung des Isomalts **12** unter BgLT Katalyse

Das Trisaccharid **90** (Abb. 57) entstand durch Inkubation von Isomaltulose und den Donoren Pyridinylgalactosid **20** und Lactose. Auch hier fielen die Ausbeuten mit 13.2 % für den künstlichen und 7.9 % für den natürlichen Donor wie schon in der Umsetzung mit Isomalt geringer aus als für die Reaktion mit Saccharose.

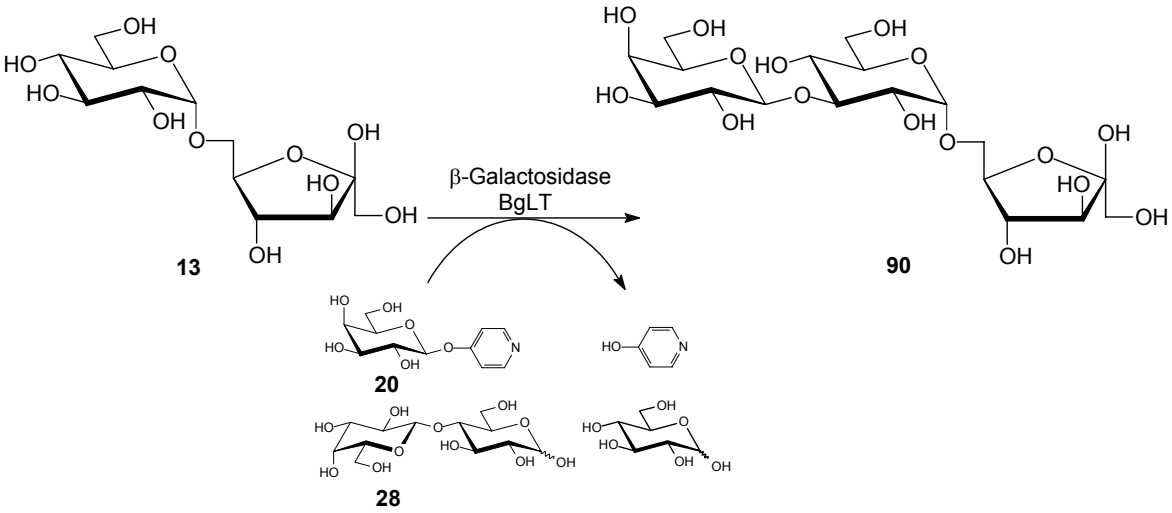


Abb. 57 Galactosylierung der Isomaltulose **13** unter BgLT Katalyse

Als Akzeptor wird aber auch das Allyl-*N*-acetylglucosaminid **17** in Ausbeute von 11 % akzeptiert, welches wie die anderen, eingesetzten Akzeptoren regioselektiv nur in der 3-*O*-Position galactosyliert wird. Somit sind auch mit dem Enzym BgLT interessante Synthesewege zu β(1→3) verknüpften Chitooligomeren möglich, die kürzlich chemisch synthetisiert worden sind. [95,96] (Abb. 58)

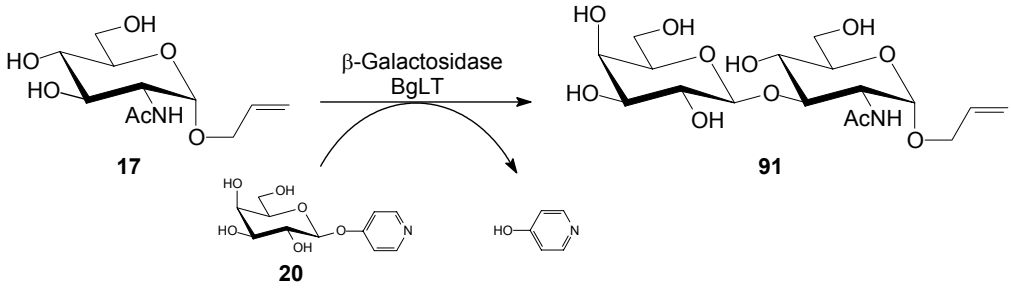


Abb. 58 Galactosylierung des Allyl-*N*-acetylglucosaminid **17** unter BgLT Katalyse

Die Umsetzungen mit der thermophilen Hydrolase BgLT zeigten gute bis sehr gute Ausbeuten mit den Akzeptoren Methylglucosid und Saccharose. Geringere Ausbeuten wurden in den Umsetzungen mit den Akzeptoren Isomalt und Isomaltulose erzielt. Eine höhere Ausbeute als mit Lactose zeigte sich insgesamt bei allen Reaktionen mit den künstlichen Donorsubstraten Pyridinylgalactosid **20** und β-*p*NP-Galactopyranosid. Die Regioselektivität der β-Galactosidase aus BgLT erweist sich als sehr hoch, denn zu allen Akzeptorsubstraten wurden ausschließlich β-(1→3) Bindungen etabliert. Hierbei ist ebenfalls interessant, dass nur die Pyranose-Einheit des jeweiligen Akzeptors und nicht etwa weitere vorhandene Fructosyl- noch Glucitol / Mannitoleinheiten galactosyliert wurden.

BgLT bietet sich gerade aus diesem Grund als Substitut für die Galactosidase aus Bovine testes an. Die genetische Information lässt sich in *E. coli* exprimieren und in beliebigen Mengen reproduzieren.

Zur analytischen Trennung sowie zur Reaktionsverfolgung, wurden wie bei allen enzymatischen Reaktionen, bei denen komplexe Oligomere entstanden, auf die HPLC-Technik mit Polysphere®-Säulen, zurückgegriffen.

6. Upscaling ausgesuchter Transglycosylierungsreaktionen mit β-Galactosidasen aus Bovine testes, *Bacillus circulans* und A*spergillus oryzae*.

In diesem Kapitel wird die spezielle Problematik und Durchführung der Ansatzvergrößerung (angelsächsisch: „upscaling“) verschiedener β-Hydrolase-vermittelter Galactosylierungsreaktionen behandelt. Als Zielsetzung war die Darstellung ausgesuchter β-(1→3), β-(1→4) sowie β-(1→6) galactosylierter Akzeptorsubstrate und eine Optimierung der spezifischen Reaktionsbedingungen anvisiert.
Mit diesen Untersuchungen sollten genug β-(1→3), β-(1→4) sowie β-(1→6) galactosylierte Produkte erhalten werden, damit Verdaulichkeitsprüfungen durchgeführt werden konnten. Ferner sollten spezifische, bei der Ansatzvergrößerung auftretende Probleme eliminiert werden.

6.1 Untersuchungen zur β-Galactosidase aus Bovine testes.

Die β-Galactosidase aus Bovine testes ist kommerziell erhältlich, aber schon für präparative Ansatzgrößen geschweige denn für die Herstellung von Saccharidderivaten im Grammmaßstab zu teuer. Da für die anstehenden Synthesen das Rohenzym aus Rinderhoden den präparativen Ansprüchen genügte, wurde bei der Gewinnung und Reinigung des Enzyms auf die bereits erwähnte Methode von Hedbys *et al.*,[93] die auf Arbeiten von Distler und Jourdian [94] basiert, zurück-gegriffen.

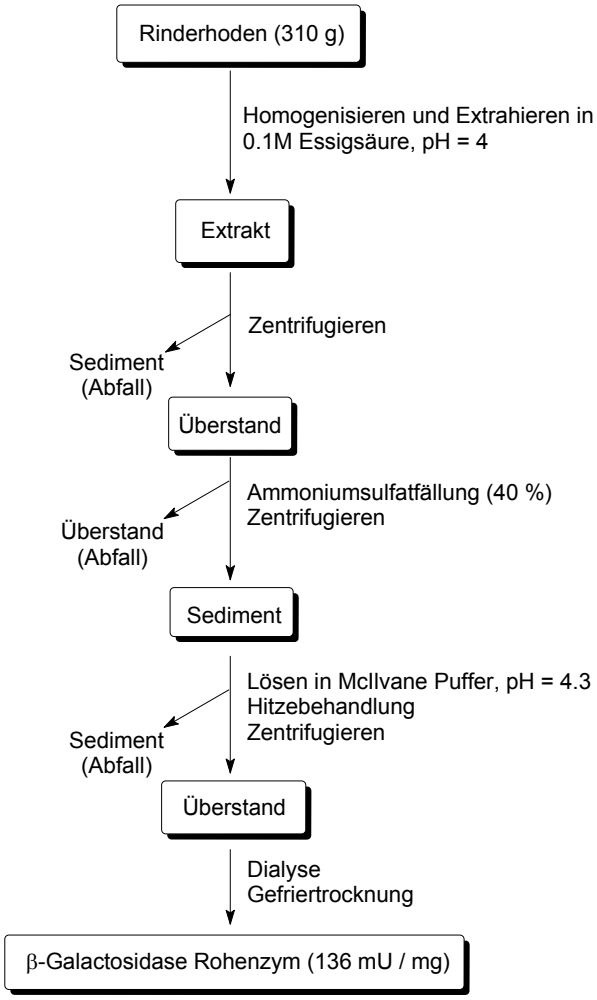


Abb. 59 Schematische Darstellung der Gewinnung des Rohenzyms aus Rinderhoden

Bekannt ist, dass die β-Galactosidase aus Bovine testes *in vivo* β-(1→3), β-(1→4) sowie β-(1→6)-Bindungen von *N*-Acetyllactosamin-Derivaten hydrolysiert und umgekehrt, unter Transgalactosylierungsbedingungen eine Präferenz für die Etablierung von β-(1→3)-Verknüpfungen besitzt. Detailliertere Untersuchungen bezüglich der Selektivität wurden bereits von Gambert *et al.* [89] an *N*-Acetylglycosamin-Verbindungen sowie von Schmidt [97] an verschiedenen Oligosacchariden unternommen.

Die bisher angewandten Synthesemethoden stützten sich auf folgende Charakteristika: Die Ansätze fanden in relativ verdünnter Konzentration statt (Volumina in der Regel 1 – 1.5 ml) und die absolute Ansatzgröße spielte sich im Bereich von 0.1 bis 0.2 mmol für das Akzeptorsubstrat ab.

Um Upscaling zu betreiben, wird gern auf die Immobilisierung des eingesetzten Enzyms zurückgegriffen. [98] Da bei dieser Methode ein Teil des immobilisierten Enzyms unter Umständen inaktiviert wird, wurde hierauf verzichtet.

Bei ersten Versuchen zur Ansatzvergrößerung um den Faktor fünf mussten Ausbeuteverluste gegenüber den durchgeführten Standardansatzgrößen (1 mmol Akzeptor, 0.5 – 1.0 mmol Donor) hingenommen werden. Diese Schwierigkeit konnte nach Optimierungsarbeiten dadurch umgangen werden, dass in sehr hohen Konzentrationen gearbeitet wurde. Das bedeutet, dass das Reaktionsmedium eine stark zähflüssige Konsistenz (Sirup) hatte. Durch diese Maßnahme war es möglich, die Ausbeute bei vergrößerten Ansätzen auf einen akzeptablen Status zu bringen.

Gleichzeitig ergab sich das Problem, dass die Puffersalze bei größeren Ansätzen für die Trennung des Produktes von den Edukten schwierig zu entfernen waren. Um dem Gesichtspunkt der Entsalzung zu entsprechen, wurde daher die Pufferkonzentration sukzessive herabgesetzt. Letztlich gelang es, ganz auf eine Puffersalzlösung zu verzichten und die mit Bovine testes katalysierten Reaktionen in wässrigen Medien bei pH = 4.3 durchzuführen.

Absicht war es, sowohl die Saccharose als auch das Isomalt zu den β-(1→3)-galactosylierten Trisacchariden **86** und **89** im Gramm-Maßstab umzusetzten (Abb. 60/61).

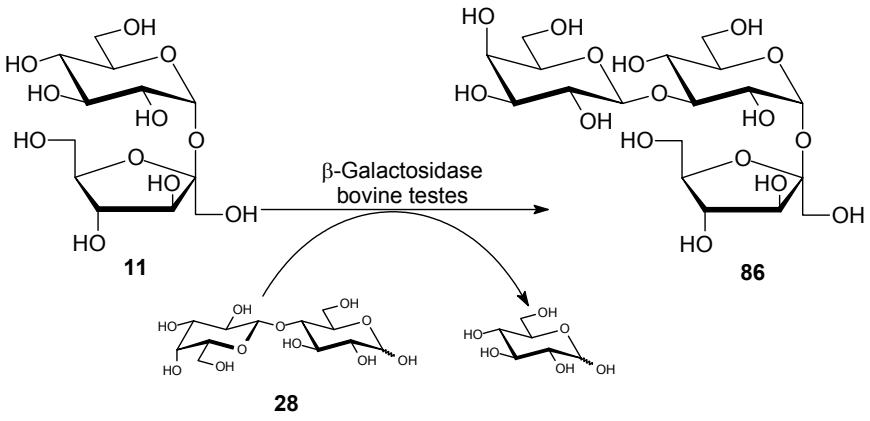


Abb. 60 Gewinnung der β-(1→3) galactosylierten Saccharose **86** beim Upscaling

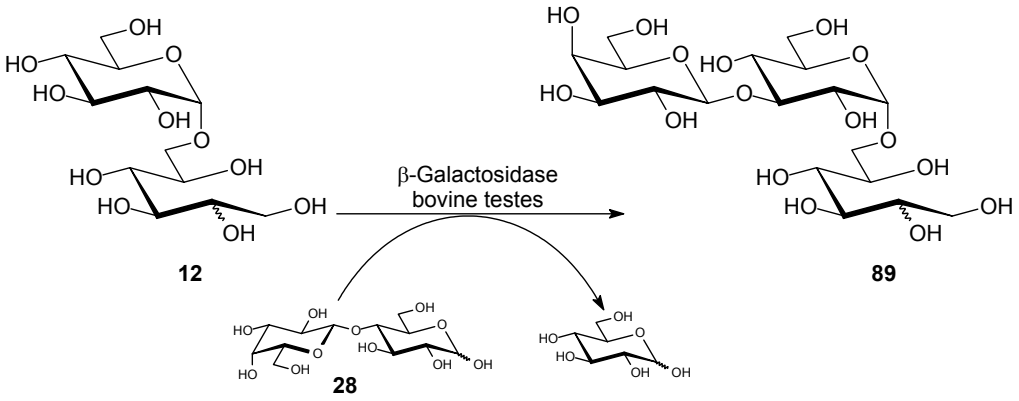


Abb. 61 Gewinnung des β-(1→3) galactosylierten Isomaltitols **89** beim Upscaling

Angefangen bei Ansatzgrößen von 1 mmol Akzeptorsubstrat, konnte durch Optimierung die Ansatzgröße sukzessive auf 50 mmol bei höheren Ausbeuten von 16 – 17 % gesteigert werden.

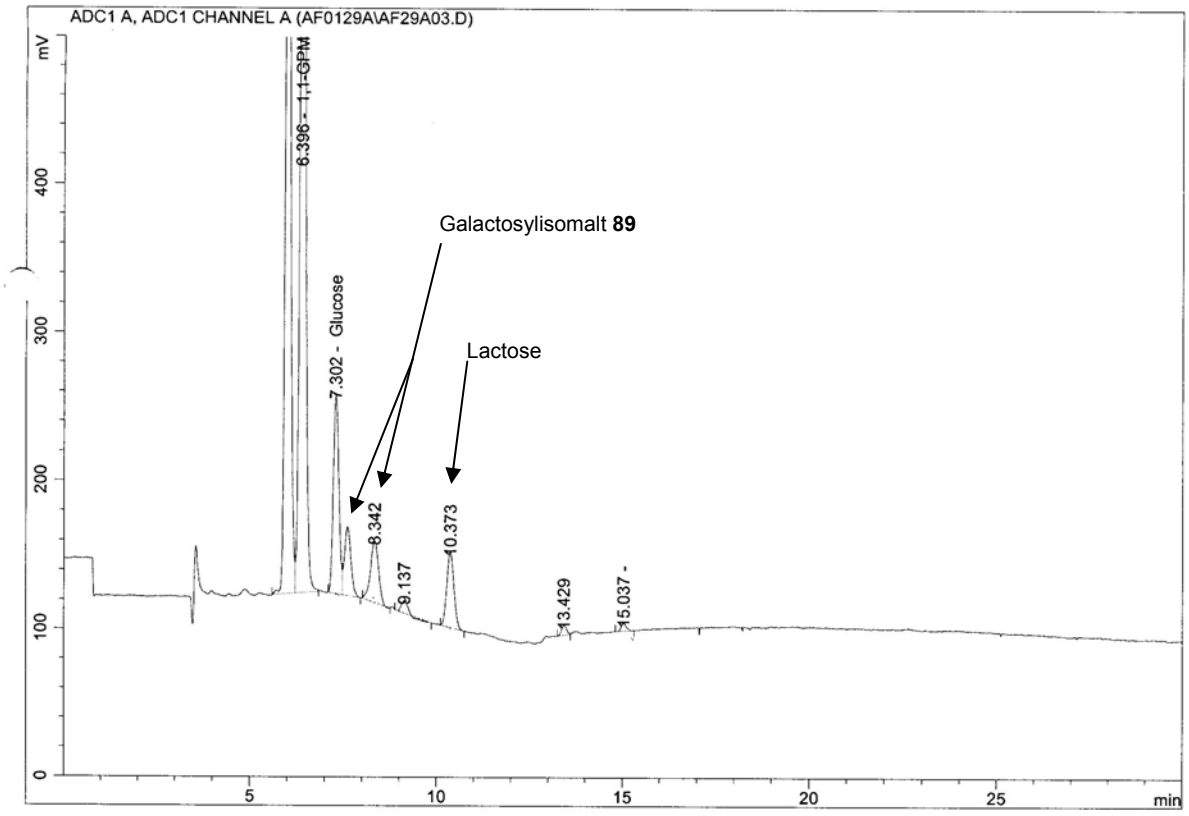
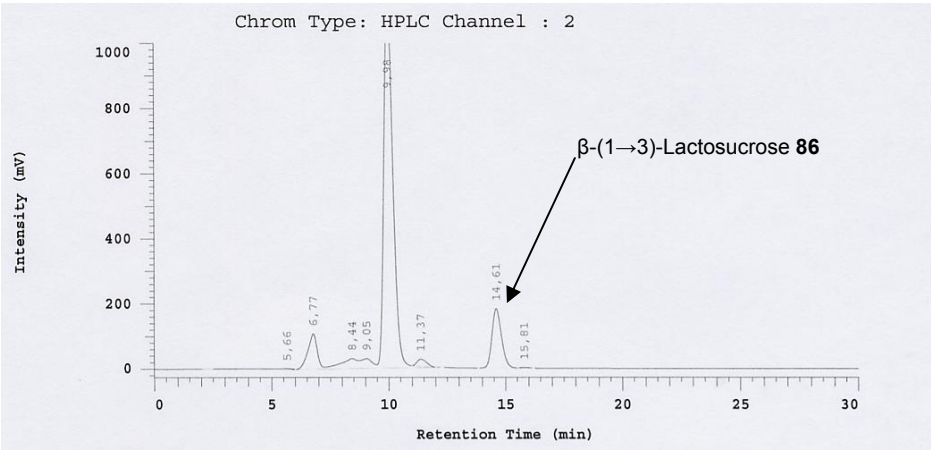


Abb. 62 HPAEC-Chromatogramm aus dem Reaktionsgemisch zur Synthese des β-(1→3)-Galactosylisomalts **89**.

Gleichzeitig gelang es, die Reaktionen unter Katalyse von Bovine testes ohne Pufferlösung durchzuführen. Vielmehr ließen sich die Reaktionen mit dem Rinderhoden Rohenzym ohne Puffer und Salzfracht in Wasser bei pH = 4.3 durchführen.

Die anschließende Trennung der großen Reaktionsansätze wurde in Kooperation mit der Südzucker AG auf einer industriellen GPC-Säule durchgeführt. Das Fortschreiten der Reaktionen wurde mit chromatographischen Mitteln beobachtet. Auf dem HPAC-Chromatogramm (Abb. 62) sind die beiden Produkt-Isomere des β-(1→3)-Galactosylisomalts **89** hervorgehoben. Es gelang die Isolierung von 4.6 g (16 %) des gewünschten Produktes **89** durch den Einsatz von 20.7 g Lactose als Donor sowie 17.2 g Isomalt als Akzeptorsubstrat, unter Katalyse von Bovine testes.



Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA
Calculation Method: AREA%

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	5,66	288116	0,681	BB
2	6,77	2973438	7,025	BV
3	8,44	1545129	3,651	VV
4	9,05	1094030	2,585	VV
5	9,98	30537449	72,151	VV
6	11,37	627092	1,482	TBB
7	14,61	5217693	12,328	BV
8	15,81	41700	0,099	TBB
		42324647	100,000	

Abb. 63 HPLC-Chromatogramm (Polysphere® NA) aus der Reaktionsgemisch zur Darstellung der β-(1→3)-Lactosucrose **86**

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 63) des Produktgemisches aus der Synthese zur β-(1→3)-Lactosucrose **86** zeigt zu Beendigung der Reaktionszeit von 5 d bei 37 °C

eine weit fortgeschrittene Bildung des gewünschten Produktes, bei einer RT (*R*etention *T*ime) von 14.61 min. Ausgehend von 10.8 g Lactose als Donor sowie 17.1 g Saccharose unter Katalyse von Bovine testes 2.7 g (17 %) der β-(1→3)-Lactosucrose **86** gewonnen werden. Wie bei allen anderen Reaktionen wurde die die abschließende Analytik mit Hilfe von MALDI-TOF Spektroskopie und NMR-Spektroskopie durchgeführt um die Molekülmasse in Einklang mit der richtigen Regioselektivität zu bestimmen.

Als Fazit für die enzymatische Synthese mit Bovine testes ist zu resümieren, dass die bisher im zweistelligen Milligrammmaßstab durchgeführten Ansätze auf Grammmaßstab vergrößert werden konnten. Die dabei erzielten Ausbeuten ließen sich durch Optimierungsarbeiten auf 16 - 17 % steigern.
Die Trennung der Produktes **86** und **89** von den Edukten erfolgte in Kooperation mit der Südzucker AG an einer industriellen GPC-Säule mit Fractogel® HW40S und Wasser als Eluenten.

6.2 Anwendung von β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*

Von der β-Galactosidase aus *Bac. circulans* ist bekannt, dass sie glycosidische Bindungen der Galactose in nachstehender regioselektiver Präferenz hydrolysiert: β-D-Gal(1→4)-OR > β-D-Gal(1→6)-OR >> β-D-Gal(1→3)-OR (R = beliebiges Glycosid). Unter Transgalactosylierungsbedingungen entstehen durch die β-Galactosidase aus *Bac. circulans* vorwiegend β-(1→4) Bindungen, [99] obgleich es sich bei dieser Position um die chemisch am wenigsten reaktive handelt. [100]

Diese hohe Selektivität zugunsten der 4-Position wird allerdings nur beobachtet, wenn die Reaktionszeit von 2 h nicht wesentlich überschritten wird, danach wird zunehmend auch die 6-Position des spezifisch eingesetzten Akzeptorsubstrats galactosyliert.

Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit der Regioselektivität von der angewandten Reaktionstemperatur wurde von Vetere *et al*. durchgeführt. [46] Bilanz dieser Untersuchungen war, dass mit steigender Inkubationstemperatur von 15 °C bis 55 °C die Regioselektivität zugunsten des jeweiligen β-(1→6) galactosylierten Produktes abnahm. Dennoch gelang es Schmidt, [97] trotz hoher Temperaturen von 55 °C konstant hohe Ausbeuten zu erzielen.

