

Einfluss unkonventioneller Medien auf die Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Tina Gerhards

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Einfluss unkonventioneller Medien auf die Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Tina Gerhards

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 54

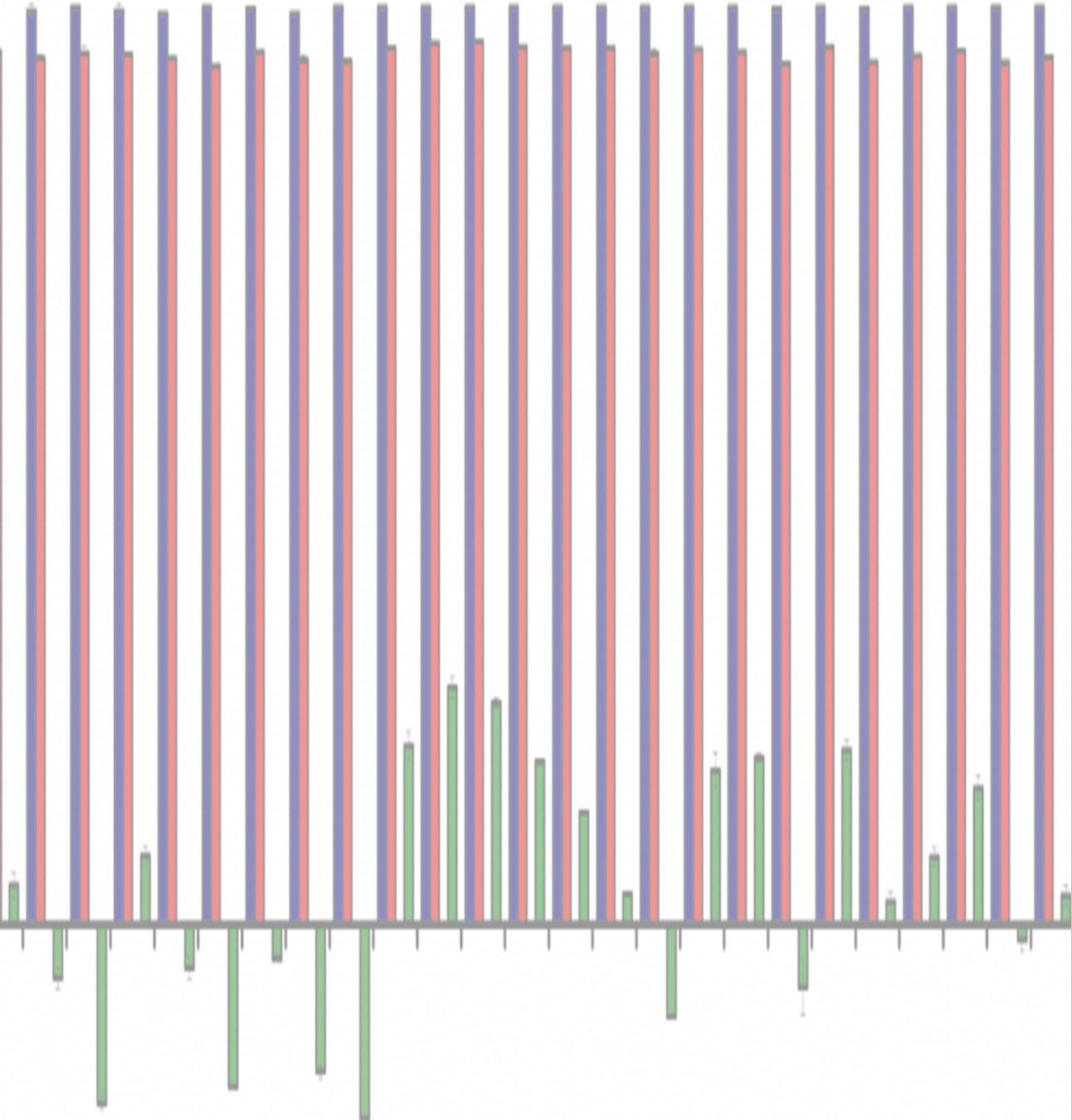
ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-89336-846-4

