

Einfluss unkonventioneller Medien auf die Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tina Gerhards

aus Viersen

Jülich, September 2012

aus dem Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie)
des Forschungszentrums Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Frau Prof. Dr. Martina Pohl
Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2012

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist.

Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Tina Gerhards

PUBLIKATIONEN

Publikationen in Fachjournalen

Rother, D.; Kolter, G.; Gerhards, T. Berthold, C. L.; Gauchenova, E.; Knoll, M.; Pleiss, J.; Müller, M.; Schneider, G.; Pohl, M. (2011). „S-selective mixed carboligation by structure-based design of the pyruvate decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*.“ ChemCatChem 3 (10) 1587-1596.

Gerhards, T.; Mackfeld, U.; Bocola, M.; von Lieres, E.; Wiechert, W.; Pohl, M.; Rother, D. (2012). „Influence of organic solvents on enzymatic asymmetric carboligations.“ Adv Synth Catal, 354, 2805-2820

Gerhards, T.; Mackfeld, U.; Bocola, M.; von Lieres, E.; Paul, C.E.; Lavandera, I.; Pohl, M.; Rother, D. (2013). „Influence of ionic liquids on enzymatic asymmetric carboligations.“ in Bearbeitung

Posterpräsentationen

Gerhards, T.; Klein, A. S.; von Lieres, E.; Wiechert, W.; Pohl, M.; Gocke, D. (2010). „Influence of non-conventional media on the bimolecular carboligase reaction catalyzed by ThDP-dependent enzymes.“
28. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, 21.09.10 – 23.09.10, Aachen

Gerhards, T.; Klein, A. S.; von Lieres, E.; Wiechert, W.; Pohl, M.; Gocke, D. (2010). „Influence of non-conventional media on the bimolecular carboligase reaction catalyzed by ThDP-dependent enzymes.“
Biocat 2010, 29.08.10 – 02.09.10, Hamburg

Gerhards, T.; Mackfeld, U.; von Lieres, E.; Wiechert, W.; Pohl, M.; Rother, D. (2011). „Does the addition of water-miscible organic solvents change the selectivity of ThDP-dependent enzymes?“
Frontiers in white biotechnology; 21.06.11 – 22.06.11, Delft, Niederlande

Gerhards, T.; Mackfeld, U.; von Lieres, E.; Wiechert, W.; Pohl, M.; Rother, D. (2011). „Influencing the stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes by addition of water-miscible organic solvents.“
Biotrans 2011, 02.10.11 – 07.10.11, Giardini Naxos (Messina) Sizilien, Italien

Vorträge

Gerhards, T.; Bocola, M.; von Lieres, E.; Pohl, M.; Rother, D. (2012). „Influence of water-miscible organic solvents on enzymatic asymmetric carboligations“
Biocat 2012, 02.09.12 – 06.09.12, Hamburg

INHALTSVERZEICHNIS

Selbstständigkeitserklärung	III
Publikationen.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungen.....	XIV
I. Einleitung.....	15
1 Biokatalyse	15
2 ThDP-abhängige Enzyme	16
2.1 Der Kofaktor Thiamindiphosphat	17
2.2 Reaktionsmechanismus ThDP-abhängiger Lyasen	19
2.3 Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	20
2.4 Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	22
2.5 Spezielle ThDP-abhängige Enzyme	24
2.5.1 Pyruvatdecarboxylase aus <i>Acetobacter pasteurianus</i>	24
2.5.1.1 Die Variante <i>ApPDCE469G</i>	25
2.5.2 Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>	25
2.5.2.1 Die Variante <i>PpBFDH281A</i>	26
2.5.3 Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	26
2.5.4 Verzweigt-kettige 2-Ketosäuredecarboxylase aus <i>Lactococcus lactis</i>	27
3 Unkonventionelle Medien	27
3.1 Organische Lösungsmittel	29
3.1.1 Wasseraktivität organischer Lösungsmittel	29
3.1.2 Polarität organischer Lösungsmittel	30
3.1.3 Organische Lösungsmittel in der Biokatalyse.....	31
3.1.3.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf ThDP-abhängige Enzyme ..	33
3.2 Ionische Flüssigkeiten	35
3.2.1 Ionische Flüssigkeiten in der Biokatalyse.....	37
3.2.1.1 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf ThDP-abhängige Enzyme	39
II. Motivation und Zielsetzung	40
III. Material und Methoden.....	41
1 Material.....	41
1.1 Chemikalien	41
1.2 Geräte.....	42
1.3 Puffer	43

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 Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme	113
3.1	Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Chemoselektivität 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

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Struktur des Kofaktors Thiamindiphosphat (ThDP).	18
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Lyasereaktion (Decarboxylierung, Benzoinspaltung) und Carboligation	20
Abbildung 3: Mögliche Produkte der bimolekularen Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd.	21
Abbildung 4: Festlegung der Chemoselektivität der gemischten Carboligationsprodukte ThDP-abhängiger Enzyme	22
Abbildung 5: Vergleich der aktiven Zentren von <i>PfBAL</i> (A) und <i>PpBFD</i> (B).	23
Abbildung 6: In dieser Arbeit verwendete organische Lösungsmittel.	31
Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendete ionische Flüssigkeiten.	37
Abbildung 8: Reaktionsschema des TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)-Tests	48
Abbildung 9: Wellenlängenscan der Produkte, welche auf der achiralen HPLC nachgewiesen werden sollten	65
Abbildung 10: Kalibrierungen der achiralen HPLC mit den Substanzen Benzaldehyd (A), Benzoin (B), HPP (C) und PAC (D)	66
Abbildung 11: Kalibrierungen der chiralen GC mit Acetoin	68
Abbildung 12: <i>ApPDCE469G</i> : pH-Optimum mittels instrumenteller Analytik.	72
Abbildung 13: <i>L/KdcA</i> : Optimale Substratkonzentrationen mittels TTC-Test (A) und instrumenteller Analytik (B)	73
Abbildung 14: <i>ApPDCE469G</i> : Optimale Substratkonzentration mittels TTC-Test (A) und instrumenteller Analytik (B)	74
Abbildung 15: Chemoselektivität der <i>L/KdcA</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	80
Abbildung 16: Stereoselektivität der <i>L/KdcA</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	82
Abbildung 17: Chemoselektivität der <i>PpBFD</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	83
Abbildung 18: Stereoselektivität der <i>PpBFD</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	84
Abbildung 19: Chemoselektivität der <i>PpBFDH281A</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	86
Abbildung 20: Stereoselektivität der <i>PpBFDH281A</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	87
Abbildung 21: Chemoselektivität der <i>ApPDC</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	89
Abbildung 22: Stereoselektivität der <i>ApPDC</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	90
Abbildung 23: Chemoselektivität der <i>ApPDCE469G</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	91
Abbildung 24: Stereoselektivität der <i>ApPDCE469G</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	92
Abbildung 25: Chemoselektivität der <i>PfBAL</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	94
Abbildung 26: Stereoselektivität der <i>PfBAL</i> in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	95
Abbildung 27: Chemoselektivität der <i>L/KdcA</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	97

Abbildung 28: Stereoselektivität der <i>L/KdcA</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	98
Abbildung 29: Chemoselektivität der <i>PpBFD</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten.	100
Abbildung 30: Stereoselektivität der <i>PpBFD</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	101
Abbildung 31: Chemoselektivität der <i>PpBFDH281A</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	102
Abbildung 32: Stereoselektivität der <i>PpBFDH281A</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	103
Abbildung 33: Chemoselektivität der <i>ApPDC</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	105
Abbildung 34: Stereoselektivität der <i>ApPDC</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	106
Abbildung 35: Chemoselektivität der <i>ApPDCE469G</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	108
Abbildung 36: Stereoselektivität der <i>ApPDCE469G</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	109
Abbildung 37: Chemoselektivität der <i>PfBAL</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	111
Abbildung 38: Stereoselektivität der <i>PfBAL</i> unter Einfluss ionischer Flüssigkeiten	112
Abbildung 39: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch organische Lösungsmittel und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne Lösungsmittelzugabe.	114
Abbildung 40: Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd durch die <i>PfBAL</i> zu (<i>R</i>)-HPP	120
Abbildung 41: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch ionische Flüssigkeiten (ILs) und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne IL-Zugabe	122
Abbildung 42: Struktur der verwendeten kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten	124
Abbildung 43: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch kleine und chirale ionische Flüssigkeiten (kCILs) und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne Zugabe von kCILs	125
Abbildung 44: Zusammenhang zwischen dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse)	127
Abbildung 45: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der <i>L/KdcA</i>	131
Abbildung 46: Zusammenhang zwischen dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Enantiomerenüberschuss (ee) repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-oLM})}$ (kcal/mol) und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse)	132
Abbildung 47: Einfluss der verschiedenen organischen Lösungsmittel (Konzentration in Klammern, Tabelle 13) auf die Stereoselektivität der PAC-Bildung durch <i>ApPDCE469G</i>	135
Abbildung 48: Einfluss der verschiedenen organischen Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der HPP-Bildung durch <i>PpBFD</i>	138
Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der Acetoin synthese durch <i>L/KdcA</i>	139
Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der PAC-Synthese durch <i>ApPDCE469G</i>	140

Abbildung 51: Zusammenhang zwischen dem Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse).....	142
Abbildung 52: Zusammenhang zwischen dem Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (ee), repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-IL})}$ (kcal/mol) und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse)	144
Abbildung 53: Zusammenhang zwischen dem Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse).....	146
Abbildung 54: Zusammenhang zwischen dem Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten (kclLs) auf den Enantiomerenüberschuss (ee), repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-kclL})}$ (kcal/mol) und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse).....	147
Abbildung 55: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten	148
Abbildung 56: Struktur der verwendeten ammoniumbasierten ionischen Flüssigkeiten (Ammonium-ILs).....	150
Abbildung 57: Struktur der verwendeten Natriumsalze.	151
Abbildung 58: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Natriumsalze	152
Abbildung 59: Struktur der verwendeten ionischen Flüssigkeiten und Natriumsalze mit einem Sulfatanion oder dessen Derivaten.....	154
Abbildung 60: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten und Natriumsalze mit Sulfatanion oder Sulfatanion-Derivaten.....	154
Abbildung 61: Struktur der verwendeten ionischen Flüssigkeiten und Salze mit Chloridanion.....	155
Abbildung 62: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten und Natriumsalze mit Chloridanion.....	156
Abbildung 63: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart von PEG 1000 (ApPDCE469G_PEG) sowie von PEG 1000 und Natriumethylsulfat (ApPDCE469G_Na-E_PEG)	158
Abbildung 64: Korrelation zwischen den simulierten und experimentell gewonnenen Energiewerten für die ApPDCE469G-katalysierte PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel.....	164
Abbildung 65: pH-Abhängigkeit der Carboligation der ApPDC.....	173
Abbildung 66: pH-Abhängigkeit der Carboligation der PpBFDH281A	173
Abbildung 67: pH-Abhängigkeit der Carboligation der PpBFD.....	173
Abbildung 68: pH-Abhängigkeit der Carboligation der L/KdcA	174
Abbildung 69: Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Carboligation der L/KdcA mittels TTC-Test.....	174
Abbildung 70: Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Carboligation der ApPDCE469G mittels TTC-Test.....	174
Abbildung 71: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Carboligation der L/KdcA mittels TTC-Test.....	175
Abbildung 72: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Carboligation der ApPDCE469G mittels TTC-Test.....	175
Abbildung 73: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der L/KdcA in Gegenwart organischer Lösungsmittel.....	176
Abbildung 74: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der PpBFD in Gegenwart organischer Lösungsmittel.....	176

Abbildung 75: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Pp</i> BFDH281A durch Anwesenheit organischer Lösungsmittel.....	177
Abbildung 76: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Ap</i> PDC in Gegenwart organischer Lösungsmittel	177
Abbildung 77: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Ap</i> PDCE469G in Gegenwart organischer Lösungsmittel.	178
Abbildung 78: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Pf</i> BAL in Gegenwart organischer Lösungsmittel	178
Abbildung 79: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>L/KdcA</i> in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	179
Abbildung 80: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Pp</i> BFD in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	179
Abbildung 81: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Pp</i> BFDH281A in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	180
Abbildung 82: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Ap</i> PDC in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten.....	180
Abbildung 83: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Ap</i> PDCE469G in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten.....	181
Abbildung 84: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der <i>Pf</i> BAL in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten.....	181
Abbildung 85: Zusammenhang zwischen dem Enantiomerenüberschuss (<i>ee</i>) und $\Delta G_{(R/S)}$	182
Abbildung 86: Headspace-GC-MS Messung der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3)	184
Abbildung 87: FIA-FTICR-MS-Messung der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3).....	185

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme.....	16
Tabelle 2: Chemikalien.....	41
Tabelle 3: Geräteliste	42
Tabelle 4: Verwendete Enzyme.....	43
Tabelle 5: Beständigkeit von Mikrotiterplatten aus Polypropylen (PPL) und Polystyrol (PS) gegenüber organischen Lösungsmitteln	46
Tabelle 6: Einfluss organischer Lösungsmittel auf den TTC-Test	55
Tabelle 7: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den TTC-Test.....	57
Tabelle 8: Löslichkeit der verwendeten organischen Lösungsmittel in Kpi- und TEA-Puffer im Vergleich zu deren Löslichkeit in Wasser	70
Tabelle 9: Verwendeter pH-Wert für die Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd durch ThDP-abhängige Enzyme	72
Tabelle 10: Optimale Substratkonzentrationen für die Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd ThDP-abhängiger Enzyme	74
Tabelle 11: Temperaturabhängigkeit der Carboligation verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme	76
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen der eingesetzten ThDP-abhängigen Enzyme in der gemischten Carboligation.....	78
Tabelle 13: Überblick über die Substrate und Produkte der bimolekularen Carboligation (hell grau) und alle eingesetzten organischen Lösungsmittel, sortiert nach ihrem Ausschlussvolumen (berechnet durch ChemDraw Add-In für Excel) ...	134
Tabelle 14: <i>Ap</i> PDE469G-katalysierte PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Ammoeng 102 (IL-3)-Konzentrationen.....	149
Tabelle 15: Größe der Ammoeng-IL-Anionen sortiert nach ihrem Ausschlussvolumen im Vergleich zu Benzaldehyd.....	151
Tabelle 16: Enthalpie eines Benzaldehydmoleküls in der pro- <i>S</i> - und pro- <i>R</i> -Konfiguration in <i>Ap</i> PDC und <i>Ap</i> PDCE469G	160
Tabelle 17: Enthalpie von Benzaldehyd und ausgewählten organischen Lösungsmitteln außerhalb des Enzyms und in der <i>S</i> -Tasche der <i>Ap</i> PDCE469G ...	161
Tabelle 18: Verwendete organische Lösungsmittel und deren Konzentrationen in vol% und mol/L.....	182
Tabelle 19: Verwendete Ammoeng-ILs und Natriumsalze sowie deren Konzentration in % (w/v) und mol/L.....	183

ABKÜRZUNGEN

2-MBA	2-Methoxybenzaldehyd	MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
A	Alanin	MTHF	2-Methyltetrahydrofuran
AA	Acetaldehyd	n.b.	nicht bestimmt
Ammoeng-ILs	Ammonium-basierte ionische Flüssigkeiten	oLM	organisches Lösungsmittel
<i>Ap</i> PDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Acetobacter pasteurianus</i>	P	Puffer
ATP	Adenosintriphosphat	PAC	1-hydroxy-1-phenyl-propan-2-one, Phenylacetylcarbinol
a_w	Wasseraktivität	PEG	Polyethylenglycol
BA	Benzaldehyd	<i>Pf</i> BAL	Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	PLE	Esterase aus der Schweineleber
BZ	Benzoin	PMMA	Polymethylmethacrylat
DCM	Dichlormethan	PPL	Polypropylen
DIPE	Diisopropylether	PP	Pyrophosphatbindende (Domäne)
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>Pp</i> BFD	Benzoylformiatdecarboxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PS	Polystyrol
E	Glutaminsäure	PYR	Pyrimidinbindende (Domäne)
Ecoeng-ILs	Ecoeng-basierte ionische Flüssigkeiten	R_f	Retentionsfaktor
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss	RNA	Ribonukleinsäure
EtOAc	Ethylacetat	<i>Rp</i> BAL	Benzaldehydlyase aus <i>Rhodopseudomonas palustris</i>
EtOH	Ethanol	r _{pv}	relative Produktverteilung
exp.	Experimentell gewonnene Werte	ScPDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
G	Glycin	sim.	Simulierte Werte
GC	Gas Chromatographie	ST	S-Tasche
H	Histidin	TCM	Trichlormethan
h	Stunde(n)	TEA-Puffer	Triethanolamin-Puffer
HPLC	high-performance liquid chromatography	ThDP	Thiamindiphosphat
HPP	2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one	THF	Tetrahydrofuran
IL	ionische Flüssigkeit	TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
<i>i</i> Prop	Isopropanol	Upm	Umdrehungen pro Minute
kcILs	kleine und chirale ionische Flüssigkeiten	v/v	Volumen pro Volumen
KPi-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer	vol%	Volumenprozent
<i>L</i> KdcA	2-Ketosäuredecarboxylase aus <i>Lactococcus lactis</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
Med	Medium	<i>Zm</i> PDC	Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>
MIBK	Methylisobutylketon		

I. EINLEITUNG

1 Biokatalyse

Der Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen wird in der synthetischen Chemie unter dem Begriff der Biokatalyse zusammengefasst. Hierbei werden die Biokatalysatoren für Synthesen eingesetzt, die über ihre physiologischen Aktivitäten oft weit hinausgehen (Breuer und Stürmer 2006; Wenda *et al.* 2011).