In Bezug auf die Akzeptorspezifität wurde von Crout *et al*. festgestellt, dass der von *Bac. circulans* katalysierte Galactosyltransfer auf Di- und Oligosaccharide selektiver verläuft als auf Monosaccharide. Diese Erkenntnis wurde auf eine erweiterte Substraterkennung über mindestens zwei Kohlenhydrateinheiten im aktiven Zentrum des Enzyms zurückgeführt. [101] Der Befund ließe die gleichbleibend hohe Regioselektivität trotz erhöhter Reaktionstemperatur verstehen. Aus den erörterten Ergebnissen ließ sich übereinstimmend mit der Literatur [102,103] die hohe Regioselektivität der β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* ableiten.

Ein wichtiger Aspekt des Upscalings ist natürlich auch hier die Verfügbarkeit des Enzyms. Die β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* ist kommerziell verfügbar (DAIWA KASEI, Osaka, Japan) und der Preis läßt auch eine Verwendung in präparativen Ansätzen zu. Bei der Synthese der β-(1→4) glycosidisch verknüpften Akzeptoren Saccharose und Isomalt mit Galactose, unter Katalyse der β-Galactosidase aus *Bac. circulans* kamen entscheidende Unterschiede zur β-Galactosidase aus Bovine testes zum Tragen. Während bei den Ansätzen mit Bovine testes ohne einen spezifischen Puffer gearbeitet werden konnte, war eine Reaktion mit *Bacillus circulans* mit nur pH eingestelltem Wasser nicht möglich, sondern es

musste auf einen Acetatpuffer (pH = 5) zurückgegriffen werden. Allerdings waren hier größere Ansätze auch in verdünnten Lösungen, wie sie im kleinen Maßstab Usus sind, ohne Ausbeuteverlust durchführbar.
So ließ sich nach Optimierungsarbeiten in insgesamt vier Ansätzen zu je 20.6 g (60 mmol) mit Isomalt **12** als Akzeptor und 4.1 g Lactose (12 mmol) als Donorsubstrat das β-(1→4) galactosylierten Isomalt **92** in Ausbeute von 15.2 % isolieren. (Abb. 64)

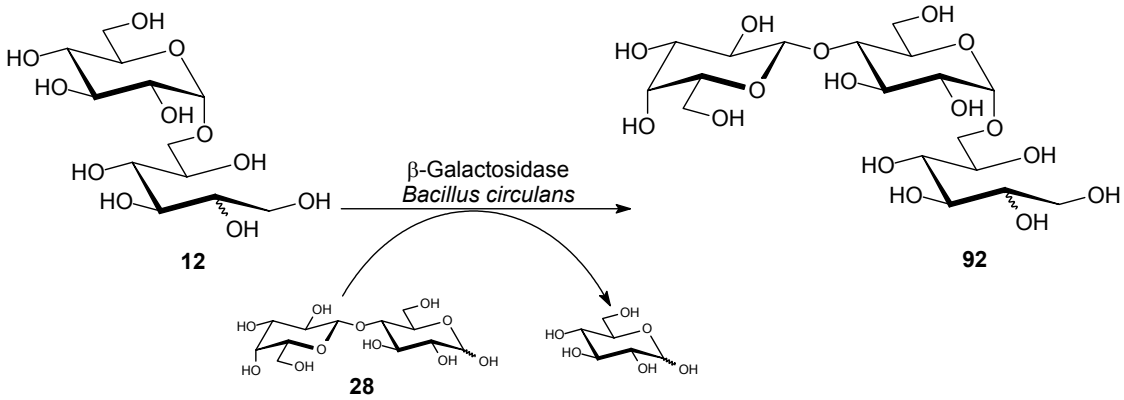


Abb. 64 Gewinnung des β-(1→4) galactosylierten Isomaltitols **92** beim Upscaling

Nach ähnlichem Muster verlief die Reaktion mit dem Akzeptor Saccharose. Hier konnten 18.6 % Ausbeute bei der Umsetzung von 20.4 g Saccharose mit 4.1 g Lactose erzielt werden (Abb. 65).

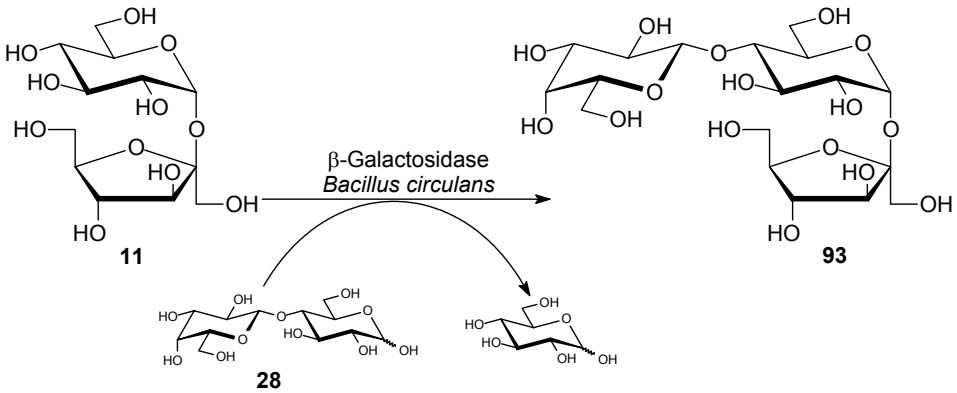


Abb. 65 Darstellung der β-(1→4) galactosylierten Saccharose **93** beim Upscaling

Wie schon mit dem Akzeptor Isomalt, ließen sich brauchbare Ausbeuten mit dem Akzeptor Saccharose erzielen. Interessanterweise konnten die Ansätze unter Katalyse der β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* ohne allzu großes Problem auf Grammmaßstab vergrößert werden.

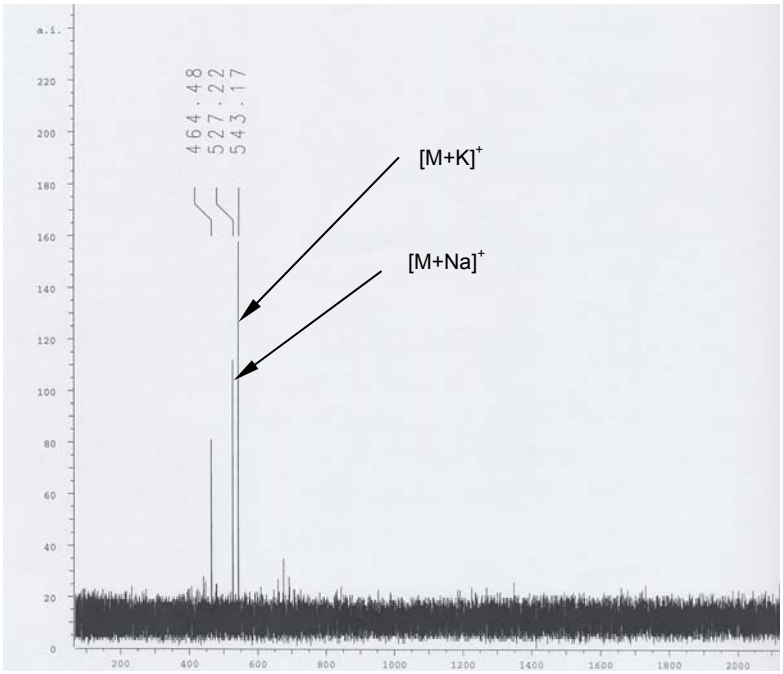


Abb. 66 MALDI-TOF Spektrum der β-(1→4)-Lactosucrose **93** nach Aufreinigung

Auch in diesem Fall wurden die großen Ansätze auf einer industriellen GPC-Säule, in Kooperation mit der Südzucker AG, aufgetrennt.

6.3 Nutzung der β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae*

Die β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* hydrolysiert *in vivo* vornehmlich β-(1→6)-verküpfte Galactosestrukturen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis werden unter Transgalactosylierungbedingungen hauptsächlich primäre Hydroxylgruppen der Kohlenhydrat-Akzeptoren, unter Bildung von β-(1→6) Bindungen galactosyliert.

Die Akzeptorspezifität dieses Enzyms ist weit geringer als die der Galactosidasen aus Bovine testes oder *Bacillus circulans*. Publiziert sind in diesem Zusammenhang Transgalactosylierungen von *N*-geschützten Aminosäuren, [104] Steroiden [105] und *trans*-1,2-Cyclohexandiol. [106] Nach einer Kinetikstudie, die von Lopez *et al.* [107] mit der β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* durchgeführt wurde, haben pH-Werte zwischen 5 – 8, Inkubationstemperaturen von 4 °C bis 50 °C sowie der Einsatz von Cosolventienten (DMF, DMSO und Diethylenglycoldiethylether) keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute und auf die Produktzusammensetzung.

Um β-(1→6)-galactosylierte Saccharose sowie Isomalt im Grammmaßstab bereitzustellen, wurden die Synthesen aus kleinem Maßstab abgeleitet und wie zuvor auf größere Ansätze optimiert. Als interessantes Ergebnis lässt sich anmerken, dass das kommerziell erhältliche Enzym aus *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) nicht nur unter gepufferten Bedingungen, sondern auch wie schon die Galactosidase aus Bovine testes in wässrigen, pH-eingestellten Systemen einsetzbar ist.

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen in einem wässrigen, ungepufferten System (pH = 4.5) konnten wesentlich vergrößerte Ansätze durchgeführt werden.

So ließ sich unter Katalyse mit Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* bei 30 °C und nach 2 Stunden Reaktionszeit mit 2 g des Donors Lactose (**28**) und 5 g Saccharose (**11**) als Akzeptor bei einer Ausbeute von 21 % das Trisaccharid **94** isolieren (Abb. 67).

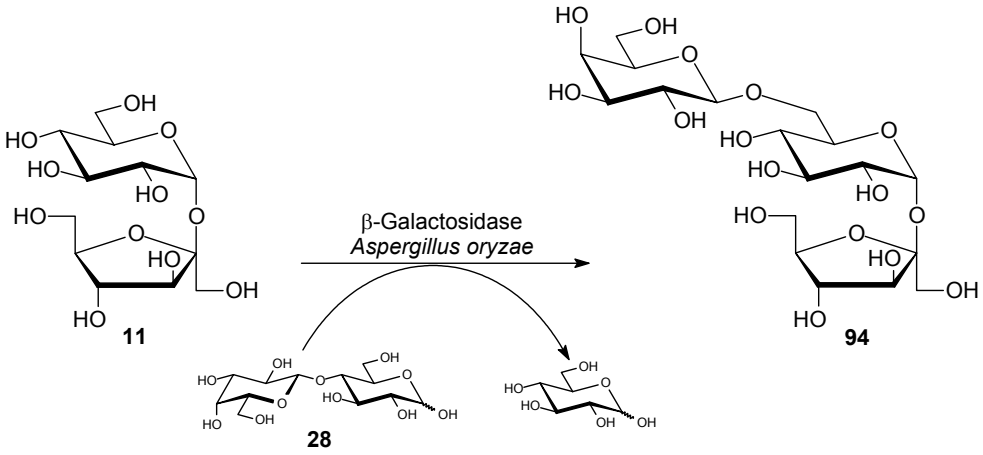


Abb. 67 Gewinnung der β(1→6) galactosylierten Saccharose **94** beim Upsacling

Ebenso wie die Saccharose ließ sich Isomalt (**12**) als Akzeptor umsetzten. Unter den gleichen Bedingungen konnte 10 g Isomalt (**12**) mit 4.1 g Lactose (**28**) bei 29.8 % Ausbeute zu 1.8 g Trisaccharid **95** umsetzt werden. (Abb. 68)

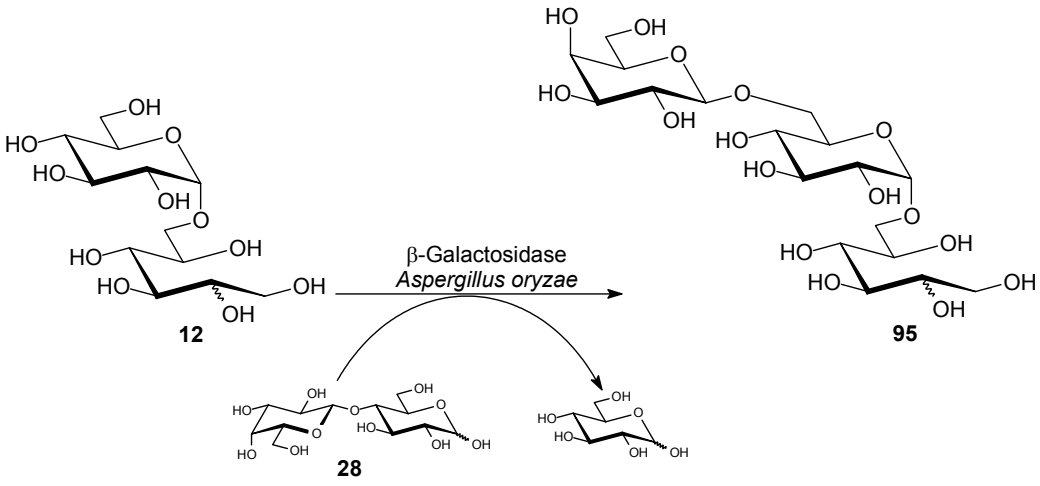


Abb. 68 Gewinnung des β(1→6) galactosylierten Isomalts **95** beim Upsacling

Die signifikant hohen Ausbeuten gerade für den Akzeptor Isomalt (**12**) ohne Pufferlösung machen die Reaktion besonders für industrielle Zwecke interessant. Sofern die synthetisierten Trisaccharide **94** und **95** bifidogene Eigenschaften zeigen, könnte nach weiterer Optimierung eine industrielle Erzeugung mit Hilfe der eingesetzten Hydrolasen möglich werden.

Wie schon bei den vorangegangen großen Ansätzen erfolgte die Separation der Produkte **94** und **95** von den Edukten in Kooperation mit der Südzucker AG an einer industriellen GPC-Säule mit Fractogel® HW40S und Wasser als Eluenten.

7. Zusammenfassung

Der Marktanteil an so genannten „functional food“ Lebensmittel ist in den letzten Jahren stetig gestiegen. Die Definition des Begriffs „functional“ beinhaltet in diesem Zusammenhang Lebensmittel, die bei Einnahme einen positiven Effekt auf die Gesundheit haben. Im Besonderen seien hier Oligosaccharide mit präbiotischen Eigenschaften genannt, die beispielsweise eine intakte Darmflora begünstigen und in diesem Zusammenhang zur Stärkung des Immunsystems beitragen. Diese Oligosaccharide und deren synthetischer Zugang in größerem Maßstab stehen daher im zentralen Interesse der Lebensmittelindustrie.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Selektivität und die Donorspezifität der α-Hydrolasen RAF-A und aGaB sowie der β-Hydrolase BgLT untersucht. Einhergehend wurden neue Donoren synthetisiert sowie enzymatische Zugänge zu neuen Oligosacchariden entwickelt und das upscaling mit den Enzymen aus Bovine testes, *Bacillus circulans* und *Aspergillus oryzae* erfolgreich durchgeführt.

Bei RAF-A handelt es sich um eine α-Galactosidase, die gegenüber monomeren Akzeptoren wie Methylglucosid, Methylmannosid oder Methylgalactosid eine ausgeprägte α(1→6) Spezifität und zusätzlich mit geringeren Anteilen an α(1→4) galactosyliertem Produkt für Methylglucosid zeigte. Weiterhin konnte bei selektiv 6-*O*-geschützten Akzeptorsubstraten die Galactosylierungsposition gezielt beeinflusst werden. Bei Disaccharidakzeptoren wie Saccharose und Isomaltulose entstanden ausschließlich die α(1→6) Derivate. Gleichzeitig zeigte RAF-A eine weitere interessante Donorspezifität, denn neben dem klassischen Donor *p*NP-Galactosid **19**, werden auch Mellibiose **27**, Galactosylfluorid **18**, sowie teilweise Fucosylfluorid **21** und Arabinosylfluorid **24** als Donoren akzeptiert.

Bei aGaB handelt es sich eine thermophile α-Galactosidase, deren Optimum bei 65 °C liegt und die ausschließlich α(1→6) Spezifität zeigt. Dieses Enzym war wegen seiner Donorspezifität weniger universell verwendbar als RAF-A und akzeptierte neben *p*NP-Galactopyranosid **19** nur Mellibiose **27** und α-Galactopyranosylfluorid **18**.

BgLT ist eine thermophile β-Galactosidase, die sich als Substitut für das Enzym aus Bovine testes herausstellte. Dieses Enzym zeigt eine ausgeprägte Regiospezifität zur Bildung von β-(1→3) glycosidischen Bindungen und akzeptiert neben *p*NP-β-D-Galactopyranosid (**85**), Lactose **28** und 4-Pyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**) auch 4-Pyridinyl-β-D-fucopyranosid (**23**) sowie 4-Pyridinyl-α-L-arabinopyranosid (**26**) als

Donorsubstrate. Neben den Akzeptoren Saccharose (**11**), Isomalt (**12**), Isomaltulose (**13**) und Methyl-α-D-glucopyranosid (**14**) ließ sich auch Allyl-α-*N*-acetylglucosaminid **17**, enzymatisch galactosylieren, was einen interessanten Syntheseweg für neuartige Chitooligomere eröffnen mag.

Ebenso gelang die Durchführung von Transgalactosylierungsreaktionen mit den spezifischen β-Galactosidasen aus Bovine testes und *Aspergillus oryzae* in sehr guten Ausbeuten ohne Pufferlösung. Weiterhin konnte mit den beiden vorher genannten Enzymen, sowie mit *Bacillus circulans* β-(1→3)-, β-(1→4) sowie β-(1→6)-galactosylierte Strukturen im Grammmaßstab hergestellt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt neue, interessante Synthesewege zur Darstellung spezifischer Oligosaccharide und unterstreicht die vielseitige Einsatzmöglichkeit von Hydrolasen mit natürlichen und künstlichen Donoren in der organischen Synthese.

7. Summary

In recent years, an increasing effort has been made to screen for functional food components. In this context the definition of the term “functional” describes components displaying health beneficial effects. Oligosaccharides are of particular interest due to their prebiotic attributes, responsible for a proper intestinal flora and thus stabilizing effects of the immune system. Synthetic access for these oligosaccharides on larger scale of is of particular interest to the food industry.

In this work the selectivity and the donor specificity of the α-hydrolases RAF-A and aGaB as well as the β-hydrolase BgLT were studied. Novel donors have been synthesised, and enzymatic approaches for the synthesis of new oligosaccharides were developed. Further, upscaling with β-galactosidases from bovine testes, *Bacillus circulans* and *Aspergillus oryzae* were accomplished successfully.

RAF-A is an α-galactosidas with distinctive α(1→6) specificity for monomeric acceptors such as methyl glucoside **14**, methyl gactoside **15** or methyl mannoside **16**. In case of methyl glucoside **14** the α(1→4) linked derivative was found as side product. Further, it was possible to diversify the position of galactosylation employing selectively 6-*O*-protected acceptors. Using disaccharide acceptors such as sucrose and isomaltulose only the α(1→6) regioisomeric derivatives were obtained. RAF-A showed other interesting donor specificities because in addition to *p*NP-α-D-galactopyranoside (**19**), even mellibiose **27** and α-D-galactopyranosyl fluoride (**18**), as well as partially α-D-fucopyranosyl fluoride (**21**) and β-L-arabinopyranosyl fluoride (**24**) were accepted as a donor substrate.

aGaB is a thermophilic α-hydrolase with a temperature optimum at 65 °C, showing an exclusive α-(1→6) specificity. This enzyme showed a significant selectivity and only accepted *p*NP-α-D-galactopyranoside (**19**), mellibiose **27** und α-D-galactopyranosyl fluoride (**18**).

BgLT is a thermophilic β-galactosidase, which turned out to establish novel β-(1→3) linkages to the applied acceptors and thus may be considered a distinguished substitute for the β-galactosidase from bovine testes. In addition to lactose **28**, *p*NP β-D-galactopyranoside (**85**) and pyridinyl β-D-galactopyranoside (**20**) BgLT accepted even pyridinyl β-D-fucopyranoside (**23**) and pyridinyl α-L-arabinopyranoside (**26**) as donor substrates and formed β-(1→3) bonds exclusively. In the range of acceptor substrates sucrose (**11**), isomalt (**12**), isomaltulose (**13**) and methyl α-D-glucopyranoside (**14**) also allyl-α-*N*-acetylglucosaminide **17**, could be galactosylated

successfully wich this may open an interesting synthetic passway to new chitooligomers.

Further it was shown, that transglycosylation succeeded well with both the β-galactosidases from bovine testes and *Aspergillus oryzae* without a specific buffer only in pH adjusted aqueous media. Finally these enzymes, as well as the β-galactosidase from *Bacillus circulans* could be employed to attain β-(1→3)-, β-(1→4) and β-(1→6)-galactosylated structures on a gram scale.

The present work shows novel pathways for the enzymatic synthesis of oligosaccharides and emphasises the versatile applications of hydrolases with natural and artificial donors in organic synthesis.

8. Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden:

Reaktionsführung und Reaktionsverfolgung:

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Kieselgel-Folien der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F_{254}, Merck). Die Detektion der Substanzen erfolgte durch UV-Absorption, besprühen mit 10 %iger ethanolischer Schwefelsäure mit anschließender Hitzebehandlung oder durch Besprühen mit einer 10 %igen Molybdatophosphorsäure-Lösung und anschließender Hitze-Behandlung.

Mit Ausnahme der Reaktionen an denen Wasser direkt als Lösungsmittel, respektive Reaktand beteiligt war, wurden alle Reaktionen in nach den üblichen Methoden absolutierten organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Alle Pufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und zur Unterbindung einer eventuellen Kontamination durch Mikroorganismen mit 0.5 % Natriumazid versetzt.
pH-Messungen erfolgten mit einem pH-Meter: Mettler „Toledo“ MP 220
Die Inkubation der Enzymansätze bis zu einem Gesamtvolumen von 2 ml erfolgte in einem Eppendorf *Thermomixer comfort*. Größere Ansätze wurden in einem Schüttelautomaten GFL 1086 durchgeführt. Zentrifugiert wurde mit einer Beckmann Kühlzentrifuge J2-21 oder einer Eppendorf Zentrifuge 5415. Gefriertrocknung erfolgte mit einem Leybold-Heraeus Lyovac GT2 Gerät.

Folgende Enzyme kamen zum Einsatz:
Von Prof. Dr. R. Mattes, Institut für Industrielle Genetik, Stuttgart, geklonte und in *E. coli* exprimierte Enzyme:
α-Galactosidase RAF-A, α-Galactosidase agaB, β-Galactosidase BgLT.
β-Galactosidase aus Rinderhoden (EC 3.2.1.23), isoliertes Rohenzym.
β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* (EC 3.2.1.23), Biolacta Daiwa Kasei Co., Japan.
β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.23), Sigma-Aldrich.
Lipase aus Schweineleber, (EC 3.1.1.3) Sigma-Aldrich.

Säulenchromatographie:

Säulenchromatographische Trennungen wurden, nach dem Flashverfahren an Kieselgel 60 (230 – 400 mesh, Korngröße 40 – 63 µm, Merck), durchgeführt. Für Chromatographie an Kieselgel wurden ausschließlich destillierte organische Solventien verwendet. Gelpermeationschromatographie wurde an Biogel® P2 (fine, 2 x 100 cm) mit den Eluenten Wasser oder 0.25 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung durchgeführt.

Für chromatographische Trennungen an Sephadex® LH-20 (fine, 2 x 100 cm) wurde eine Mischung aus Ethanol / Wasser 1:5 verwendet.

