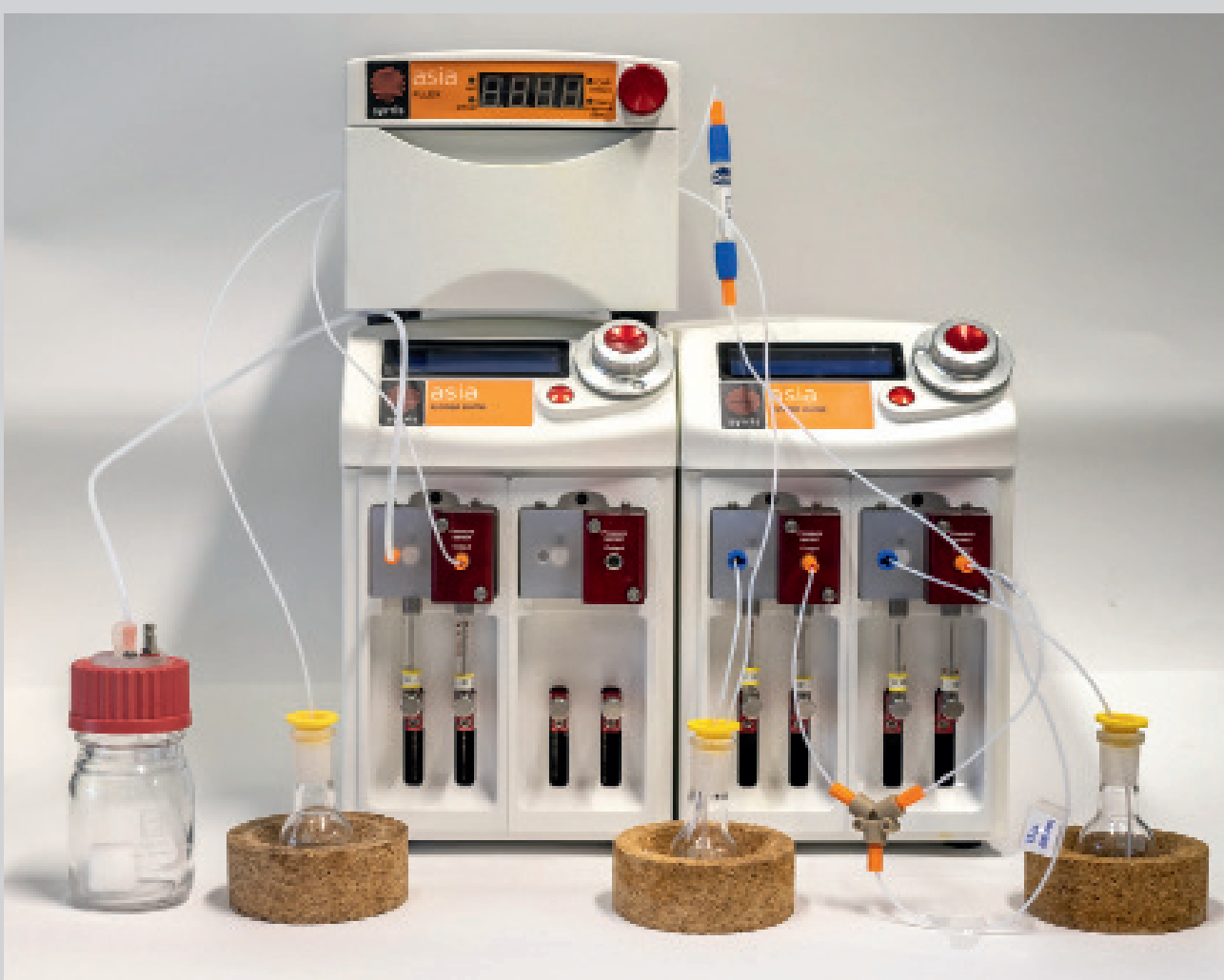


Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese

Benedikt Baumer



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Immobilisierte Enzyme und Kofaktor- Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese

