

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stereoselektive Synthesen	1
1.2	Biokatalytische Reaktionen mit isolierten Oxidoreduktasen	3
1.2.1	Cofaktorabhängigkeit von Oxidoreduktasen	7
1.2.2	Methoden der Cofaktorregenerierung	9
1.3	Ganzzellbiotransformationen	13
1.4	Betrachtung der Cofaktoren bei Biotransformationen mit ruhenden Zellen	15
1.5	Cofaktoranalytik	17
2	Zielsetzung	20
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Cofaktoranalytik	22
3.1.1	Quantifizierung intrazellulärer Cofaktoren	22
3.2	Cofaktorstabilität während der Probenaufarbeitung und der Messung	26
3.2.1	Zusammenfassung	28
3.3	Intrazelluläre Cofaktorstabilitäten im <i>Escherichia coli</i> -Wirtsstamm . . .	29
3.3.1	Zusammenfassung	32
3.4	Ganzzellbiotransformationen mit Substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung	33
3.4.1	Ganzzellbiotransformation mit dem ADH/ADH-System	33
3.4.2	Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation	33
3.4.3	Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten und Produkten	38
3.4.4	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren	41
3.4.5	Zusammenfassung	47
3.5	Ganzzellbiotransformationen mit Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung	49
3.5.1	Produktion und Aufreinigung der ER	49
3.5.2	Charakterisierung der ER	51
3.5.3	Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	52
3.5.4	Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid	54

3.5.5	Ermittlung der kinetischen Parameter für (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	54
3.5.6	Biokatalytische Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit isolierter ER im Satzreaktor	55
3.5.7	Zusammenfassung	58
3.6	Ganzzellbiotransformationen mit dem ER/ADH-System	59
3.6.1	Klonierung und Transformation des pCDF-Duet- <i>LbADH</i> - <i>OYE</i> -Vektors	59
3.6.2	Expressionsoptimierung ER/ADH-System	60
3.6.3	Ganzzellbiotransformation im Satzverfahren	63
3.6.4	Kontinuierliche Ganzzellbiotransformation	66
3.6.5	Zusammenfassung	70
4	Zusammenfassung	72
5	Ausblick	75
6	Materialien und Methoden	77
6.1	Chemikalien	77
6.2	Verwendete Geräte	77
6.3	Verwendete Materialien	80
6.4	Biologische Materialien	81
6.4.1	Verwendete Plasmide	81
6.4.2	Verwendete Stämme	81
6.4.3	Klonierung des pCDF-Duet- <i>OYE</i> - <i>LbADH</i> -Plasmids	82
6.4.3.1	Klonierung des <i>lbadh</i> -Gens und des <i>oye</i> -Gens	82
6.4.3.2	Präperative Agarosegele	88
6.5	Expressionsoptimierung für das ER/ADH-System	88
6.6	Herstellung der Ganzzellbiokatalysatoren	91
6.7	Ganzzellbiotransformationen	93
6.7.1	Ermittlung der Cofaktorstabilität ohne den Einfluss von Substraten	93
6.7.2	Ganzzellbiotransformationen mit dem ADH/ADH-System	94
6.7.2.1	Kontinuierliche Reaktionsführung	94
6.7.2.2	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren	95
6.7.3	Ganzzellbiotransformation mit dem ER/ADH-System	95
6.7.3.1	Kontinuierliche Reaktionsführung	96
6.7.3.2	Ganzzellbiotransformationen im Satzverfahren	96
6.8	Produktion und Aufreinigung der ER	97
6.8.1	Expressionsoptimierung der ER	97
6.8.2	Produktion der ER im 5 L Maßstab	98
6.8.3	Isolierung und Aufreinigung der ER	98
6.8.4	Charakterisierung der ER	99

6.8.5	Bestimmung der kinetischen Parameter der ER bezüglich (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	99
6.9	Synthese von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat	100
6.10	Reduktion von (Z)-Ethyl-2-methyl-3-nitroacrylat mit Natriumborhydrid	102
6.11	Biokatalyse mit isolierter ER	103
6.12	Analytik	103
6.12.1	Biomassenspezifische Analytik	103
6.12.1.1	Bestimmung der optischen Dichte	103
6.12.1.2	Bestimmung der Biotrockenmasse	104
6.12.1.3	Bestimmung des Zellvolumens	104
6.12.1.4	Visualisierung der Zellintegrität	105
6.12.2	Proteinanalytik	105
6.12.2.1	SDS-PAGE	105
6.12.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	106
6.12.2.3	Aktivitätstest für die ER	106
6.12.2.4	Ermittlung der Cofaktorabhängigkeit der ER	107
6.12.2.5	Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ADH/ADH-System	107
6.12.2.6	Aktivitätstest für den Ganzzellbiokatalysator des ER/ADH-System	108
6.12.3	Gaschromatographie	108
6.12.4	Enantiomerenanalytik	109
6.12.5	Kernresonanzspektroskopie	111
6.12.6	Cofaktoranalytik	111
6.12.6.1	Herstellung der ¹³ C-markierten Cofaktorstandards	111
6.12.6.2	Pobenaufarbeitung	114
6.12.6.3	Messung der intrazellulären Cofaktorkonzentrationen	115
6.12.6.4	Bestimmung der Stabilität der Cofaktoren während der Probenaufarbeitung	118
	Literaturverzeichnis	119
7	Anhang	133
7.1	Sequenzen der verwendeten Gene	133
7.1.1	Sequenz des <i>adh</i> -Gens	133
7.1.2	Sequenz des <i>oye</i> -Gens	134
7.2	NMR-Spektren der Nitro-Verbindungen	135
7.3	Chromatogramme Enantiomerenanalytik	138