Zur analytischen HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) an einem LaChrom®-HPLC-System wurden neben LiChrosorb® RP-18 und LiChrosorb® NH_2 Säulen (250 x 4 mm, 5 µm) hauptsächlich Polyspher® NA, CA, sowie PB (300 x 6.5 mm) zur Analytik von oligomeren Zuckergemischen eingesetzt. Die Detektion erfolgte substanzspezifisch mittels UV-(L-7455) oder RI-(L-7490) Detektor der Firma Merck. Zur Trennung der Enzymansätze im Grammmaßstab wurde eine GPC-Trennanlage mit drei Trennsäulen besteht (Säulen Durchmesser 10 cm, Länge 121.8 cm) eingesetzt. Bei der stationären Phase handelt es sich um Fractogel® HW40S Wasser wurde als Eluenten verwendet. [108]

Analytik:

Für photometrische Messungen wurde ein Shimadzu Spektrophotometer UV-160-A benutzt.

Spezifische Drehwerte wurden an einem Polarimeter der Firma Perkin-Elmer, Modell 241 PE, in einer 1 dm Küvette bei 589 nm und bei 20 °C bestimmt.

MALDI-TOF Massenspektren wurden mit einem Bruker Biflex III (N_2-Laser, 337 nm, extern kalibriert) in einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) gemessen.

NMR Spektren wurden an einem Bruker Spektrometer AMX-400 (^{1}H: 400 MHz, ^{13}C: 100 MHz) bzw. einem Bruker DRX-500 Spektrometer (^{1}H: 500 MHz, ^{13}C: 125 MHz) gemessen. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan (0.00 ppm) in $CDCl_3$ verwandt. Spektren, die in anderen deuterierten Lösungsmitteln vermessen wurden, wurden auf die jeweiligen spezifischen Solvenspeaks geeicht. Eine vollständige Zuordnung der Signale erfolgte falls erforderlich mit ^{1}H-^{1}H / ^{1}H-^{13}C COSY, TOCSY sowie HMQC und HMBC- Experimenten. Für die eindeutige Zuordnung der Signale und zur Bestimmung der Regioselektivität wurden die

ungeschützten Saccharid-Derivate gemäß AAV1 Variante A acetyliert. Es sind dann zusätzlich zu ausgesuchten Signalen der ungeschützten Verbindung die chemischen Verschiebungen der jeweiligen acetylierten Produkte angegeben.
Eine Ausnahme bildet hier das Isomalt **12** und alle davon abgeleiteten Produkte. Weil Isomalt als Diastereomerengemisch vorliegt, kommt es zu ausgeprägten Signalüberlagerungen und –verbreiterungen. Daher war eine eindeutige Zuordnung der ^{1}H- und ^{13}C- Signallagen nur durch Analogieüberlegung unter Zuhilfenahme der Literatur möglich. [109,110]

Aktivitätsmessungen:

1.) *Assay zur Bestimmung der Aktivität der β-Galactosidase aus Bovine testes (Rinderhoden) gegenüber pNP-β-D-galactopyranosid:*

Die β-Galactosidase katalysiert unter anderem die Spaltung des Substrats *p*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid. Die Menge des dabei freiwerdenden *p*-Nitrophenols kann photometrisch quantifiziert werden. 75 µl 2 mM wässrige *p*NP-β-Galactosid Lösung sowie 75 µl 50 mM McIlvane Puffer (NaH_2PO_4 • $12H_2O$ / Zitronensäure, pH = 4.3) werden mit 150 µl Enzymlösung bei 37 °C inkubiert. Parallel wird eine Vergleichslösung angesetzt, bei der die Substratlösung durch 75 µl Puffer ersetzt wird. Nach jeweils 10, 20 und 30 min werden 100 µl Aliquote entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 0.25 M Glycinpuffer (pH = 10) terminiert. Die Extinktion wurde bei 400 nm bestimmt. Die Konzentration an freiem *p*-Nitrophenol ergibt sich aus einer Eichgeraden, die mit einem Standard aus 0 - 2 mM *p*NP-Lösung in 0.25 M Glycinpuffer (pH = 10) aufgestellt wurde. Ein Unit enzymatischer Aktivität entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µmol *p*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid pro Minute unter den jeweils angegebenen Bedingungen zu hydrolysieren.

2.) *Assay zur Bestimmung der Aktivität der α-Galactosidase aus RAF-A gegenüber pNP-α-D-galactopyranosid:*

Analog des ersten Assays zur Bestimmung der Aktivität der β-Galactosidase aus Bovine testes wird *p*-Nitrophenyl-α-D-galactopyranosid verwandt um die Aktivität der α-Hydrolase zu bestimmen.

Isolierung der Enzyme

Alle eingesetzten Enzyme, bis auf die β-Galactosidase aus Rinderhoden, wurden von Prof. Mattes (RAF-A, aGaB, BgLT) zur Verfügung gestellt oder sind erworbene Produkte kommerzieller Anbieter.

β-Galactosidase aus Rinderhoden:

310 g Rinderhoden (die Tiere sollten nicht viel jünger als 24 Monate sein) wurden zerkleinert und in einem Mixer homogenisiert. Anschließend wurden 310 ml 0.1 M Essigsäure zugegeben und die Mischung mit 2 M Salzsäure auf pH 4 titriert. Das Homogenisat wurde 30 min. gerührt und weiterhin mit 10^6 m/s^2 20 min. zentrifugiert und der Überstand (320 ml) mit 90 g gemörsertem Ammoniumsulfat (Endkonzentration 40 %) versetzt. Nach abermaligem Zentrifugieren wurde der Niederschlag in 120 ml 50 mM McIlvane Puffer (NaH_2PO_4 • 12 H_2O / Zitronensäure, pH = 4.3) gelöst, 15 min. bei 50 °C erwärmt und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand 24 h bei 4 °C gegen McIlvane Puffer (pH = 4.3) dialysiert. Das Rohenzym ist nach Gefriertrocknung bei –20 °C haltbar.

Die spezifische Aktivität der β-Galactosidase beträgt 136 U/g.

Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Acetylierung

Variante A

Die ungeschützte Verbindung wurde in trockenem Pyridin gelöst und mit 5 Äquivalenten Essigsäureanhydrid pro OH-Gruppe versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol codestilliert. Falls erforderlich wurde das Produkt an Kieselgel chromatographiert.

Variante B

Die ungeschützte Verbindung wurde mit 5 Äquivalenten Natriumacetat pro OH-Gruppe sowie einem Überschuss an Essigsäureanhydrid versetzt und langsam auf 130 °C erhitzt. Bei einsetzender exothermer Reaktion wurde die Heizquelle entfernt. Nach Vollendung der Reaktion wurde der Ansatz noch 2 h unter Rückfluss erhitzt,

dann ließ man abkühlen, goss den Ansatz auf Eiswasser und rührte über Nacht. Das Gemisch wurde mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase abgetrennt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. konnte der Rückstand zur Reinigung kristallisiert oder an Kieselgel chromatographiert werden.

AAV 2: Deacetylierung nach Zemplén

Die Verbindung wurde in absolutem Methanol gelöst und mit einer frisch angesetzten 0.1 M methanolischen Natrium-methanolat-Lösung bis pH = 8 – 9 versetzt. Der Fortschritt der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit Amberlite IR 120 (H^+) neutralisiert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt.

AAV 3: Enzymatische Transgalactosylierung mit der α-Galactosidase aus RAF-A

Die Donorverbindung (1 Äquivalent) wurde mit dem Akzeptorsubstrat (2 Äquivalente) in Kaliumphospatpuffer (Konzentration gemäß Variante A oder B, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und mit der Galactosidase RAF-A (20 U / mmol Akzeptor) in 100 µl des gleichen Puffers versetzt. Der Ansatz wurde 24 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Separation der Produkte von den Edukten erfolgte an Biogel® P2 mit dem Eluenten Wasser oder an Sephadex® LH-20 mit dem Eluenten Wasser / Ethanol 1:5.

Variante A für Fluoride: 0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5
Variante B: 0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5

AAV 4: Enzymatische Transgalactosylierung mit der α-Galactosidase aGaB

Die Donorverbindung (1 Äquivalent) wurde mit dem Akzeptorsubstrat (2.5 Äquivalente) in Kaliumphospatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) und mit der thermophilen Galactosidase aGaB (10 U / mmol Akzeptor) in 100 µl des gleichen Puffers versetzt. Der Ansatz wurde 24 h bei 65 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 15 min auf 95 °C erhitzt. Die Separation der Produkte von den Edukten erfolgte an Biogel® P2 mit dem Eluenten Wasser oder an Sephadex® LH-20 mit dem Eluenten Wasser / Ethanol 1:5.

Variante A für Fluoride: 0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5
Variante B: 0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5

AAV 5: Enzymatische Transgalactosylierung mit der β-Galactosidase BgLT

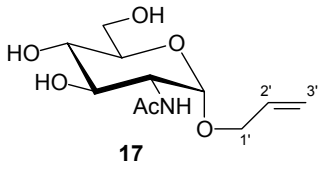
Die Donorverbindung (1 Äquivalent) wurde mit dem Akzeptorsubstrat (2 Äquivalente) in Kaliumphospatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) und mit der thermophilen Galactosidase BgLT (10 U / mmol Akzeptor) in 100 µl des gleichen Puffers versetzt. Der Ansatz wurde 24 h bei 65 °C im Thermomixer inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes auf 95 °C für 15 Minuten. Für den Fall, daß das *p*NP-β-D-galactopyranosid als Donor verwandt wurde, wurde das entstandene *p*-Nitrophenol durch Schütteln mit Essigester extrahiert. Die Separation der Produkte von den Edukten erfolgte an Biogel® P2 mit dem Eluenten Wasser oder an Sephadex® LH-20 mit dem Eluenten Wasser / Ethanol 1:5.

^{13}C-NMR-Literaturwerte des Akzeptors Isomalt (**12**) [109,110]

	Glucosylα(1→6)	**Glucitol**	**Mannitol**
C-1	98.55 / 98.51	63.63	62.79
C-2	71.67		
C-3	73.28		
C-4	69.80		
C-5	72.23		
C-6	60.86	68.90 / 69.16	68.90 / 69.16

Synthesen

Allyl-2-acetamido-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (17)



17

10.0 g (45.2 mmol) *N*-Acetylglucosamin wurden in 160 ml Allylalkohol gelöst und mit 0.6 ml Acetylchlorid versetzt. Der Ansatz wird 24 h unter Rückfluss erhitzt, dabei wird der Fortgang der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel (Essigester / Methanol 6 : 1) chromatographisch gereinigt.
Als Produkt konnte 8.1 g (31.0 mmol, 68 %) eines weißen amorphen Feststoffes isoliert werden

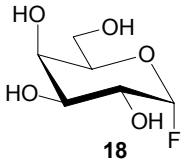
$C_{11}H_{19}NO_{11}$ (261.12)

$[\alpha]_D^{20}$ = +156 (c=1 in H_2O) Lit.:[111] +154.8 (c=1.43 in H_2O)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 7.70 (dddd, 1H, CH-allyl, $J_{2',3'}$ = 1.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 5.5 Hz, $J_{1',2'}$ = 10.4 Hz, $J_{1',2'}$ = 17.3 Hz), 5.10 (dd, 1H, CH_2-allyl, $J_{2',3'}$ = 1.5 Hz, $J_{1',2'}$ = 17.3 Hz), 5.00 (dd, 1H, CH_2-allyl, $J_{2',3'}$ = 1.5 Hz, $J_{1',2'}$ = 10.4 Hz), 4.67 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz), 3.96 (dd, 1H, OCH_2-allyl, $J_{1',1'}$ = 5.5 Hz, $J_{1'2'}$ = 13.1 Hz), 3.77 (dd, 1H, OCH_2-allyl, $J_{1',1'}$ = 5.5 Hz, $J_{1'2'}$ = 13.1 Hz), 3.66 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 3.62 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 2.2 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.1 Hz), 3.56 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 10.7 Hz) 3.52 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 5.3 Hz, $J_{6a,6b}$= 12.1 Hz), 3.45 (ddd, 1H, H-5, $J_{5,6a}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6b}$ = 5.3 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.1), 3.23 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3,}$=$J_{4,5}$ = 10.7 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 174.86 (*C*=O), 134.05, 118.30 allyl *C*, 96.50 (C-1), 72.35 (C-5), 71.42 (C-2), 70.42 (C-3), 68.86 (C-4), 60.94 (C-6), 54.06 (CH_2-allyl), 22.25 (CO*C*H_3).

α-D-Galactopyranosylfluorid (18)



18

1.8 g (5.0 mmol) Tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosylfluorid (**30**) werden unter Zemplén-Bedingungen gemäß AAV 2 unter DC-Kontrolle deacetyliert. Es werden 800 mg (4.4 mmol, 86 %) eines weißen amorphen Feststoffes erhalten, der aus Gründen der Hydrolysesensibilität möglichst trocken bei –20 °C gelagert werden sollte.

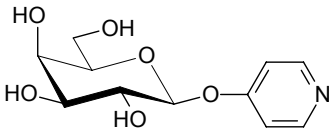
$C_6H_{11}FO_5$ (182.15)

$[\alpha]_D^{20}$ = +111 (c=1 in H_2O) Lit.:[112] +127 (c=1 in MeOH)

^{1}H-NMR (MeOH-d5, 500 MHz): δ [ppm] = 5.42 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 2.7 Hz, J_{H-F} = 54.7 Hz), 4.98 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.5 Hz), 4.56 (ddd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 2.7 Hz, $J_{2,3}$ = 9.0 Hz, J_{H-F} = 24.1 Hz), 3.67 (br. vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 9.0 Hz), 3.59 – 3.50 (m, 1H, H-5), 3.46 – 3.42 (m, 1H, H-6a), 3.42 – 3.38 (m, 1H, H-6b).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ [ppm] = 109.73, 107.51 (C-1, $^1J_{C-F}$ = 222 Hz), 74.30 (C-5), 74.27 (C-4), 69.41 (C-3), 68.19 – 67.95 (C-2, $^2J_{C-F}$ = 24 Hz), 60.69 (C-6).

p-Pyridinyl-β-D-galactopyranosid (20)



20

0.9 g (2.1 mmol) des peracetylierten Pyridinylgalactosids **56** wurden gemäß AAV2 unter DC Kontrolle deacetyliert. Es konnten 541 mg (2.0 mmol, 95.2 %) eines weißen amorphen Feststoffes erhalten werden.

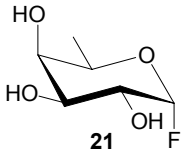
$C_{11}H_{15}NO_6$ (257.08)
$[\alpha]_D^{20}$ = +102 (c=0.2 in H_2O)

berechnet:	C 51.36	H 5.88	N 5.44
gefunden:	C 50.92	H 6.03	N 5.27

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 8.4 (br. s, 2H, Ar), 7.25 (d, 2H, Ar, J = 5.8 Hz), 5.19 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 7.9 Hz), 3.97 (d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 2.8 Hz), 3.89 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 2.8 Hz, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 3.81 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 7.9 Hz, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 3.76 – 3.72 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 150.19 (Ar), 112.68 (Ar), 99.75 (C-1), 76.11 (C-3), 72.81 (C-5), 70.63 (C-2), 68.77 (C-4), 61.09 (C-6).

α-D-Fucopyranosylfluorid (21)



21

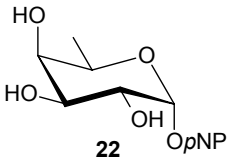
1.81 g (6.21 mmol) Des peracetylierten D-Fucopyranosylfluorids **36** wurden gemäß AAV 2 unter DC-Kontrolle deacetyliert. Nachdem das Lösungsmittel i.Vak entfernt wurde, konnten 0.9 g (5.4 mmol) 87 % eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$C_6H_{11}FO_4$ (166.15)
$[\alpha]_D^{20}$ = +137 (c=1 in MeOH)

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ [ppm] = 5.60 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.2 Hz, J_{H-F} = 54.0 Hz), 5.13 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.8 Hz), 4.21 (br. vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 3.84 (ddd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.1 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz, J_{H-F} = 23.1 Hz), 3.80 – 3.76 (m, 1H, H-5), 1.13 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ [ppm] = 98.46, 96.63 (C-1, $^1J_{C-F}$ = 183 Hz), 73.33 (C-4), 72.29 (C-5), 71.87, 71.81, (C-2, $^2J_{C-F}$ = 12 Hz), 69.67 (C-3), 14.93 (C-6).

para-Nitrophenyl-α-D-fucopyranosid (22)



22

1.51 g (3.67 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-*p*-nitrophenyl-α-D-fucopyranosid wurden gemäß AAV2 unter DC-Kontrolle deacetyliert. Nach Entfernen des Methanols i. Vak. konnten 0.83 g (2.90 mmol, 79%) leicht gelber, amorpher Feststoff isoliert werden.

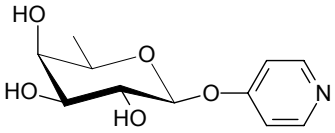
$C_{12}H_{15}NO_7$ (285.08)

$[\alpha]_D^{20}$ = +198 (c=0.3 in MeOH) Lit.:[113] +249 (c=1 in MeOH)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 8.20 (d, 2H, Ar, J = 9.1), 7.20 (d, 2H, J = 9.1 Hz Ar), 5.75 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.09 (dd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 3.3 Hz, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz), 4.05 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz, $J_{2,3}$ = 10.2 Hz), 3.49 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.2 Hz), 3.82 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz), 1.10 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 126.45, 117.16 (Ar), 97.23 (C-1), 71.99 (C-4), 69.85 (C-3), 68.43 (C-5), 68.01 (C-2), 15.62 (C-6).

Pyridinyl-β-D-fucopyranosid (23)



23

183 mg (0.5 mmol) des peracetylierten β-D-Pyridinylfucosids **61** wurden gemäß AAV2 unter DC-Kontrolle deacetyliert. Nach Entfernen des Methanols i. Vak. konnten

110 mg (0.46 mmol, 92.3 %) eines blassgelben, amorphen Feststoffes erhalten werden.

$C_{11}H_{15}NO_5$ (241.24)

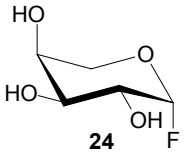
$[\alpha]_D^{20}$ = +129 (c=0.2 in H_2O)

berechnet:	C 54.77	H 6.27	N 5.81
gefunden:	C 54.26	H 6.39	N 5.49

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ [ppm] = 8.41 (d, 2H, Ar, J = 6.3 Hz), 7.05 (d, 2H, Ar, J = 6.3 Hz), 5.03 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 7.5 Hz), 3.84 (m_c, 1H, H-5), 3.57 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 7.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 3.51 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz), 3.44 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz, $J_{3,4}$ = 9.8 Hz), 1.18 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ [ppm] = 151.29 (Ar), 111.86 (Ar), 99.75 (C-1), 73.67 (C-3), 71.19 (C-4), 70.86 (C-5), 69.98 (C-2), 16.83 (C-6).

β-L-Arabinopyranosylfluorid (24)



24

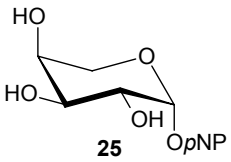
1.17 g (4.2 mmol) des per-*O*-acetylierten α-L-Arabinosylfluorids **39** wurde nach Zemplén gemäß AAV 2 unter DC-Kontrolle deacetyliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurden 548 mg (3.6 mmol) 86 % eines weißen, sehr harten, amorphen Feststoffes erhalten, der trocken bei -20 °C gelagert werden kann.

$C_5H_9FO_4$ (152.04)

$[\alpha]_D^{20}$ = +129 (c=0.8 in MeOH) Lit.:[114] +138.2 (c=0.4 in H_2O)

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ [ppm] = 5.90 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, J_{H-F} = 53.0 Hz), 5.61 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz), 5.48 (dd, 1H, H-4, $J_{4,5}$ = 1.7 Hz, $J_{4,5}$ = 3.4 Hz), 5.39 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz, J_{H-F} = 22.3 Hz), 3.93 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5}$ = 1.8 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.0 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5}$ = 1.8 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.0 Hz).
^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ [ppm] = 98.35, 96.56, $^1J_{C-F}$ = 179 Hz (C-1), 73.53 (C-4), , 71.91, 71.80, $^2J_{C-F}$ = 11 Hz (C-2), 68.53 (C-5), 68.11 (C-3).

p-Nitrophenyl-β-L-arabinopyranosid (25)



25

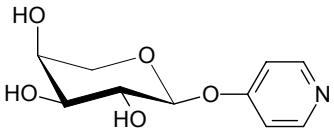
1.03 g (2.58 mmol) des 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-β-L-arabinopyranose (**49**) werden gemäß AAV2 deacetyliert. Als Produkt konnten 545 mg (2.01 mmol 81 %) eines leicht orangen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$C_{11}H_{13}NO_7$ (271.06)
$[\alpha]_D^{20}$ = +196.5 (c=0.3 in MeOH) Lit.:[115] +260 (c=0.5 in MeOH)

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 8.12 (d, 2H, Ar, J = 9.1 Hz), 7.15 (d, Ar, 2H, J = 9.1 Hz), 5.65 (d,1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.02 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5a}$ = 0.6 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.1 Hz), 3.95 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5b}$ = 1.9 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.1 Hz) 3.89 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz), 3.49 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz), 3.82 (d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 125 MHz): δ [ppm] = 126.45, 117.16 (Ar), 97.23 (C-1), 71.99 (C-4), 69.85 (C-3), 68.43 (C-5), 68.01 (C-2).

p-Pyridinyl-β-L-arabinopyranosid (26)



26

1.76 g (5.0 mmol) des acetylierten Pyridinylarabinosids **62** wurden in Methanol gelöst und gemäß AAV2 unter DC Kontrolle deacetyliert. Nachdem das Lösungsmittel i.Vak entfernt worden war konnten 932 mg (4.1 mmol, 89.2 %) eines orangefarbenen Feststoffes isoliert werden.

$C_{10}H_{13}NO_5$ (227.27)

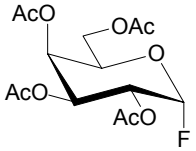
$[\alpha]_D^{20}$ = +5 (c=0.15 in H_2O)

berechnet:	C 52.86	H 5.77	N 6.16
gefunden:	C 51.98	H 5.89	N 6.29

^{1}H-NMR (D_3COD, 500 MHz): δ [ppm] = 8.42 (d, 2H, Ar, J = 5.7 Hz), 7.05 (d, 2H, Ar, J = 5.7 Hz), 5.03 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 6.9 Hz), 3.76 – 3.71 (m, 2H, H-5a, H-4), 3.68 – 3.62 (m, 2H, H-2, H-5b), 3.48 (m_c, 1H, H-3).

^{13}C-NMR (D_3COD, 100 MHz): δ [ppm] = 151.31 (Ar), 111.90 (Ar), 99.81 (C-1), 72.67 (C-3), 70.34 (C-4), 67.74 (C-2), 66.10 (C-5).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosylfluorid (30)



30

In einem Kunststoffgefäß wurden Galactoseperacetat **35** (2.15 mg, 5.50 mmol) in 4 ml HF / Pyridin – Lösung (65 % HF in Pyridin, δ = 1.14 g/cm^3, 110 mmol HF), gelöst und 3 h gerührt. Anschließend wurden 20 ml Dichlormethan zugegeben und zweimal mit je 30 ml Wasser und im Anschluss so häufig mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen, bis kein Kohlendioxid mehr entstand. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der verbleibende, blassgelbe Rückstand wird an Kieselgel (EE / PE 1:1) chromatographiert. Es werden 1.8 g (5 mmol, 90 %) eines weißen, amorphen Feststoffes erhalten.