Benedikt Baumer

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 48

ISBN 978-3-95806-783-7

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Abstract	XV
Kurzzusammenfassung	XVII
1 Einleitung.....	19
1.1 Motivation.....	19
1.2 Zielsetzung.....	21
2 Theoretische Grundlagen	22
2.1 Flusssynthese.....	22
2.1.1 Grundlagen der Flusschemie.....	22
2.1.2 Beispiele der Flusschemie in der organischen Synthese	27
2.2 Immobilisierung von Enzymen.....	31
2.2.1 Immobilisierungsstrategien	31
2.2.2 HaloTag™-System.....	38
2.2.2.1 DhaA und Mutante - Mechanismen im Vergleich.....	38
2.2.2.2 HaloTag™-Ligand	40
2.3 Enzyme	42
2.3.1 Alkoholdehydrogenasen.....	42
2.3.1.1 Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i> (LbADH)	43
2.3.1.2 Alkoholdehydrogenase aus <i>Ralstonia species</i> (RADH).....	47
2.3.2 Phosphitdehydrogenase (PhosDH).....	50
2.3.3 <i>Candida antarctica</i> Lipase B (CalB).....	53
2.4 Kofaktor-Regenerierung in der Durchflusssynthese.....	60
2.4.1 Kofaktor-Regenerierung im einfachen Durchfluss	60
2.4.2 Kofaktor-Regenerierung mit immobilisiertem o. gefangenem Kofaktor	66
2.4.3 Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf	68
3 Eigene Ergebnisse	71
3.1 Kofaktor-Regenerierung in der Flusssynthese	71
3.1.1 Einleitung.....	71
3.1.2 Einfacher Durchfluss.....	71
3.1.2.1 Aufbau des Systems	72
3.1.2.2 Einsatz des einfachen Durchflusssystemes	73
3.1.3 Geschlossenes System.....	80
3.1.3.1 Aufbau des Systems „geschlossener Kreislauf“	81
3.1.3.2 Anwendung des geschlossenen Systems.....	83
3.1.4 Konsekutivreaktion mit der Lipase CalB (Novozym 435).....	101
3.1.4.1 Vinylacetat Konzentrationscreening.....	102
3.1.4.2 Geschlossenes System mit konsekutiver Acetylierung.....	105
3.1.5 Modellsystem HaloTag™-LbADH und PhosDH.....	109
3.1.6 Morita-Baylis-Hillmann und das geschlossene System	113
3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick	115
3.2 Catalytically active inclusion bodies (CatIBs).....	120
3.2.1 Einleitung.....	120

3.2.2	Kenntnisstand	120
3.2.3	Zielsetzung.....	122
3.2.4	Immobilisierung.....	123
3.2.5	RADH-CatIBs im einfachen Durchfluss	126
3.2.6	RADH-CatIBs und HaloTag™-LbADH im kombinierten System.....	128
3.2.7	Batch-Synthese.....	133
3.2.8	Einfacher Durchfluss	135
3.2.9	RADH-CatIB im geschlossenen System	137
3.2.10	Zusammenfassung und Ausblick	139
3.3	Old Yellow Enzymes und YqjM	143
3.3.1	Einleitung	143
3.3.2	YqjM in der Durchflusssynthese	146
3.3.3	Zusammenfassung und Ausblick	151
3.4	Technische Zusammenfassung	157
3.4.1	Realer Flussaufbau.....	157
3.4.2	Hergestellte (Enzym-)Reaktoren.....	158
3.4.3	System- und Fehleranalyse.....	160
4	Experimenteller Teil	162
4.1	Allgemeine Angaben.....	162
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	162
4.1.2	Kleinteile der Durchflussschemie.....	162
4.2	Analytik, Geräte und Software	162
4.2.1	Durchflussschemie.....	162
4.2.2	Präparative Säulen-/Flashchromatographie.....	163
4.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	163
4.2.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	163
4.2.5	Infrarotspektroskopie (IR).....	164
4.2.6	Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)	164
4.2.7	Gaschromatographie (GC).....	164
4.2.8	Bestimmung des spezifischen Drehwertes $[\alpha]$	164
4.3	Methoden	165
AAV 1:	Allgemeine Vorschrift zum Enzymaufschluss.....	165
AAV 2:	Aktivitätsassay HaloTag™-LbADH.....	165
AAV 3:	Allgemeine Vorschrift für die Immobilisierung mit HaloTag™.....	165
AAV 4:	Allgemeine Synthese der racemischen Standards.....	166
AAV 5:	Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss	167
AAV 6:	Allgemeine Vorschrift für das Screening und die Synthese im geschlossenen Kreislauf.....	168
AAV 7:	Vorschrift für Substratwechsel im geschlossenen Kreislauf.....	170
AAV 8:	Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss mit der Lipase CalB (Novozym 435).....	171
AAV 9:	Geschlossener Kreislauf mit Lipase CalB (Novozym 435).....	172
AAV 10:	Vorschrift für Screening im einfachen Durchfluss (RADH-CatIBs).....	173
AAV 11:	Allgemeine Vorschrift für Screening und Synthese im geschlossenen Kreislauf (RADH-CatIBs)	174
AAV 12:	Allgemeine Vorschrift für das Packen/Befüllen einer CatIB-Säule.....	175
AAV 13:	Allgemeine Vorschrift für CatIBs und HaloTag™-LbADH (kombiniertes System) im geschlossenen Kreislauf.....	175