Die Existenz von Enzymen wurde durch den Einsatz eines zellfreien Extrakts zur Alkoholfermentation bewiesen (Buchner 1897). Dass es sich bei Enzymen meist um Proteine handelt, konnte mit der Kristallisation der Urease gezeigt werden (Sumner 1926). Diese beiden bahnbrechenden Entdeckungen, jeweils geehrt durch den Nobelpreis in Chemie (1907 bzw. 1946), ebneten den Weg für die erste Phase der angewandten Biokatalyse. In dieser Phase wurde die Fähigkeit von Komponenten lebender Zellen ausgenutzt, chemische Substanzen zu synthetisieren. In einer zweiten Phase (1980er-1990er) begann die Modifikation der Biokatalysatoren durch den Einsatz erster Proteindesign-Technologien. Die Voraussetzung für diese Techniken war zweifelsohne das Verständnis der chemischen Zusammensetzung der DNA und des genetischen Codes (Watson und Crick 1953). Schließlich begann die dritte Welle der Biokatalyse in den späten 1990ern durch die Möglichkeit der *in vitro* Evolution von Biokatalysatoren (Boersma *et al.* 2007; Bornscheuer *et al.* 2012). Früher wurde der Prozess, in den ein Biokatalysator eingesetzt werden sollte, an dessen Limitierungen angepasst. Heute ist es möglich, die künstliche Evolution eines Biokatalysators soweit zu beschleunigen, dass das Enzym dem Prozess und dessen Anforderungen theoretisch uneingeschränkt angepasst werden kann (Bornscheuer *et al.* 2012). Dies kann zum einen die molekulare Veränderung eines Enzyms beinhalten, um eine gewünschte Substanz zugänglich zu machen (vgl. I.2.5.1.1), zum anderen aber auch eine induzierte Robustheit gegenüber Prozessbedingungen bedeuten (Clouthier und Pelletier 2012). Die Prozessführung erfordert beispielsweise den Einsatz organischer Lösungsmittel, um die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen zu erhöhen. Diese Lösungsmittel können jedoch z.B. Stabilität, Selektivität und Aktivität der Enzyme beeinträchtigen bzw. verändern. Um Enzyme

für den Einsatz in solchen Reaktionssystemen anzupassen, muss verstanden sein, welchen Einfluss das Reaktionsmedium auf die Enzyme nehmen kann.

Vor Beginn dieser Arbeit gab es insbesondere zur Wirkung organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten auf Enzyme noch keine systematische Untersuchung. Dies ist daher das Hauptziel dieser Dissertation.

2 ThDP-abhängige Enzyme

Die Enzyme, welche in dieser Arbeit untersucht werden, sind Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme. Mit Ausnahme der Transketolasen (Klasse 2: Transferasen), der Pyruvatoxidasen (Klasse 1: Oxidoreduktasen) und der Pyruvatdehydrogenasen (Klasse 1) gehören ThDP-abhängige Enzyme der Enzymklasse 4 (Lyasen) an und katalysieren, gemäß der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, nicht-hydrolytische Spaltungen (I.2.2). ThDP-abhängige Enzyme spielen in den verschiedensten Stoffwechselwegen vieler Organismen eine wichtige Rolle (Tabelle 1).

Tabelle 1: Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme

Enzym	E.C.-Nr.	Stoffwechselweg
Acetohydroxysäuresynthase (AHAS)	4.1.3.18	Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren
Transketolase (TK)	2.2.1.1	Pentosephosphatweg
Pyruvatoxidase (POX)	1.2.3.3	Atmungskette
Benzaldehydlyase (BAL)	4.1.2.38	Nicht bekannt
Pyruvatdehydrogenase (PDH)	1.2.4.1	Citratzyklus
Pyruvatdecarboxylase (PDC)	4.1.1.1	Alkoholische Gärung
Benzoylformiatdecarboxylase (BFD)	4.1.1.7	Mandelsäure-Metabolismus
Phenylpyruvatdecarboxylase (PhePDC)	4.1.1.43	Phenylalanin-Metabolismus
Indol-3-Pyruvatdecarboxylase (InPDC)	4.1.1.74	Tryptophan-Metabolismus
Verzweigtkettige 2-Ketosäure-decarboxylase (KdcA)	4.1.1.72	Leucin-Metabolismus
(1R, 6R)-2-Succinyl-5-enoylpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexadiene-1-carboxylate Synthase (MenD)	2.2.1.9	Menachinonbiosynthese

Um katalytisch aktiv zu sein, benötigen diese Enzyme ThDP und Magnesiumionen (Mg^{2+}) als Kofaktoren (I.2.1). Mg^{2+} verankert das ThDP, an dem die Katalyse erfolgt (I.2.1).

ThDP-abhängige Enzyme zeigen verschiedenste Aktivitäten und Substratspezifitäten. Diese Divergenz spiegelt sich in ihrer Aminosäuresequenz wider. Werden die verschiedenen Strukturfamilien im Vergleich betrachtet, zeigen sich signifikante Unterschiede (Widmann *et al.* 2010). Die Sequenzähnlichkeit ThDP-abhängiger Enzyme beträgt maximal 40 %. So zeigen *PfBAL* und *PpBFD* lediglich eine Sequenzähnlichkeit von 24 %, verfügen jedoch über nur wenige strukturelle Unterschiede (Knoll *et al.* 2006). Alle ThDP-abhängigen Enzyme zeigen zwei konservierte Domänen, die stets über einen ähnlichen Aufbau verfügen: PYR- (Pyrimidin-bindende, α) und PP- (Pyrophosphat-bindende, γ) Domäne (Duggleby 2006). Innerhalb der PYR-Domäne befindet sich ein konserviertes Glutamat, welches an der Aktivierung des ThDPs beteiligt ist (I.2.1). Die PP-Domäne verfügt über ein konserviertes ThDP-bindendes Motiv G-D-G-(X)₂₅₋₃₀-N-N (Hawkins *et al.* 1989). An der Grenzfläche zwischen zwei Untereinheiten entstehen zwei aktive Zentren, wobei ThDP mit dem Pyrimidinring der PYR-Domäne des einen Monomers und der Phosphatrest (koordiniert über ein Metallion - meist Mg^{2+}) mit der PP-Domäne des zweiten Monomers interagiert (Dobritsch *et al.* 1998; Hasson *et al.* 1998; Mosbacher *et al.* 2005). Die kleinste mögliche aktive Form ThDP-abhängiger Enzyme ist demnach das Dimer mit zwei aktiven Zentren pro Einheit. Diese kleinste Form findet sich in der Struktur der *LKdcA* (Berthold *et al.* 2007, I.2.5.4). Die meisten ThDP-abhängigen Enzyme liegen jedoch in tetramerer Form vor (Dyda *et al.* 1993; Arjunan *et al.* 1996; Dobritsch *et al.* 1998; Hasson *et al.* 1998; Pang *et al.* 2002; Schütz *et al.* 2003; Pang *et al.* 2004; Mosbacher *et al.* 2005; Maraite *et al.* 2007; Versees *et al.* 2007; Gocke *et al.* 2008), aber auch Oktamere wurden beschrieben (Pohl *et al.* 1994; Raj *et al.* 2002).

2.1 Der Kofaktor Thiamindiphosphat

Thiamindiphosphat (ThDP) ist die biologisch aktive Form des Vitamins B₁ (Thiamin) (Pohl *et al.* 2012). Wird dieser Kofaktor durch den jeweiligen Organismus nicht zur Verfügung gestellt, muss er über die Nahrung aufgenommen werden. So wurde auch das Thiamin entdeckt, als die Nervenkrankheit Beri-Beri, die auf neurologischen Störungen beruht und mit Gewichtsverlust und Nervenlähmungen einhergeht, durch

Gabe von abwechslungsreicher Kost geheilt werden konnte (Eijkman 1897a; Eijkman 1897b). Diese Entdeckung durch den holländischen Arzt Christiaan Eijkman im Jahr 1897 legte die Grundlage für die Entdeckung der Vitamine und deren Wirkung. Die Struktur des Vitamins Thiamin wurde erstmals 1935 beschrieben (Williams *et al.* 1935). Kurz darauf konnte ThDP als Kofaktor der Pyruvatdecarboxylasen identifiziert werden (Lohmann und Schuster 1937). Die Eigenkatalyse des ThDPs im ungebundenen Zustand (Abbildung 1, A) ist sehr schwach. Erst das Enzym aktiviert das ThDP, bindet es im aktiven Zentrum und bringt die Substrate in einen optimalen Abstand zum Kofaktor (Kluger und Tittmann 2008).

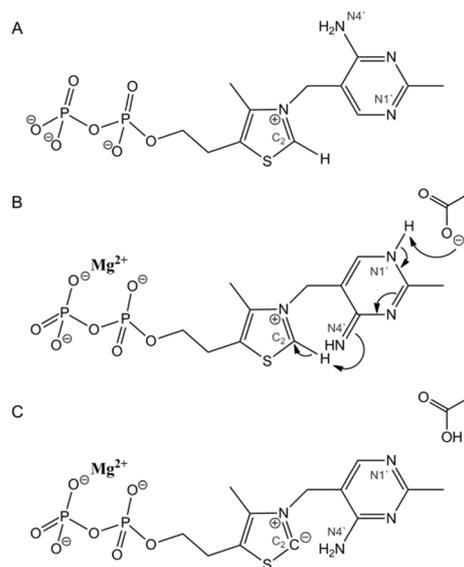


Abbildung 1: Chemische Struktur des Kofaktors Thiamindiphosphat (ThDP). (A) ThDP in Lösung, (B) ThDP koordiniert durch Mg²⁺ im aktiven Zentrum, Elektronentransfers sind eingezeichnet, ThDP liegt nicht in der aktivierten Form vor, (C) aktivierte Ylid-Form des ThDPs (Frank *et al.* 2007).

Das ThDP wird im aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme durch ionische Wechselwirkung mit Mg²⁺-Ionen verankert (Dobritzsch *et al.* 1998) und liegt in einer V-Konformation vor (Abbildung 1, C, Jordan 2003). Diese V-Konformation ermöglicht eine räumliche Nähe des C₂-Atoms des Thiazoliumrings und der N₄-Aminogruppe des Pyrimidinrings. Ein konservierter Glutamatrest im aktiven Zentrum des Enzyms bildet eine H-Brücke zum N₁-Atom des Pyrimidinrings aus, sodass ein Protonentransfer stattfinden kann (Abbildung 1, B). Die Basizität der N₄-Aminogruppe wird durch Elektronendelokalisation verstärkt. Im weiteren Verlauf entzieht das N₄-Atom dem C₂-Atom ein Proton, um die negative Ladung auszugleichen; das C₂-Atom wird so deprotoniert. Diese enzymatische Deprotonierung des ThDPs stellt den ersten Schritt des Reaktionszyklus dar und führt zur aktiven Form des ThDPs, dem Ylid (Kern *et al.* 1997, Abbildung 1, C).

2.2 Reaktionsmechanismus ThDP-abhängiger Lyasen

In dieser Arbeit werden nur ThDP-abhängige Lyasen untersucht. Aus diesem Grund wird im Folgenden speziell deren Reaktionsmechanismus betrachtet.

Wenn das ThDP in seiner reaktiven Form vorliegt (Abbildung 1, C), können ThDP-abhängige Lyasen in ihrem aktiven Zentrum zwei Reaktionen katalysieren. Die physiologische Reaktion der Enzyme ist die Lyaseaktivität (Pohl *et al.* 2004 Abbildung 2). Die Decarboxylierung (Abspaltung von CO₂) stellt einen Spezialfall dieser Aktivität dar. Darüber hinaus sind die untersuchten Enzyme in der Lage eine C-C-Knüpfung zu katalysieren. Für die Lyasen stellt dies eine nicht-physiologische Reaktion dar.

Der durch Deprotonierung aktivierte Kofaktor (Abbildung 2, A) greift im Fall der Decarboxylierung einer Ketosäure (Abbildung 2, roter Weg) die Ketogruppe nukleophil an. Das Substrat ist dadurch über das C₂-Atom des ThDPs gebunden und ein instabiles Intermediat entsteht (Abbildung 2, B rot), das durch CO₂-Abspaltung stabilisiert wird. Es entsteht der entsprechende ThDP-gebundene Aldehyd, der sogenannte „aktive Aldehyd“ (Abbildung 2, C). Nach Protonierung wird dieser Aldehyd freigesetzt und der Kofaktor im gleichen Schritt regeneriert (Abbildung 2, D - A).

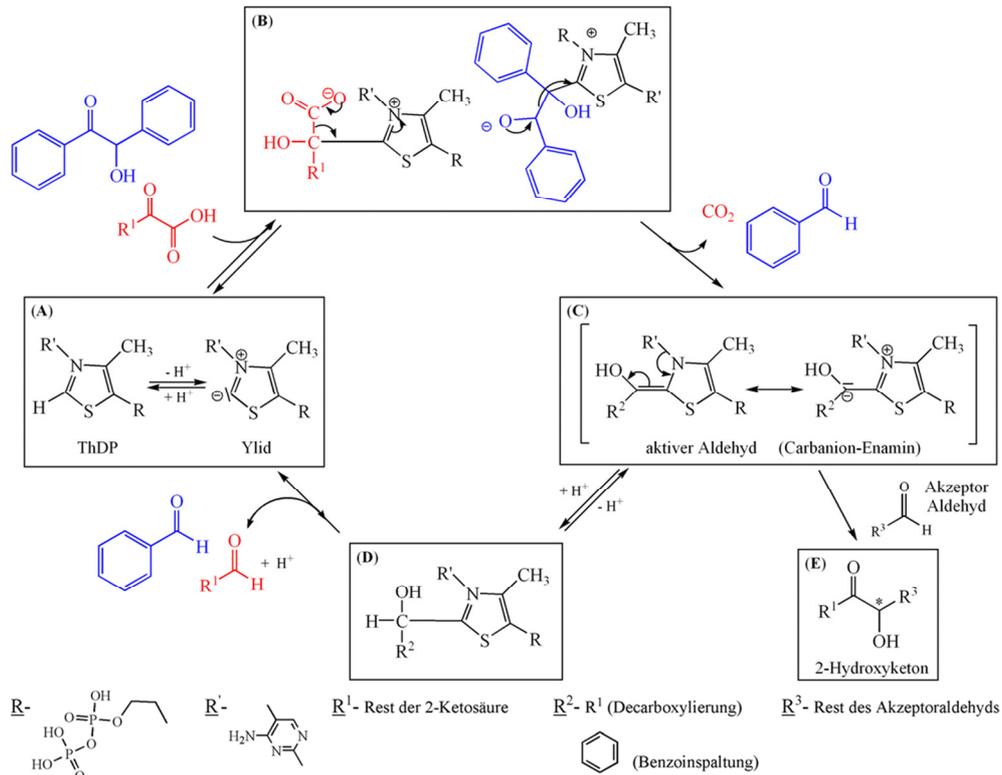


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Lyasereaktion (Decarboxylierung, Benzoinsspaltung) und Carboligation. Dargestellt ist der Reaktionsmechanismus für die Benzoinsspaltung (*PfBAL*) (blau) und die Decarboxylierung (Decarboxylasen) (rot). **(A-B)**: Nukleophiler Angriff des Ylids auf die Ketogruppe der 2-Ketosäure (rot) bzw. des Benzoin (blau) führt zu einer instabilen ThDP-gebundenen Zwischenstufe **(B)**, die sich durch CO_2 - (rot) bzw. Benzaldehydabspaltung (blau) stabilisiert. Hierdurch entsteht der sog. „aktive Aldehyd“ **(C)**. Durch Protonierung wird der korrespondierende Aldehyd der 2-Ketosäure (rot) oder ein Benzaldehydmolekül (blau) frei **(D-A)**. Tritt an die Stelle des Protons ein Akzeptoraldehyd, entsteht in der Carboligation ein 2-Hydroxyketon **(E)** (Abbildung nach Siegert *et al.* 2005; Gerhards 2009).

Im Fall der Benzoinsspaltung (Abbildung 2, blauer Weg) durch die *PfBAL* wird zunächst ein Molekül Benzaldehyd frei (Abbildung 2, B - C). Das am Kofaktor verbleibende zweite Molekül wird anschließend ebenfalls nach Protonierung freigesetzt und der Kofaktor dadurch regeneriert (Abbildung 2, D - A).

Bei der Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, wird der aktivierte Aldehyd (Abbildung 2, C) nicht protoniert, sondern mit einem zweiten Aldehyd (Akzeptor) zu einem 2-Hydroxyketon verknüpft (Abbildung 2, C-E).

2.3 Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Ein wichtiger Aspekt die Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme zu analysieren, ist die Chemoselektivität der Reaktion. Im Fall dieser Enzyme wird die Chemoselektivität als die bevorzugte Synthese eines Produkts gegenüber einer

Reihe von anderen möglichen Produkten definiert. Im Folgenden wird das Konzept der Chemoselektivität näher betrachtet.

Das erste Substrat, welches während der Carboligation an den Kofaktor ThDP bindet, stellt den Donor der Reaktion dar und entsprechend das zweite Substrat den Akzeptor (Dünkelmann *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme akzeptieren Aldehyde sowohl als Donoren als auch als Akzeptoren. Es gibt jedoch andere ThDP-abhängige Enzyme, wie z.B. MenD und AHAS (Tabelle 1), bei denen die Decarboxylierung der korrespondierenden Ketosäure essentiell für die Erzeugung eines „aktiven Aldehyds“ ist (Abbildung 2).

Je nachdem welcher Aldehyd die Donor- oder Akzeptorfunktion einnimmt, kann es in der bimolekularen Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd zu vier verschiedenen Produkten in jeweils beiden enantiomeren Formen kommen (Abbildung 3).

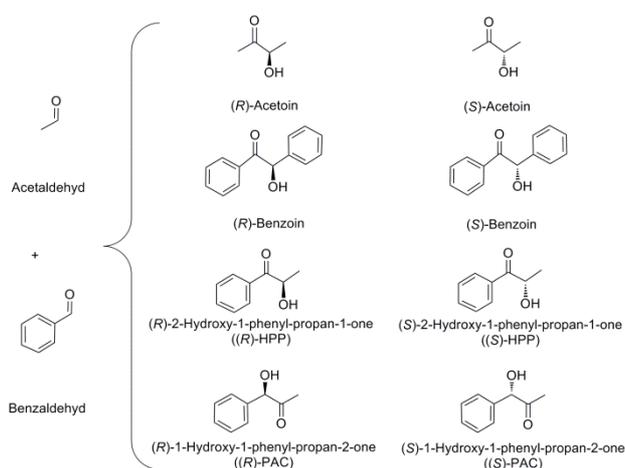


Abbildung 3: Mögliche Produkte der bimolekularen Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd.

Wenn Acetaldehyd sowohl als Donor als auch als Akzeptor fungiert, entsteht das Selbstligationsprodukt Acetoin. Benzoin wird analog aus zwei Molekülen Benzaldehyd gebildet. Neben diesen Selbstligationsprodukten können zwei gemischte Produkte auftreten. Im Fall von 1-Hydroxy-1-phenyl-propan-2-one (Phenylacetylcarbinol, PAC) bindet zunächst Acetaldehyd als Donor an das ThDP. Benzaldehyd fungiert dabei als Akzeptor. Bei der Synthese von 2-Hydroxy-1-phenyl-propan-1-one (HPP) ist die Reihenfolge umgekehrt: Benzaldehyd ist der Donor und Acetaldehyd der Akzeptor dieser Reaktion (Abbildung 4).