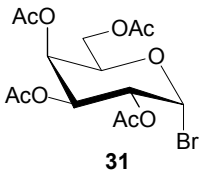
$C_{14}H_{19}FO_9$ (350.30)

$[\alpha]_D^{20}$ = +98.5 (c=1 in $CHCl_3$) Lit.:[116] +96.5 (c=1 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 5.81 (dd, 1H, H-1; $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, $J_{H\text{-}F}$ = 53.3 Hz), 5.54 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz), 5.36 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz), 5.19 (ddd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz, $J_{H\text{-}F}$ = 23.8 Hz), 4.41 (vt, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz), 4.19 – 4.09 (m, 2H, H-6a, H-6b, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.35 Hz), 2.15, 2.12, 2.06, 2.01 (4s, je 3H, CO-C*H*$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ [ppm] = 170.72, 170.61, 170.36, 170.25 (*C*=O), 105.84, 103.58 (C-1, $^1J_{C\text{-}F}$ = 226 Hz), 69.29 (C-5), 69.25 (C-4), 67.93, 67.75, (C-2, $^2J_{C\text{-}F}$ = 18 Hz), 67.69 (C-3), 61.65 (C-6), 21.03 (CO-*C*H$_3$).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosylbromid (31)



31

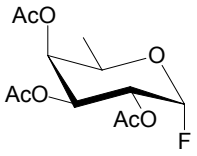
18 g (100 mmol) Galactose **33** wurden unter Eiskühlung in 100 ml Essigsäureanhydrid suspendiert. Anschließend wurde innerhalb von 30 min. 20 ml HBr / Eisessig (33 %) zugegeben und solange gerührt bis sich die gesamte Galactose gelöst hatte. Im Anschluss wurden weitere 100 ml HBr / Eisessig (33 %) unter Eiskühlung zugegeben und die Lösung noch 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Zur Aufarbeitung wurden dem Ansatz 200 ml Methylenchlorid zugefügt, die Mischung auf Eiswasser gegeben und in Folge mit jeweils 60 ml Wasser, 60 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 60 ml ges. Kochsalzlösung gewaschen. Nach erfolgter Phasentrennung wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde aus Diethylether / Petrolether umkristallisiert.
Ausbeute: 21. 6 g (52.5 mmol, 52 %) farbloser Nadeln

$C_{14}H_{19}BrO_9$ (411.20)
Smp.: 87 °C Lit.:[117] 87 °C

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 6.81 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.8 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 2.2 Hz, $J_{2,3}$ = 10.6 Hz), 5.67 (d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 2.2 Hz), 5.37 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.6 Hz), 4.38 (vt, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz), 4.18 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.4 Hz), 4.12 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.4 Hz), 1.82, 1.72, 1.71, 1.70 (3s, je 3H, CO-C*H*$_3$)

^{13}C-NMR (C_6D_6, 125 MHz): δ [ppm] = 169.97, 169.83, 169.58 (*C*=O), 89.35 (C-1), 71.91 (C-5), 68.78 (C-3), 68.48 (C-2), 67.60 (C-4), 61.03 (C-6), 20.30, 20.07 (CO-*C*H$_3$).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-α-D-fucopyranosylfluorid (37)



37

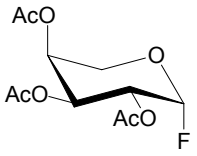
3 g (9 mmol) 2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-β-D-fucopyranose (**36**) wurden mit 6 ml (165 mmol) HF / Pyridin Lösung in einem Kunststoff-Behälter für 3 h unter Feuchtigkeitsauschluss gerührt. Anschließend wurden 30 ml Dichlormethan zugegeben und der Ansatz zweimal mit je 45 ml Wasser und dann so häufig mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis kein CO_2 mehr entstand. Die organische Phase wurde separiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand an Kieselgel (EE / PE 1 : 2) chromatographiert. Als Produkt konnten 1.81 g (6.21 mmol, 69 %) eines farblosen Sirups isoliert werden.

$C_{12}H_{17}FO_7$ (292.09)
$[\alpha]_D^{20}$ = +148 (c=0.4 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 5.76 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, J_{H-F} = 53.8 Hz), 5.39 –5.34 (m, 2H, H-3, H-4), 5.17 (ddd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 2.5 Hz, $J_{2,3}$ = 10.8 Hz, J_{H-F} = 24 Hz), 4.35 (vt, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz), 2.17, 2.11, 2.00 (s, 3H, CO-C*H*$_3$), 1.2 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ [ppm] = 105.45, 103.65 (C-1, $^1J_{C-F}$ = 181 Hz), 70.38 (C-4), 67.61 (C-5), 67.48, 67.42 (C-2, $^2J_{C-F}$ = 12 Hz), 67.36 (C-3), 20.70, 20.64, 20.58 (CO-*C*H$_3$), 15.79 (C-6).

Tri-*O*-acetyl-β-L-arabinopyranosylfluorid (39)



39

2 g (6.3 mmol) 2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-α-L-arabinopyranose (**38**) wurden in einem Kunststoffbehälter mit 4 ml (110 mmol) HF / Pyridin versetzt und 3 h gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Dichlormethan wurde zweimal mit je 30 ml Wasser und dann so häufig mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen, bis kein CO_2 mehr entstand. Nach Phasentrennung und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der verbleibende Rückstand an Kieselgel (PE / EE 2 : 1) chromatographiert. Ausbeute 1.17 g (4.2 mmol 67%) farbloser Sirup.

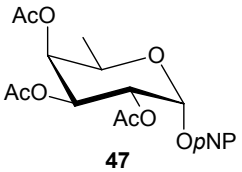
$C_{11}H_{15}FO_7$ (278.23)

$[\alpha]_D^{20}$ = +117 (c=0.7 in $CHCl_3$) Lit.:[116] +136 (c=1 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 5.81 (dd, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, J_{H-F} = 52.7 Hz), 5.60 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 5.44 (dd, 1H, H-4, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz), 5.33 (ddd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.4, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz, J_{H-F} = 22.0 Hz), 3.97 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.2 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.2), 1.99, 1.98, 1.95 (s, je 3H, CO-CH_3).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ [ppm] = 171.55, 171.42, 171.15 (*C*=O), 95.11 (C-1), 68.53 (C-4), 67.49 (C-2), 66.81 (C-3), 61.71 (C-5), 20.89, 20.71 (CO-*C*H_3).

p-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-D-fucopyranosid (47)



47

3.0 g (9.0 mmol) Tetra-*O*-acetyl-β-D-fucopyranose (**36**) wurde mit 1.5 g (10.8 mmol) *p*-Nitrophenol unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst und mit 12.5 ml (45 mmol) BF_3•Et_2O (Gehalt: ~ 46.5 %, ρ = 1.13 g/cm^3) versetzt und 4 h gerührt. Anschließend wurde erst 20 ml eisgekühltes Wasser zugegeben und dann mehrmals mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde das als Hauptprodukt entstandene α-Anomer vom β-Anomer an Kieselgel (Toluol/Aceton 30:1) separiert.

R_fα = 0.32

R_fβ = 0.21

Als Produkt konnte 1.51 g (3.67 mmol, 40.7 %) eines blassgelben Sirups isoliert werden.

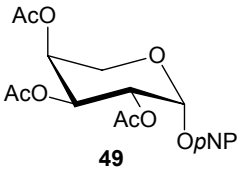
$C_{18}H_{21}NO_{10}$ (411.11)

$[\alpha]_D^{20}$ = +201 (c=0.5 in $CHCl_3$) Lit.:[113] +229 (c=1 in MeOH)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 8.15 (d, 2H, J = 9.3 Hz, Ar), 7.11 (d, 2H, J = 9.3 Hz, Ar), 5.80 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.51 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz), 5.31 (d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz), 5.25 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz), 4.13 (t, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz), 2.14, 2.01, 1.98 (3s, 9 H, H_3C-CO), 1.07 (d, 3H, H_3C-C-5).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ [ppm] = 170.84, 170,49 (*C*=O), 161.60 (*C*-O, Ar), 143.31 (*C*-NO_2, Ar), 126.32, 116.78 (Ar), 95.24 (C-1), 71.02 (C-4), 68.04 (C-3), 67.88 (C-2), 66.58 (C-5), 21.12, 21.09, 21.01 (CO-*C*H_3), 16.26 (C-6).

p-Nitrophenyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-L-arabinopyranosid (49)



49

2.2 g (6.6 mmol) Tetra-*O*-acetyl-L-arabinopyranose **38** wurde mit 1.1 g (7.9 mmol) 4-Hydroxynitrobenzol unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst und mit 8.9 ml (33 mmol) BF_3•Et_2O (Gehalt: ~ 46.5 %, ρ = 1.13 g/cm^3) versetzt und 4 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde dem Ansatz zuerst 15 ml eisgekühltes Wasser zugefügt und anschließend mehrmals mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde, wurde das als Hauptprodukt entstandene α-Anomer vom β-Anomer an Kieselgel (Toluol/Aceton 10:1) separiert. R_fα = 0.29; R_fβ = 0.22

Als Produkt konnten 1.03 g (2.58 mmol 39.2 %) eines blassorangenen Sirups erhalten werden.

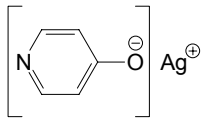
$C_{17}H_{19}NO_{10}$ (397.10)

$[\alpha]_D^{20}$ = +176 (c=0.6 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 8.23 (d, 2H, Ar, J = 9.3 Hz), 7.16 (d, 2H, J = 9.3 Hz, Ar), 5.87 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 5.57 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 5.42 (br. dd, 1H, H-4, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz), 5.36 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 3.97 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.2 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5}$ = 1.6 Hz, $J_{5a,5b}$ = 13.2), 1.91, 1.90, 1.88 (s, je 3H, CH_3).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ [ppm] = 170.35, 170.19, 170.05 (*C*=O), 161.03 (*C*-O, Ar), 143.01 (*C*-NO_2, Ar), 125.91, 116.44 (Ar), 95.11 (C-1), 68.53 (C-4), 67.49 (C-2), 66.81 (C-3), 61.71 (C-5), 20.89, 20.71 (CO-*C*H_3).

Silber-*p*-pyridinolat (55)

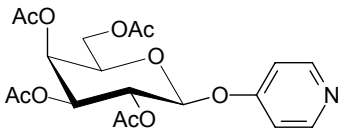


55

5.20 g (54 mmol) 4-Hydroxypyridin (**54**) wurden in 200 ml bidest. Wasser gelöst und mit 2.16 g (54 mmol) Natriumhydroxid versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur ca. 15 min. gerührt bis alle Feststoffe gelöst waren. Anschließend wurden 100 ml einer frisch bereiteten Silbernitratlösung (9.17 g, 54 mmol) zu der basischen Hydroxypyridin-Lösung gegeben. Der entstandene braungraue Niederschlag wurde über einen Hirschtrichter abgesaugt und zuerst mit Methanol und anschließend mit Diethylether gewaschen. Nachdem das Produkt unter Lichtausschluß im Exsikkator getrocknet wurde, konnten 9.69 g (89 %, 48 mmol) eines braun-grauen amorphen Feststoffes erhalten werden. Das Produkt ist im Eisfach unter Lichtausschluß stabil und wurde ohne weitere Analytik eingesetzt.

C_5H_4AgNO (201.96)

***p*-Pyridinyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosid (56)**



56

2.0 g (4.8 mmol) α-Acetobromgalactose **31** wurden mit 970 mg (4.8 mmol) Silber-4-pyridinolat (**55**) in einer Mischung aus 100 ml Acetonitril und 30 ml DMF gelöst und 5 h bei 80 °C unter Rühren erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Ansatz über Celite filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde an

Kieselgel, Eluent Toluol / Aceton 3:1 chromatographiert. Als Produkt konnte 900 mg (2.1 mmol, 44 %) eines leicht gelben Sirups isoliert werden.

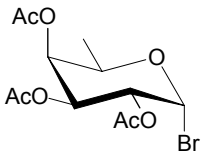
$C_{19}H_{23}NO_{10}$ (425.13)

$[\alpha]_D^{20}$ = +112 (c=0.5 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 8.45 (d, 2H, Ar, J = 5.9 Hz), 6.65 (d, 2H, Ar, J = 5.9 Hz), 5.91 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 7.6, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 5.51 (d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz), 5.21 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 4.81 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 7.6 Hz), 4.09 (m_c, 2H, H-6a, H-6b, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.4 Hz), 3.38 (t, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz), 1.78, 1.73, 1.64, 1.59 (4s, 12 H, COC*H*$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ [ppm] = 152.07 (Ar), 112.04 (Ar), 98.19 (C-1), 71.64 (C-5), 71.36 (C-3), 68.98 (C-2), 67.31 (C-4), 61.47 (C-6), 20.47, 20.42, 20.27, 20.03 (CO-*C*H_3).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-α-D-fucopyranosylbromid (58)



58

4.0 g (2.4 mmol) D-Fucose (**57**) wurden unter Eiskühlung in 25 ml Essigsäureanhydrid suspendiert. Anschließend wurde innerhalb von 30 min. 5 ml HBr / Eisessig (33 %) zugegeben und solange gerührt bis sich die gesamte Fucose gelöst hat. Dann werden weitere 25 ml HBr / Eisessig (33 %) unter Eiskühlung zugegeben und die Lösung noch 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Zur Aufarbeitung werden 50 ml Dichlormethan dem Ansatz zugefügt, die Mischung auf Eiswasser geschüttet und in Folge mit jeweils 20 ml Wasser, 20 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung sowie 20 ml ges. Kochsalzlösung gewaschen. Nach

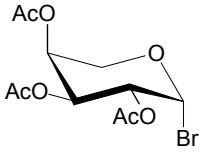
Phasentrennung wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether / Essigester 2 : 1) unter Zugabe einiger Tropfen Triethylamin pro 100 ml Laufmittel chromatographiert.
Es wurden 430 mg (51 %, 1.22 mmol) eines gelben Sirups isoliert.

$C_{12}H_{17}BrO_7$ (353.17)
$[\alpha]_D^{20}$ = +122 (c=0.3 in $CHCl_3$) Lit.:[118] +113 (c=0.5 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 6.85 (d,1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.78 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 5.43 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,2}$ = 3.2 Hz), 5.35 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 4.10 (m_c, 1H, H-5), 1.83, 1.75, 1.72 (s, je 3H, COC*H*$_3$), 0.95 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.6 Hz).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 163.98, 162.95, 162.77 (*C*=O), 90.50 (C-1), 71.29 (C-4), 70.74 (C-5), 69.10 (C-2), 21.36, 21.25, 21.00 (COC*H*$_3$), 16.43 (C-6 C*H*$_3$).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-α-L-arabinopyranosylbromid (60)



60

10 g (66 mmol) L-Arabinose (**59**) wurden unter Eiskühlung in 50 ml Essigsäureanhydrid suspendiert. Anschließend wurde innerhalb von 30 min. 12 ml HBr / Eisessig (33 %) zugegeben und solange gerührt bis sich die gesamte Arabinose gelöst hatte. Anschließend wurden weitere 55 ml HBr / Eisessig (33 %) unter Eiskühlung zugegeben und die Lösung noch 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Zur Aufarbeitung wurde 100 ml Dichlormethan dem Ansatz zugefügt und in Folge mit jeweils 50 ml Wasser, 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonatlösung sowie 50 ml ges.

Kochsalzlösung gewaschen. Nach Phasentrennung wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel (Laufmittel: Essigester / Petrolether 3 : 1) chromatographiert. Es konnte 4.41 g (13.2 mmol, 20 %) eines orangefarbenen Sirups isoliert werden.

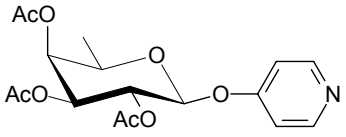
$C_{11}H_{15}BrO_7$ (339.14)

$[\alpha]_D^{20}$ = +198 (c=0.8 in $CHCl_3$) Lit.: [119] -302 (c=0.5 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 6.83 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.73 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 5.42 – 5.38 (m, 2H, H-4, H-2), 3.84 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5a}$ < 1Hz, $J_{5a,5b}$ = 14.2 Hz), 3.50 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5b}$ = 1.9 Hz, $J_{5a,5b}$ = 14.2 Hz), 1.81, 1.71, 1.70 (s, je 3H, COC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100.67 MHz): δ [ppm] = 162.59, 162.51, 161.95 (*C*=O), 91.74 (C-1), 69.99 (C-4), 69.20 (C-3), 68.40 (C-2), 66.03 (C-5), 20.94, 20.75, 19.91 (COC*H*$_3$).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-4-pyridinyl-β-D-fucopyranosid (61)



61

430 mg (1.22 mmol) α-Acetobromfucose **58** wurden mit 246 mg (1.22 mmol) Silber-4-pyridinolat **55** in einer Mischung aus 50 ml Acetonitril und 5 ml DMF gelöst und 5 h bei 80 °C unter Rühren erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Ansatz über Celite filtriert und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird chromatographisch an Kieselgel, Eluent Toluol / Aceton 10:1, gereinigt. Als Produkt konnten 183 mg (0.5 mmol, 41 %) eines schwach gelben, Sirups isoliert werden.

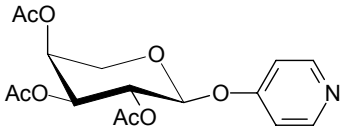
$C_{17}H_{21}NO_8$ (367.12)

$[\alpha]_D^{20}$ = +35.7 (c=0.3 in $CHCl_3$)

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 8.51 (d, 2H, Ar, J = 6.0 Hz), 6.92 (d, 2H, Ar, J = 6.0 Hz), 5.49 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 5.33 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz), 5.19 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz), 5.14 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 4.05 (m_c, 1H, H-5), 2.20, 2.05, 2.02 (s, je 3H, COC*H*$_3$), 1.28 (d, 3H, H-6, $J_{5,6}$ = 6.3 Hz).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): [ppm] δ = 170.53, 170.10, 169.34 (C=O), 151.14 (Ar), 111.62 (Ar), 97.78 (C-1), 71.05 (C-3), 69.91 (C-5), 69.82 (C-4), 68.37 (C-2), 20.69, 20.63, 20.59 (COC*H*$_3$), 16.08 (C-6).

_p_-Pyridinyl-2,3,4-tri-_O_-acetyl-β-L-arabinopyranosid (62)



62

4.41 g (13.2 mmol) β-Acetobrom-L-arabinose **60** wurden mit 2.6 g (13.2 mmol) Silber-4-pyridinolat **55** in einer Mischung aus 200 ml Acetonitril und 60 ml DMF gelöst und 5 h bei 80 °C unter Rühren erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Ansatz über Celite filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde chromatographisch an Kieselgel, Eluent Toluol / Aceton 10:1, gereinigt. Als Produkt konnten 1.76 g (5.0 mmol, 38 %) eines gelben Sirups isoliert werden.

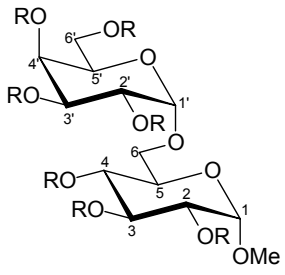
$C_{16}H_{19}NO_8$ (353.33)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 115 (c=1 in $CHCl_3$)

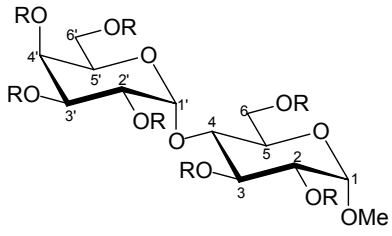
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 8.49 (d, 2H, Ar, J = 6.3 Hz), 6.98 (d, 2H, Ar, J = 6.3), 5.41 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 5.7 Hz, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz), 5.34 (m_c, 1H, H-4), 5.25 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 5.7 Hz), 5.19 (dd, 1H, H-3, J_1 = 3.5 Hz, J_2 = 8.2 Hz), 4.10 (dd, 1H, H-5a, $J_{4,5a}$ = 4.7 Hz, $J_{5a,5b}$ = 12.6 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-5b, $J_{4,5b}$ = 2.2 Hz, $J_{5a,5b}$ = 12.6 Hz), 2.14, 2.09, 2.05 (s, je 3H, COC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] =170.10, 169.99, 169.30 (*C*=O), 151.39 (Ar), 111.61 (Ar), 96.91 (C-1), 69.24 (C-3), 68.58 (C-4), 66.57 (C-2), 62.27 (C-5), 20.84, 20.72, 20.68 (CO*C*H$_3$).

Methyl-α-D-galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosid (65) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-OMe), und Methyl-α-D-galactopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosid (66) [α-D-Gal*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-OMe)



R = H **65**
R = Ac **65a**



R = H **66**
R = Ac **66a**

242 mg (1.25 mmol) Methyl-α-D-glucopyranosid (**14**) wurden mit:
a) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol)
b) *p*-Nitrophenyl- α-D-galactopyranosid (**19**) (150 mg, 0.5 mmol)
c) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol)
für a) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5),
für b) und c) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV 4 a/b mit der α-Galactosidase aus aGaB inkubiert.

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-glucopyranosid (**14**) wurden mit

d) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert.

Der Ansatz b) wurde nach Beendigung der Reaktion mit Essigester ausgeschüttelt. Nach Chromatographie der Ansätze an Biogel P2 wurden für:
a) 16.0 mg (45.0 µmol, 9 %)
b) 39.2 mg (110.0 µmol, 22 %)
c) 26.7 mg (75.0 µmol, 15 %)
d) 33.8 mg (95 µmol, 19%)
farbloser, amorpher Feststoff isoliert.
Die Produkte aus a), b) und c) wurden als α(1→6) galactosyliertes Methylglucosid **65** identifiziert.

$C_{13}H_{24}O_{11}$ (356.13)
$[\alpha]_D^{20}$ = +106 (c=0.7 in H_2O)
Masse des Acetats **65a** / **66a**: $C_{27}H_{38}O_{18}$ (650.20)
MALDI-TOF *m/z* 673.05 $[M+Na]^+$, 689.19 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung **65**:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.93 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 4.76 (d, 1H, H-1, $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 3.97 – 3.91 (m, 3H, H-4', H-6a, H-6b), 3.82 (br. dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 9.9 Hz), 3.77 (m_c, 1H, H-2'), 3.72 – 3.67 (m, 3H, H-5, H-6'a, H-6'b), 3.64 – 3.59 (m, 1H, H-3), 3.52 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 3.46 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = $J_{4,5}$ = 9.8 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 99.76 (C-1), 98.47 (C-1'), 73.68 (C-3), 71.56 (C-2), 71.35 (C-4), 68.83 (C-2'), 66.01 (C-6), 61.48 (C-6'), 55.57 (O*C*H_3).

Acetylierte Verbindung **65a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.50 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.8 Hz), 5.46 (br. s, 1H, H-4', J < 1), 5.36 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',4'}$ = 11.0 Hz), 5.18 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz), 5.11 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 11.0 Hz), 5.02 (vt, 1H, H-4, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.8 Hz), 4.91 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.85 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 4.28 (vt, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz), 4.12 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz,

$J_{6a,6b}$ = 11.4 Hz), 4.06 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'}$ = 6.5 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.4 Hz), 3.95 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6}$ = 5.8 Hz, $J_{5,6}$ = 11.1 Hz), 3.73 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6}$ = 5.8 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.1 Hz), 3.53 (dd, 1H, H6b, J_1 = 2.2 Hz, J_2 = 11.1 Hz), 3.35 (s, 3H, OCH_3), 2.14, 2.12, 2.08, 2.06, 2.04, 2.01, 1.99 (7s, je 3H, CO-C*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 170.80, 170.59, 170.45, 170.29, 169.93 (*C*=O), 96.90 (C-1'), 96.52 (C-1), 71.22 (C-3), 70.54 (C-2), 69.48 (C-5), 68.53 (C-4'), 68.47 (C-2', C-4), 67.85 (C-5'), 66.82 (C-6), 66.50 (C-3'), 62.20 (C-6'), 55.75 (O*C*H$_3$), 20.41 – 19.95 CO-*C*H$_3$.

Das Produkt aus d) wurde als eine Mischung aus α(1→6) und α(1→4) galactosylierter Verbindungen **65** und **66** identifiziert. Verhältnis (Integrale ^{1}H-NMR): 71 % **65** und 29 % **66**.