1.4	Enzyme.....	43
1.5	Computerprogramme.....	44
2	Methoden	44
2.1	Chemische Methoden.....	44
2.1.1	Destillation des Benzaldehyd	44
2.1.2	Löslichkeit von Benzaldehyd in wässrigem Puffer.....	44
2.1.3	Löslichkeit organischer Lösungsmittel in wässrigem Puffer	45
2.1.4	Dichtebestimmung der organischen Lösungsmittel/ Wasser-Gemische	45
2.1.5	Beständigkeitsstudien von Kunststoffen gegenüber Additiven	45
2.1.6	Herstellung gesättigter Lösungen mit organischen Lösungsmitteln ...	47
2.1.7	Trocknung von Lösungsmitteln und Syntheseprodukten.....	47
2.1.8	Abtrennen von Lösungsmitteln mittels Rotationsverdampfer	47
2.1.9	Karl-Fischer-Titration.....	47
2.1.10	Schnelltest zur Bestimmung der Carboligaseaktivität (TTC-Test).....	48
2.1.11	Synthese von Referenzprodukten	49
2.1.11.1	Reinigung von (<i>R</i>)-PAC aus einer Hefefermentation	49
2.1.11.2	Synthese von racemischem HPP	50
2.1.11.3	Zugang zu Acetoin und Benzoin	50
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.2.1	Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen.....	50
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976).....	50
2.2.3	Reinigung von rekombinanten Proteine	51
2.2.3.1	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC, Porath <i>et al.</i> 1975; Sulkowski 1985).....	51
2.2.3.2	Entsalzung des Eluats nach IMAC.....	52
2.2.4	Gefriertrocknung und Lagerung von gereinigten Proteinen.....	52
2.2.5	Enzymatische Synthese von (<i>S</i>)-HPP durch <i>PpBFDwt</i>	53
2.2.6	Enzymatische Synthese von (<i>S</i>)-PAC durch <i>ApPDCE469G</i>	54
2.2.7	Carboligaseaktivitäts-Screening.....	54
2.2.7.1	Einfluss organischer Lösungsmittel auf den TTC-Schnelltest.....	54
2.2.7.2	Einfluss achiraler ionischer Flüssigkeiten auf den TTC-Schnelltest.. ..	56
2.2.7.3	TTC-Schnelltest der Carboligation mit organischen Lösungsmitteln.	57
2.2.7.4	TTC-Schnelltest der Carboligation mit ionischen Flüssigkeiten ...	58
2.2.7.5	Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Carboligation	59
2.2.7.6	Substratkonzentrations-Abhängigkeit der Carboligation	59
2.2.7.7	Carboligation in Gegenwart organischer Lösungsmitteln.....	60

2.2.7.8	Carboligation in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	61
2.2.7.9	Carboligation in Gegenwart sonstiger Additive	62
2.3	Chromatographische Methoden.....	62
2.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	62
2.3.1.1	Analytische Dünnschichtchromatographie.....	62
2.3.1.2	Präparative Dünnschichtchromatographie.....	63
2.3.2	Säulenchromatographie	63
2.3.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatographie</i> , HPLC).....	64
2.3.3.1	Achirale HPLC	64
2.3.3.2	Chirale HPLC.....	66
2.3.4	Gas Chromatographie (GC).....	67
2.3.4.1	Chirale GC.....	67
2.3.4.2	Achirale GC-MS.....	69
2.4	Sonstige Methoden.....	69
2.4.1	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i> , NMR)..	69
2.4.2	Modellierungen der Carboligation in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln	69
IV.	Ergebnisse und Diskussion	70
1	Festlegung der Rahmenbedingungen zur Untersuchung der Einflüsse von Additiven auf die Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme	70
1.1	Löslichkeit der Additive in wässrigem Puffer.....	70
1.1.1	Löslichkeit organischer Lösungsmittel.....	70
1.1.2	Löslichkeit ionischer Flüssigkeiten	71
1.2	Rahmenbedingungen der enzymatischen Anwendung.....	71
1.2.1	pH-Optimum ThDP-abhängiger Carboligation.....	71
1.2.2	Optimale Substratkonzentration ThDP-abhängiger Carboligation.....	73
1.2.3	Temperaturabhängigkeit der Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme	75
2	Charakterisierung der Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme.....	78
2.1	Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme in Gegenwart organischer Lösungsmittel.....	79
2.2	Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	96
3	Einfluss von Additiven auf die Chemo-selektivität ThDP-abhängiger Enzyme	113
3.1	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Chemo-selektivität ThDP- abhängiger Enzyme	113
3.1.1	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Enzymflexibilität.....	117

3.1.2	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Löslichkeit von Substraten, Intermediaten und Produkten	119
3.1.3	Direkte Interaktion der organischen Lösungsmittel mit dem aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme	121
3.2	Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	121
3.2.1	Einfluss kleiner achiraler sowie chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	124
4	Einfluss von Additiven auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	126
4.1	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	127
4.1.1	Einfluss der Größe und des logPs organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der <i>Ap</i> PDCE469G	133
4.1.2	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der <i>Pp</i> BFD	137
4.1.3	Zeitlicher Verlauf der Carboligation ausgewählter Reaktionen	138
4.2	Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	141
4.2.1	Einfluss kleiner achiraler sowie chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	145
4.2.2	Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der <i>Ap</i> PDCE469G	147
4.2.2.1	Einfluss der Ammoeng-ILs auf die PAC-Produktion durch <i>Ap</i> PDCE469G	148
4.2.2.2	Beeinflussung der Stereoselektivität der <i>Ap</i> PDCE469G je nach Ionenpaarbindungsstärke	153
4.2.2.3	Veränderung des Mediums durch die Kationen der Ammoeng-ILs ..	157
5	Simulation der Interaktion ausgewählter Additive mit dem aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme	159
5.1	Interaktion organischer Lösungsmittel mit der S-Tasche der <i>Ap</i> PDCE469G	160
6	Zusammenfassende Diskussion	165
V.	Zusammenfassung	168
VI.	Abstract	171
VII.	Anhang	173
VIII.	Literaturverzeichnis	186



Schlüsseltechnologien / Key Technologies
Band / Volume 54
ISBN 978-3-89336-846-4