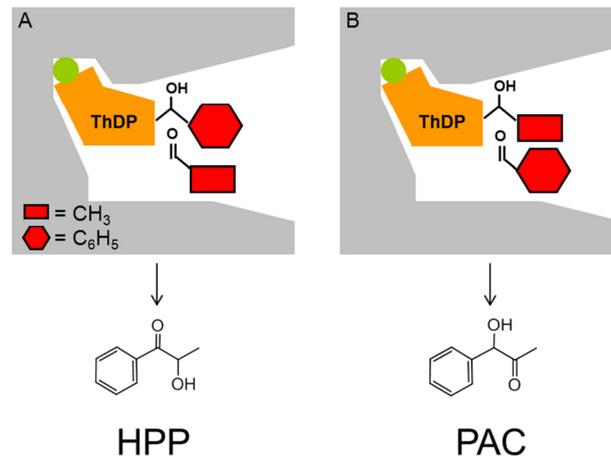


Abbildung 4: Festlegung der Chemo Selektivität der gemischten Carboligationsprodukte ThDP-abhängiger Enzyme. Bindet Benzaldehyd (Rest C₆H₅) als Donor an das ThDP (orange, koordiniert durch Mg²⁺, grün) und Acetaldehyd (Rest CH₃) als Akzeptor, entsteht das HPP-Produkt (A). Binden die beiden Substrate in umgekehrter Reihenfolge, entsteht PAC (B).

Die Chemo Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme wird also durch die Bindungsreihenfolge der Substratmoleküle determiniert.

2.4 Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Die durch die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (*PfBAL*, I.2.5.3) katalysierte Carboligationsreaktion von Acetaldehyd und Benzaldehyd führt (unter anderem) zu dem Produkt (*R*)-HPP (*ee* > 99 %, Demir *et al.* 2001). Die gleiche Reaktion, allerdings katalysiert durch die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (*PpBFD*, I.2.5.2), führt zum anderen Enantiomer des HPP-Produkts ((*S*)-HPP *ee* = 92 %, Iding *et al.* 2000). Die biochemische Charakterisierung zahlreicher Mutationen der aktiven Zentren, vor allem der *PpBFD* (Lingen *et al.* 2002; Lingen *et al.* 2003; Siegert *et al.* 2005; Gocke *et al.* 2008), und insbesondere die Auflösung der Kristallstrukturen (*PfBAL*: Mosbacher *et al.* 2005; Maraite *et al.* 2007, *PpBFD*: Hasson *et al.* 1998), ermöglichten die Erklärung der gegensätzlichen Stereoselektivität dieser beiden Biokatalysatoren (Knoll *et al.* 2006; Gocke *et al.* 2008, Abbildung 5).

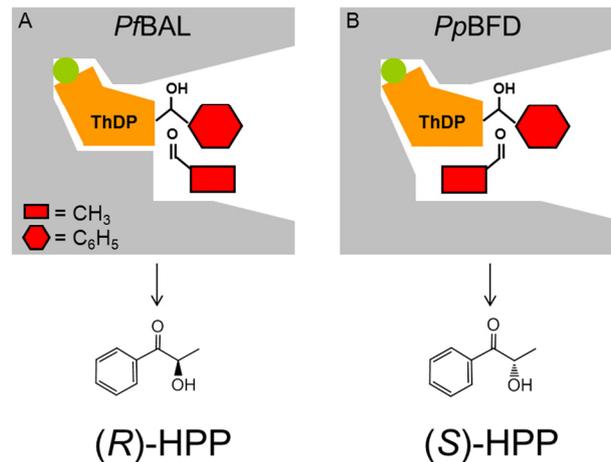


Abbildung 5: Vergleich der aktiven Zentren von *PfBAL* (A) und *PpBFD* (B). Der Kofaktor ThDP (orange) ist im aktiven Zentrum durch Mg^{2+} (grün) gebunden. Die beiden Substrate Acetaldehyd (Rest CH_3) und Benzaldehyd (Rest C_6H_5) sind in ihrer Orientierung zueinander vor der C-C-Verknüpfung gezeigt. Während es in der *PfBAL* durch die sterischen Gegebenheiten nur zu einer parallelen Anordnung und so zu einer Bildung von (*R*)-HPP kommen kann, ermöglicht die S-Tasche der *PpBFD* die antiparallele Anordnung der Substrate zueinander und damit den Zugang zu (*S*)-HPP (Knoll *et al.* 2006).

Im Gegensatz zur *PfBAL* verfügt die *PpBFD* über eine sterische Besonderheit innerhalb ihres aktiven Zentrums, die sogenannte S-Tasche. Wie in 1.2.3 beschrieben, bindet bei der HPP-Synthese zunächst Benzaldehyd an das ThDP. Die CH_3 -Gruppe des Acetaldehyds findet im Fall der *PpBFD* Platz in dieser S-Tasche und kann sich so antiparallel zu dem Donor der Reaktion anordnen. Durch diese antiparallele Situation entsteht das S-Produkt des HPPs. Eine parallele Anordnung der Substrate ist zwar immer noch möglich, die antiparallele Anordnung wird aber durch die Affinität der CH_3 -Gruppe in der S-Tasche besser stabilisiert und liegt daher bevorzugt vor. In der *PfBAL* ist keine S-Tasche vorhanden (Abbildung 5B). Acetaldehyd kann sich daher nur parallel zum Donor ausrichten. Durch diese Anordnung wird nach Carboligierung das *R*-Enantiomer gebildet.

Nach der Identifikation der S-Tasche im aktiven Zentrum der *PpBFD* zeigten sich auch in weiteren ThDP-abhängigen Enzymen potentielle S-Taschen. Diese sind jedoch in der wildtypischen Form der Enzyme für Substrate nicht zugänglich, da sie von sterisch anspruchsvollen Aminosäureseitenketten blockiert werden. Die S-Taschen, die theoretisch in den verschiedenen ThDP-abhängigen Enzymen, mit Ausnahme der *PfBAL*, vorhanden sind, unterscheiden sich in ihrer Größe; wobei $PpBFD < LKdcA < ZmPDC = ScPDC < ApPDC$ (vgl. Tabelle 1, Gocke 2007b). Das Wissen um die potentiell größte S-Tasche in der *ApPDC* ermöglichte die Modifikation des *R*-selektiven Enzyms für die Synthese des so erstmalig zugänglichen (*S*)-PACs

(I.2.5.1). Dabei wurde die blockierende, sterisch anspruchsvolle Aminosäure Glutamat in der S-Tasche gegen die kleinere Aminosäure Glycin ausgetauscht (Rother *et al.* 2011, I.2.5.1.1) und die S-Tasche so für die Anlagerung der aromatischen Seitenkette des Benzaldehyds geöffnet.

Zusammenfassend ist für die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme die relative Orientierung der Substratmoleküle zueinander entscheidend. Binden die Substrate parallel zueinander im aktiven Zentrum so entsteht das *R*-Enantiomer. Die antiparallele Anordnung, welche zur Bildung des *S*-Enantiomers führt, wird durch die S-Tasche ermöglicht.

2.5 Spezielle ThDP-abhängige Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene ThDP-abhängige Enzyme umfassend untersucht. Die einzelnen Vertreter werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

2.5.1 Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus*

Pyruvatdecarboxylasen (PDCs) sind essentiell für die anaerobe Umsetzung von Glukose zu Ethanol und CO₂. PDCs wurden in Pflanzen, Hefen, Pilzen und Bakterien (Holzer *et al.* 1956; Alvarez *et al.* 1993; Hossain *et al.* 1996; König 1998), allerdings nicht in Säugetieren beschrieben.

Neben der PDC aus *Sacharomyces cerevisiae* (ScPDC) ist die ZmPDC aus *Zymomonas mobilis* eine der bestbeschriebenen PDCs (Bringer-Meyer *et al.* 1986; Neale *et al.* 1987; Bringer-Meyer und Sahn 1988; Miczka *et al.* 1992; Bornemann *et al.* 1993; Pohl *et al.* 1994; Bruhn *et al.* 1995; Pohl *et al.* 1995; Bornemann *et al.* 1996; Lie *et al.* 2005; Pei *et al.* 2010). Die Lösung der Kristallstruktur (Dobritsch *et al.* 1998) zeigte einen tetrameren Aufbau der ZmPDC und legte den Grundstein für intensive Struktur-Funktionsanalysen (Bruhn *et al.* 1995; Pohl *et al.* 1998; Siegert *et al.* 2005). In dieser Arbeit wird die PDC aus *Acetobacter pasteurianus* (ApPDC, Graf 2005; Gocke 2007b; Rother *et al.* 2011) näher betrachtet. Im Gegensatz zu den o. g. PDCs, katalysiert die ApPDC die Spaltung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO₂ im oxidativen Metabolismus von *Acetobacter pasteurianus* (Raj *et al.* 2001). Eine *in vitro* Decarboxylierung der ApPDC wurde ebenso beschrieben (Raj *et al.* 2002; Graf 2005; Gocke 2007b; Rother *et al.* 2011) wie der Einsatz des Enzyms für die Carboligation (Graf 2005; Gocke 2007b; Rother *et al.* 2011).

2.5.1.1 Die Variante ApPDCE469G

Struktur-Funktionsstudien ThDP-abhängiger Enzyme (Pohl *et al.* 2009; Rother *et al.* 2011) identifizierten eine potentiell sehr große S-Tasche für die ApPDC (I.2.4), die jedoch durch eine sterisch anspruchsvolle Aminosäureseitenkette nicht für Substrate zugänglich war. Erst eine Punktmutation im aktiven Zentrum der ApPDC von Glutamat in Position 469 zu Glycin, öffnete die S-Tasche und erlaubte eine S-selektive Synthese von PAC und -Derivaten (Rother *et al.* 2011). Die Mutation in der S-Tasche hatte zur Folge, dass die Decarboxylaseaktivität der Variante auf etwa 1 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms reduziert wurde. Bei der Carboligation sinkt zwar der Umsatz zu PAC ebenfalls, jedoch zeigte sich in Anwesenheit von 20 vol% DMSO ein Produkt mit einem ee von 61 % (S) (Rother *et al.* 2011).

2.5.2 Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida*

Benzoylformiatdecarboxylasen (BFDs) wurden in verschiedenen Organismen beschrieben (*P. aeruginosa* (Barrowman *et al.* 1986), *Bradyrhizobium japonicum* (Wendorff 2006), *A. calcoaceticus* (Barrowman und Fewson 1985), *P. stutzeri* (Saehuan *et al.* 2007), *P. putida* (Hegeman 1966; Henning *et al.* 2006)). Am besten charakterisiert ist eine der BFDs aus dem Organismus *Pseudomonas putida* (Hegeman 1966; Iding *et al.* 2000; Siegert *et al.* 2005). Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd und CO₂ innerhalb des Mandelsäure-Metabolismus (Tsou *et al.* 1990). Für die natürliche Lyaseaktivität zeigt die PpBFD eine hohe Substratspezifität für Benzoylformiat mit 400 U/mg (Gocke *et al.* 2008). Sterisch anspruchsvolle Ketosäuren werden nur bedingt akzeptiert (Iding *et al.* 2000). Neben ihrer Decarboxylaseaktivität zeigt das Enzym auch Carboligaseaktivität (Wilcocks *et al.* 1992) und katalysiert die Synthese des 2-Hydroxyketons (S)-HPP (Demir *et al.* 1999; Iding *et al.* 2000; Lingen *et al.* 2002). Durch Lösung der Kristallstruktur der PpBFD (Hasson *et al.* 1998) waren Struktur-Funktionsuntersuchungen möglich. Diese zeigten warum dieses Enzym, als einziges bisher entdecktes ThDP-abhängiges Enzym der Decarboxylase-Superfamilie, S-selektiv für die bimolekulare Carboligation ist (Wilcocks *et al.* 1992; Iding *et al.* 1998) (I.2.4).

2.5.2.1 Die Variante *PpBFDH281A*

Ein Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum der *PpBFD* konnte die Akzeptorbindestelle in der Variante *PpBFDH281A* vergrößern (Polovnikova *et al.* 2003). Die Decarboxylaseaktivität dieser Variante ist dadurch zwar im Vergleich zum Wildtyp-Enzym herabgesetzt, allerdings konnte eine um den Faktor 100 gesteigerte Aktivität für die Benzoinkondensation erreicht werden (0,4 U/mg mit dem Wildtyp-Enzym, Siegert *et al.* 2005 und 50 U/mg mit der Variante, Knoll *et al.* 2006). Eine asymmetrische Benzoinligation, bei der auch substituierte Benzaldehydsubstrate akzeptiert werden, wurde neben der *PfBAL* (I.2.5.3) nun auch mit diesem Enzym möglich (Dünkelmann *et al.* 2002; Polovnikova *et al.* 2003).

2.5.3 Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*

Die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* wurde erstmals 1989 beschrieben (Gonzalez und Vicuna 1989), später kloniert und charakterisiert (Hinrichsen *et al.* 1994). Isoliert aus Holzresten einer Zellulosefabrik (Gonzalez *et al.* 1986), war es dem gram-negativen Bakterium durch die *PfBAL* möglich auf Kohlenstoffquellen wie Anisoin oder Benzoin als alleiniger C- und Energiequelle zu wachsen und diese zu metabolisieren. Das 2-Hydroxyketon (*R*)-Benzoin wird mit einer Aktivität von 74 U/mg in zwei Moleküle Benzaldehyd gespalten (in 15 vol% PEG, Janzen *et al.* 2006). Zunächst wurde vermutet, dass diese Spaltungsreaktion irreversibel sei (Gonzalez und Vicuna 1989). Später zeigte sich jedoch, dass die *PfBAL* auch in der Lage ist, die Carboligation von 2-Hydroxyketonen zu katalysieren (Demir *et al.* 2001). Bezüglich der Benzoin synthese aus Benzaldehyd zeigt das Enzym eine außergewöhnlich hohe Aktivität von 320 U/mg (Janzen *et al.* 2006) mit einem ee von < 99 % (*R*) (Demir *et al.* 2001). Durch diese hohe Stereoselektivität der *PfBAL* ist ihr Einsatz auch bei der Gewinnung von (*S*)-Benzoin mittels kinetischer Racematspaltung möglich. Aus racemischen Benzoin kann so in Gegenwart von Acetaldehyd (*S*)-Benzoin und (*R*)-HPP hergestellt werden (Demir *et al.* 2001).

Die Kristallstruktur der *PfBAL* (Mosbacher *et al.* 2005; Maraite *et al.* 2007) zeigt ein sehr großes aktives Zentrum, was das breite Substratspektrum des Enzyms und die Bildung von Benzoin erklärt. Benzaldehyd mit Substitutionen in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position werden genauso akzeptiert wie mehrfach substituierte Benzaldehyd-derivate sowie heteroaromatische und längerkettige aliphatische Aldehyde (Demir *et al.* 1999; Sanchez-Gonzalez und Rosazza 2003; Dominguez de Maria *et al.* 2006;

Dominguez de Maria *et al.* 2008a; Dominguez de Maria *et al.* 2007). Es zeigte sich allerdings, dass die *PfBAL* sehr sensibel gegenüber Aldehyden ist und bereits bei sehr geringen Aldehydkonzentrationen signifikante, jedoch vielfach reversible, Inaktivierung zeigt (Hildebrand *et al.* 2007; van de Wittenboer 2009; Schwarz 2011).

Die schlechte Löslichkeit der Substrate der *PfBAL* (z.B. Benzoin) war der Grund für den Einsatz dieses Enzyms in organischen Lösungsmitteln (z.B. Demir *et al.* 2001; Demir *et al.* 2002; Demir *et al.* 2003; Stillger 2004; Janzen *et al.* 2006; Shanmuganathan *et al.* 2010, I.3.1.3.1), ionischen Flüssigkeiten (Kokova *et al.* 2009, I.3.2.1.1), in Zweiphasensystemen (Hischer *et al.* 2005; Ansorge-Schumacher *et al.* 2006) und in Immobilisierungsversuchen (Kurlermann und Liese 2004; Sopaci *et al.* 2009).

Bislang ist die *PfBAL* aufgrund ihrer Eigenschaften einzigartig in der Gruppe ThDP-abhängiger Enzyme. Es wurden verschiedene weitere potentielle Benzaldehydlyasen in Sequenzdatenbanken identifiziert, jedoch zeigte keine auch nur annähernd so hohe Aktivitätswerte wie die *PfBAL* (Brosi 2006; Gocke 2007b).

2.5.4 Verzweigt-kettige 2-Ketosäuredecarboxylase aus *Lactococcus lactis*

Verzweigt-kettige 2-Ketosäuredecarboxylasen wurden in *Bacillus subtilis* (Oku und Kaneda 1988), *Lactococcus lactis* (Amarita *et al.* 2001) sowie in der dazugehörigen Subspezies *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* (*L/KdcA*) (Smit *et al.* 2005) beschrieben. Die *L/KdcA* ist das Schlüsselenzym beim Metabolismus der Aminosäure Leucin zu 2-Methylbutanal (Smit *et al.* 2005). Dieser Prozess findet vor allem Anwendung in der Käseproduktion, bei der der Abbau von Aminosäuren zur Geschmacksbildung nötig ist (McSweeney und Sousa 2000). 2005 wurde dieses Enzym hinsichtlich seiner Decarboxylaseaktivität beschrieben (Smit *et al.* 2005), später konnte auch die Fähigkeit zur Carboligation belegt werden (Gocke *et al.* 2007a). Nachdem ein Homologiemodell (Yep *et al.* 2006) und schließlich die Kristallstruktur gelöst wurden (Berthold *et al.* 2007), zeigte sich für katalytisch aktive *L/KdcA* ein dimerer Aufbau.