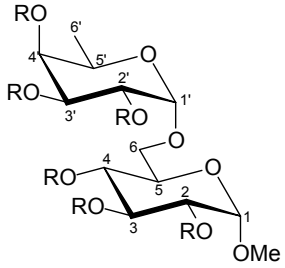
Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung **66**:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.10 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 4.92 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.18 (vt, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.2 Hz), 4.10 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 10.2).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 96.96 (C-1), 96.53 (C-1'), 71.45 (C-3), 68.97 (C-2).

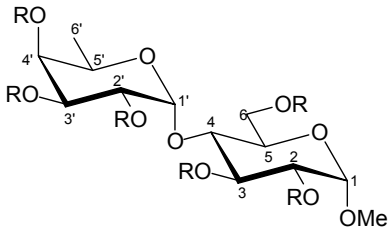
Acetylierte Verbindung **66a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.42 (br. vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ $J_{4,5}$ = 9.8 Hz), 5.32 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz), 5.25 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.8 Hz), 4.97 (vt, 1H, H-3', $J_{3,4}$ = 10.8 Hz), 4.82 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.45 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 11.2 Hz), 4.23 – 4.16 (m, 3H, H-4', H-6a, H-6b), 4.09 (m_c, 1H, H-6'a), 4.04 (m_c, 1H, H-6'b), 4.01 (vt, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ = 6.0 Hz), 3.85 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 6.5 Hz, $J_{5,6b}$ = 12.1 Hz), 3.80 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 11.2 Hz), 3.42 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 96.87 (C-1), 96.48 (C-1'), 75.17 (C-2), 71.83 (C-4), 70.84 (C-3'), 69.84 (C-5), 69.53 (C-2'), 68.92 (C-3), 67.89 (C-5'), 66.54 (C-4'), 62.43 (C-6), 62.29 (C-6'), 54.98 (O*C*H$_3$), 20.41 – 19.95 CO-*C*H$_3$.

Methyl-α-D-fucopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosid (67) [α-D-Fuc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-OMe), Methyl-α-D-fucopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosid (68) [α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-OMe]



R = H **67**
R = Ac **67a**



R = H **68**
R = Ac **68a**

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-glucopyranosid (**14**) wurden mit
d) α-D-Fucopyranosylfluorid (**21**) (83 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz an Sephadex LH-20 chromatographiert. Es wurden 27.2 mg (0.08 mmol, 16 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert, der nach Acetylierung gemäß AAV1 Variante A als eine Mischung von α(1→6) und α(1→4) fucosylierten Verbindungen **67** und **68** charakterisiert werden konnte. Verhältnis (Integrale ^{1}H-NMR): 69 % für **67** und 31 % für **68**.

$C_{13}H_{24}O_{10}$ (340.13)
Molekülmasse der Acetate **67a** / **68a**:$C_{25}H_{36}O_{16}$ (592.20)
MALDI-TOF *m/z* 615.07 $[M+Na]^+$, 631.25 $[M+K]^+$

Acetylierte Verbindung **67a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.91 (vt,1H, H-3, $J_{2,3} = J_{3,4}$ = 9.8 Hz), 5.80 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.2 Hz, $J_{2',3'}$ = 11.3 Hz), 5.60 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, J_2 = 11.3 Hz), 5.55 (d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 3.2 Hz), 5.40 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 5.33 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4} = J_{4,5}$ = 9.8 Hz), 5.09 (d, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz), 4.93 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.11 (br. d, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ = 5.8 Hz), 3.96 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.4 Hz, $J_{5,6b}$ = 11.4 Hz), 3.70 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 5.4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.4 Hz), 3.49 (dd, 1H, H-6b, $J_{6a,6b}$ = 2.2 Hz, J_2 = 11.4 Hz), 1.05 (d, 3H, 3H-6', $J_{5',6'}$ = 5.4 Hz).

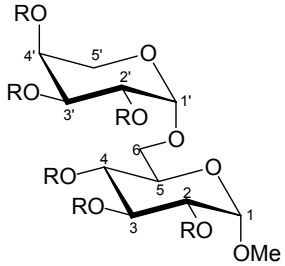
^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 169.76, 169.62, 169.56, 169.49, (C=O), 96.58 (C-1), 96.29 (C-1'), 71.35 (C-4'), 70.90 (C-3), 70.40 (C-4), 69.30 (C-2'), 68.32 (C-5), 68.27 (C-5'), 68.01 (C-2'), 67.98 (C-3'), 65.74 (C-6), 15.47 (C-6').

Acetylierte Verbindung **68a**:

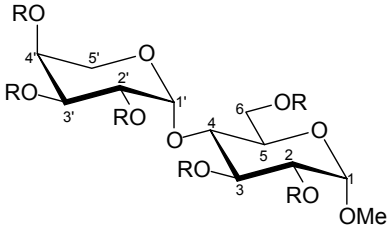
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.76 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.2 Hz), 5.67 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.2 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.45 (br. s, 1H, H-4'), 5.42 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.30 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ =$J_{4,5}$ = 9.2 Hz), 5.27 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 4.69 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.38 – 4.33 (m, 2H, H6a, H6b), 4.14 (br. d, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ = 5.8 Hz), 3.87 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.8 Hz, $J_{5,6b}$ = 11.1 Hz), 3.63 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz), 3.07 (s, 3H, OCH_3), 1.00 (d, 3H, H-6', $J_{5',6'}$ = 5.8 Hz),

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 169.29, 169.19, 169.12, 169.01, 168.77 (C=O), 96.58 (C-1'), 95.87 (C-1), 75.99 (C-4), 73.56 (C-2), 72.35 (C-2'), 71.35 (C-4'), 70.97 (C-3), 68.54 (C-3'), 67.98 (C-5'), 67.74 (C-5), 61.61 (C-6), 15.27 (C-6').

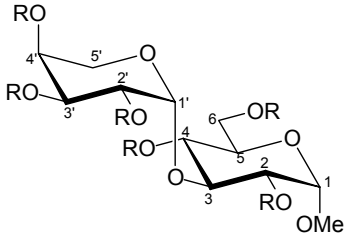
Methyl-β-L-arabinopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosid (69) [β-L-Ara*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-OMe], Methyl-β-L-arabinopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosid (70) [β-L-Ara*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-OMe], Methyl-β-L-arabinopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosid (71) [β-L-Ara*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-OMe]



R = H **69**
R = Ac **69a**



R = H **70**
R = Ac **70a**



R = H **71**
R = Ac **71a**

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-glucopyranosid **14** wurden mit

β-L-Arabinosylfluorid **24** (76 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert. Nachdem das Enzym inaktiviert wurde, wurde der Ansatz an Sephadex® LH 20 chromatographiert. Als Produkt wurde 19.5 mg (0.06 mmol, 12 %) eines farblosen amorphen Feststoffes isoliert. Nachdem das Produkt gemäß AAV1 Variante A acetyliert wurde, konnte es als eine Mischung aus α(1→6), α(1→4) und α(1→3) arabinosylierter Verbindung **69**, **70** und **71** identifiziert werden. Verhältnis (Integrale ^{1}H-NMR): 65 % für **69**, 23 % für **70** und 12 % für **71**.

$C_{12}H_{22}O_{10}$ (326.12)
Molekülmasse der Acetate **69a** / **70a** / **71a**:$C_{24}H_{34}O_{16}$ (578.13)
MALDI-TOF *m/z* 600.71 $[M+Na]^+$, 618.65 $[M+K]^+$

Acetylierte Verbindung **69a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.90 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3} = J_{3,4}$ = 10.1 Hz), 5.74 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 1.6 Hz, $J_{2',3'}$ = 11.0 Hz), 5.63 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, $J_{2',3'}$ = 11.0 Hz), 5.55 (br. d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 1.9 Hz), 5.40 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 5.29 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4} = J_{4,5}$ = 10.1 Hz), 5.08 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 4.90 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 3.95 (m_c, 1H, H-5), 3.89 (br. d, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ = 12.9 Hz), 3.67 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6}$ = 5.7 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz), 3.54 (dd, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ = 1.9 Hz, $J_{5'a,5'b}$ = 12.9 Hz), 3.45 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 3.1 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz), 3.11 (s, 3H, OC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 170.51, 170.30, 170.15, 170.10, 170.00, 169.91 (C=O), 97.70 (C-1), 97.41 (C1'), 71.71 (C-2'), 71.19 (C-2), 70.07 (C-3), 69.68 (C-4'), 69.46 (C-4), 69.32 (C-3'), 68.05 (C-5), 66.54 (C-6), 61.13 (C-5'), 55.40 (O*C*H$_3$).

Acetylierte Verbindung **70a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.78 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4} = J_{4,5}$ = 10.1 Hz), 5.74 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 1.6 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.9 Hz), 5.54 (d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 1.6 Hz), 5.50 (m_c, 1H, H-2'), 5.45 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 5.25 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 4.64 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.34 (dd, 1H, H-5'a, $J_{4',5'a}$ = 4.4 Hz, $J_{5a,5b}$ = 12.3 Hz), 4.22 (m_c, 1H, H-3), 4.10 (dd, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ = 2.2 Hz, $J_{5a,5b}$ = 12.3 Hz),

3.95 – 3.91 (m, 1H, H-5), 3.60 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 4.7 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.3 Hz), 3.48 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 2.8 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.3 Hz), 3.06 (s, 3H, OC*H*$_3$).

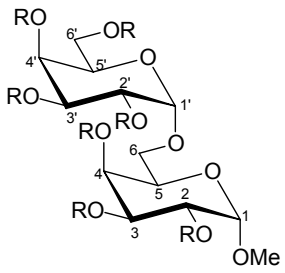
^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 97.70 (C-1), 96.42 (C-1'), 73.87 (C-4), 73.03 (C-3'), 71.88 (C-3), 70.92 (C-2), 69.98 (C-4'), 69.92 (C-2'), 67.72 (C-5), 62.46 (C-5'), 61.65 (C-6), 55.51 (O*C*H$_3$).

Acetylierte Verbindung **71a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.58 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), 5.49 (m_c, 1H, H-2'), 5.32 (d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 1.8 Hz), 5.01 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.85 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.9 Hz), 4.46 (t, 1H, H-3, $J_{2,3}$ =$J_{3,4}$ = 9.9 Hz), 3.84 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.7 Hz, $J_{5,6b}$ = 12.3 Hz), 2.97 (s, 3H, OC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 99.51 (C-1), 97.91 (C-1'), 76.26 (C-3), 71.45 (C-4'), 71.02 (C-2), 69.91 (C-2'), 62.53 (C-5'), 55.19 (O*C*H$_3$).

Die Signale der Protonen: H-4, H-6a, H6b, H-3', H-5', H-6'a, H-6'b sowie die dazugehörenden ^{13}C-Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Dennoch konnte die Konnektivität der Verbindung **71** zweifelsfrei durch HMBC-Experimente festgestellt werden.

Methyl-α-D-galactopyranosyl-(1→6)-α-D-galactopyranosid (72) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Gal*p*-OMe]



R = H **72**
R = Ac **72a**

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-galactopyranosid (**15**) wurden mit 91 mg (0.5 mmol) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3M, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit RAF bei 37 °C inkubiert. Die nach 24 h beendete Reaktion ergab nach säulenchromatographischer Trennung an Biogel P2 37.4 mg (105 µmol, 21 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 13 (c=0.7 in H_2O)

$C_{13}H_{24}O_{11}$ (356.13)

Masse des Acetats **72a**: $C_{27}H_{38}O_{18}$ (650.20)

MALDI-TOF *m/z* 673.12 $[M+Na]^+$, 689.13 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.76 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.2 Hz), 4.61 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz).

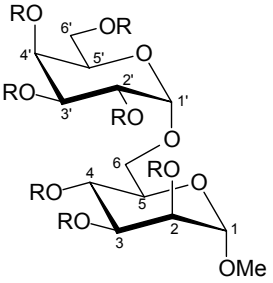
^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 99.87 (C-1), 98.67 (C-1'), 66.88 (C-6), 61.58 (C-6'), 55.53 (O*C*H_3).

Acetylierte Verbindung **72a**:

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.87 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.0 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.82 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 2.2 Hz), 5.79 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 2.2 Hz, $J_{2,3}$ = 10.8 Hz), 5.71 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 10.7 Hz), 5.67 (br. d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 3.0 Hz), 5.60 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.28 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 5.21 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz), 4.45 (br. vt, 1H, H-5', $J_{5',6'a}$ = 6.0 Hz), 4.38 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'a}$ = 6.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.1 Hz), 4.22 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$ = 7.3 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.1 Hz), 3.94 (br. vt, 1H, H-5, $J_{5,6}$ = 6.0 Hz), 3.85 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 6.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10.1 Hz), 3.34 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 5.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10.1 Hz), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 2.04, 2.01, 1.86, 1.84, 1.75, 1.73, 1.72 je ein (s, je 3H, CCH_3).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 170.47, 170.39, 170.32, 170.19, 170.08, 169.95 (C=O), 97.93 (C-1), 97.10 (C-1'), 69.45 (C-4'), 69.11 (C-2), 68.98 (C-2'), 68.69 (C-4), 68.62 (C-3), 68.43 (C-3'), 67.84 (C-5), 67.52 (C-5'), 66.68 (C-6'), 62.35 (C-6), 55.58 (O*C*H_3), 20.85, 20.73, 20.71, 20.65, 20.58, 20.23 (C*C*H_3)

Methyl-α-D-galactopyranosyl-(1→6)-α-D-mannopyranosid (73) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Man*p*-OMe]



R = H **73**
R = Ac **73a**

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-mannopyranosid (**16**) wurden mit α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert. Nachdem der Ansatz chromatographisch an Biogel® P2 gereinigt wurde, konnten 35.6 mg (0.1 mmol, 20 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$C_{13}H_{24}O_{11}$ (356.13)
$[\alpha]_D^{20}$ = +18 (c=1 in H_2O)

Masse des Acetats **73a**: $C_{27}H_{38}O_{18}$ (650.20)
MALDI-TOF *m/z* 673.27 $[M+Na]^+$, 689.23 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.84 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz), ca. 4.60 (H-1, unter HDO-peak), 3.85 – 3.83 (m, 2H, H-6a, H-6b) 3.78 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 1.6 Hz, $J_{2,3}$ = 3.8 Hz), 3.67 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.1 Hz), 3.60 – 3.58 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 3.25 (s, 3H, OCH_3).

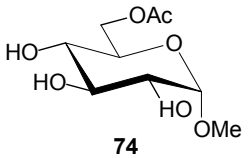
^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 101.51 (C-1), 98.46 (C-1'), 71.23 (C-2'), 71.15 (C-2), 66.02 (C-6), 61.53 (C-6'), 55.23 (O-CH_3).

Acetylierte Verbindung **73a**:

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.91 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.9 Hz), 5.84 (br. d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 2.9 Hz), 5.80 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 3.5 Hz, $J_{3,4}$ = 10.1 Hz), 5.72 – 5.69 (m, 1H, H-4), 5.67 – 5.65 (m, 2H, H-2, H-2'), 5.41 (d, 1H, H-1', J = 3.5 Hz), 4.64 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 1.3 Hz), 4.45 (br. vt, 1H, H-5', $J_{5',6'}$ = 6.6 Hz), 4.33 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'}$ = 6.6 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.2 Hz), 4.29 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'}$ = 6.6 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.2 Hz), 4.09 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.6 Hz, $J_{5,6a}$ = 6.4 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.7 Hz), 3.94 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6}$ = 6.4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10.7 Hz), 3.63 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 2.6 Hz, $J_{6a,6b}$ = 10.7 Hz), 1.87, 1.85, 1.84, 1.82, 1.79, 1.77, 1.74 je ein (s, 3H, CC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 125 MHz): δ [ppm] = 170.36, 170.33, 170.04, 169.93, 169.81, 169.79 (C=O), 99.17 (C-1), 96.54 (C-1'), 70.36 (C-3), 70.11 (C-2), 69.00 (C-5'), 68.86 (C-4), 68.37 (C-2'), 67.39 (C-4'), 67.35 (C-5), 67.12 (C-6), 61.97 (C-6'), 55.25 (O*C*H$_3$), 20.68, 20.66, 20.63, 20.60, 20.49, 20.29 (C*C*H$_3$).

Methyl-6-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosid (74)



74

1.00 g (5.15 mmol) α-Methylglucopyranosid (**14**) wurden in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 2 ml (ρ = 0.926 g/cm^3, 2.16 g, 38.48 mmol) Vinylacetat sowie mit 5 g Lipase aus Schweineleber (Sigma, EC 3.1.1.3) versetzt und bei 55 °C für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert und der produkthaltige Überstand separiert. Es wurde noch dreimal je 5 ml Pyridin zugegeben, aufgeschüttelt, zentrifugiert und der Überstand jeweils gesammelt. Das Pyridin aus den vereinigten organischen Phasen wurde mit Toluol codestilliert. Der braune, sirupöse Rückstand wurde an Kieselgel (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1) chromatographiert.

Ausbeute war 0.77 g (3.25 mmol, 63 %) eines leicht braunen Sirups.

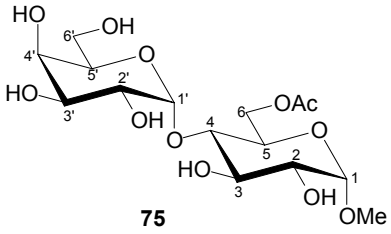
$[\alpha]_D^{20}$ = +145.5 (c=0.8 in H_2O) Lit.:[120] +147.5 (c=1 in Aceton)

$C_9H_{16}O_7$ (236.08)

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ [ppm] = 4.48 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.19 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 2.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz), 4.03 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 5.8 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz), 3.54 (m_c, 1H, H-5), 3.44 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.4 Hz), 3.25 – 3.20 (m, 4H, H-2, OC*H*$_3$), 3.10 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 9.4, $J_{4,5}$ = 10.0 Hz), 1.90 (s, 3H, OCOC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ [ppm] = 100.18 (C-1), 72.36 (C-2), 70.74 (C-4), 70.53 (C-3), 70.41 (C-5), 63.86 (C-6), 54.38 (OC*H*$_3$), 19.88 (CO-*C*H$_3$).

Methyl-α-D-galactopyranosyl-6-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosid (75)



75

236 mg (1 mmol) Methyl-6-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosid (**74**) wurden mit d) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert. Nachdem der Ansatz an Biogel® P2 chromatographiert wurde, konnten 23.9 mg (0.06 mmol, 12 %) eines farblosen Schaums isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +111 (c=1 in H_2O)

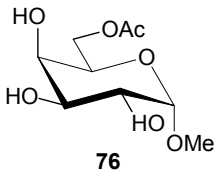
$C_{15}H_{26}O_{12}$ (398.14)

MALDI-TOF *m/z* 421.31 $[M+Na]^+$, 437.59 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.75 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz), ~ 4.70 (H-1, unter HDO-peak), 4.34 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6}$ = 1.6 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.0 Hz), 4.23 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 5.4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.0 Hz), 3.91 (br. s, 1H, H-4), 3.80 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'a}$ = 1.9 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 12.5 Hz), 3.76 (m_c, 1H, H-5), 3.68 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$ = 5.7 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 12.5 Hz), 3.61 – 3.56 (m, 3H, H-4', H-3', H-5'), 3.52 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 8.2 Hz), 3.46 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz), 3.34 (s, 3H, OC*H*$_3$), 3.31 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.5 Hz), 2.07 (s, 3H, OCC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 174.45 (*C*=O), 99.69 (C-1), 99.46 (C-1'), 73.43 (C-2), 73.26 (C-2'), 71.93 (C-4), 71.71 (C-5), 71.56 (C-3), 71.46 (C-5'), 71.37 (C-4'), 69.91 (C-3'), 63.74 (C-6), 60.64 (C-6), 55.46 (O*C*H$_3$), 20.56 (C*C*H$_3$).

Methyl-6-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosid (76)



76

0.6 g (3.1 mmol) Methyl-α-D-galactopyranosid (**15**) wurden zusammen mit 5 ml Pyridin, 1 ml (ρ = 0.926 g/cm^3, 1.1g 11 mmol) Vinylacetat sowie 2.5 g Lipase aus Schweineleber (Sigma, EC 3.1.1.3) versetzt und bei 55 °C für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert und der produkthaltige Überstand separiert. Es wurde noch dreimal je 5 ml Pyridin zugegeben, aufgeschüttelt, zentrifugiert und der Überstand jeweils gesammelt. Das Pyridin wurde codestillativ mit Toluol aus der Produktlösung i. Vak entfernt. Nach chromatographischer Trennung an Kieselgel (Methylenchlorid / Methanol 9 : 1) konnten 0.45 g (1.89 mmol) 61 % eines leicht braunen sirupösen Feststoffes isoliert werden.

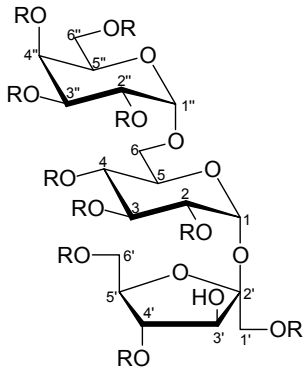
$C_9H_{16}O_7$ (236.08)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 146.5 (c=1 in H_2O) Lit.:[121] +148 (c=0.4 in H_2O)

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ [ppm] = 4.72 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.28 (dd,1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 7.5 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.3 Hz), 4.26 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 5.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 11.3 Hz), 3.97 (dd, 1H, H-5, $J_{5,6b}$ = 5.0 Hz, $J_{5,6a}$ = 7.5 Hz), 3.87 (br. d, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 3.73 (dd, 1H, H-3, $J_{3,4}$ = 3.2 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 3.41 (s, 3H, OMe), 2.07 (s, 3H, CO-C*H*$_3$).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 125 MHz): δ [ppm] = 173.06 (*C*=O), 101.91 (C-1), 71.66 (C-4), 71.32 (C-2), 70.49 (C-3), 70.04 (C-5), 65.54 (C-6), 55.99 (O-*C*H$_3$), 21.10 (CO-*C*H$_3$)

α-D-Galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranosid (78)
[α-D-Gal*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-(1↔2)-β-D-Fru*f*]



R = H **78**
R = Ac **78a**

342 mg (1 mmol) Saccharose (**11**) wurden mit
a) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit RAF-A inkubiert.
b) *p*-Nitrophenyl-α-D-galactopyranosid (**19**) (150 mg, 0.5 mmol) und

c) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in je 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante B mit RAF-A inkubiert

427 mg (1.25 mmol) Saccharose wurde mit
d) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV4 Variante A mit aGaB inkubiert.
e) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und nach AAV4 Variante B mit aGaB inkubiert.

b) Der Reaktionsansatz wird nach Beendigung der Reaktion mit Essigester extrahiert.
Die Reaktionsansätze wurden chromatographisch an Biogel P2 von den Edukten separiert. Es wurden:
a) 38.8 mg (0.077 mmol, 15.4%)
b) 42.9 mg (0.085 mmol, 17 %)
c) 17.6 mg (0.035 mmol, 7%)
d) 8.6 mg (0.017 mmol, 3.4 %)
e) 22.7 mg (0.045 mmol, 9 %)
weißer, amorpher Feststoff isoliert.

$C_{18}H_{32}O_{16}$ (504.44)
MALDI-TOF m/z 527.51 $[M+Na]^+$, 543.45 $[M+K]^+$
$[\alpha]_D^{20}$ = +73 (c=1 in H_2O) Lit.:[122] +122.8 (c=2 in H_2O)

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.27 (d, 1H, H-1'', J = 3.8 Hz), 4.84 (br. d, 1H, H-1, J = 3.5 Hz), 3.41 (dd, 1H, H-2, J_1 = 3.8 Hz, J_2 = 9.8 Hz), 3.26 (vt, 1H, H-3 J = 9.8 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 104.20 (C-2'), 98.87 (C-1''), 92.49 (C-1), 72.75 (C-2), 71.79 (C-3).