4.4	Synthesen und Analytik	177
4.4.1	<i>rac</i> -3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-ol (<i>rac</i> -85).....	177
4.4.2	<i>rac</i> -7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (<i>rac</i> -84).....	177
4.4.3	<i>rac</i> -4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (<i>rac</i> -82).....	178
4.4.4	<i>rac</i> -2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (<i>rac</i> -97).....	178
4.4.5	3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25a).....	179
4.4.6	7-Oxonon-8-ensäureethylester (83).....	180
4.4.7	(<i>R</i>)-Phenylethan-1-ol (17).....	181
4.4.8	(<i>R</i>)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	182
4.4.9	(<i>S</i>)-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (84).....	183
4.4.10	(<i>S</i>)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (82).....	184
4.4.11	(<i>R</i>)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (93).....	185
4.4.12	HaloTag™-YqjM - Testversuche.....	188
5	Anhänge	190
5.1	NMR-Spektren.....	190
5.1.1	3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25b).....	190
5.1.2	7-Oxonon-8-ensäureethylester (83).....	191
5.1.3	(<i>R</i>)-Phenylethan-1-ol (17).....	192
5.1.4	(<i>R</i>)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	193
5.1.5	(<i>S</i>)-7-Hydroxonon-8-ensäureethylester (84).....	194
5.1.6	(<i>S</i>)-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester (82).....	195
5.1.7	(<i>R</i>)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97).....	196
5.2	GC-/HPLC-Chromatogramme.....	197
5.2.1	(<i>R</i>)-Phenylethan-1-ol (17).....	197
5.2.2	(<i>R</i>)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	198
5.2.3	(<i>S</i>)-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (84).....	199
5.2.4	(<i>S</i>)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (82).....	200
5.2.5	(<i>R</i>)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97).....	201
5.2.6	Cyclohexanon (98).....	202
5.2.7	Cyclohexanol (99).....	202
6	Literatur	203
7	Danksagung.....	227
8	Erklärung	231

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Wissenschaft und Natur müssen Hand in Hand arbeiten, um eine grünere und effizientere Zukunft zu gestalten. Insbesondere in der Chemie und Biotechnologie erweist sich der Einsatz der Durchflusschemie unter Verwendung von Biokatalysatoren als eine der vielversprechendsten Technologien. Dabei sind eine hohe Effizienz, milde Reaktionsbedingungen, sicherere Handhabung und Prozessautomatisierung nur ein kleiner Auszug der vielfältigen Vorteile. Dennoch gibt es einige Hürden zu bewältigen – Enzyme müssen immobilisiert werden und benötigen teure Kofaktoren, die aus ökologischer und ökonomischer Sicht zu regenerieren sind. Während dies im Batchverfahren bereits auf viele Arten lösbar ist, stellt es im Durchflussverfahren immer noch eine Herausforderung dar.

Dieses Buch bietet einen tiefgehenden Einblick in dieses Thema und zeigt anhand der Entwicklung von Beispielsystemen und verschiedener Methoden mögliche Lösungsstrategien auf.

Band 48
ISBN 978-3-95806-783-7