3 Unkonventionelle Medien

Es ist bekannt, dass das Innere einer Zelle weniger aus Wasser, sondern aus einer komplexen solartigen Mischung aus Proteinen, Zuckern, DNA, RNA und weiteren Komponenten besteht (McGuffee und Elcock 2010). Trotzdem herrschte lange Zeit

die allgemeine Auffassung, dass Enzyme lediglich in Wasser bzw. wässrigem Puffer als ihrem natürlichen Reaktionsmedium aktiv seien (Krishna 2002). Historisch bedingt wird Wasser daher als das konventionelle Reaktionsmedium angesehen und jedes davon abweichende Medium als unkonventionelles Medium bezeichnet. Studien zu Enzymen in Systemen, die nicht nur aus Wasser bestehen, sind schon Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben worden (Hill 1898). Hier wurde z.B. der Einsatz von Enzymen in Glukoselösungen untersucht. In diesem Fall ist die Mischung von Glukose und Wasser das unkonventionelle Medium. Eine aktuellere Einteilung unterscheidet vier Gruppen von unkonventionellen Medien:

- organische Lösungsmittel (I.3.1)
- ionische Flüssigkeiten (I.3.2)
- Gasphase (z.B. Maugard *et al.* 2001)
- superkritische Flüssigkeiten (z.B. Matsuda *et al.* 2004)

Die Gemeinsamkeit unkonventioneller Medien ist ein reduzierter Wasseranteil. Es zeigt sich, dass viele Enzyme z.B. auch in reinem organischem Lösungsmittel bzw. in Reaktionsmedien mit minimalem Wasseranteil nicht nur aktiv bleiben, sondern dort Aktivitäten und Selektivitäten zeigen, die in wässrigen Medien nicht möglich wären. Der Einsatz von Enzymen in solchen Medien bringt einige Vorteile. Schwer wasserlösliche Substanzen können in unkonventionellen Medien meist besser gelöst werden. Außerdem können chemische Gleichgewichte durch die Medien verändert werden, so dass theoretisch höhere Produktausbeuten möglich sind (Halling 1990; Vermue und Tramper 1995). Unerwünschte Nebenreaktionen, die in wässriger Umgebung ablaufen, können durch den Einsatz in unkonventionellen Medien unterdrückt bzw. verhindert werden (Halling 1987; Klibanov 2001). Des Weiteren können Eigenschaften der Enzyme, wie Chemo- oder Stereoselektivität durch das Medium und die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Medium beeinflusst werden. Untersuchungen wurden diesbezüglich für organische Lösungsmittel (Carrea und Riva 2000; Klibanov 2001) und ionische Flüssigkeiten veröffentlicht (Kim *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003). Die Möglichkeit, Selektivitäten zu beeinflussen, ist wohl auch eines der Hauptargumente, den Einsatz von Enzymen in unkonventionellen Medien zu prüfen. Die Möglichkeiten und Eigenschaften von Enzymen vervielfachen sich, wenn statt der wässrigen Umgebung Additive wie organische Lösungsmittel hinzugegeben werden. Neben den klassischen Methoden des Enzymdesigns, etwa durch gerichtete Mutagenese zur Veränderung der Eigenschaften eines Enzyms,

ergeben sich durch Modifikation der Umgebungsbedingungen weitere Optionen. Neben Veränderungen der Reaktionsparameter wie Temperatur, pH, Substratkonzentration, Puffer und dessen Konzentration, Enzymmenge etc., bietet der Einsatz unkonventioneller Medien ein zusätzliches Veränderungs- und Optimierungspotential. Hier wird nicht das Enzym, sondern die Umgebung des Enzyms verändert, um neue katalytische Möglichkeiten und damit neue Produkte zu erschließen (Carrea und Riva 2000).

Im Folgenden werden die beiden in dieser Arbeit eingesetzten unkonventionellen Medien bezüglich ihrer Eigenschaften aber auch bezüglich ihrer Kombination mit Enzymen näher betrachtet.

3.1 Organische Lösungsmittel

Organische Lösungsmittel sind kohlenstoffhaltige Verbindungen, welche einen Stoff lösen, ohne diesen in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften zu verändern. Viele verschiedene funktionelle Gruppen innerhalb der organischen Lösungsmittel können unterschieden werden, wie etwa Ether, aliphatische, zyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe oder Alkohole.

Um organische Lösungsmittel und deren Wechselwirkung mit Enzymen zu beschreiben, wird der so genannte logP-Wert (I.3.1.2, Leo *et al.* 1971) und die Dielektrizitätskonstante (van Vechten 1969) verwendet. Darüber hinaus spielt bei organischen Lösungsmitteln mit minimalem Wassergehalt auch deren Wasseraktivität (I.3.1.1, Gupta und Roy 2004) eine wichtige Rolle.

3.1.1 Wasseraktivität organischer Lösungsmittel

Die Wasseraktivität beschreibt das Verhältnis des Wasserdampfdrucks über einer Substanz zum Wasserdampfdruck von reinem Wasser bei gleicher Temperatur. Reines Wasser hat daher per Definition eine Wasseraktivität von $a_w(\text{H}_2\text{O}) = 1,0$. Die Wasseraktivität, die vereinfacht die Verfügbarkeit von freiem Wasser beschreibt, ist z.B. in der Lebensmittelindustrie ein wichtiges Kriterium, da Organismen ein Wachstumsoptimum in Bezug auf die Wasseraktivität und nicht nur in Bezug auf die Wasserkonzentration zeigen (Andersson 1980; Grant 2004). Auch bei Enzymen hat die Wasseraktivität der Umgebung einen Einfluss auf deren Eigenschaften. So kann sich etwa die Stereoselektivität eines Enzyms je nach Wasseraktivität des Mediums ändern (betrachtet die Wasseraktivität: Carrea *et al.* 1995, betrachtet den

Wassergehalt: Klibanov 2003; Dimoula 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht in reinen organischen Lösungsmitteln, sondern stets in Mischungen von organischen Lösungsmitteln und Wasser gearbeitet. Hierbei machte prozentual immer wässriger Puffer den Hauptteil des Reaktionsmediums aus. Aus diesem Grund kann hier die Wasseraktivität in der Betrachtung der Einflüsse außen vorgelassen werden.

Größere Bedeutung hat in dieser Arbeit die Polarität der eingesetzten organischen Lösungsmittel.

3.1.2 Polarität organischer Lösungsmittel

Die Polarität einer chemischen Substanz beschreibt die Fähigkeit zur Ausbildung von Ladungsschwerpunkten durch Ladungsverschiebung. Die Substanz bildet mit der Ladungsverschiebung ein Dipolmoment aus. Die Polarität von organischen Lösungsmitteln wird durch den $\log P$ angegeben. Hierbei beschreibt P die Konzentrationsverteilung eines Stoffs in einem 2-Phasensystem aus Oktanol und Wasser. Ein positiver $\log P$ -Wert gibt eine höhere Löslichkeit der untersuchten Substanz in Oktanol als in Wasser an. Dieser Stoff zeigt demnach eine geringe Polarität bzw. ist unpolar. Ist die Löslichkeit in Wasser besser als in Oktanol, so ergibt sich ein negativer $\log P$ -Wert und die Substanz verfügt über ein stabiles Dipolmoment.

Werden organische Lösungsmittel in Kombination mit Enzymen verwendet, so scheint der $\log P$ des Lösungsmittels entscheidend für den Einfluss auf das Enzym zu sein (Laane *et al.* 1985). Der Theorie nach soll ein unpolares Lösungsmittel besser für den Einsatz in einer enzymatischen Reaktion geeignet sein, da das Wasser, welches das Enzym umgibt, durch das Lösungsmittel nicht verdrängt wird. Ein polares Lösungsmittel hingegen, könnte die essentielle Wasserschicht um das Enzym verdrängen und das Enzym somit inaktivieren. So seien Einflüsse reiner organischer Lösungsmittel auf eine Interaktion mit dem enzymgebundenen Wasser und nicht auf eine direkte Interaktion mit dem Katalysator zurückzuführen (Carrea und Riva 2000). Zur Einteilung der Eignung organischer Lösungsmittel in Kombination mit Enzymen wurden folgende Beobachtungen zu Regeln zusammengefasst, die sich auf den Einsatz in reinen organischen Lösungsmitteln beziehen (Laane *et al.* 1987; Gupta 1992):

$\log P < 2$	schlechte Aktivität
$\log P 2 - 4$	unterschiedliche Ergebnisse
$\log P > 4$	gute Aktivität

Im weiteren Verlauf wurde das logP-Konzept durch die Dielektrizitätskonstante erweitert (Halling 1990). Es zeigte sich, dass ein Zusammenhang zwischen dem logP eines Lösungsmittels und der Aktivität eines in diesem Lösungsmittel gelösten Enzyms besteht.

Der logP kann jedoch nicht immer den Einfluss eines Lösungsmittels auf ein Enzym ausreichend beschreiben. Es wurde neben der Polarität auch die funktionelle Gruppe eines Lösungsmittels betrachtet (Vilela *et al.* 2003; Stillger 2004).

Abbildung 6 zeigt die in dieser Arbeit eingesetzten organischen Lösungsmittel.

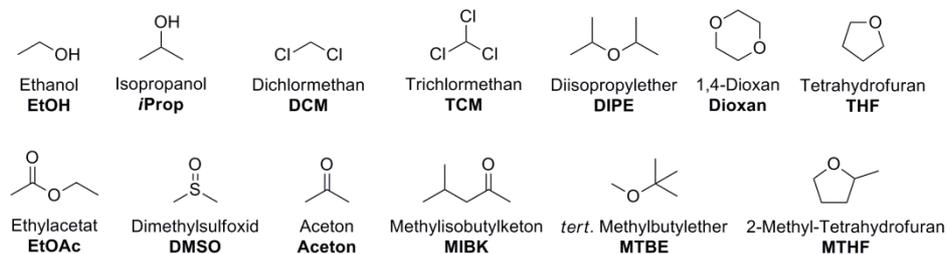


Abbildung 6: In dieser Arbeit verwendete organische Lösungsmittel.

Im Folgenden wird der Einfluss organischer Lösungsmittel auf Enzyme und damit der Einsatz dieser unkonventionellen Medien in der Biokatalyse zusammengefasst.

3.1.3 Organische Lösungsmittel in der Biokatalyse

Bereits 1933 beschrieb Sym die Aktivität von Enzymen in unkonventionellen Medien (Sym 1933). Diese Entdeckung blieb lange Zeit unbeachtet und wurde erst 1980 wieder aufgegriffen (Klibanov 2000). Obwohl Wasser für die native Struktur von Enzymen entscheidend ist (Serdakowski und Dordick 2008), verfügen Enzyme in Gegenwart organischer Lösungsmittel häufig über eine verbesserte Stabilität (Gupta 1992). Diese Stabilitätserhöhung kann durch eine verringerte Rigidität der Biokatalysatoren erklärt werden (Secundo *et al.* 2011).

Die Vorteile des Einsatzes organischer Lösungsmittel in Biotransformationen sind (Sellek und Chaudhuri 1999):

- eine höhere Löslichkeit von hydrophoben Substanzen wird erreicht
- die Spezifität des Katalysators kann verändert werden
- die reduzierte Wasseraktivität verändert das hydrolytische Gleichgewicht
- unerwünschte Nebenreaktionen, die in wässriger Umgebung stattfinden können minimiert werden

- unpolare organische Lösungsmittel verdrängen das enzymgebundene Wasser nicht
- Substrat- und Produktverteilung werden beeinflusst, was zu höheren Ausbeuten führen kann und die Separation erleichtert
- verminderte mikrobielle Kontamination
- erhöhte Stabilität von Katalysatoren in unpolaren organischen Lösungsmitteln möglich

Allerdings dürfen auch folgende mögliche Nachteile nicht unbeachtet bleiben (Sellek und Chaudhuri 1999):

- eventuelle Reduktion der Enzymaktivität
- dadurch höherer Enzymeinsatz nötig
- polare organische Lösungsmittel können Enzyme denaturieren
- in Zweiphasensystemen auftretende Grenzflächen können Katalysatoren inaktivieren
- die Wasseraktivität muss kontrolliert werden, besonders im Fall von Kondensationsreaktionen

Wie bei den Vorteilen zum Einsatz organischer Lösungsmittel genannt, kann neben der Stabilität ebenso ein Einfluss auf die Selektivität der Enzyme auftreten (Zaks und Klibanov 1986; Yang *et al.* 1997; Castro und Knubovets 2003). Einige Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss auf die Stereoselektivität von Lipasen (Mine *et al.* 2003; Chang und Hsu 2005). Durch Zugabe organischer Lösungsmittel konnte eine Stereoinversion, von 39 % (*S*) (in Anwesenheit von Aceton) zu 39 % (*R*) (in Tetrachlormethan und *n*-Hexan (1:1), Ueji *et al.* 1992) oder sogar von 60 % (*R*) zu 67 % (*S*) beobachtet werden. Lipasen sind besonders gut für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln geeignet, weil auch ihre natürliche Aktivität an einer Lipid-Wasser-Schicht und damit an einer Grenzfläche stattfindet. Durch ihre Bevorzugung einer hydrophoben Umgebung nehmen Lipasen in Kombination mit organischen Lösungsmitteln eine Sonderstellung ein (Santaniello *et al.* 1993). Der Einfluss reiner organischer Lösungsmittel wurde daher hauptsächlich für Lipasen untersucht (Ueji *et al.* 1992; Bornscheuer *et al.* 1993; Shin *et al.* 2000; Ciuffreda *et al.* 2003; Klibanov 2003; Singh *et al.* 2010).

Neben den Arbeiten zur Stereoselektivität der Lipasen wurde auch der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität von Proteasen beschrieben (Broos *et al.* 1995; Wescott *et al.* 1996).

Des Weiteren gibt es einige Arbeiten, die den Einfluss von Mischungen organischer Lösungsmittel mit Wasser auf Enzyme beschreiben, zum Beispiel beim Einfluss auf die Struktur von Lipasen (Luque *et al.* 1998), Alkoholdehydrogenasen (Olofsson *et al.* 2005) oder Monooxygenasen (Secundo *et al.* 2011). Kaul *et al.* beschrieben einige generelle Trends verschiedener wassermischbarer organischer Lösungsmittel in Bezug auf den Umsatz und die Stereoselektivität einer Nitrilase in Korrelation zu den logP-Werten (I.3.1.2) der Lösungsmittel und deren dielektrischen Konstanten (Kaul und Banerjee 2008).

Obwohl schon einige Studien durchgeführt wurden, z.B. zu dem kinetischen Verhalten von α -Chymotrypsin in organischen Lösungsmitteln (Belyaeva *et al.* 2002), ist es bis jetzt schwer, generelle Tendenzen zum Einfluss organischer Lösungsmittel auf Enzyme abzuleiten. Mechanistische Erklärungen sind nur für ganz spezifische Systeme anwendbar (Rariy und Klibanov 2000) und Solventeffekte noch lange nicht verstanden. Wenige Studien befassen sich systematisch mit dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf verschiedene Enzyme. So wurde etwa mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln und ionische Flüssigkeiten ein Einfluss auf die Stereoselektivität der Schweineleberesterase (PLE) beschrieben (u.a. Dominguez de Maria *et al.* 2005; Wallert *et al.* 2005; Masterson *et al.* 2009), jedoch erst in diesem Jahr eine umfassendere Untersuchung publiziert (Smith *et al.* 2012). Diese beschreibt zwar die Effekte zusammenfassend, mechanistische Erklärungen werden aber nicht geliefert.

Auch in Bezug auf ThDP-abhängige Enzyme in Kombination mit organischen Lösungsmitteln wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt.

3.1.3.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf ThDP-abhängige Enzyme

PfBAL

Besonders das Verhalten der *PfBAL* (Dominguez de Maria *et al.* 2006; Kokova *et al.* 2009; Schmidt *et al.* 2009; Shanmuganathan *et al.* 2010) in einphasigen Mischungen aus organischem Lösungsmittel und Wasser wurde untersucht. Diese Studien befassten sich ausschließlich mit der Synthese von Benzoin bzw. HPP. Bereits 10 – 20 vol% Aceton, Ethanol und Isopropanol beeinträchtigen die Aktivität des Enzyms (Kokova 2008). Demgegenüber kann die Zugabe von 5 vol% Methyltertbutylether (MTBE) die Halbwertszeit der *PfBAL* bei 4 °C um den Faktor 75 steigern. In Gegenwart von 20 – 30 vol% DMSO nimmt die Lyaseaktivität der *PfBAL* ab, während

die Ligaseaktivität für das Benzoinprodukt unberührt bleibt (Stillger 2004). Allerdings erhöht sich die Lagerstabilität durch DMSO sogar um den Faktor 150 (Stillger 2004). Ein Nachteil in der *PfBAL*-katalysierten Synthese in Gegenwart von DMSO ist die erschwerte Aufarbeitung von Produkten aus diesem Lösungsmittel im Vergleich etwa zu MTBE (Stillger 2004; Dominguez de Maria *et al.* 2006).

Die *PfBAL* zeigt ebenfalls eine hohe Stabilität in wässrig-organischen Zweiphasensystemen. Hierbei erweisen sich offenkettige Ether mit verzweigten aliphatischen Seitenketten als besonders günstige Additive. MTBE steigert die Halbwertszeit in Puffer von 15 h auf einen Wert von 1150 h (im homogenen System). Stillger konnte in seinen Untersuchungen keine Korrelation des Einflusses der Lösungsmittel auf die *PfBAL* und deren logP-Werte finden. In Bezug auf die Stabilität der *PfBAL* scheint eine Einteilung der Lösungsmittel aufgrund ihrer chemischen Struktur besser zu sein (Stillger 2004). Diese Arbeit beschäftigte sich bis heute am ausführlichsten mit dem Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf ein ThDP-abhängiges Enzym. Ein Einfluss auf die Stereoselektivität der *PfBAL* wurde hier nicht beobachtet.

PpBFDH281A

Neben der *PfBAL* wurde auch das Verhalten der *PpBFDH281A* in einphasigen Mischungen aus organischen Lösungsmitteln und Wasser intensiv untersucht (Kokova *et al.* 2009). Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie für die *PfBAL*. 10 – 20 vol% Aceton, Ethanol und Isopropanol beeinträchtigen die Aktivität der *PpBFDH281A* signifikant (Kokova 2008). Die Stabilität des Enzyms wird im Gegensatz zur *PfBAL* durch Zugabe von DMSO nicht verbessert (Kokova 2008), jedoch wird die initiale Aktivität des Enzyms (in Puffer) in Gegenwart von 10 vol% DMSO verdoppelt (Kokova 2008). Auch in diesen Studien wurde ausschließlich die Synthese von Benzoin bzw. HPP betrachtet.

LlKdcA und ApPDC

Neben der *PfBAL* und der *PpBFDH281A* wurden weitere ThDP-abhängige Enzyme in Gegenwart organischer Lösungsmittel untersucht. Diese Studien befassten sich jedoch bei weitem nicht so umfangreich mit den Einflüssen dieser Medien. Es wurde lediglich der Einfluss von DMSO auf die Stabilität der Enzyme untersucht. Im Fall der *LlKdcA* wurde in Gegenwart von 20 vol% DMSO eine verbesserte Stabilität des

Enzyms beschrieben (Gocke *et al.* 2007a). Auch auf die Wildtyp-ApPDC zeigte sich eine stabilisierende Wirkung des DMSOs (Graf 2005).

3.2 Ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten sind in der Katalyse (Parvulescu und Hardacre 2007) und Biokatalyse (van Rantwijk und Sheldon 2007) von großer Bedeutung.