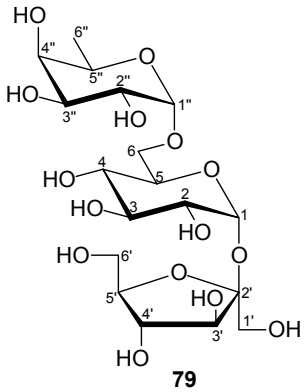
Acetylierte Verbindung **78a**:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 6.08 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 3.5 Hz), 5.97 (br. d, 1H, H-4'', $J_{3'',4''}$ = 1.3 Hz), 5.95 – 5.92 (m, 2H, H-3'', H-6a), 5.87 (dd, 1H, H-6b, J_1 = 2.5 Hz, J_2 = 11.9 Hz), 5.72 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 7.9 Hz), 5.68 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz), 5.62 – 5.58 (m, 1H,H-5''), 5.43 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.30 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 10.9 Hz), 5.10 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 3.8 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.4 Hz), 4.82 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 7.9 Hz), 4.72 – 4.64 (m, 5H, H-1'a, H-1'b, H-6'a, H-6'b, H-5), 4.52 – 4.47 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.35 (dd, 1H, H-5', $J_{5',6'a}$ = 6.9 Hz, $J_{5'6'b}$ = 11.1 Hz), 3.93 (dd, 1H, H-6''a, $J_{5'',6''a}$ = 6.9 Hz, $J_{6''a,6''b}$ = 10.8 Hz), 3.70 (dd, 1H, H-6''b, $J_{5',6''b}$ = 1.9 Hz, $J_{6''a,6''b}$ = 10.8 Hz), 2.07, 2.05, 2.03, 2.02, 1.98, 1.97, 1.96 (s, insg. 33H, OCC*H*$_3$).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ [ppm] = 171.06, 170.73, 170.61, 170.47, 170.16, 170.09, 169.81, 169.53 (C=O), 104.14 (C-2'), 96.55 (C-1''), 91.03 (C-1), 81.17 (C-5), 77.37 (C-3), 77.11 (C-3'), 76.15 (C-3''), 71.38 (C-2''), 70.40 (C-4'), 70.15 (C-5''), 69.83 (C-4''), 69.05 (C-4'), 68.55 (C-2), 67.23 (C-5'), 66.94 (C-6), 64.19 (C-1'), 62.27 (C-6'), 62.14 (C-6''), 20.77, 20.69, 20.62, 20.59, 20.55, 20.53, 20.40, 20.31 (C*C*H$_3$).

α-D-Fucopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranosid (79)

[α-D-Fuc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1↔2)-β-D-Fru*f*]



79

342 mg (1 mmol) Saccharose (**11**) wurden mit α-D-Fucopyranosylfluorid (**21**) (83 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit RAF-A inkubiert. Nachdem das Enzym durch Erhitzen inaktiviert wurde, wurde das Produkt an Biogel P2 von den Edukten separiert. Nach Gefriertrocknung konnten 5.1 mg (0.01 mmol, 2 %) eines farblosen amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ +41 (c=0.2 MeOH)

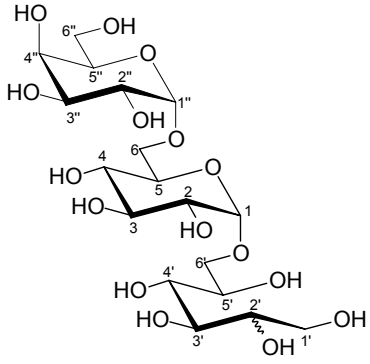
$C_{18}H_{32}O_{15}$ (488.44)

MALDI-TOF *m/z* 511.45 $[M+Na]^+$, 527.47 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.38 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 3.5 Hz), 4.82 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.22 (m_c, 1H, H-3''), 4.16 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 8.4 Hz), 4.05 – 3.98 (m, 3H, H-4'', H-3, H-4), 3.93 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.1 Hz), 3.86 – 3.83 (m, 2H, H-2'', H-5''), 3.80 (m_c, 1H, H-5), 3.77 – 3.73 (m, 4H, H-1'a, H-1'b, H-6'a, H-6'b), 3.66 – 3.63 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.42 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 8.4 Hz), 1.16 (d, 3H, H-6'', $J_{5'',6''}$ = 6.3 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 104.53 (C-2'), 98.65 (C-1''), 96.83 (C-1), 81.71 (C-5'), 77.49 (C-5), 73.53 (C-3''), 72.37 (C-4'), 72.32 (C-3), 72.24 (C-3'), 72.15 (C-5''), 72.00 (C-2), 71.19 (C-2''), 69.84 (C-4''), 68.54 (C-6), 67.39 (C-4), 62.69 (C-6'), 61.76 (C-1'), 15.65 (C-6'').

α-D-Galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-D-glucitol/mannitol (80) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-D-Glc-ol/Man-ol]



80

344 mg (1 mmol) Isomalt (**12**) wurden zusammen mit:

a) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit der Galactosidase aus RAF-A inkubiert.

b) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante B mit der Galactosidase aus RAF-A inkubiert.

430 mg (1.25 mmol) Isomalt (**12**) wurden zusammen mit

c) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV4 Variante A mit der Galactosidase aus aGaB inkubiert.

d) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV4 Variante B mit der Galactosidase aus aGaB inkubiert.

Nach Abbruch der Reaktionen und chromatographischer Reinigung an Biogel P2 konnten für:

a) 43.0 mg (0.085 mmol, 17 %)

b) 22.8 mg (0.045 mmol, 9 %)

c) 15.3 mg (0.03 mmol, 6 %)

d) 30.5 mg (0.06 mmol, 12 %)

eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +141 (c=1 in H_2O)

$C_{18}H_{34}O_{16}$ (506.18)

MALDI-TOF m/z 529.35 $[M+Na]^+$, 545.53 $[M+K]^+$

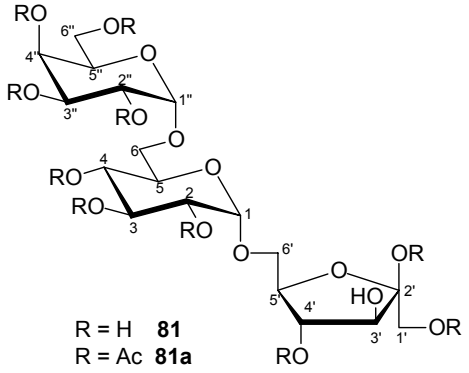
berechnet:	C 42.69	H 6.77
gefunden:*	C 37.98	H 6.66

* die Differenz ist durch Reste von gebundenen Wasser in dem Produkt zu begründen

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.94 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 3.8 Hz), 4.88 (m_c, 2H, 2H-1).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 98.70, 98.57 (C-1''), 98.53 (C-1), 73.68 (C-5''), 73.49 (C-3), 73.27 (C-3''), 72.15 (C-5), 71.97 (C-2), 71.88 (C-2''), 69.84 (C-4), 68.80 (C-6'), 69.58 (C-6), 68.89 (C-4''), 63.64 (C-1', Man-ol), 62.79 (C-1', Glc-ol), 61.61 (C-6'').

α-D-Galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-fructofuranose (81) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-β-D-Fru*f*]



342 mg (1 mmol) Isomaltulose (**13**) wurden zusammen mit:

a) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit der Galactosidase aus RAF-A inkubiert.
b) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante B mit der Galactosidase aus RAF-A inkubiert.

427 mg (1.25 mmol) Isomaltulose (**13**) wurden zusammen mit
c) α-D-Galactopyranosylfluorid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV4 Variante A mit der Galactosidase aus aGaB inkubiert.
d) Mellibiose (**27**) (171 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV4 Variante B mit der Galactosidase aus aGaB inkubiert.

Nach Beendigung der Reaktion und chromatographischer Reinigung an Biogel P2 konnten für:
a) 30.3 mg (0.06 mmol, 12 %)
b) 20.2 mg (0.04 mmol, 8 %)
c) 17.7 mg (0.035 mmol, 7 %)
d) 32.8 mg (0.065 mmol, 13 %)
eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +145 (c=1 in H_2O)

$C_{18}H_{36}O_{16}$ (504.44)
MALDI-TOF m/z 527.45 $[M+Na]^+$, 543.35 $[M+K]^+$

berechnet:	C 42.86	H 6.39
gefunden:*	C 38.60	H 6.53

* die Differenz ist durch Reste von gebundenem Wasser in dem Produkt zu begründen.

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:

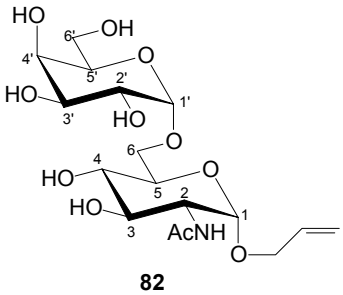
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.80 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.75 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 3.1 Hz), 3.98 (m_c, 1H, H-6a), 3.90 (m_c, 1H, H-6b).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 102.11 (C-2'), 98.73 (C-1''), 98.42 (C-1), 69.88 (C-6).

Acetylierte Verbindung **81a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.85 – 5.76 (m, 2H, H-3'', H-3), 5.73 (d, 1H, H-4'', $J_{3'',4''}$ = 2.2 Hz), 5.58 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.6 Hz), 5.51 (m_c, 1H, H-5''), 5.20 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 5.13 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 3.8 Hz), 5.05 (dd, 1H, H-2' $J_{1'',2''}$ = 3.8 Hz, $J_{2'',3''}$ = 8.9 Hz), 5.00 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 8.9 Hz), 4.67 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = $J_{4',5'}$ = 8.9 Hz), 4.58 (m_c, 1H, H-5'), 4.53 (m_c, 1H, H-6a), 4.45 (m_c, 1H, H-6b), 4.32 – 4.22 (m, 4H, H-1'a, H-1'b, H-6'a, H-6'b), 3.70 (m_c, 1H, H-5), 3.64 – 3.59 (m, H-6''a, H-6''b), 1.91, 1.90, 1.88, 1.87, 1.85, 1.82, 1.80, 1.78, (s, insg. 33H, OC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 125 MHz): δ [ppm] = 170.95, 170.80, 170.67, 170.60, 170.40, 170.16, 169.82, 169.55 (C=O), 103.56 (C-2'), 96.79 (C-1), 95. 97 (C-1''), 82.26 (C-5'), 79.87 (C-4'), 77.60 (C-5''), 74.84 (C-3'), 71.60 (C-5), 71.10 (C-4), 69.88 (C-3''), 69.20 (C-3), 69.07 (C-4''), 68.95 (C-2), 68.38 (C-2''), 67.39 (C-6), 62.38 (C-6'), 62.27 (C-1'), 61.96 (C-6''), 21.19, 21.08, 21.03, 20.98, 20.81, 20.74 (C*C*H$_3$).

Allyl-α-D-galactopyranosyl-(1→6)-2-acetamido-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (82) [α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-GlcNAc-OAll]



82

261 mg (1 mmol) Allyl-α-*N*-acetylglucosaminid (**17**) wurden mit Fluor-α-D-galacto-pyranosid (**18**) (91 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphospatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A inkubiert. Nachdem die Reaktion beendet wurde und der Ansatz an Biogel® P2 chromatographisch gereinigt wurde, konnte 10.9 mg (26.0 µmol, 5.2 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

berechnet:	C: 48.22	H: 6.90	N: 3.31
gefunden:*	C: 45.35	H: 6.99	N: 2.96

* die Differenz ist durch Reste von gebundenem Wasser zu erklären.

$[\alpha]_D^{20}$ = +113 (c=0.5 in H_2O)

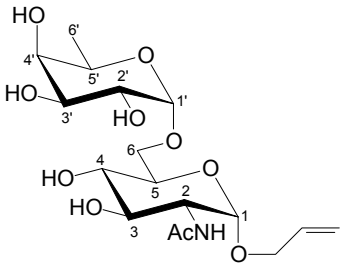
$C_{17}H_{29}NO_{11}$ (423.42)

MALDI-TOF *m/z* 447.16 $[M+Na]^+$, 462.17 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ = 6.10 (dddd, 1H, CH-allyl, J_1= 1.2 Hz, J_2 = 5.5 Hz, J_3 = 10.4 Hz, J_4 = 17.3 Hz), 5.34 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 17.3 Hz), 5.19 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 10.4 Hz), 5.16 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.85 (H-1', unter H_2O peak), 4.23 (dd, 1H, OCH_2-allyl, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 12.9 Hz), 4.05 – 3.98 (m, 2H, OCH_2-allyl, H-6a), 3.91 (m_c, 2H, H-2', H-6b), 3.86 – 3.81 (m, 2H, H-4', H-2), 3.77 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.2 Hz, $J_{2',3'}$ = 8.5 Hz), 3.74 (m_c, 1H, H-5'), 3.72 – 3.68 (m, 3H, H-6'a, H-6'b, H-4), 3.62 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.2 Hz, $J_{5,6b}$ = 8.8 Hz), 3.38 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 8.8 Hz, $J_{3,4}$ = 10.1), 2.01 (s, 3H, COC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100.67 MHz): δ = 171.28 (*C*=O), 135.90, 117.88 allyl *C*, 99.23 (C-1'), 98.09 (C-1), 75.94 (C-4), 74.43 (C-5'), 73.16 (C-3), 72.80 (C-2), 72.01 (C-5), 72.01 (C-2'), 71.70 (C-3'), 71.55 (C-4'), 69.53 (C-6), 62.93 (C-6'), 55.81 CH_2-allyl, 22.93 (CO*C*H$_3$).

Allyl-β-D-fucopyranosyl-(1→6)-2-*N*-acetyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (83) [α-D-Fuc*p*-(1→6)-α-D-allyl-GlcNAc]



83

261 mg (1 mmol) α-Allyl-*N*-acetylglucosaminid (**17**) wurden mit α-D-Fucopyranosylfluorid (**21**) (83 mg, 0.5 mmol) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.3 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV3 Variante A mit RAF-A inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion und chromatographischer Aufreinigung des Ansatzes an Biogel® P2, konnten 7.1 mg (17.0 µmol, 3.4 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +8 (c=0.4 in MeOH)

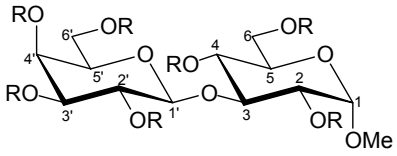
MALDI-TOF *m/z* 430.32 $[M+Na]^+$, 446.21 $[M+K]^+$

$C_{17}H_{29}NO_{10}$ (407.42)

^{1}H-NMR (MeOH-d4, 500 MHz): δ = 6.00 (dddd, 1H, CH-allyl, J_1= 1.5 Hz, J_2 = 5.5 Hz, J_3 = 10.4 Hz, J_4 = 17.3 Hz), 5.38 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.5 Hz, J_2 = 17.3 Hz), 5.22 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.5 Hz, J_2 = 10.4 Hz), 4.97 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz), 4.88 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz), 4.25 (dd, 1H, OCH_2-allyl, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 12.9 Hz), 4.05 (dd, 1H, OCH_2-allyl, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 12.9 Hz), 3.95 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 8.4 Hz), 3.90 (m_c, 1H, H-6a), 3.85 (br. d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 2.1 Hz), 3.83 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.6 Hz, $J_{2,3}$ = 8.6 Hz), 3.77 – 3.74 (m, 2H, H-3', H-5), 3.71 (m_c, 1H, H-6b), 3.67 – 3.64 (m, 1H, H-4, H-5'), 3.40 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 8.6 Hz, $J_{3,4}$ = 9.4 Hz), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 1.24 (d, 3H, H-6', $J_{5,6}$ = 6.6 Hz).

^{13}C-NMR (MeOH-d4, 100 MHz): δ = 169.98 (*C*=O), 133.95, 118.51 (allyl *C*), 98.73 (C-1'), 98.09 (C-1), 74.98 (C-4), 74.34 (C-5'), 73.15 (C-3), 73.05 (C-2), 72.98 (C-5), 72.78 (C-2'), 72.56 (C-3'), 72.10 (C-4'), 69.52 (C-6), 55.79 CH_2-allyl, 22.94 (CO*C*H_3), 17.21 (C-6').

Methyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosid (84) [β-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-OMe]



R = H **84**
R = Ac **84a**

194 mg (1 mmol) Methyl-α-D-glucopyranosid (**14**) wurden mit
a) 129 mg (0.5 mmol) *p*-Pyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**)
b) 171 mg (0.5 mmol) Lactose (**28**)
c) 150 mg (0.5 mmol) *p*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (**85**)
in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT zur Reaktion gebracht. Nach Beendigung der Reaktion wurden die jeweiligen Reaktionsgemische an Biogel® P2 chromatographisch gereinigt. Der Ansatz c) wird zum Entfernen des *p*-Nitrophenols vor dem Auftragen auf Biogel P2 noch gegen Essigester geschüttelt.
Als Produkt konnten für
a) 47.9 mg (0.135 mmol, 27 %)
b) 23.1 mg (0.065 mmol, 13 %)
c) 40.8 mg (0.115 mmol, 23 %)
eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +97 (c=1 in H_2O)
$C_{13}H_{24}O_{11}$ (356.33)

berechnet: C 43.82 H 6.79
gefunden: C 40.72 H 6.85
*die Differenz ist durch Reste von gebundenem Wasser in dem Produkt zu begründen.

Masse des Acetats: $C_{27}H_{38}O_{18}$ (650.20)
MALDI-TOF *m/z* 673.17 $[M+Na]^+$, 689.25 $[M+K]^+$

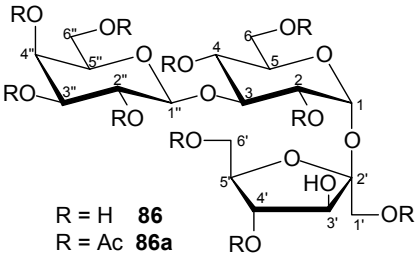
Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.77 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.78 Hz), 4.56 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 7.9 Hz), 3.87 (br. d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 3.1 Hz), 3.81 (br. s, 1H, H-3), 3.64 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.1 Hz, $J_{2',3'}$ = 9.8 Hz), 3.55 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, $J_{2',3'}$ = 9.8 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 125 MHz): δ [ppm] = 103.28 (C-1'), 99.41 (C-1), 82.98 (C-3), 75.72 (C-2), 71.72 (C-2'), 71.31 (C-3'), 71.06 (C-4).

Acetylierte Verbindung **84a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.48 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 8.0 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.40 (d, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 3.1 Hz), 5.16 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 10.1 Hz), 5.06 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.1 Hz, $J_{2',3'}$ = 10.7 Hz), 5.01 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.1 Hz), 4.78 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.62 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 8.0 Hz), 4.35 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 10.1 Hz), 4.25 (dd, 1H, H6a, $J_{5,6a}$ = 5.0 Hz, $J_{6a,6b}$= 12.1 Hz), 4.16 (dd, 1H, H6b, $J_{5,6b}$ = 2.5 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.1 Hz), 4.08 (dd, 1H, H6'a, $J_{5',6'a}$ = 6.5 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.0 Hz), 4.01 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$ = 6.5 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11.0 Hz), 3.88 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.0 Hz, $J_{5,6b}$ = 12.1 Hz), 3.27 (vt, 1H, H-5', $J_{5',6'a}$ = 6.5 Hz), 2.16, 2.14, 2.10, 2.06, 2.04, 1.98, 1.96 (s, je 3H, CC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 125 MHz): δ [ppm] = 170.62, 170.58, 170.31, 170.10, 169.94, 169.83, 169.55, (*C*=O), 101.69 (C-1'), 97.24 (C-1), 76.59 (C-4), 73.65 (C-2), 71.89 (C-3'), 71.14 (C-5'), 69.76 (C-2'), 69.27 (C-3), 68.24 (C-5), 67.30 (C-4'), 62.70 (C-6), 60.75 (C-6'), 54.96 (O*C*H$_3$), 20.71, 20.44, 20.21, 20.03, 20.00, 19.98, 19.95 (CO-*C*H$_3$).

β-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranosid (86) [β-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1↔2)β-D-Fru*f*]



342 mg (1 mmol) Saccharose (**11**) wurde mit

a) 78 mg (0.3 mmol) *p*-Hydroxypyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**)

b) 171 mg (0.5 mmol) Lactose (**28**)

in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Nachdem die Reaktion durch 5 min. erhitzen auf 99 °C beendet wurde, wurden die jeweiligen Ansätze an Biogel® P2 chromatographisch gereinigt.

Es wurden für

a) 46.9 mg (0.093 mmol, 31 %)

b) 30.2 mg (0.06 mmol, 12 %)

eines farblosen amorphen Feststoffes isoliert.

Upscaling mit der β-Galactosidase aus Bovine testes:

17.1 g (50 mmol) Saccharose (**11**) und 10.8 g (30 mmol) Lactose (**28**) wurden in 50 ml deionisiertem Wasser pH = 4.3 (eingestellt mit verd. HCl) mit 25 Units der β-Galactosidase aus Bovine testes gelöst. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 5 Tage inkubiert und während dieser Zeit HPLC-analytisch verfolgt. Die Reaktion wurde durch 5 min. Erhitzen auf 90 °C beendet. Der gesamte Ansatz wurde lyophilisiert und zur Trennung auf einer industriellen GPC-Säule an die Südzucker AG geschickt. Nach Separation der Produkte von den Edukten wurden 2.7 g (5.3 mmol, 17 %) der Verbindung **86** erhalten.

$[\alpha]_D^{20}$ = +49 (c=1 H_2O) Lit.: [97] +45 (c=0.5 in H_2O)

$C_{18}H_{32}O_{16}$ (504.44)

MALDI-TOF m/z 527.33 $[M+Na]^+$, 543.45 $[M+K]^+$

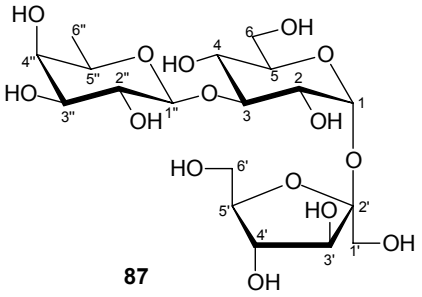
Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.46 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 4.0 Hz), 4,67 (d, 1H, H1‘‘, $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz), 4,24 (d, 1H, H-3‘, $J_{2',3'} = J_{3',4'}$ = 8.7 Hz), 4.08 (vt, 1H, H-4‘, $J_{3',4'}$ = 8.7 Hz), 4.02 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3} = J_{3,4}$ = 9.3 Hz), 3.93 – 3.89 (br. m, 1H, H-5), 3.84 (br. s, 2H, H-6‘a, H-6‘b), 3.79 (br. d, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 4.0), 3.65 (br. dd,1H, H-2‘‘, J_1 = 7.9 Hz, J_2 = 9.3 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 125 MHz): δ [ppm] = 104.07 (C-1‘‘), 103.56 (C-2), 92.50 (C-1), 82.14 (C-4‘), 81.77 (C-3), 76.94 (C-3‘), 74.40 (C-5‘), 62.74 (C-6‘).