Per Definition sind ionische Flüssigkeiten Salze, die meist bei Raumtemperatur in ihrer flüssigen Form vorliegen (Earle und Seddon 2000). Die niedrige Schmelztemperatur wird durch eine instabile Packung aus einem großen asymmetrischen Kation in Kombination mit einem schwach koordinierenden Anion erreicht (Dominguez de Maria 2012). Ionische Flüssigkeiten verfügen über einen vernachlässigbaren Dampfdruck und sind nicht brennbar (Earle *et al.* 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften gelten sie oft auch als „grüne“ Lösungsmittel. Trotz dieser Vorteile ist der Einsatz ionischer Flüssigkeiten umstritten, da die Frage nach der Toxizität nicht umfassend geklärt, jedoch für einige ionische Flüssigkeiten bereits gezeigt wurde (Quijano *et al.* 2010). Es wird daran gearbeitet, besonders die Herstellung ionischer Flüssigkeiten umweltverträglicher zu gestalten (Holbrey *et al.* 2002; Fukumoto *et al.* 2005; Morrissey *et al.* 2009). Außerdem kann es beim Einsatz von ionischen Flüssigkeiten zu Einflüssen kommen, die durch etwaige Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess verursacht werden und dadurch nicht reproduzierbar sind (Kohlmann und Greiner 2012). Trotz dieser Bedenken ist ein entscheidender Vorteil, bei der Anwendung von ionischen Flüssigkeiten, dass die physio-chemischen Eigenschaften durch geschickte Kombination und Variation der Ionenpaare verändert werden können (Cantone *et al.* 2007). Durch Verknüpfung mit chiralen Komponenten ist es außerdem möglich, chirale ionische Flüssigkeiten herzustellen (Kitazume 2001; Zhao *et al.* 2006; Bica und Gaertner 2008; Prectl *et al.* 2009; Olivier-Bourbigou *et al.* 2010). Das Zusammenbringen chiraler Lösungsmittel mit chiralen (Bio-)Katalysatoren wird als attraktive Option zur Entwicklung neuer Ansätze betrachtet (Dominguez de Maria und Maugeri 2011). Diese Möglichkeiten der Modulation der Eigenschaften sind in dem Maße mit organischen Lösungsmitteln nicht gegeben. Ein weiterer Punkt, warum das Interesse an ionischen Flüssigkeiten stetig wächst, ist das Bestreben, flüchtige organische Lösungsmittel durch die nicht flüchtigen ionischen Flüssigkeiten zu ersetzen (van Rantwijk und Sheldon 2007). So

ist es prinzipiell möglich jedes konventionelle Lösungsmittel durch eine ionische Flüssigkeit zu ersetzen (Plechkova und Seddon 2008).

Bereits 1914 wurde die erste ionische Flüssigkeit beschrieben (Walden 1914). Lange Zeit später erschien ein Patent, welches von der Zelluloselöslichkeit einiger Pyridinium-basierter geschmolzener Salze berichtet (Graenacher 1934). In der Literatur werden drei Generationen unterschieden, die auch den erst späten Erfolg der ionischen Flüssigkeiten dokumentieren:

Ionische Flüssigkeiten der ersten Generation (1960-1990) verfügten meist über Kationen, die aus Dialkylimidazolium- oder Alkylimidazoliumderivaten bestanden. Die Anionen waren oft Chloroaluminat oder andere Metallhalogenidstrukturen. Diese ionischen Flüssigkeiten hatten den Nachteil, sensitiv gegenüber Wasser und Luft zu sein, was deren Einsatz und Fortschritte in der Anwendung verhinderte (Dominguez de Maria 2012).

Die zweite Generation von ionischen Flüssigkeiten (ab 1990) verfügte über schwach koordinierende Anionen wie BF_4^- oder PF_6^- und war als deutlicher Fortschritt gegenüber ionischen Flüssigkeiten der ersten Generation Wasser- und Luft-stabil. Diese ionischen Flüssigkeiten sind Gegenstand vieler grundlegender Forschungen des letzten Jahrzehnts. Vor allem neue Anwendungen in der Chemie wurden vorangetrieben. Der kommerzielle Einsatz ionischer Flüssigkeiten ist aber immer noch, wahrscheinlich aufgrund ökonomischer Faktoren, auf Einzelfälle reduziert (Dominguez de Maria und Maugeri 2011).

Ionische Flüssigkeiten der dritten Generation (ab 2000) sollen umweltverträglicher sein, da sie aus biologisch abbaubaren natürlichen Basen (z.B. Cholin), Aminosäuren oder Carboxylsäuren bestehen (Wilkes 2002; Gorke *et al.* 2010).

Die in dieser Arbeit eingesetzten ionischen Flüssigkeiten sind in Abbildung 7 dargestellt und gehören zu den ionischen Flüssigkeiten der zweiten Generation.

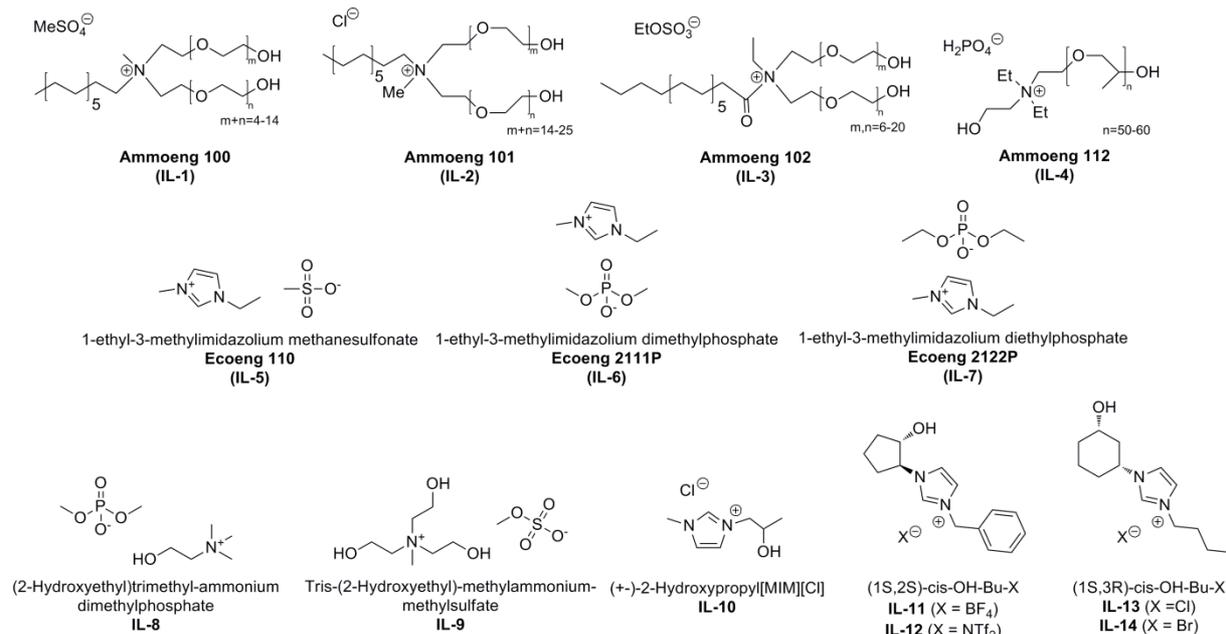


Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendete ionische Flüssigkeiten.

Bei den verwendeten Additiven handelt es sich um achirale (IL-1 - IL-10) und chirale (IL-11 - IL-14) ionischen Flüssigkeiten.

3.2.1 Ionische Flüssigkeiten in der Biokatalyse

Der erste Einsatz eines Enzyms (Alkalische Phosphatase) in einer ionischen Flüssigkeit (Ethylammoniumnitrat) wurde bereits 1984 beschrieben (Magnuson *et al.* 1984), stieß jedoch auf wenig Interesse. Erst im Jahr 2000 wurden weitere Einsätze von Enzymen in ionischen Flüssigkeiten publiziert (Erbeldinger *et al.* 2000; Lau *et al.* 2000). Es zeigte sich, dass etwa bei der Synthese von Z-Aspartam durch Thermolysin in der ionischen Flüssigkeit [BMIM][PF₆] die Aktivität, Stabilität und Selektivität des Enzyms verbessert werden konnte (Erbeldinger *et al.* 2000). Auch der Einsatz ganzer Zellen in ionischen Flüssigkeiten wurde erstmals in diesem Jahr dargestellt (Cull *et al.* 2000).

Von diesem Zeitpunkt an gab es zahlreiche Publikationen und Patente über Enzyme oder ganze Zellen in ionischen Flüssigkeiten. Sie wurden als Lösungsmittel, als Kosolventien oder als Zusatz zur Verbesserung der Aktivität, Stabilität oder Selektivität eingesetzt. Die meisten dieser Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einsatz ionischer Flüssigkeiten der zweiten Generation, aber auch ionische Flüssigkeiten der dritten Generation finden immer mehr Anklang (Dominguez de Maria 2012). In den ersten Jahren befasste sich die Forschung verstärkt mit dem

Einsatz von Hydrolasen in mit ionischen Flüssigkeiten angereicherten Medien (Kohlmann und Greiner 2012). Es zeigte sich jedoch, dass viele Enzyme in einem weiten Spektrum an ionischen Flüssigkeiten aktiv sind und kaum eine ionische Flüssigkeit vorhanden ist, die von keinem der Enzyme toleriert wird (van Rantwijk *et al.* 2003; van Rantwijk und Sheldon 2007).

Die Vorteile, die sich allgemein beim Einsatz von Enzymen in ionischen Flüssigkeiten zeigen, sind nach Moniruzzaman (Moniruzzaman *et al.* 2010):

- variable chemische Eigenschaften
- in manchen Fällen wird die Prozess- und Thermostabilität verbessert
- verbesserte Löslichkeit für schwer lösliche Substanzen
- mögliche Änderung der Substratspezifität
- einfaches Enzymrecycling
- einfache Produktaufarbeitung durch Verdampfung oder Auswaschung mit unpolaren Lösungsmitteln
- Unterdrückung von wasserabhängigen Seitenreaktionen
- Enzymimmobilisierung in hoch viskosen ionischen Flüssigkeiten möglich

Wird der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Selektivität von Biokatalysatoren betrachtet, sind einige Beispiele zu finden. So konnte die Selektivität zweier Lipasen durch die Anwesenheit von ionischen Flüssigkeiten um den Faktor 25 gesteigert werden (Kim *et al.* 2001) sowie eine Steigerung der Selektivität im Vergleich zur Selektivität in organischen Lösungsmitteln erreicht werden (Park und Kazlauskas 2001; Nara *et al.* 2004). Auch die Stabilität der Enzyme kann durch ionische Flüssigkeiten positiv beeinflusst werden, z.B. im Fall von Proteasen, bei denen der Einfluss der verschiedenen ionischen Flüssigkeiten mit der Hofmeister-Reihe korreliert (Zhao 2005; Zhao *et al.* 2006). Beschrieben werden auch Einflüsse ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität verschiedener Enzyme. Zum einen finden sich Belege, dass der ee reduziert wird bzw. unbeeinflusst bleibt (Howarth *et al.* 2001; Itoh *et al.* 2004), zum anderen ist auch eine Verbesserung der Stereoselektivität durch Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten möglich. Besonders für Lipasen scheint durch die Zugabe von ionischen Flüssigkeiten die Stereoselektivität verbessert zu werden (Schöfer *et al.* 2001; Pilissao und Nascimento 2006).

Ionische Flüssigkeiten müssen für ihren Einsatz an den jeweiligen Prozess angepasst werden (Ke *et al.* 1996). Hierbei ist zu beachten, dass der Einfluss von ionischen Flüssigkeiten auf Biotransformationen scheinbar nicht auf eine oder

wenige Eigenschaften wie etwa logP o.ä. reduziert und erklärt werden kann (van Rantwijk und Sheldon 2007). Aus diesem Grund sind generelle Trends nicht identifiziert worden (Roosen *et al.* 2008).

Dennoch werden ionische Flüssigkeiten häufig als Kosolventien in wässrigen biokatalytischen Prozessen eingesetzt. In vielen Fällen zeigte sich eine bessere Stabilität der Enzyme im Vergleich zu klassischen Kosolventien, wie z.B. DMSO (Gorke *et al.* 2010; Moniruzzaman *et al.* 2010; Dominguez de Maria und Maugeri 2011). Hierbei ist es wichtig anzumerken, dass durch den Einsatz von ionischen Flüssigkeiten in wässrigen Systemen in den meisten Fällen ein Verlust der ionischen Interaktion einhergeht (Dominguez de Maria 2012).

3.2.1.1 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf ThDP-abhängige Enzyme

Bisher wurden die meisten Studien zum Einsatz von unkonventionellen Medien mit ThDP-abhängigen Enzymen unter Zugabe von organischen Lösungsmitteln durchgeführt (I.3.1.3.1). Nur die *PfBAL* sowie die *PpBFDH281A* wurden in Anwesenheit einiger ionischer Flüssigkeiten charakterisiert (Kokova 2008). Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der *PfBAL* kann durch die ionischen Flüssigkeiten Ecoeng 21M und Ecoeng 1111P bezüglich ihrer Benzoinbildungs-Aktivität gesteigert werden, während die Stereoselektivität der Benzoinsynthese weder für die *PfBAL* noch für die *PpBFDH281A* beeinflusst wird. Die Stereoselektivität für das HPP-Produkt wurde sowohl durch die ionischen Flüssigkeiten als auch durch organische Lösungsmittel in der *PfBAL* gesteigert, wohingegen die *PpBFDH281A* lediglich in Anwesenheit von ionischen Flüssigkeiten selektiver wurde. Der unterschiedliche Einfluss auf die Stereoselektivität der HPP-Produktion wurde durch minimale strukturelle Unterschiede in der S-Tasche (I.2.4) der Enzyme erklärt, welche die Bindung des Akzeptoraldehyds beeinflussen (Kokova 2008).

II. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Wie in Kapitel I beschrieben, ist es heute möglich, Enzyme durch eine *in vitro* beschleunigte Evolution an einen gewünschten Prozess anzupassen. Dabei werden Enzyme auch unter Konditionen eingesetzt, die lange Zeit nicht als optimale Medien für Biokatalysatoren galten. Hierzu gehören organische Lösungsmittel und ionische Flüssigkeiten. Um Enzyme zu entwickeln, die an den Einsatz in diesen unkonventionellen Medien angepasst sind, ist es von entscheidender Bedeutung, die Einflüsse dieser Lösungsmittel in Bezug auf Aktivität, Selektivität sowie Stabilität zu verstehen. Die biochemischen sowie strukturell gut charakterisierten Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Lyasen stellen ein geeignetes System für umfassende Untersuchungen dar. Bislang fehlt ein globales Verständnis sowie ein Erklärungsansatz zum Einfluss unkonventioneller Medien auf diese Enzyme, da sich initiale Arbeiten zu diesem Thema lediglich auf die Synthese von einzelnen Produkten mit maximal zwei Vertretern dieser Enzymgruppe beschränkten.

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten auf die bimolekulare Carboligation verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme umfassend zu untersuchen. Der Fokus liegt dabei auf einer möglichen Beeinflussung der ausgewählten Additive hinsichtlich Änderungen der Chemo- und Stereoselektivität unter stets gleichbleibenden experimentellen Bedingungen. Hierbei wurde als Modellreaktion die Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd gewählt. Der Vorteil dieser Reaktion ist die mögliche Synthese von vier verschiedenen Produkten in jeweils beiden enantiomeren Formen. Je nach Selektivität der Enzyme in wässriger Umgebung erlaubt dieser Ansatz innerhalb der Chemo- und Stereoselektivität vielfache Verschiebungen. Das Verhalten von sechs ThDP-abhängigen Enzymen in Kombination mit 13 verschiedenen organischen Lösungsmitteln und 14 ionischen Flüssigkeiten in unterschiedlichen Konzentrationen wurde mittels instrumenteller Analytik detailliert erforscht.

Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, den Einfluss von organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten auf ThDP-abhängige Enzyme zu detektieren, wenn möglich Trends zu identifizieren und diese erklären zu können.

III. MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	ID	Bezugsquelle
(2-Hydroxyethyl)trimethylammonium dimethylphosphat	IL-8	Solvent innovation (heute Merck Chemicals)
Ammoeng 100 (C1EG)	IL-1	IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH
Ammoeng 101	IL-2	Solvent innovation (heute Merck Chemicals)
Ammoeng 102 (T2EG)	IL-3	IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH
Ammoeng 112 (P51P)	IL-4	Evonik Goldschmidt GmbH*
Ecoeng 110 (1-Ethyl-3-Methylimidazolium methansulfonat)	IL-5	Solvent innovation (heute Merck Chemicals)
Ecoeng 2111P (1-Ethyl-3-Methylimidazolium dimethylphosphat)	IL-6	Solvent innovation (heute Merck Chemicals)
Ecoeng 2122P (1-Ethyl-3-Methylimidazolium diethylphosphat)	IL-7	Solvent innovation (heute Merck Chemicals)
Tris-(2-Hydroxyethyl)-Methylammoniummethylsulfat	IL-9	Sigma-Aldrich

* Diese ionische Flüssigkeit wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. Schwab (Evonik Goldschmidt GmbH) als Muster zur Verfügung gestellt.