Acetylierte Verbindung **86a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.93 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 5.88 (d, 1H, H-3’, $J_{3',4'}$ = 6.3 Hz), 5.75 (vt, 1H, H-4’, $J_{3',4'}$ = 6.3 Hz), 5.65 (dd, 1H, H-2’’,$J_{1'',2''}$ = 8.0 Hz, J_2 = 10.4 Hz), 5.60 (br. d, 1H, H-4’’, $J_{3'',4''}$ = 2.8 Hz), 5.30 (dd, 1H, H-3’’, $J_{3'',4''}$ = 2.8 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.4 Hz), 5.24 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 10.0 Hz), 5.16 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz), 4.94 (d, 1H, H-1’’, $J_{1'',2''}$ = 8.0 Hz), 4.62 – 4.56 (m, 3H, H-5, H-6a, H6b), 4.54 (br. vt, 1H, H-3, $J_{2,3} = J_{3,4}$ = 10.0 Hz), 4.50 – 4.41 (m, 4H, H-1’a, H-1’b, H-6’a, H-6’b), 4.34 (br. dd, 1H, H-5’, $J_{5',6'a}$ = 6.9 Hz, $J_{5',6'b}$ = 11.3 Hz), 4.29 (dd, 1H, H-6’’a, $J_{5'',6''a}$ = 6.9 Hz, $J_{6''a,6''b}$ = 11.0 Hz), 4.24 (dd, 1H, H-6’’b, $J_{5'',6''b}$ = 6.9 Hz, $J_{6''a,6''b}$ = 11.0 Hz), 3.67 (vt, 1H, H-5’’, $J_{5'',6''a}$ = 6.9 Hz), 2.02, 1.96, 1.89, 1.85, 1.81, 1.75, 1.68 (s, insg. 33H, CCH_3).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 125 MHz): δ = 170.57, 170.55, 170.48, 170.29, 170.25, 170.06, 169.94, 169.83, 169.35, 169.12 (*C*=O), 104.98 (C-2’), 102.01 (C-1’’), 91.21 (C-1), 79.68 (C-5’), 77.01 (C-3’), 76.46 (C-3), 76.10 (C-4’), 73.26 (C-2), 72.00 (C-3’’), 71.18 (C-5’’), 70.00 (C-2’’), 69.63 (C-5), 69.25 (C-4), 67.71 (C-4’’), 64.43 (C-1’), 63.76 (C-6’’), 62.75 (C-6’), 61.40 (C-6), 20.85, 20.65, 20.51, 20.43, 20.35, 20.22, 20.17, 20.05, 19.98, 19.95, 19.91 (CO-*C*H_3).

β-D-Fucopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranosid (87) [β-D-Fuc*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1↔2)β-D-Fru*f*]



87

342 mg (1 mmol) Saccharose (**11**) wurden zusammen mit 121 mg (0.5 mmol) Pyridinyl-β-D-fucopyranosid (**23**) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung an Biogel P2 konnten 6.5 mg (13.3 µmol, 2.6 %) eines farblosen amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ =+45 (c=0.2 in H_2O)

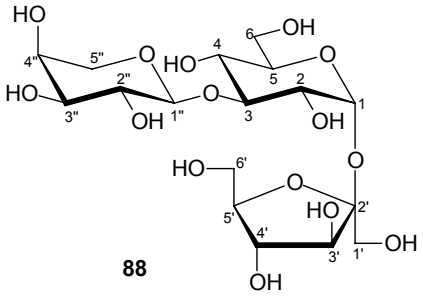
$C_{18}H_{32}O_{15}$ (488.17)

MALDI-TOF *m/z* 510.25 $[M+Na]^+$, 526.51 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.39 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.56 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz), 4.15 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 8.8 Hz), 4.01 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 8.8 Hz), 3.95 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz), 3.90 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 9.8 Hz), 3.83 (m_c, 1H, H-5), 3.74 – 3.73 (m, 5H, H-3'', H-1'a, H-1'b, H-6'a, H-6'b), 3.71 (m_c, 1H, H-5'), 3.67 (br. d, 1H, H-4'', $J_{3'',4''}$ = 2.1 Hz), 3.63 – 3.60 (m, 3H, H-5'', H-6a, H-6b), 3.57 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.2 Hz), 3.50 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 9.2 Hz), 1.19 (d, 3H, H-6'', $J_{5'',6''}$ = 6.5 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 104.43 (C-2'), 103.08 (C-1''), 92.43 (C-1), 82.57 (C-3), 81.71 (C-5'), 76.79 (c-3'), 74.30 (C-4'), 73.09 (C-3''), 72.43 (C-5), 71.63 (C-5''), 71.27 (C-2), 71.23 (C-2''), 71.08 (C-4), 70.91 (C-4''), 62.69 (C-1'), 61.79 (C-6'), 60.43 (C-6), 15.84 (C-6'' *C*H_3).

α-L-Arabinopyranosyl-(1→3)-α-glucopyranosyl-β-D-fructofuranosid (88) [α-L-Ara*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1↔2)β-DFru*f*]



88

342 mg (1 mmol) Saccharose (**11**) wurden zusammen mit 113 mg (0.5 mmol) Pyridinyl-α-L-fucopyranosid (**26**) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Der Ansatz wurde nach Inaktivierung des Enzyms säulenchromatographisch an Biogel P2 gereinigt. Es konnten 7.2 mg (15.2 µmol, 3.0 %) eines farblosen amorphen Feststoffes isoliert werden

$[\alpha]_D^{20}$ +100 (c=1 in H_2O)

$C_{17}H_{30}O_{15}$ (474.15)

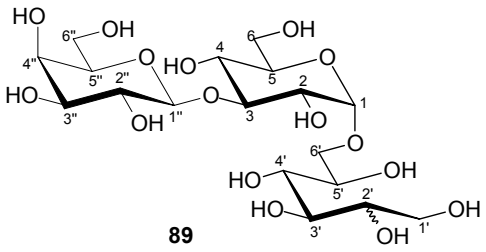
MALDI-TOF *m/z* 497.25 $[M+Na]^+$, 513.09 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.36 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.53 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 6.5 Hz), 4.15 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 8.9 Hz), 3.98 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 8.9 Hz), 3.92 – 3.87 (m, 2H, H-3, H-4''), 3.82 (m_c, 2H, H-5, H-5'), 3.77 – 3.74 (m, 4H, H-1'a, H-1'b, H-6'a, H-6'b), 3.67 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 9.8 Hz), 3.46 (dd, 1H, H-3'', $J_{3'',4''}$ = 2.5 Hz, $J_{2'',3''}$ = 7.8 Hz), 3.62 – 3.58 (m, 4H, H-5''a, H-5''b, H-6a, H-6b), 3.54 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 6.5 Hz, $J_{2'',3''}$ = 7.8 Hz), 3.49 (vt, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 104.02 (C-2'), 103.77 (C-1''), 92.48 (C-1), 82.52 (C-3), 82.10 (C-5'), 76.85 (C-3'), 74.32 (C-4'), 72.60 (C-5''), 72.52 (C-5), 71.56 (C-2''), 71.51 (C-2), 70.98 (C-4), 68.61 (C-4''), 66.53 (C-3''), 62.69 (C-1'), 61.80 (C-6), 60.46 (C-6').

β-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-glucitol/mannitol (89)

[β-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1→6)-D-Glc-ol/Man-ol]



89

344 mg (1 mmol) Isomalt (**12**) wurden zusammen mit:
a) 78 mg (0.3 mmol) *p*-Hydroxypyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**)
b) 171 mg (0.5 mmol) Lactose (**28**)
in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung an Biogel® P2 konnten für
a) 17.0 mg (33.6 µmol, 11.2 %)
b) 22.2 mg (44.0 µmol, 8.8 %)
eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

Upscaling mit der β-Galactosidase aus bovine testes:
17.2 g (50 mmol) Isomalt (**12**) wurden mit 20.7 g (60 mmol) Lactose (**28**) in 50 ml deionisiertem Wasser (pH=4.3 eingestellt mit verd. HCl), mit 37.5 U der β-Galactosidase aus Bovine testes bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 5 Tagen durch Erhitzen des Ansatzes für 5 min. auf 90 °C beendet. Anschließend wurde der Ansatz gefriergetrocknet und zur Trennung an einer industiellen GPC-Säule zur Südzucker AG gesandt. Es konnten 4.6 g (9.1 mmol, 16 %) der Verbindung **89** isoliert werden.

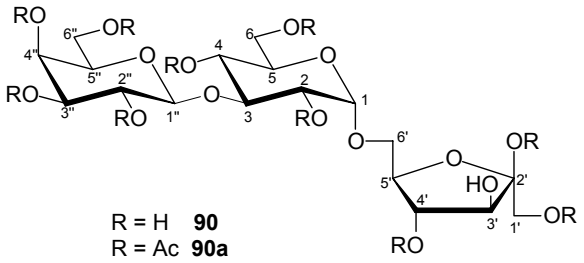
$[\alpha]_D^{20}$ = +54 (c=1 in H_2O) Lit.:[97] +52 (c=0.6 in H_2O)

$C_{18}H_{34}O_{16}$ (506.18)
MALDI-TOF *m/z* 529.13 $[M+Na]^+$, 545.34 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.90 (m_c, 2H, 2H-1), 4.45 (d, 1H, H-1'', J = 7.8 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 103.68 (C-1''), 98.47 (C-1), 82.37 (C-3), 75.43 (C-5''), 72.88 (C-3''), 71.40 (C-2), 71.13 (C-2''), 69.91 / 69.63 (C-4/4''), 68.99 / 68.94 (C-6'), 63.63 (C-1', Man-ol), 62.78 (C-1', Glc-ol), 61.36 (C-6''), 60.86 (C-6).

β-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-fructofuranose (90) [β-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1→6)-β-D-Fru*f*]



R = H **90**
R = Ac **90a**

342 mg (1 mmol) Isomaltulose (**13**) wurden zusammen mit
a) 78 mg (0.3 mmol) *p*-Pyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**)
b) 171 mg (0.5 mmol) Lactose (**28**)
in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Nachdem die Reaktion durch Erhitzen auf 90°C beendet wurde, wurde der jeweilige Ansatz an Biogel® P2 chromatographisch gereinigt.
Es wurden für
19.7 mg (39.6 µmol, 13.2 %)
19.5 mg (39.5 µmol, 7.9 %)
eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert.

$[\alpha]_D^{20}$ = +44 (c=0.97 in H_2O) Lit.:[97] +43 (c=1.2 in H_2O)

$C_{18}H_{32}O_{18}$ (504.15)
MALDI-TOF *m/z* 527.45 $[M+Na]^+$, 543.35 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:

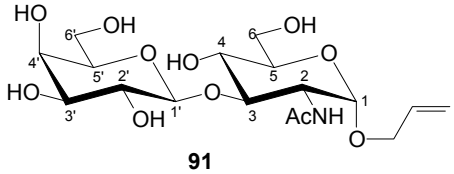
^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.92 (br. d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.57 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 103.72 (C-1''), 103.25 (C-2'), 98.57 (C-1), 82.72 (C-3), 68.31 (C-6').

Acetylierte Verbindung **90a**:
^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.59 (br. d, 1H, H-4'', $J_{3'',4''}$ = 2.5 Hz), 5.56 (dd, 1H, H-3'', $J_{3'',4''}$ = 2.5 Hz, $J_{2'',4''}$ = 9.2 Hz), 5.49 (m_c, 1H, H-4), 5.25 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 6.7 Hz), 5.04 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz), 4.76 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz, $J_{2'',3''}$ = 9.2 Hz), 4.62 (dd, 1H, H-5', $J_{5',6'a}$ = 3.3 Hz, $J_{4',5'}$ = 6.7 Hz), 4.58 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8 Hz, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz), 4.52 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz), 4.46 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 8.2 Hz), 4.40 – 4.36 (m, 2H, H-3', H-5), 4.30 (m_c, 1H, H-5''), 4.23 – 4.18 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-6''a, H-6''b), 4.10 (m_c, 1H, H-1'a), 4.05 (m_c, 1H, H-1'b), 3.79 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'a}$ = 6.2 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 10.7 Hz), 3.73 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$ = 3.3 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 10.7 Hz), 2.23, 2.16, 2.15, 2.11, 2.07, 2.04, 2.03, 2.00 (s, insg. 33H, CC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 170.52, 170.45, 170.41, 170.37, 170.27, 170.21, 170.17, 170.14, 170.07, 170.01, 169.95 (C=O), 102.88 (C-2'), 101.71 (C-1''), 96.60 (C-1), 83.12 (C-3), 81.54 (C-5'), 79.33 (C-5''), 78.39 (C-3''), 76.90 (C-4'), 76.79 (C-3'), 76.31 (C-3''), 73.61 (C-4), 73.53 (C-5), 71.89 (C-4''), 71.75 (C-2), 71.71 (C-2''), 68.55 (C-6'), 61.75 (C-6''), 61.26 (C-1'), 61.14 (C-6), 20.78, 20.74, 20.72, 20.67, 20.63, 20.58, 20.56, 20.48, 20.42 (C*C*H$_3$).

Allyl-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-2-acetamido-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (91) [β-D-Gal*p*-(1→3)-α-D-GlcNAc-OAll]



91

261 mg (1 mmol) Allyl-*N*-acetyl-α-D-glucopyranosid (**17**) wurden zusammen mit 78 mg (0.3 mmol) *p*-Pyridinyl-β-D-galactopyranosid (**20**) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, KH_2PO_4 / K_2HPO_4, pH = 6.5) gelöst und gemäß AAV5 mit der β-Galactosidase aus BgLT inkubiert. Nachdem die Reaktion durch 5 min. Erhitzen auf 90 °C beendet wurde, konnten nach Separation des Ansatzes an Biogel P2 14.0 mg (0.033 mmol, 11.0 %) eines farblosen, amorphen Feststoffes isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ =+175 (c=1 in H_2O)

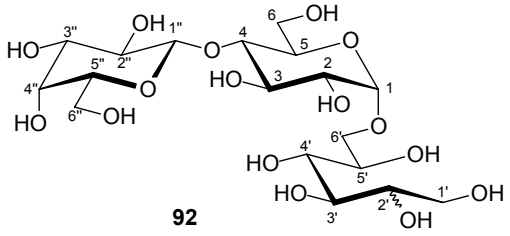
$C_{17}H_{29}NO_{11}$ (423.42)

MALDI-TOF *m/z* 443.39 $[M+Na]^+$, 462.22 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ = 5.80 (dddd, 1H, CH-allyl, J_1= 1.5 Hz, J_2 = 5.5 Hz, J_3 = 10.2 Hz, J_4 = 17.0 Hz), 5.20 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.5 Hz, J_2 = 17.0 Hz), 5.12 (dd, 1H, CH_2-allyl, J_1 = 1.5 Hz, J_2 = 10.2 Hz), 4.78 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.3 Hz), 4.33 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ = 7.8 Hz), 4.07 (dd, 1H, OCH_2-allyl, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 13.0 Hz), 3.88 (dd, 1H, OCH_2-allyl, J_1 = 5.5 Hz, J_2 = 13.0 Hz), 3.80 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.3 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.78 – 3.75 (m, 2H, H-4', H-3), 3.73 – 3.68 (m, 3H, H-6'a, H-6'b, H-5), 3.61 -3.55 (m, 4H, H-4, H-6a, H-6b, H-5'), 3.51 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 3.5 Hz, $J_{2',3'}$ = 9.9 Hz), 3.38 (dd, 1H, H-2', $J_{1',2'}$ = 7.8 Hz, $J_{2',3'}$ = 9.9 Hz), 1.88 (s, 3H, COC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ = 174.75 (*C*=O), 133.92, 118.33 (allyl *C*), 103.27 (C-1'), 96.18 (C-1), 79.12 (C-5'), 75.72 (C-3), 75.69 (C-5), 73.12 (C-3'), 71.58 (C-2'), 71.30 (C-4),70.98 (C-4'), 69.59 (C-2), 69.20 (allyl *C*), 61.36 (C-6'), 60.94 (C-6), 53.66 (*C*H_2-allyl), 22.22 CO*C*H_3.

β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucitol/mannitol (92)
[β-D-Gal*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-(1→4)-D-Glc-ol/Man-ol]



92

20.6 g (60 mmol) Isomalt (**12**) wurden zusammen mit 4.1 g (12 mmol) Lactose (**28**) in 50 ml (Na-acetatpuffer, 50 mM, pH = 5) und 30 U der β-Galactosidase aus *bacillus circulans* bei 50 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 5 min. Erwärmen auf 90 °C inaktiviert. Der Ansatz wurde gefriergetrocknet und zur Abtrennung des Produktes zur Südzucker AG geschickt. Es konnten nach Chromatographie an einer industriellen Säule mit Fractogel® HW40S 922 mg (1.82 mmol, 15.2 %) des Produktes **92** isoliert werden.

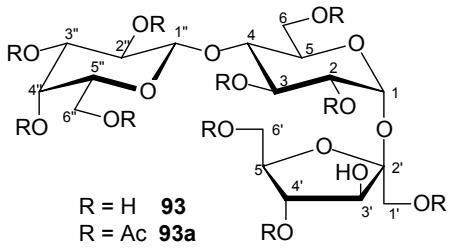
$[\alpha]_D^{20}$ = +62 (c=0.5 in H_2O) Lit.:[97] +61 (c=0.8 in H_2O)

$C_{18}H_{34}O_{16}$ (506.46)
MALDI-TOF m/z 529.55 $[M+Na]^+$, 545.67 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.89 (m_c, 2H, 2H-1,Glc-ol / Man-ol), 4.36 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 103.30 (C-1''), 98.56 (C-1), 78.77 (C-4), 75.76 (C-5''), 72.90 (C-3''), 72.14 (C-5), 71.58, 71.54 (C-2), 71.34 (C-3), 71.15 (C-2''), 69.49 (C-4''), 68.92 (C-6' Glc-ol / Man-ol), 63.65 (C-1' Man-ol), 62.79 (C-1' Glc-ol), 61.42 (C-6''), 60.24 (C-6).

β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranosid (93)



20.4 g (14.6 mmol) Saccharose (**12**) wurden zusammen mit 4.1 g (12 mmol) Lactose (**28**) in 50 ml (Na-acetatpuffer, 50 mM, pH = 5) und 30 U der β-Galactosidase aus *Bacillus circulans* bei 55 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 5 min. Erwärmen auf 95 °C inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde lyophilisiert und zur Separation des Produktes zur Südzucker AG geschickt. Es konnten nach Chromatographie an einer industriellen Säule mit Fractogel® HW40S 1.1 g (2.2 mmol, 18.6 %) des Produktes **93** isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +53 (c=1 in H_2O) Lit.:[97] +51 (c=0.7 in MeOH)

$C_{18}H_{36}O_{16}$ (504.44)

MALDI-TOF m/z 527.22 $[M+Na]^+$, 543.17 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.35 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.8), 4.55 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz), 4.16 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 6.4 Hz), 3.99 (dd, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 6.4 Hz, $J_{4',5'}$ = 8.5 Hz).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 104.65 (C-2'), 103.27 (C-1''), 92.32 (C-1), 76.67 (C-3'), 74.35 (C-4').

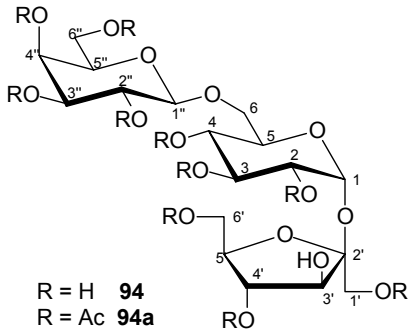
Acetylierte Verbindung **93a**:

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.70 – 5.68 (m, 2H, H-5'', H-4'), 5.55 (br. s, 1H, H-4), 5.53 – 5.48 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-6''b), 5.37 (vt, 1H, H-5', $J_{4',5'}$ = 8.7 Hz), 5.24 (d, 1H, H-6''a, $J_{5'',6''a}$ = 3.2 Hz, $J_{6''a,6''b}$ = 10.2 Hz), 5.11 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz), 4.81 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 8.7 Hz), 4.65 (dd, 1H, H-3'', $J_{3'',4''}$ = 4.1 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.1 Hz), 4.59 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.1 Hz), 4.52 – 4.49 (m, 1H, H-5), 4.45 (br. d,

1H, H-4'', $J_{3'',4''}$ = 2.8 Hz), 4.41 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 7.8 Hz), 4.30 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ =$J_{3,4}$ = 9.4 Hz), 4.20 – 4.10 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-1'a, H-1'b), 3.65 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 9.4 Hz), 2.11, 2.00, 1.89, 1.85, 1.81, 1.75, 1.72 (s, insg. 33H, CC*H*$_3$).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ = 170.76, 170,44, 170.41, 170.22, 170,14, 170.07, 170.01, 169.95, 169.63, 168.93 (*C*=O), 104.34 (C-2'), 102.49 (C-1''), 92.61 (C-1), 80.54 (C-5'), 80.14 (C-4), 79.70 (C-3'), 76.66 (C-5''), 76.44 (C-4'), 76.40 (C-3''), 76.20 (C-5), 71.27 (C-2'), 70.39 (C-3), 69.56 (C-2), 69.25 (C-2''), 69.21 (C-4''), 62.63 (C-6'), 61.63 (C-1'), 61.32 (C-6''), 61.28 (C-6), 20.87, 20.69, 20.65, 20.60, 20.56, 20.52 (C*C*H$_3$).

β-D-Galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1↔2)-β-D-fructofuranosid (94) [β-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1↔2)-β-D-Fru*f*)]



5.0 g (14.6 mmol) Saccharose **12** wurden zusammen mit 2.0 g (5.8 mmol) Lactose **28** in 25 ml deionisiertem Wasser (pH = 4.5) und 150 U der β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* bei 30 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 10 min. Erwärmen auf 90 °C inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde lyophilisiert und zur Abtrennung des Produktes zur Südzucker AG geschickt. Es konnten nach Chromatographie an einer industriellen Säule mit Fractogel® HW40S 605.3 mg (1.2 mmol, 21 %) des Produktes **94** isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +48 (c=1 in H_2O) Lit.:[97] +47 (c=0.9 in MeOH)

$C_{18}H_{36}O_{16}$ (504.44)

MALDI-TOF m/z 527.45 $[M+Na]^+$, 543.35 $[M+K]^+$

Ausgewählte Signale der OH-freien Verbindung:

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 5.34 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 3.2 Hz), 4.42 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz), 4.16 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 6.5 Hz), 3.39 (vt, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ = 6.5 Hz).

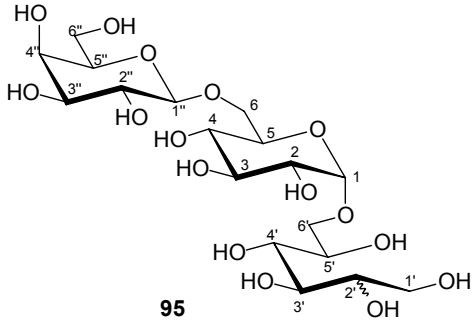
^{13}C-NMR (D_2O, 125 MHz): δ [ppm] = 103.85 (C-2'), 103.62 (C-1''), 92.37 (C-1), 76.67 (C-3'), 71.92 (C-4').

Acetylierte Verbindung **94a**:

^{1}H-NMR (C_6D_6, 500 MHz): δ [ppm] = 5.89 – 5.86 (m, 1H, H-4), 5.84 (d, 1H, H-1, J = 3.8 Hz), 5.76 (d, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ = 6.9 Hz), 5.65 (dd, 1H, H-2'', $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz, $J_{2'',3''}$ = 10.4), 5.61 – 5.58 (m, 2H, H-4', H4''), 5.36 (vt, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 10.4 Hz), 5.29 (dd, 1H, H-3'', $J_{3'',4''}$ = 3.5 Hz, $J_{2'',4''}$ = 10.4 Hz), 5.08 (d, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 3.8, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz), 4.85 – 4.81 (m, 2H, H-6''a, H-6''b), 4.61 (d,1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.9 Hz), 4.53 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5}$ = 2.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.4 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.3 Hz), 4.41 - 4.39 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.38 – 4.37 (m, 1H, H-5'), 4.31 – 4.29 (m, 2H, H-1'a, H-1'b), 4.20 (dd, 1H, H-6'a, $J_{5',6'a}$ = 4.4 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 10.9 Hz), 4.00 (dd, 1H, H-6'b, $J_{5',6'b}$ = 7.6 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 10.9 Hz), 3.78 (m_c, 1H, H-5''), 1.91, 1.90, 1.84, 1.80, 1.72, 1.69, 1.66, 1.64, 1.61 (s, insg. 33H, CCH_3).