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von den Firmen Fluka (Steinheim, Deutschland, heute Sigma Aldrich Chemie GmbH), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

1.2 Geräte

Tabelle 3: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Autoklav	Systec	Systec DX-65
Dünnschicht-chromatographie-Folie	Merck	DC Kieselgel 60 F ₂₅₄
Dünnschicht-chromatographie-Platte	Merck	PLC Kieselgel 60 F ₂₅₄ 0,5 mm
Faltenfilter	Schleicher & Schüll	S&S Faltenfilter, 595½, ø 125 mm
Feinwaage	Sartorius	Analytic AC 210P
Flüssigchromatograph	Amersham Biosciences	
Fraktionssammler	LKB Bromma	2070 ULTRORAC® II
GC-Säule	CS Chromatographie	FS-Cyclodex beta-I/P
GC-System	Agilent Technologies	6890N Network GC system
Gefriertrockner	Christ	Alpha 2-4
HPLC-Autosampler (achiral)	Dionex	ASI-100 Automated Sample Injector
HPLC-Autosampler (chiral)	Dionex	GINA 50
HPLC-Degaser (chiral)	Gynkotec	Degasys DG 1310
HPLC-Detektor (achiral)	Dionex	UVD170U
HPLC-Detektor (chiral)	Dionex	UVD170U
HPLC-Ofen (achiral)	Thermotechnic Products GmbH	Column-Thermostat Jetstream II Plus
HPLC-Ofen (chiral)	Jasco	
HPLC-Pumpe (achiral)	Dionex	P680 HPLC Pump
HPLC-Pumpe (chiral)	Gynkotec	High-precision pump model 480
HPLC-Säule (achiral)	Merck	Hibar® 250-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm)
HPLC-Säule (chiral)	Daicel Chemical IND	Chiralpak IC, 4,6 x 250 mmL (5µm)
HPLC-Säule (chiral)	Agilent	Chiracel OD-H
Kühlaggregat	Lauda	RC6 CS Lauda
Magnetrührer	IKA Labortechnik	IKAMAG RET-G
Mikrotiterplatten-Verschlussfilm	Roth	Rotilabo®-Verschlussfilm für Mikrotiterplatten aus Polyester
Millipore Anlage	Millipore Corporation	Milli-Q
pH-Elektrode	Nordantec GmbH	pH Elektrode pH 0-14, 0-60 °C, IJ44
pH-Meter	Metrohm	691 pH Meter
Pipetten	Eppendorf	Research
PMMA Einmal-Küvetten	Brand	Plastibrand® 1,5 mL halbmikro
PP-Mikrotiterplatte	greiner bio-one	PP-Microplate, sterile 96 Well, F-bottom
PS-Mikrotiterplatten	greiner bio-one	96 Well Microplate, PS, F-bottom
Quarzglas Küvetten	Hellma	QS 10,00 mm
Quarzglas Mikrotiterplatten	Hellma	QG
Rotationsverdampfer	Büchi	Rotavapor R-114
Rotationsverdampfer-Bad	Büchi	Waterbath B-480
Rotationsverdampfer-Vakuumpumpe	Büchi	Vac® V-513
Rotor (Hettich Zentrifuge)	Hettich Zentrifugen	4x130 g, RPM 400, 1624
Schüttelinkubator	Infors HAT	Multitron Standard

1.5 Computerprogramme

ChemBioOffice 2010	Zeichnung chemischer Formeln und Gleichungen
Microsoft Office 2010	Datenauswertung, Präsentation
Origin 8.5	Datenpräsentation
Mestrec23	Analyse von NMR Rohdaten

2 Methoden

2.1 Chemische Methoden

2.1.1 Destillation des Benzaldehyds

Bei der Lagerung von Benzaldehyd kann es zur Bildung des Oxidationsprodukts Benzoesäure kommen. Auch wenn die Aldehydentnahme stets unter Argon durchgeführt worden ist, konnte mittels GC-MS (III.2.3.4.2) gezeigt werden, dass in einigen Fällen eine Verunreinigung des Benzaldehyds durch Benzoesäure vorlag. Vorbeugend wurde das zu verwendende Substrat Benzaldehyd destilliert, um eine höhere Reinheit zu erlangen und keine Nebensubstanzen in die enzymatische Reaktion einzusetzen. Da Benzaldehyd einen Siedepunkt von 179 °C hat und der der Benzoesäure bei 250 °C liegt, sind diese Substanzen durch Destillation sehr gut voneinander zu trennen. Die verunreinigte Benzaldehydlösung wurde in einem Rundkolben vorgelegt und in einem Ölbad erhitzt. Auf dem Rundkolben wurde eine kurze Vigreux-Kolonnen mit Thermometer befestigt. Die Vakuumpumpe wurde vor dem Ansaugen von Substanzen durch eine Kühlfalle mit Stickstoffkühlung geschützt. Je nach Stärke des Vakuums konnte Benzaldehyd bei einer Kopftemperatur von 60 – 110 °C destilliert werden. Die Reinheit des Destillats wurde durch NMR-Messungen überprüft. Demnach konnte Benzoesäure vollständig entfernt werden.

2.1.2 Löslichkeit von Benzaldehyd in wässrigem Puffer

Zur Bestimmung der Löslichkeit von Benzaldehyd in wässrigem Puffer bei niedrigen Temperaturen wurde bei Raumtemperatur (RT ~ 20 °C) eine 18 mM Benzaldehydlösung in TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 7,5) hergestellt. Diese Lösung wurde auf zwei Eppendorff-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Ansatz wurde bei Raumtemperatur, der zweite bei 5 °C im Kühlschrank für 24 h inkubiert. Um eventuelle Mikrotropfen von ungelöstem Benzaldehyd pelletieren zu können,

wurden beide Proben nach Inkubation zentrifugiert und zügig 200 µL aus dem oberen Flüssigkeitsbereich entnommen. Im Anschluss daran wurden die beiden Lösungen gut durchmischt und erneut 200 µL entnommen. Diese vier Proben wurden auf der achiralen HPLC (III.2.3.3.1) vermessen, um festzustellen, ob sich die Löslichkeit bei Raumtemperatur und 5 °C unterscheidet. Ein Löslichkeitsunterschied konnte nicht festgestellt werden.

2.1.3 Löslichkeit organischer Lösungsmittel in wässrigem Puffer

Die Löslichkeitsgrenzen, gerade für die nicht vollständig mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wurden im Vorfeld für die Mischung mit Puffer untersucht. Dazu wurden für jedes Lösungsmittel Konzentrationsreihen mit steigendem Lösungsmittelanteil in KPi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 7,0) und TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 8,0) hergestellt. Basierend auf den maximalen Löslichkeiten, der nicht vollständig mischbaren organischen Lösungsmittel in reinem Wasser wurden sinnvolle Konzentrationsreihen der Lösungsmittel in Puffer hergestellt. Für die in reinem Wasser vollständig mischbaren Lösungsmittel wurden Volumenanteile von 10, 50 und 95 % (v/v) angesetzt. Jeder Ansatz wurde gründlich gemischt und für mindestens 16 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze visuell auf Zweiphasigkeit überprüft und ggf. weitere eingrenzende Konzentrationsreihen zur Bestimmung der Löslichkeit erstellt.

2.1.4 Dichtebestimmung der organischen Lösungsmittel/ Wasser-Gemische

Für die computergestützte Modellierung der Carboligation ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme (III.2.4.2) musste die Dichte der Lösungsmittelgemische der organischen Lösungsmittel mit wässrigem Puffer bestimmt werden. Dazu wurden die Gewichte der Mischungen mittels einer Analysenwaage und das Volumen der Mischung in einem Standzylinder bestimmt, um die Dichte als Masse/Volumen berechnen zu können.

2.1.5 Beständigkeitsstudien von Kunststoffen gegenüber Additiven

Um Hochdurchsatzanalytik in Mikrotiterplatten durchführen zu können, wurde die Beständigkeit von Kunststoff-Mikrotiterplatten (96-well, greiner bio-one) aus Polystyrol (PS) und Polypropylen (PPL) gegenüber allen eingesetzten

Lösungsmitteln untersucht. Hierfür wurden in je 8 Vertiefungen (*wells*) 100 µL reines Lösungsmittel pipettiert und die Mikrotiterplatten mit Verschlussfilm (Roth) aus Polyester abgedichtet. Obwohl nicht angenommen wurde, dass diese Folien alle Lösungsmittel zurückhalten, wurde erprobt, inwieweit sie sich eignen, um die Verdunstung der Lösungsmittel zu reduzieren. Es folgte eine Inkubation von mindestens 16 h bei 30 °C. Waren beide Plattenarten nicht beständig gegenüber den Lösungsmitteln konnten Mikrotiterplatten aus Quarzglas eingesetzt werden. Letztere sind Lösungsmittel-stabil, müssen aber nach jedem Test gereinigt werden, weshalb Mikrotiterplatten aus Plastik, wenn möglich, zu bevorzugen sind.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Beständigkeit von Mikrotiterplatten aus Polypropylen (PPL) und Polystyrol (PS) gegenüber organischen Lösungsmitteln. Inkubation für mind. 16 h bei 30 °C, Einsatz von reinem Lösungsmittel. - : keine Beständigkeit, +: Beständigkeit, n.b.: nicht bestimmt

Lösungsmittel	Beständigkeit (bei 30 °C) gegenüber	
	PS	PPL
1,4-Dioxan	-	+
Aceton	-	+
Dichlormethan (DCM)	-	+
Diisopropylether (DIPE)	-	+
Dimethylsulfoxid (DMSO)	+	+
Ethanol (EtOH)	+	+
Ethylacetat (EtOAc)	-	+
Isopropanol (<i>i</i> Prop)	+	+
4-Methyl-pentan-2-on (MIBK)	-	+
<i>tert</i> -Butylmethylether (MTBE)	-	+
Trichlormethan (TCM)	-	+
Tetrahydrofuran (THF)	n.b.	+
2-Methyltetrahydrofuran (MTHF)	n.b.	+

Der Einsatz von PS-Mikrotiterplatten war nur in Kombination mit den Lösungsmitteln Ethanol (EtOH), DMSO und Isopropanol (*i*Prop) möglich. Alle anderen Lösungsmittel konnten in PPL-Mikrotiterplatten verwendet werden. Für den längeren Einsatz von Lösungsmitteln wie Diisopropylether (DIPE) standen zudem Mikrotiterplatten aus Quarzglas zur Verfügung. Obwohl die getesteten PPL-Platten über 16 h stabil waren, garantiert der Hersteller keine Beständigkeit gegenüber diesem Lösungsmittel.

Die eingesetzten ionischen Flüssigkeiten (Abbildung 7) konnten alle in Kombination mit den einfachen PS-Mikrotiterplatten verwendet werden.

2.1.6 Herstellung gesättigter Lösungen mit organischen Lösungsmitteln

Für die Herstellung gesättigter Lösungen von Puffer und organischem Lösungsmittel wurden Puffer und Lösungsmittel in einem Scheidetrichter kräftig durchmischt. Nach der Phasentrennung wurden beide Phasen separat aufgefangen. Die entstandene Interphase wurde verworfen.

2.1.7 Trocknung von Lösungsmitteln und Syntheseprodukten

Lösungsmittel nehmen bei längerem Kontakt mit der Luft geringe Anteile an Wasser auf und müssen daher je nach Anwendungsanforderungen getrocknet werden. Um dies zu erreichen, wurde Natriumsulfat (oder Magnesiumsulfat) zu der zu trocknenden Flüssigkeit gegeben und ca. 30 min in einem verschlossenen Glaskolben gerührt. Mit Hilfe eines Faltenfilters wurde das Trocknungsmittel abgetrennt. Im Falle der Trocknung von Syntheseprodukten, wurde das Trocknungsmittel im Anschluss nochmals mit wasserfreiem Lösungsmittel nachgewaschen, um die Produktausbeute bei der Aufarbeitung zu erhöhen.

2.1.8 Abtrennen von Lösungsmitteln mittels Rotationsverdampfer

Organische Lösungsmittel aus verschiedenen Ansätzen, z.B. bei der Herstellung der Referenzprodukte (III.2.1.11) wurden mittels Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (MTBE bei 560 mbar und 40 °C, Cyclohexan bei 235 mbar und 40 °C, DCM bei atmosphärischem Druck und 40 °C) entfernt. Sollte die Probe nicht nur von ihrem Volumen her eingeeengt, sondern vollständig getrocknet werden (wie im Falle der HPP (III.2.1.11.2, III.2.2.5)- oder PAC (III.2.1.11, III.2.2.6)- Reinigung), so wurde im Anschluss für mehrere Stunden mit maximalem Vakuum (ca. 10-20 mbar bei 40 °C) Lösungsmittel entzogen.

2.1.9 Karl-Fischer-Titration

Zur Bestimmung des Wassergehalts von ionischen Flüssigkeiten wurde eine Karl-Fischer-Titrationsanlage (665 Dosimat, 718 STAT Titrino, 728 Stirrer) der Firma Metrohm (Filderstadt, Deutschland) verwendet. Die beiden Lösungen zur Bestimmung des Wassergehalts waren „Hydranal Solvent“ und „Hydranal Composite 2“ der Firma Riedel-de Haën (Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH).

um eine Endpunktbestimmung, mit der lediglich die Bildung von 2-Hydroxyketonen nach einer bestimmten Reaktionszeit nachgewiesen werden kann. Es kann keine Aussage über Produktmischungen, die Konformation der gebildeten Produkte bzw. deren Stereochemie gemacht werden.

Zur Dokumentation wurden unmittelbar nach Zugabe der TTC-Lösung Fotos angefertigt bzw. die Mikrotiterplatte gescannt. Entsprechendes wurde nach einer, fünf und zehn Minuten wiederholt.

2.1.11 Synthese von Referenzprodukten

2.1.11.1 Reinigung von (*R*)-PAC aus einer Hefefermentation

Laufmittel 90 % (v/v) Cyclohexan
 10 % (v/v) Ethylacetat

In der Firma BASF wurde das 2-Hydroxyketon Phenylacetylcarbinol (PAC) mittels Hefefermentation synthetisiert. Diese Probe enthielt neben PAC zusätzliche Verunreinigungen von HPP, Benzaldehyd, Benzylalkohol, Benzoesäure und Benzoin, weshalb eine Reinigung unumgänglich war.

Um die Benzoesäure von den anderen Komponenten zu trennen, wurde die Probe zunächst basisch extrahiert. Dazu wurden 10 mL der BASF-Probe in 15 mL Dichlormethan (DCM) gelöst und gegen 120 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde gesammelt und die wässrige weitere viermal mit je 15 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet (III.2.1.7), um dann unter vermindertem Druck eingeengt zu werden (III.2.1.8).

Im Anschluss wurde eine Destillation durchgeführt, um Benzaldehyd und den Benzylalkohol zu entfernen. Mit dem Destillationsrückstand wurde anschließend eine säulenchromatographische Reinigung vorgenommen (III.2.3.2). In diesem Schritt wird Benzoin von dem gewünschten PAC abgetrennt (Petrolether/ Ethylacetat 90:10).

2.1.11.2 Synthese von racemischem HPP

Nach dem Protokoll von Chen *et al.* wurde racemisches HPP synthetisiert (Chen *et al.* 2008). Abweichend von diesem Protokoll wurde das Rohprodukt durch Säulen-chromatographie (III.2.3.2, Petrolether/Ethylacetat = 90:10) gereinigt. Das so aufgearbeitete 2-Hydroxyketon konnte mit einer Ausbeute von 31 % gewonnen werden (Sehl *et al.* 2012).

2.1.11.3 Zugang zu Acetoin und Benzoin

Die beiden Selbstligationsprodukte Acetoin und Benzoin sind kommerziell erhältlich (Sigma Aldrich).

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Aufschluss von *E. coli* Zellen

Vor der Reinigung rekombinanter Proteine (III.2.2.3) mussten die fermentierten Zellen (aus früheren Arbeiten vorhanden, Kultivierung und Reinigung: *PfBAL* (Schwarz 2011), *PpBFD/PpBFDH281A* (Iding *et al.* 2000), *LlKdcA* (Gocke *et al.* 2007a), *ApPDC/ApPDCE469G* (Rother *et al.* 2011)) des gewünschten Enzyms aufgeschlossen werden. Es wurden ca. 15 g Zellen für eine Reinigung verwendet. Dazu wurde eine 10 – 20 %ige Suspension in Kpi-Puffer hergestellt und unter Rühren gelöst. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit 1 mg/mL Lysozym unter Rühren auf Eis. Daran schloss sich die Ultraschallbehandlung an. Die Zellsuspension wurde 4 x 5 min (Sonotrode SD14) mit je 5 min Pause auf Eis beschallt. Alternativ wurde eine Durchflusszelle verwendet, welche kontinuierlich beschallt werden konnte.

Im Anschluss wurde der enzymhaltige Rohextrakt durch Zentrifugation (45 min, 18000 Upm, 4 °C, SS34) von den Zelltrümmern getrennt.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Lösungen Coomassie Brilliant Blau G250 100 mg/L
 Ethanol p.a. 50 mL/L
 Phosphorsäure (85 %) 100 mL/L

Für einen Liter Lösung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 mL EtOH gelöst. Nach Zugabe von 100 mL Phosphorsäure, rührte die Lösung mindestens 1 h. Anschließend wurde die Mischung mit Wasser auf 1 L aufgefüllt und aufgeköcht. Nach der Filtration der Bradford-Lösung, konnte sie im Dunkeln gelagert oder verwendet werden.

Die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe wurde relativ zum Proteingehalt bekannter Proben mit Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine Kalibriergerade mit BSA aufgenommen.

Anhand der Absorptionen der unbekannt Probe mit der Bradford-Lösung kann der Proteingehalt über die Geradengleichung der Kalibriergerade bestimmt werden.

2.2.3 Reinigung von rekombinanten Proteine

2.2.3.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC, Porath *et al.* 1975; Sulkowski 1985)

Ni²⁺-NTA-Reinigung *ApPDC/ApPDCE469G* (pH 6,5)
 PpBFD/PpBFDH281A (pH 6,5)
 L/KdcA (pH 6,5)
 PfBAL (pH 6,5)

Aufschlusspuffer 50 mM Kaliumphosphatpuffer (Kpi-Puffer)
 0,1 mM Thiamindiphosphat (ThDP)
 2,5 mM Magnesiumsulfat

Äquilibrierungspuffer 50 mM Kpi-Puffer

Waschpuffer 50 mM Kpi-Puffer
 50 mM Imidazol

Elutionspuffer 50 mM Kpi-Puffer
 250 mM Imidazol

Unabhängig von dem benötigten pH-Wert wurde der Elutionspuffer auf einen Wert von pH 7,5 eingestellt, um das Imidazol zu deprotonieren und eine bestmögliche Verdrängung des Zielproteins aus der Ni²⁺-NTA-Matrix zu erreichen.

Entsalzungspuffer 10 mM Kpi-Puffer
 0,1 mM ThDP
 2,5 mM Magnesiumsulfat

Alle Puffer wurden über eine Vakuumpumpe (IImvac) sterilfiltriert (0,2 µm Membranfilter, Sartorius) und in einem Ultraschallbad (15 min) entgast. Alternativ

wurden einige Puffer durch Sättigung mit Argon entgast. Durch die Filtration und die Entgasung wurden kleine Partikel und Luftblasen entfernt, die sich im chromatographischen System festsetzen, die Detektion behindern und das Säulenmaterial verunreinigen könnten.

Zu Beginn einer Reinigung wurde die Ni²⁺-NTA-Säule (~35 mL, Ni-NTA Superflow, Qiagen) mit Äquilibrierungspuffer gespült. Anschließend wurde der Rohextrakt mithilfe eines Superloops aufgetragen. Nach Bindung des Zielproteins an die Ni²⁺-NTA-Matrix konnten ungebundene Proteine mit Äquilibrierungspuffer ausgewaschen werden (Durchlauf). Durch die anschließende Elution mit Waschpuffer incl. geringer Imidazolkonzentration (50 mM) wurden unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) von der Matrix verdrängt. An diese Reinigung schloss sich eine Entsalzung durch Größenausschlusschromatographie an, um das Imidazol aus der Proteinfraction zu entfernen.

2.2.3.2 Entsalzung des Eluats nach IMAC

Zur Entsalzung des Eluats aus der IMAC wurde eine Sephadex[®] G-25-Säule (GE healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Entsalzungspuffer äquilibriert. Nach dem Auftrag der Probe wurde bis zur Elution des Proteins mit Entsalzungspuffer gespült. Die zurückgehaltenen Salze konnten anschließend alternativ zum Puffer auch durch 20 % (v/v) Ethanol_{tech.} eluiert werden, um die Säule simultan zu konservieren.