^{13}C-NMR (C_6D_6, 100 MHz): δ [ppm] = 170.42, 170.13, 170.09, 170.06, 169.98, 169.93, 169.73, 169.60 (C=O), 104.06 (C-1'), 102.48 (C-1''), 90.94 (C-1), 80.53 (C-5'), 76.75 (C-4), 75.80 (C-4'') 71.71 (C-3''), 71.28 (C-2), 71.15 (C-2''), 71.05 (C-3'), 70.42 (C-3), 69.49 (C-6), 69.39 (C-5), 69.23 (C-4'), 69.13 (C-5''), 68.35 (C-6'), 62.41 (C-2'), 61.39 (C-6''), 20.80, 20.69, 20.59, 20.56, 20.51, 20.45, 20.42, 20.55 (CCH$_3$).

β-D-Galactopyranosyl-(1→6)-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-D-glucito/mannitol (95) [β-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-D-Glc-ol/Man-ol]



95

10 g (29 mmol) Isomalt (**12**) wurden zusammen mit 4.1 g (12 mmol) Lactose (**28**) in 50 ml deionisiertem Wasser (pH = 4.5, mit verd. HCl eingestellt) und 300 U der β-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* bei 30 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 10 min. Erwärmen auf 90 °C inaktiviert. Der Ansatz wurde gefriergetrocknet und zur Abtrennung des Produktes zur Südzucker AG geschickt. Es konnten nach Chromatographie an einer industriellen Säule mit Fractogel® HW40S 1.80 g (3.55 mmol, 29.8 %) des Produktes **95** isoliert werden.

$[\alpha]_D^{20}$ = +72 (c=1 in H_2O) Lit.:[97] +56 (c= 0.7 in H_2O)

$C_{18}H_{34}O_{16}$ (506.46)

MALDI-TOF m/z 529.59 $[M+Na]^+$, 545.62 $[M+K]^+$

^{1}H-NMR (D_2O, 500 MHz): δ [ppm] = 4.90 (m_c, 2H, 2H-1 Glc-ol / Man-ol), 4.39 (d, 1H, H-1'', $J_{1'',2''}$ = 7.8 Hz), 4.15 – 4.10 (m, 2H, H-6a, H6b).

^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz): δ [ppm] = 103.59 (C-1''), 98.64, 98.45 (C-1), 75.54 (C-5''), 73.49 (C-3), 73.07 (C-3''), 73.07 (C-5), 72.14 (C-2), 71.81 (C-2''), 71.14 (C-2''), 69.94 (C-4), 69.66 (C-4''), 69.09 (C-6), 68.55 (C-6'), 63.65 (C-1', Man-ol), 62.81 (C-1', Glc-ol), 61.48 (C-6'').

9. Gefahrenhinweise

Substanz	Gefahren-symbol	R	S
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetylchlorid	C	14-34	9-26-36/37/39-45
Allylalkohol	T, N	10-23/24/25-36/37/38-50	36/37/39-45-61
Amberlite IR 120 (H^+)	Xi	36	26
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	22
Benzaldehyddimethylacetal	Xn	22	
Benzol-d_6	F, T	45-11-E48/23/24/25	53-45
Benzylchlorid	T	22-23-37/38-41	36/37/39/-45
Bortrifluorid-ethyletherat	T, C	15/15-34	26-28-36/37/39-45
Bromwasserstoff in Eisessig (33%)	C	34-37	7/9-23.2-26-36/37/39-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Deuterochloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	26/36/37/39-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Fluorwasserstoff-Pyridin-Komplex	T, C	26/27/28-35	7/9-26-36/37-45

Substanz	Gefahren-symbol	R	S
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Kalium-tert.-butoxid	F, C	11-14-22-35	7/8-16-26-36/37/39
Kieselgel 60 (0.040 – 0.063 mm)			22
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Methanol-d_4	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
N,*N*-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumhydrid (60% in Paraffinöl)	F, C	15-34	7/8-26-36/37/39-43.6-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriummethanolat	T	11-14-34	8-16-26-43.6-45
para-Nitrophenol	X	21/22-40-41	15-24/25-26-47.3
Palladium / Aktivkohle	F, Xi	7-36/37/38	17-26-36
Petrolether (50-70 °C)	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	16-23.2-24-33-36/37-61-62
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
para-Hydroxy-pyridin	Xi	36/37/38	26-36 F:3-8
Quecksilber(II)bromid	T, N	26/27/28-33-50/53	13-28-45-60-61
Silbernitrat	C, N	34-50/53	26-45-60-61
Silber-tetrafluoroborat	C	20/21/22-34	26-28.1-36/37/39-45
Salzsäure (37 %)	C	34-37	26-45
Toluol	F, Xn	11-20	16-25-29-33

Substanz	Gefahren-symbol	R	S
para-Toluolsulfonsäure.	Xi	36/37/38	26-37
Trichloracetonitril	T, N	23/24/25-51/53	45-61
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester	C	10-14-34-37	26-36/37/39-54
Vinylacetat	F	11	16-23-29-33
p-Xylol	F, X	10-20/21-38	25
Zinn(IV)-chlorid	C	34-52/53	7/8-26-45-61

10. Literatur

([1]) *Glycoscience – Chemistry and Chemical Biology*, B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, Eds., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg **2001**.

([2]) P. Collins, R. Ferrier, Monosaccharides: *Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, J. Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore **1995**.

([3]) R. U. Lemieux, *Explorations with sugars: How sweet it was*, American Chemical Society, Washington, DC **1990**.

([4]) A. Varki, Glycobiology **1993**, *3*, 97 –130.

([5]) G. M. Edelmann, *Spektrum der Wissenschaft* **1989**, *7*, 52 – 60.

([6]) G. M. Edelmann, *Spektrum der Wissenschaft* **1984**, *6*, 62 – 74.

([7]) N. Sharon, *The Proteins*, Academic Press, New York, **1982**, *5*, 1 - 24.

([8]) J. C. Paulson, *The Receptors*, Academic Press, New York, **1985**, *5*, 131 – 145.

([9]) T. Feizi, *Nature* **1985**, *314*, 53 – 57.

([10]) J. Thiem, *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*, 193 – 211.

([11]) S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products. The Chiron Approach*, Pergamon Press, Oxford **1983**.

([12]) M. M. Palcic, *Methods Enzymol*. **1994**, *230*, 300 – 360.

([13]) U. Gambert, J. Thiem, *Top. Curr. Chem.* **1997**, 186, 21 – 43.

([14]) B. W. Murray, S. Takayama, J. Schultz, C.–H. Wong, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11183 – 11195.

([15]) C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507 – 2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1996**, *35*, 2350 – 2353.

([16]) M. L. Sinnott, *Chem. Rev*. **1990**, *90*, 1171 – 1202.

([17]) E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985 – 2993.

([18]) D. E. Koshland Jr., *Biol. Rev*. **1953**, *28*, 416 – 436.

([19]) C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. T. C. North, D. C. Phillips, V. R. Sharma, *Proc. R. Soc. London, B*. **1967**, *167*, 378 – 385.

([20]) J.-H. Yoon, K. Ajisaka, *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 153 – 163.

([21]) B. Sauerbrei, J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 201 – 204.

([22]) Y. Ooi, T. Hashimoto, N. Mitsou, T. Satoh, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2241 – 2244.

([23]) P. Valette, P. Pelenc, Z. Djouzi, F. Paul, P. Monsan, O. Szylit, *J. Sci. Food Agrc.* **1993**, *62*, 121 – 127.

([24]) H. Huchzermeyer, C. Schumann, *Z. Gastroenterol.* **1997**, *35*, 945 – 955.

([25]) M. Ito, M. Kimura, Y. Deguchi, A. Miyamori-Watabe, T.Yajima, T. Ken, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1993**, *39*, 278 – 288.

([26]) N. Kaur. A. K. Gupta, *J. Bioscience* **2002**, *7*, 703 – 704.

([27]) M. R. Jenner, A. Smithson, *J. Food Science* **1989**, *54*, 1646 – 1649.

([28]) H. Yamada, M. Nishizawa, C. Katayama, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *28*, 4009 – 4010.

([29]) W. H. Bowen, D.A Young, S. K. Pearson, *J. Dental Res.* **1990**, *8*, 1485 – 1487.

([30]) D. A. Rees, E. J. Welsh, *Angew. Chem*. **1977**, *89*, 228 – 239; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1977**, 16, 214 – 223.

([31]) O. Fridjonsson, H. Watzlawick, A. Gehweiler, T. Rohrhirsch, R. Mattes, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3955 – 3963.

([32]) J. L. Aduse-Opoku, J. Tao, J. Ferretti, R. R. B. Russell, *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 757 – 764.

([33]) N. Onishi, A. Yamashiro, K. Yokozeki, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 4022 – 4025.

([34]) C. T. M.Fransen, K. M. J. Van Laere, A. A. C. van Wijk, L. P. Brüll, M. Dignum, J. E. Thomas Oates, J. Haverkamp, A. Schols, A. G. J. Voragen, J. F. G. Vliegenhart, *Carbohydr. Res*. **1998**, *314*, 101 - 114.

([35]) S. Yanahira, M. Morita, S. Aoe, T. Suguri, I. Nakajima, E. Deya, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1995**, *41*, 83 – 94.

([36]) S. Yanahira, M. Morita, S. Aoe, T. Suguri, Y. Takada, S. Miura, I. Nakajima, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. **1997**, *43*, 123.

([37]) M. S. Alles, R. Hartemink, S. Meyboom, J. L. Harryvan, K. van Laere, F. M. Nagengart, J. G. Hautvast, *Am. J. Clin. Nutr*. **1999**, *69*, 980.

([38]) S. Salminen, C. Bouly, M.C. Boutron-Ruault, J. H. Cummings, A. Franck, G. R. Gibson, E. Isolauri, M. C. Moreau, *Brit. J. Nutr.* **1998**, *80*, 147 - 171.

([39]) J. M. T. Hamilton-Miller, G. R. Gibson, *Brit. J. Nutr.* **1999**, *82*, 73 – 74.

([40]) M. B. Roberfroid, *Brit. J. Nutr.* **1998**, *80*, 197 - 202.

([41]) C. T. M.Fransen, K. M. J. Van Laere, A. A. C. van Wijk, L. P. Brüll, M. Dignum, J. E. Thomas Oates, J. Haverkamp, A. Schols, A. G. J. Voragen, J. F. G. Vliegenhart, *Carbohydr. Res*. **1998**, *314*, 101 - 114.

([42]) G. L. Cote, B. Y. Tao, *Glycoconjugate J*. **1990**, *7*, 145 - 162.

([43]) T. Murata, T. Usui, *Biosci. Biotech. Biochem*. **1997**, *61*, 1059 - 1066.

([44]) V. Kren, J. Thiem, *Chem. Soc. Rev*., **1997**, *26*, 463 - 473.

([45]) S. Yanahira, T. Kobayashi, T. Suguri, M. Nakakoshi, S. Miura, H. Ishikawa, I. Nakajima, *Biosci. Biotechol. Biochem* **1995**, *59*, 1021 - 1026.

([46]) A. Vetere, S. Paoletti, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1996**, *219*, 6 - 13.

([47]) F. Micheel, A. Klemer, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1961**, *16*, 85 – 103.

([48]) M. Hayashi, S. I. Hashimoto, R. Noyori, *Chem. Lett.* **1984**, 1747 – 1750.

([49]) M. Shimizu, H. Togo, M. Yokoyama, *Synthesis* **1998**, 799 – 822.

([50]) K. Igarishi, T. Honma, J. Irisawa, *Carbohydr. Res.* **1970**, *13*, 49 – 55.

([51]) C. Walsh, *Adv. Biochem.* **1983**, *55*, 197 – 289.

([52]) D. O' Hagan, H. S. Rzepa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 645 – 652.

([53]) H. Reinke, D. Rentsch, R. Miethchen, *Carbohydr. Res.*, **1996**, *281*, 293 – 299.

([54]) A. Konstantinidis, M. L. Sinnot, *J. Biochem.* **1991**, *279*, 587 – 593.

([55]) N. S. Banait, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7958 – 7963.

([56]) Y. Zhang, J. Bommuswamy, M. L. Sinnott, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7557 – 7563.

([57]) N. S. Banait, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7951 – 7958.

([58]) H. D. Ly, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, *68*, 487 – 522.

([59]) R. M. A. Knegtel, B. Strokoptov, D. Penninga, O. G. Faber, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L.Dijkhuizen, B. W. Dijkstra, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29256 – 29264.

([60]) R. Mosi, S. He, J. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, S. G. Withers, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9927 – 9934.

([61]) K. Igarashi, T. Honma, J. Irisawa, *Carbohydr. Res.* **1969**, *11*, 577 - 580.

([62]) E. J. Hehre, H. Matsui, C. F. Brewer, *Carbohydr. Res.* **1990**, *1*, 123 – 132.

([63]) M. N. Sharma, R. Eby, *Carbohydr. Res.* **1984**, *127*, 201 – 208.

([64]) K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Curr. Org. Chem.* **1999**, *3*, 287 – 307.

([65]) L. Kröger, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 9 – 23.

([66]) W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957 – 981.

([67]) R. R. Schmidt, J. Michel, M. Ross, *Liebigs* A*nn. Chem*. **1984**, *7*, 1343 - 1347.

([68]) R.R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21 – 123.

([69]) M. Goebel, H. G. Nothofer, I. Ugi, *Tetrahedron* **1997**, *9*, 3123 – 3134.

([70]) T.D. Perrine, C. P: J. Glaudemans, R. K. Ness, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 664 – 667.

([71]) A. Choudhury, R. W. Franck, R. B. Gupta, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4921 – 4924.

([72]) G. Boehm, H. Waldman, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, *4*, 613 – 619.

([73]) F. Labeguere, J-P. Lavergne, *Tetrahedron Lett*. **2002**, *40*, 7271 – 7272.

([74]) A. Dondoni, G. Mariotti, A. Marra, A. Massi, *Synthesis* **2001**, *14*, 2129 – 2137.

([75]) Y.S. Lee, E. S. Rho, Y. K. Min, B. T. Kim, *J. Carbohydr. Chem*. **2001**, *6*, 503 - 506.

([76]) M. Apparu, M. Blanc-Muesser, J. Defaye, H. Driguez, *Can. J. Chem*. **1981**, *2*, 314 – 320.

([77]) T. Yasukochi, C. Inaba, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6585 -6589.

([78]) S. Hanessian, B. Lou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4443 – 4463.

([79]) P. Spannenberger, C. André, M. Dion, C. Rabbiler, R. Mattes, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 65 – 73.

([80]) H. M. Flowers, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1981**, *39*, 279 – 345.

([81]) H. M. Flowers, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1984**, 42, 15 – 68.

([82]) S. Kochar, C. E. Hansen, M. A. Juillerat, *Nestle S.A.*, EP 1297753 A1, **2003**. Chem. Abstr. **2003**, *138*, *270653*.

([83]) J. B. Schuttle, J. de Jong, E. J. van Weerden, S. Tamenga, *Brit. J. Nutrition* **1992**, *1*, 195 - 207.

([84]) S. Osaki, T. Kimura, T. Sugimoto, S. Hizukuri, N. Iritani, *J. Nutrition* **2001**, *3*, 796 – 799.

([85]) Y. Nisikawa, G. Yoshikawa, H. Tanaka, A. Morimoto, K. Mukai, *Unitika Ltd.*, WO 0157230 A1, **2001**, Chem. Abstr. **2001**, *135*, 136725.

([86]) K.Naemura, R. Fukuda, N. Takahashi, M. Konishi, Y. Hirose, *Tetrahedron Asymm.* **1993**, *5*, 911 – 918.

([87]) J. C. Ryan, W. E. Seaman, *Immunol. Rev.* **1997**, *155*, 79 – 89.

([88]) K. Bezouska, G. Vlahas, O. Horvath, G. Jinochova, A. Fiserova, R. Giorda, W. H. Chambers, T. Feizi, M. Pospisil, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16945 – 16952.

([89]) U. Gambert, R. Gonzales Lio, E. Farkas, J. Thiem, V. Verez Bencomo, A. Lipták, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1285 – 1291.

([90]) O. Fridjonsson, R. Mattes, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4192 – 4198.

([91]) O. Fridjonsson, H Watzlawick, R. Mattes, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3385 – 3391.

([92]) O. Fridjonsson, H Watzlawick, R. Mattes, *Extremophiles* **2000**, *4*, 23 - 33.

([93]) L. Hedbys, E. Johannson, K. Mosbach, P.–O.Larsson, *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 217 – 223.

([94]) J. J. Distler, G.W. Jourdan, *J. Biol. Chem*. **1973**, *248*, 6772 – 6780.

([95]) M. G. Beak, R. Roy, K. Rittenhouse-Olson, *Chem. Comm.* **2001**, *3*, 257 – 258.

([96]) M. Ghosh, R. G. Dulina, R. Kakarla, M. J. Sofia, *J. Org. Chem*. **2000**, *24*, 8387 – 8390.

([97]) U. Schmidt, *Dissertation*, Hamburg, **1999**.

([98]) J. Kosary, E. Stefanovits-Banyai, L. Boross, *J. Biotechnol.* **1998**, *66*, 83 - 86.

([99]) S. Singh, M. Scigelova, G. Vic, D.H.G. Crout, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 1921 – 1926.

([100]) H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184 – 201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 155 – 173.

([101]) S. Singh, J. Packwood, C.J. Samuel, P. Critchley, D.H.G. Crout, *Carbohydr. Res*. **1995**, *279*, 293 – 305; S. Singh, J. Packwood, D.H.G. Crout, *Carbohydr. Res*. **1995**, *279*, 321 - 325.

([102]) T. Usui, S. Kubota, H. Ohi, *Carbohydr. Res*. **1993**, *244*, 315 – 323.

([103]) K. Sakai, R. Katsumi, H. Ohi, T. Usui, Y. Ishido, *J. Carbohydr. Chem*. **1992**, *11*, 553 – 565.

([104]) K.G.I. Nilsson, M. Scigelova, *Biotech Lett.* **1994**, *16*, 671 – 676.

([105]) Y.Ooi, T. Hashimoto, N. Mitsuo, T. Satoh, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2241 – 2244.

([106]) K. Itano, K. Yamasaki, C. Kihara, O. Tanaka, *Carbohydr. Res.* **1980**, *87*, 27 – 34.

([107]) R. Lopez, A. Fernándes-Mayoralas, M. Martin-Lomas, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 705 – 710.

([108]) M. Vogel, *Südzucker AG*, persönliche Mitteilung.

([109]) K. Bock, C. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 27-66.

([110]) K. Bock, C. Pedersen, H. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1984**, *42*, 193 - 225.

([111]) M. A. Nashed, C. W. Slife, M. Kiso, L. Anderson, *Carbohydr. Res*. **1980**, *82*, 237 – 252.

([112]) A. M. Hornemann, I. Lundt, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 1 – 8.

([113]) W. Hakamata, T. Nishio, T. Oku, *Carbohydr. Res*. **2000**, *324*, 107 – 115.

([114]) P.W. Kent, J. E. G. Barnett, *J. Chem. Soc.* **1964**, 6196 – 6204.

([115]) J. Jimenenz-Barbero, E. Junquera, M. Martin-Pastor, S. Sharma, C. Vincent, S. Penades *J. Am. Chem. Soc* **1995**, *117*, 11198 – 11204.

([116]) Y. V. Voznij, L. N. Koikov, A. A. Galoyan, *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, 339 – 341.

([117]) T. Horton, J. Turner, *J. Org. Chem*. **1965**, *30*, 3387 – 3393.

([118]) K.C. Nicolaou, E. P. Schreiner, W. Stahl, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 566 – 568; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 585 – 590.

([119]) Z. Smiatacz, M. Zygfryd, *Carbohydr. Res*. **1990**, *196*, 167 – 174.

([120]) F. H. Dasgupta, G. W. Hay, W. A. Szarek, *Carbohydr. Res.* **1983**, *114*, 153 – 157.

([121]) T. Horrobin, C. H. Tran, D. Crout, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *6*, 1069 – 1080.

([122]) R. Kuhn, H. Grassner, *Liebigs Ann. Chem*. **1957**, 55 – 67.

Mein Dankeschön geht an diejenigen, die dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit gelang, ergo:

☺ *Meinen Töchtern Lisa & Anna, die immer für eine schöne Ablenkung sorgten und zweifelsohne ein großer Teil dieser Arbeit sind.*

☺ *Meiner Frau Veronika, für ihre Geduld und ihr Verständnis, welches sie gerade auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit für mich aufbrachte.*

☺ *Meiner Mutter, auf deren Unterstützung ich mich stets verlassen konnte.*

☺ *Meinem Bruder Jan, für so manchen „Zug durch die Gemeinde".*

☺ *Meinem Freund dem „Ingenör" Axel Breuer, der als „Fachfremder" eine sehr konstruktive Durchsicht dieser Arbeit zustande gebracht hat.*

☺ *Kirsten Geisler, für die tolle Zusammenarbeit und ihren großen Einsatz.*

☺ *Meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen Daniel, Mampi und René, die mir nicht nur die Integration in den Ak Thiem sehr erleichtert haben, sondern auch immer für gute Laune sorgten.*

☺ *Nico und Lars, nicht nur für Anfertigung zahlloser MALDI-TOF Spektren, sondern auch für diverse Fachsimpeleien und so manche skurrile Unterhaltung.*

☺ *Dirk „Henk" Henkensmeier und Stefan Jürs (der Unsinkbare ☺), für die Durchsicht dieser Arbeit und so manche kurzweilige Unterhaltung.*

☺ *Ira Wallbaum für die große Hilfe und Unterstützung, sowie diverse Diskussionsrunden.*

☺ *Dem gesamten Ak Thiem für die freundliche Aufnahme, und gute Zusammenarbeit im Laufe dieser Arbeit.*

☺ *Dr. Manfred Vogel, Südzucker AG, der durch seine freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft die Kooperation im FEI/AIF-Projekt äußerst effektiv gemacht hat.*

☺ *Dr. Volker Sinnwell, nicht nur für die schnelle Anfertigung unzähliger NMR-Spektren, sondern auch seine Diskussionsfreude in Sachen NMR-Problematik, sowie PC-und Netzwerk Fachsimpeleien.*

Curriculum vitae

Sven Schröder

geboren am: 29. Juli 1970 in Itzehoe

verheiratet seit 30.10.1998, 2 Töchter (Lisa & Anna)

Schulbildung:

07/1977 – 06/1981	Grundschule Hochdonn
07/1981 – 06/1991	Meldorfer Gelehrtenschule, Abitur

Wehrdienst:

07/1991 – 07/1992	Heeresflugabwehrschule Rendsburg

Studium:

10/1992 – 06/1995	Grundstudium der Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Vordiplom
06/1995 – 06/1997	Hauptstudium der Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Diplom
08/1997 – 01/1999	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Lüning, Institut für Organische Chemie der Universität Kiel, Thema der Diplomarbeit: „Acylierung von mono-, di und polymeren 6-*O*-silylgeschützten β-D-Glucosederivaten durch basenkatalysierte Addition an Diphenylketen“
04/1999	Beginn der vorliegenden Promotion bei Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg

Tätigkeiten:

08/1997 – 02/1999	Institut für Organische Chemie der Universität Kiel, Praktikumsassistent für Agrarwissenschaftler/Ökotropholgen sowie für Mediziner/Zahnmediziner
04/1999 – 12/2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen eines vom FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie) geförderten Projektes