Alternativ zur Entsalzung über die Größenausschlusschromatographie wurde die Ultrafiltration mithilfe einer Amiconzelle (amicon Millipore) durchgeführt. Hierbei wird das Zielprotein durch eine Membran passender Porengröße (z.B. 30 kDa Ausschlussvolumen. Das kleinste verwendete Enzym *L/KdcA* hat ein Molekulargewicht von 146 kDa) zurückgehalten und durch Austausch der Pufferlösung und anschließender Volumenreduktion schrittweise verdünnt und damit entsalzt.

2.2.4 Gefriertrocknung und Lagerung von gereinigten Proteinen

Für die Gefriertrocknung wurde die gereinigte und entsalzte Proteinfraction (Konzentration bis max. 1,0 mg/mL) in einer flachen Glasschale bei -20 °C eingefroren (Füllhöhe max. 2 cm). Die Probe musste beim Einbringen in die Gefriertrocknung vollständig gefroren sein, damit das Wasser, welches entzogen

werden sollte, vollständig sublimieren konnte, ohne vorher zu schmelzen. Für gewöhnlich dauerte die Gefriertrocknung ca. 48 h. Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20 °C gelagert. Der Proteingehalt betrug je nach Enzym und Reinigung 10 – 40 %.

2.2.5 Enzymatische Synthese von (S)-HPP durch *PpBFDwt*

Syntheseansatz (15 ml)	18 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
KPi-Puffer	50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 6,5 30 % (v/v) DMSO 15 + 10 mg Enzym-Lyophilisat
Reaktionszeit	ca. 18 h
Bedingungen	30 °C bei 110 Upm schütteln

Alternativ zur chemischen Synthese von HPP (III.2.1.11.2) wurde auch ein enzymatischer Ansatz zur Produktion dieses 2-Hydroxyketons durchgeführt, um enantiomerenreines (S)-HPP zur Etablierung der chiralen Produktanalytik zu erhalten.

Acetaldehyd und Benzaldehyd wurden in 4,5 mL DMSO gelöst (Endkonzentration 18 mM). Anschließend wurde die Lösung mit KPi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,5) auf 15 mL aufgefüllt. Nach Zugabe von 15 mg Enzym-Lyophilisat erfolgte eine Inkubation für mindestens 18 h bei 30 °C und 110 Upm. Nach etwa 10 h wurden noch mal 10 mg Lyophilisat hinzugegeben.

Die Extraktion des gebildeten (S)-HPPs erfolgte mit Ethylacetat. Der Ansatz wurde 1 min gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und die organischen Phasen vereint. Anschließend wurde das Ethylacetat bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt (III.2.1.8, 240 mbar, 40 °C). Die Trennung der gelösten Substanzen erfolgte entweder durch präparative Dünnschichtchromatographie (III.2.3.1.2) oder durch Säulenchromatographie (III.2.3.1.2).

2.2.6 Enzymatische Synthese von (S)-PAC durch ApPDCE469G

Syntheseansatz (15 ml)	18 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
KPi-Puffer	50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 6,5 30 % (v/v) DMSO 15 + 10 mg Enzym-Lyophilisat
Reaktionszeit	ca. 18 h
Bedingungen	30 °C bei 110 Upm schütteln

(S)-PAC wurde zur Etablierung der chiralen Produktanalytik mit der ApPDCE469G Variante hergestellt. Die Produktaufarbeitung erfolgte analog der Reinigung von (S)-HPP (III.2.2.5).

2.2.7 Carboligaseaktivitäts-Screening

2.2.7.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf den TTC-Schnelltest

Bevor die verschiedenen Enzyme im TTC-Schnelltest (III.2.1.10) unter Einfluss organischer Lösungsmittel untersucht werden konnten, musste der Einfluss des jeweiligen Lösungsmittels auf den Farbumschlag untersucht werden. Die Nachweisgrenzen für die möglichen Produkte wurden hierzu unter Einfluss der Lösungsmittel bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluss organischer Lösungsmittel auf den TTC-Test. Angegeben sind die Nachweisgrenzen der vier Carboligationsprodukte (Acetoin, Benzoin, PAC, HPP) in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel. Für die mit Wasser mischbaren Lösungsmittel ist jeweils der 50 %ige Anteil und das reine Lösungsmittel (100 % oLM) angegeben. Im Fall der nicht vollständig mischbaren Lösungsmittel wurden lösungsmittelgesättigte Puffer (ges.) und puffergesättigte Lösungsmittel (ges. K./T.) hergestellt. Alle Grenzen wurden in Kpi (K, 50 mM, pH 7,0, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP) und TEA-Puffer (T, 50 mM, pH 8,0, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP) bestimmt. n.b.: nicht bestimmt; oLM: organisches Lösungsmittel; ges.: gesättigt.

Lösungsmittel	Puffer mit oLM (% (v/v))	Acetoin (mM)	Benzoin (mM)	PAC (mM)	HPP (mM)
Puffer	KPi (0 %)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	TEA (0 %)	0,25	0,25	n.b.	n.b.
1,4-Dioxan	Kpi (50 %)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	TEA (50 %)	0,25	0,25	n.b.	n.b.
	100 % oLM	n.b.	n.b.	0,25	0,5
Aceton	Kpi (50 %)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	TEA (50 %)	0,25	0,25	n.b.	n.b.
	100 % oLM	0,25	0,05	0,05	0,05
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kpi (50 %)	0,25	0,05	0,25	0,05
	TEA (50 %)	0,25	0,05	n.b.	n.b.
	100 % oLM ¹	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Ethanol	Kpi (50 %)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	TEA (50 %)	0,25	0,25	n.b.	n.b.
	100 % oLM	0,05	0,05	0,25	0,25
Isopropanol	Kpi (50 %)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	TEA (50 %)	0,25	0,25	n.b.	n.b.
	100 % oLM	0,05	0,05	0,25	0,5
Dichlormethan	Kpi (ges.)	0,25	0,5	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,25	0,05	n.b.	n.b.
	TEA (ges.)	0,25	0,5	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	0,25	0,5	n.b.	n.b.
Diisopropylether	Kpi (ges.)	0,25	0,5	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,25	0,5	0,25	n.b.
	TEA (ges.)	0,25	0,5	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	0,25	0,5	n.b.	n.b.
Ethylacetat	Kpi (ges.)	0,5	0,5	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,5	0,5	n.b.	n.b.
	TEA (ges.)	0,5	0,5	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	0,5	0,5	n.b.	n.b.
4-Methyl-pentan-2-on (MIBK)	Kpi (ges.)	0,25	0,5	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,25	n.b.	n.b.	n.b.
	TEA (ges.)	0,25	0,5	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	0,25	n.b.	n.b.	n.b.
<i>tert</i> -Butylmethylether (MTBE)	Kpi (ges.)	0,25	0,5	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,25	n.b.	0,25	n.b.
	TEA (ges.)	0,25	0,5	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	0,25	n.b.	n.b.	n.b.
Trichlormethan	Kpi (ges.)	0,25	0,25	0,25	n.b.
	oLM (ges.K) ²	0,25	n.b.	0,25	n.b.
	TEA (ges.)	n.b.	0,25	n.b.	n.b.
	oLM (ges.T) ²	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

¹ 100 % DMSO n.b., da der TTC-Test ab einer Konzentration von 80 vol% DMSO nicht mehr aussagekräftig ist.

² 2-Phasigkeit nach Zugabe der TTC-Lösung

Die unteren Nachweisgrenzen für die möglichen Carboligationsprodukte und somit die Testsensitivitäten werden durch die organischen Lösungsmittel beeinflusst. Eine Erniedrigung der Nachweisgrenze trat nicht auf, jedoch kam es in zahlreichen Fällen zu einer Erhöhung der Detektionsgrenze (z.B. durch Ethylacetat für Acetoin). Diese Erhöhung fiel allerdings so gering aus, dass der TTC-Test dennoch in Anwesenheit aller Lösungsmittel durchgeführt werden konnte. Die einzige Ausnahme bildete DMSO; hier zeigte sich ab einer Konzentration von 80 vol% eine deutliche Beeinflussung des Tests. Da dieses Lösungsmittel allerdings nur bis zu einer Konzentration < 50 vol% eingesetzt wurde, stellte auch dies kein Problem dar. Der Vollständigkeit halber wurden auch die nicht komplett mit Wasser mischbaren Lösungsmittel in ihrer höchsten, möglichen Konzentration auf Testkompatibilität untersucht (hierbei handelt es sich um die mit Puffer gesättigt Lösungsmittel, Tabelle 6, „ges. K“ (mit Kpi-Puffer) und „ges. T“ (mit TEA-Puffer)). Hier zeigte sich allerdings in allen Fällen eine zweite Phase nach Zugabe der TTC-Lösung. Tatsächlich eingesetzt in den enzymatischen Test werden diese Konzentrationen jedoch nicht.

2.2.7.2 Einfluss achiraler ionischer Flüssigkeiten auf den TTC-Schnelltest

Neben den organischen Lösungsmitteln wurde auch der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den TTC-Test untersucht. In diesem Fall wurde allerdings auf den testweisen Einsatz der gemischten Carboligationsprodukte HPP und PAC verzichtet. Außerdem wurden die Analysen lediglich in KPi-Puffer durchgeführt, da sich für die organischen Lösungsmittel gezeigt hatte, dass der Puffer keinen Einfluss auf den TTC-Test hat (Tabelle 6). Die Ergebnisse zur Verschiebung der Nachweisgrenzen für Benzoin und Acetoin sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den TTC-Test. Angegeben sind die Nachweisgrenzen der zwei Carboligationsprodukte (Acetoin, Benzoin) unter Einfluss verschiedener ionischer Flüssigkeiten. Alle Messungen erfolgten in KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP). Die kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten (Abbildung 7, IL-10, IL-11/-12, IL-13/-14) wurden erst im späteren Verlauf der Arbeit aufgenommen und hier nicht mitgeführt.

Ionische Flüssigkeit	Puffer mit IL (% (w/v))	Acetoin (mM)	Benzoin (mM)
Puffer	KPi (0 %)	0,25	0,25
Ammoeng 100 (IL-1)	KPi (9 %)	0,1	0,1
Ammoeng 101 (IL-2)	KPi (9 %)	0,25	0,1
Ammoeng 102 (IL-3)	KPi (9 %)	0,1	0,1
Ammoeng 112 (IL-4) ¹	KPi (9 %)	1	0,5
Ecoeng 110 (IL-5)	KPi (9 %)	1	0,25
Ecoeng 2111P (IL-6)	KPi (9 %)	1	0,25
Ecoeng 2122P (IL-7)	KPi (9 %)	1	0,25
IL-8	KPi (9 %)	1	0,25
IL-9	KPi (9 %)	5	0,5

¹ Ammoeng 112 (IL-4) bewirkt deutliche Hintergrundfärbung des TTC-Tests

Die Sensitivität des TTC-Tests wurde in Gegenwart verschiedener ionischer Flüssigkeiten deutlich beeinträchtigt. Besonders die ionische Flüssigkeit IL-9 erhöhte die untere Nachweisgrenze von Acetoin auf 5 mM. Zusätzlich zur Erhöhung der Nachweisgrenze, zeigte eine der ionischen Flüssigkeiten (Ammoeng 112 (IL-4)) eine Hintergrundfärbung. Diese beiden ionischen Flüssigkeiten reduzierten das Tetrazoliumsalz bereits ohne Zugabe von 2-Hydroxyketonen leicht bis mittelstark (Tabelle 7). Um Farbumschläge nicht mit enzymatischen Umsätzen zu verwechseln, wurde darauf geachtet, dass bei der Verwendung von ionischen Flüssigkeiten im TTC-Test stets eine Kontrolle ohne Zugabe von 2-Hydroxyketonen mitgeführt wurde.

2.2.7.3 TTC-Schnelltest der Carboligation mit organischen Lösungsmitteln

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd 18 mM/180 mM Acetaldehyd + 18 mM Benzaldehyd
Puffer	KPi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 7) TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 8)
Organische Lösungsmittel	0,5 – 50 % (v/v)
Enzymkonzentration	0,1 – 0,4 mg/mL nach Bradford
Reaktionszeit	ca. 18 h
Bedingungen	30 °C bei 50 Upm schütteln, Mikrotiterplatte (PS/PP/Quarzglas) mit 96 Vertiefungen

Zur Untersuchung des Einflusses der organischen Lösungsmittel auf die Carboligaseaktivität der verschiedenen ThDP-abhängigen Enzyme in einem TTC-Schnelltest (III.2.1.10) wurden geeignete Mikrotiterplatten (Materialauswahl je nach Lösungsmittelbeständigkeit) mit 96 Vertiefungen verwendet. Die Lösungsmittelgemische wurden mit KPi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,5) und TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,5) angesetzt. In jede Vertiefung wurden 50 µL Enzymlösung (Endkonzentration im Test: 0,1 – 0,4 mg/mL) und 50 µL Substratlösung pipettiert. Es wurden Substratlösungen in einer Endkonzentration von 18 mM/180 mM Acetaldehyd (zur Analyse der Selbstligation des Acetaldehyds zu Acetoin), 18 mM Benzaldehyd (zur Analyse der Selbstligation des Benzaldehyds zu Benzoin) sowie einem Gemisch aus 18 mM/180 mM Acetaldehyd und 18 mM Benzaldehyd zugesetzt.

Die Ansätze der Lösungsmittel, welche in jedem Verhältnis mit KPi-Puffer bzw. TEA-Puffer mischbar sind, enthielten 10, 20, 30, 40 und 50 % (v/v) Lösungsmittel. Die Ansätze der Lösungsmittel, welche nicht in jedem Verhältnis mit KPi-Puffer bzw. TEA-Puffer mischbar sind, enthielten den Lösungsmittelanteil der Löslichkeitsgrenze in Puffer. Als Referenz dienten Ansätze mit reinem Puffer und zur Kontrolle Ansätze ohne Substratzugabe.

Nach einer Inkubation der Mikrotiterplatte von ca. 18 h bei 30 °C und 50 Upm wurden die gebildeten 2-Hydroxyketone durch Zugabe von 40 µL basischer TTC-Lösung (III.2.1.10) nachgewiesen.

2.2.7.4 TTC-Schnelltest der Carboligation mit ionischen Flüssigkeiten

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd 18 mM/180 mM Acetaldehyd + 18 mM Benzaldehyd
Puffer	KPi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 7) TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 8)
Ionische Flüssigkeiten	1 – 9 % (w/v) ¹
Enzymkonzentration	0,1 – 0,4 mg/mL nach Bradford
Reaktionszeit	ca. 18 h
Bedingungen	30 °C bei 50 Upm schütteln, Mikrotiterplatte (PS) mit 96 Vertiefungen

¹ Aufgrund von vorangegangenen Studien (Magnuson *et al.* 1984; Dreyer und Kragl 2008; Kohlmann *et al.* 2009) war für die ionischen Flüssigkeiten ein Einsatz bis zu einer Konzentration von 9 % (w/v) angedacht.

Um den Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die ThDP-abhängigen Enzyme in einem ersten Schritt grob charakterisieren zu können, wurde analog zum Screening mit organischen Lösungsmitteln (III.2.2.7.3) ebenfalls ein TTC-Schnelltest (III.2.1.10) in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten durchgeführt. Im Fall der ionischen Flüssigkeiten kann die Standard-Mikrotiterplatte aus Polystyrol eingesetzt werden. Die Durchführung des Schnelltests wurde analog zu dem Screening mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt (siehe III.2.2.7.3).

2.2.7.5 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Carboligation

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
Puffer	TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 6,5 – 8,0)
Enzymkonzentration	0,02 - 0,1 mg/mL Endkonzentration
Reaktionszeit	ca. 24 h
Bedingungen	5 – 30 °C bei 550 Upm im Thermomixer

Zur Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen der einzelnen ThDP-abhängigen Enzyme, wurden pH-Studien durchgeführt. Der Carboligationsansatz wurde entsprechend den Standardansätzen in den Tests mit Additiven (III.2.2.7.7, III.2.2.7.8) angesetzt. Der pH-Wert wurde in den Messungen von pH 6,5 – pH 8,0 variiert.

Die Carboligationsansätze zur Ermittlung des pH-Optimums wurden mittels instrumenteller Analytik (III.2.3.3, III.2.3.4) untersucht. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde die Anzahl verschiedener pH-Werte auf ein Minimum reduziert.

Entsprechend den Ansätzen mit den verschiedenen pH-Werten wurden auch Carboligationen bei verschiedenen Temperaturen untersucht, um dadurch eine erhöhte Flexibilität der Enzyme zu induzieren und ihr Verhalten in Bezug auf Chemo- und Stereoselektivität zu beurteilen. Die Ansätze erfolgten analog den Standardansätzen, lediglich die Temperatur wurde variiert. Die Analyse erfolgte mittels instrumenteller Analytik (III.2.3.3, III.2.3.4)

2.2.7.6 Substratkonzentrations-Abhängigkeit der Carboligation

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
Puffer	TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 7,5/pH 8,0)
Enzymkonzentration	0,02 - 0,1 mg/mL Endkonzentration

Reaktionszeit	ca. 24 h
Bedingungen	20 °C bei 550 Upm im Thermomixer

Analog zu der Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme, wurde die Abhängigkeit der Carboligation von der Konzentration der Substrate untersucht. Hier sollten die optimalen Startbedingungen für den Standardansatz für jedes der einzelnen Enzyme festgelegt werden. Aufgrund der Löslichkeitslimitierungen des Benzaldehyds wurde üblicherweise nur die Konzentration des aliphatischen Acetaldehyds variiert.

Die Carboligationsansätze wurden teils mittels instrumenteller Analytik (III.2.3.3, III.2.3.4) und teils mithilfe des TTC-Tests (III.2.1.10) untersucht.

2.2.7.7 Carboligation in Gegenwart organischer Lösungsmittel

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
Puffer	TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 7,5/pH 8,0)
Organische Lösungsmittel	1 – 30 % (v/v) (vgl. Tabelle 18 und Achsenbeschriftungen in den Kapiteln IV.3.1 und IV.4.1)
Enzymkonzentration	0,02/0,1/0,4 mg/mL Endkonzentration
Reaktionszeit	ca. 24 h
Bedingungen	20 °C bei 550 Upm im Thermomixer

Nachdem ein TTC-Schnelltest (III.2.2.7.3) durchgeführt wurde, konnten die Rahmenbedingungen der Detailanalysen festgelegt werden. Daraus ließ sich ableiten, bis zu welcher Lösungsmittelkonzentration das Enzym aktiv ist und welche Lösungsmittel daher für detailliertere Studien eingesetzt werden sollten. Um die Carboligation nicht nur qualitativ durch den TTC-Test beschreiben zu können, sondern auch quantitative Aussagen treffen zu können, wurden Carboligationsansätze mittels instrumenteller Analytik untersucht (III.2.3.3, III.2.3.4).

Alle Reaktionen wurden im 800 µL-Maßstab in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Substrate Benzaldehyd (18 mM Endkonzentration im Test) und Acetaldehyd (18 mM (*Ap*PDC, *Ap*PDCE469G, *Pf*BAL) oder 180 mM (*Pp*BFD, *Pp*BFDH281A, *LK*dca) Endkonzentration im Test) wurden in TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 7,5 (Ausnahme *Pf*BAL pH 8,0)) angesetzt. Eine Enzymlösung von 0,1 mg/mL (Ausnahme *Pf*BAL 0,02 mg/mL) wurde ebenfalls in TEA-Puffer vorbereitet. Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen waren nötig,

um eine bestmögliche Produktbildung für eine verlässliche Produktanalytik zu gewähren. Allerdings war der Standartansatz für die jeweiligen Enzyme immer gleich, d.h. dass der einzige Unterschied in nachfolgenden Experimenten lediglich die Zugabe und Konzentration der verschiedenen Additive war. Wenn die Produktkonzentration zu gering war, um zuverlässige Enantiomerenverhältnisse bestimmen zu können, wurde die Enzymkonzentration im Test auf 0,4 mg/mL angehoben. Die organischen Lösungsmittel wurden entsprechend der gewünschten Endkonzentrationen dem Carboligationsansatz zugegeben.

Die Ansätze wurden zunächst nur in Einfachbestimmung angesetzt, um dann ganze Reihen oder einzelne interessante Reaktionen nochmals als Triplikat zu wiederholen. In seltenen Fällen waren die Ergebnisse nach einer Dreifachbestimmung immer noch unsicher und wurden in Vierfachbestimmung erneut angesetzt. Zu jeder Versuchsreihe wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt (Ansatz ohne Enzym, Ansatz ohne Substrat). Des Weiteren wurde in einem separaten Versuch mit Substrat und ohne Enzym eine Hintergrundaktivität durch den Einsatz organischer Lösungsmittel ausgeschlossen.

Alle Ansätze wurden nach der angegebenen Inkubationszeit mittels achiraler und chiraler HPLC (III.2.3.3) sowie chiraler GC (III.2.3.4.1) analysiert.

2.2.7.8 Carboligation in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Substrate	18 mM/180 mM Acetaldehyd 18 mM Benzaldehyd
Puffer	TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 7,5/pH 8,0)
Ionische Flüssigkeit	1, 2,5 und 9 % (w/v) ¹
Enzymkonzentration	0,02/0,1/0,4 mg/mL Endkonzentration
Reaktionszeit	ca. 24 h
Bedingungen	20 °C bei 550 Upm im Thermomixer

Neben dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Carboligation wurde auch der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme im Detail untersucht. Auf der Grundlage des oben beschriebenen TTC-Tests (III.2.2.7.4) wurden die Konzentrationen für die ionischen Flüssigkeiten ausgewählt. Die Carbo-

¹ Aufgrund von vorangegangenen Studien (Magnuson *et al.* 1984; Dreyer und Kragl 2008; Kohlmann *et al.* 2009) war für die ionischen Flüssigkeiten ein Einsatz bis zu einer Konzentration von 9 % (w/v) geplant.

ligationsansätze waren analog zu denen in Gegenwart organischer Lösungsmittel (III.2.2.7.7).

Auch diese Ansätze wurden in Einzelbestimmungen oder bis zu Vierfachbestimmungen untersucht, wobei die Kontrollen stets mitgeführt wurden (ohne Enzym, ohne Substrat). Eine katalytische Aktivität der ionischen Flüssigkeiten wurde ebenfalls in einem separaten Experiment ausgeschlossen.

2.2.7.9 Carboligation in Gegenwart sonstiger Additive

Neben organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten wurden chirale ionische Flüssigkeiten sowie kleine ionische Flüssigkeiten und ausgewählte Natriumsalze als Additive der enzymatischen Carboligation zugesetzt. Die Ansätze erfolgten analog zu denen mit organischen Lösungsmitteln (III.2.2.7.7) und ionischen Flüssigkeiten (III.2.2.7.8). Die Konzentrationen der Additive variierten. Alle kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten (kclLs) wurden analog den achiralen ionischen Flüssigkeiten in den Konzentrationen: 1, 2,5 und 9 % (w/v) in enzymatische Tests eingesetzt (Ausnahme: IL-12 aufgrund von schlechter Löslichkeit: 0,1, 0,5 und 0,9 % (w/v)).

Die Natriumsalze wurden in den Konzentrationen 0,05, 0,125, 0,5, 1,25 und 4,5 % (w/v) eingesetzt (vgl. Tabelle 19).

Diese Ansätze wurden in Einfach- oder Doppelbestimmungen angesetzt, wobei die Kontrollen stets mitgeführt wurden (ohne Enzym, ohne Substrat). Hintergrundaktivitäten durch den Einsatz sonstiger Additive wurden in Kontrollexperimenten ausgeschlossen.

2.3 Chromatographische Methoden

2.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

2.3.1.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	90 % (v/v) Cyclohexan
	10 % (v/v) Ethylacetat

Die analytische Dünnschichtchromatographie diente zur schnellen Identifizierung der Substrate und Produkte im Extrakt der enzymatischen und chemischen Synthese von PAC und HPP. Die stationäre Phase stellte eine Dünnschichtchromatographie-

Folie aus Aluminium mit Kieselgel 60 F254 (Merck) dar. Die mobile Phase (Laufmittel) setzte sich aus 90 % (v/v) Cyclohexan und 10 % (v/v) Ethylacetat zusammen. Die Dünnschichtchromatographie-Kammer wurde mindestens 1 h äquilibriert, bevor der Extrakt auf die DC-Platte aufgetragen und in die Kammer gestellt wurde. Nachdem das Laufmittel über die Hälfte der DC-Foliengröße hochgestiegen war, erfolgte die Detektion durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$, $R_{f(\text{HPP})} = 0,3$, $R_{f(\text{PAC})} = 0,1$).

2.3.1.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Laufmittel 90 % (v/v) Cyclohexan
 10 % (v/v) Ethylacetat

Die präparative Dünnschichtchromatographie (DC) diente zur Reinigung der Extrakte der enzymatischen Synthesen von HPP und PAC.

Die Dünnschichtchromatographie wurde entsprechend III.2.3.1.1, allerdings mit einer Kieselgelplatte aus Glas durchgeführt. Die Bande mit der Zielsubstanz wurde mit dem Kieselgel von der Glasplatte geschabt. Die Elution der adsorbierten Stoffe aus dem Kieselgel wurde durch fünfminütiges Schütteln in MTBE erreicht. Anschließend wurde das Kieselgel mittels Faltenfilter (Schleicher & Schüll, 120 mm) abfiltriert. Das MTBE mit enthaltender Zielsubstanz wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend entfernt (III.2.1.8).

2.3.2 Säulenchromatographie

Laufmittel 90 % (v/v) Cyclohexan
 10 % (v/v) Ethylacetat

Reichten die Reinigungen durch die präparative DC (III.2.3.1.2) für die Anforderungen nicht aus, so wurde eine Reinigung im größeren Maßstab mithilfe einer Säulenchromatographie durchgeführt. Für das Säulenmaterial wurde Kieselgel (50 g Kieselgel pro g Rohprodukt, 0,063 – 0,2 mm Korngröße, Merck) im Laufmittel aufgeschlämmt und in eine entsprechende Glassäule gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit einem Korkring abgeklopft, um die Packungsdichte zu erhöhen und eingeschlossene Luft zu entfernen. Der zuvor eingeeengte (III.2.1.8) Extrakt wurde auf die Säule gegeben und nach dem Einsinken mit etwas Laufmittel überschichtet. Der kontinuierliche Fluss des Laufmittels durch das Säulenmaterial wurde durch leichten

Druck mittels eines Luftballons oder einer Pumpe beschleunigt. Das Eluat wurde durch einen Fraktionssammler aufgefangen und jede Fraktion mittels analytischer DC (III.2.3.1.1) oder instrumenteller Analytik (III.2.3.3, III.2.3.4) auf enthaltene Substanzen überprüft.

2.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatographie, HPLC*)

2.3.3.1 Achirale HPLC

Trennsäule	LiChrospher® 100 RP-8 5 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland)		
Laufmittel	25 % (v/v) Acetonitril _(aq) , 60 % (v/v) Acetonitril _(aq)		
Programm	0 – 12 min	25 % Acetonitril _(aq)	
	12 – 13 min	Gradient 25 % - 60 % Acetonitril _(aq)	
	13 – 20 min	60 % Acetonitril _(aq)	
	20 – 23 min	Gradient 60 % - 25 % Acetonitril _(aq)	
	23 – 25 min	25 % Acetonitril _(aq)	
Fluss	1 mL/min		
Injektion	20 µL		
Detektion	λ = 200 nm	PAC, HPP, Benzaldehyd, Benzoin	
	λ = 250 nm	HPP, Benzaldehyd, Benzoin	
Retentionszeiten	PAC	11,2 min	(8,8 min)
	HPP	13,6 min	(10,5 min)
	Benzaldehyd	21,0 min	(16,4 min)
	2-Methoxybenzaldehyd	22,0 min	(17,0 min)
	Benzoin	23,6 min	(17,9 min)

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Retentionszeiten einer neuen Säule, die während der Arbeit eingesetzt worden ist.

Die achirale HPLC-Analytik wurde angewendet, um die Produkte und Substrate der Carboligation identifizieren und quantifizieren zu können. Benzaldehyd, Benzoin, HPP und PAC waren hierbei bei 250 nm bzw. 200 nm detektierbar (Abbildung 9).

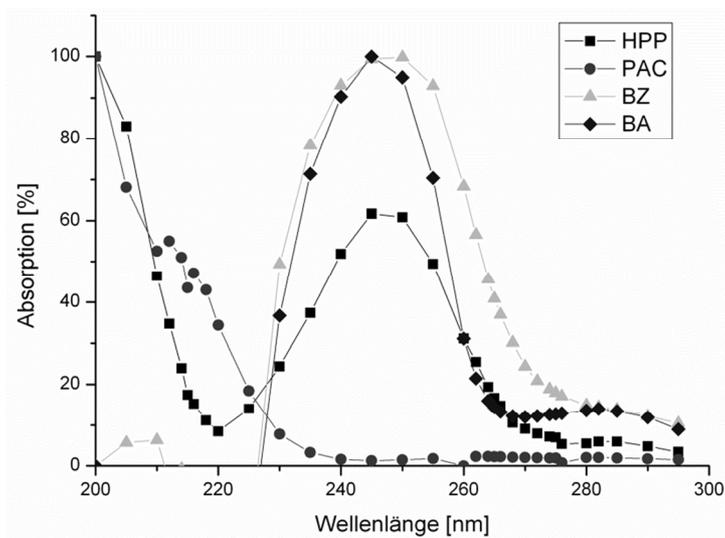


Abbildung 9: Wellenlängenscan der Produkte, welche auf der achiralen HPLC nachgewiesen werden sollten. Da keine reinen HPP- und PAC-Proben vorhanden waren (sie enthielten noch Verunreinigungen aus der Synthese und Aufarbeitung), wurde dieser Wellenlängenscan auf der achiralen HPLC durchgeführt.

Für die Probenvorbereitung wurden 200 μL des Carboligationsansatzes mit 200 μL Acetonitril (inklusive 0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 2-Methoxybenzaldehyd (2-MBA) als interner Standard) vermischt. Anschließend wurde diese Mischung zentrifugiert, um eventuell präzipitiertes Enzym zu pelletieren. 200 μL wurden danach aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein GC-Vial gefüllt. 20 μL dieses Ansatzes wurden injiziert und vermessen.

Die Identifikation und Quantifizierung der einzelnen Substanzen war über eine vorangegangene Kalibrierung mit Referenzsubstanzen möglich. Das achirale HPLC-System wurde mit jeder Substanz mindestens zweimal, unabhängig voneinander, solange kalibriert bis die Standardabweichung der Kalibrierungen weniger als 15 % betrug. Die Kalibrierungen sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

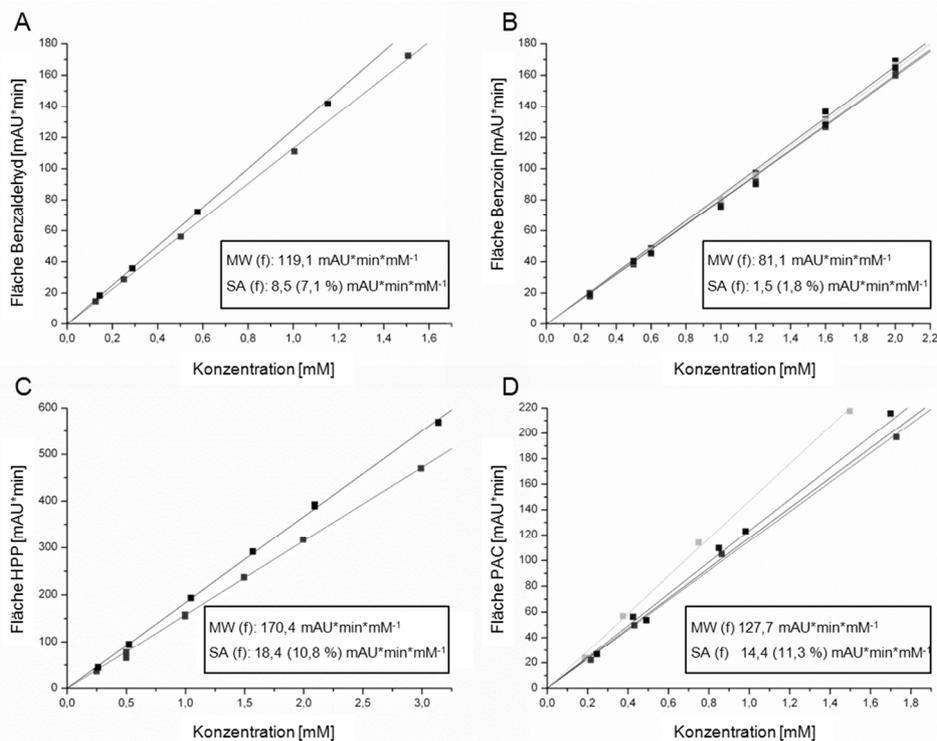


Abbildung 10: Kalibrierungen der achiralen HPLC mit den Substanzen Benzaldehyd (A), Benzoin (B), HPP (C) und PAC (D). Angegeben ist jeweils der Mittelwert (MW) des Umrechnungsfaktors (Steigung der Kalibriergeraden, f) und dessen Standardabweichung (SA) absolut und in Klammern in %. Der Umrechnungsfaktor bezieht sich auf einen mit dem internen Standard korrigierten Wert.

Die angegebenen Umrechnungsfaktoren (Steigungen der Kalibriergeraden) beziehen sich auf einen über den internen Standard korrigierten Wert (Berechnung des korrigierten Werts: Fläche (Substanz)/ Fläche (2-MBA) * Mittelwert der Flächen (2-MBA)). Das heißt, dass zunächst eine Messreihe intern über den Mittelwert der Standardfläche korrigiert wird und dann mithilfe des Umrechnungsfaktors f in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet werden kann (Rechnung: korrigierter Flächenwert/ Umrechnungsfaktor). So wird der Injektionsfehler von Messreihe zu Messreihe korrigiert und die Werte angepasst.

2.3.3.2 Chirale HPLC

Trennsäule	Chiralpak IC, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm/Chiracel OD-H 250 mm x 4,6 mm
Laufmittel	Isopropanol/n-Heptan 25:75
Programm	isokratisch 24 min
Fluss	0,5 mL/min
Injektion	20 µL
Detektion	λ = 200 nm PAC, HPP, Benzaldehyd, Benzoin λ = 250 nm HPP, Benzaldehyd, Benzoin

Retentionszeiten	Benzaldehyd	11,3 min
	(R)-PAC	12,5 min
	(S)-PAC	13,1 min
	(R)-HPP	14,2 min
	(S)-HPP	25,6 min
	(R)-Benzoin	16,8 min
	(S)-Benzoin	17,8 min

In der chiralen HPLC wurden die Enantiomere der Carboligationsprodukte PAC, HPP und Benzoin sowie Benzaldehyd voneinander getrennt. Da diese Analytik nur qualitativ zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*ee*-Werts) herangezogen wurde, war eine Kalibrierung, ebenso wie der Einsatz eines Injektionsstandards für dieses System nicht notwendig.

Für die Probenvorbereitung wurden 200 µL des Carboligationsansatzes mit 200 µL *n*-Heptan/*i*Prop kräftig vermischt. Anschließend wurde diese Mischung zentrifugiert, um die Phasentrennung zu erreichen. 180 µL wurden darauf folgend aus der organischen Phase entnommen und in ein GC-Vial gefüllt. 20 µL dieses Ansatzes wurden injiziert und vermessen.

Zunächst wurde eine Chiracel OD-H-Säule verwendet. Diese ist gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht so robust, wie die anschließend verwendete Chiralpak IC-Säule. Alle Vorversuche wurden mit der Chiracel OD-H vermessen und alle Ansätze zum Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten sind auf der Chiralpak IC durchgeführt worden.

2.3.4 Gas Chromatographie (GC)

2.3.4.1 Chirale GC

Trennsäule	FS-Cyclodex beta- <i>I</i> /P, 50 m x 0,32 mm	
Trägergas	H ₂	
Programm	0 – 5,3 min	75 °C
	10 °C/min	auf 180 °C (3 min halten)
Injektion	1 µL (Split: 50)	
Retentionszeiten	(R)-Acetoin	5,3 min
	(S)-Acetoin	5,6 min
	Decan	7,5 min

Die beiden Enantiomere des Carboligationsprodukts Acetoin wurden auf der chiralen GC detektiert. Für die Probenvorbereitung wurden 200 μL des Carboligationsansatzes mit 200 μL Ethylacetat (incl. 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Decan als interner Standard) kräftig vermischt. Anschließend wurde diese Mischung zentrifugiert, um die Phasentrennung zu erreichen. Anschließend wurden 180 μL aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein GC-Vial gefüllt. 1 μL dieses Ansatzes wurde injiziert und vermessen.

Die Identifikation und die Quantifizierung der einzelnen Enantiomere waren über eine vorangegangene Kalibrierung möglich. Das chirale GC-System wurde mit Acetoin dreimal unabhängig voneinander kalibriert, solange, bis die Standardabweichung der Kalibrierungen untereinander weniger als 15 % betrug. Die Kalibrierungen sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

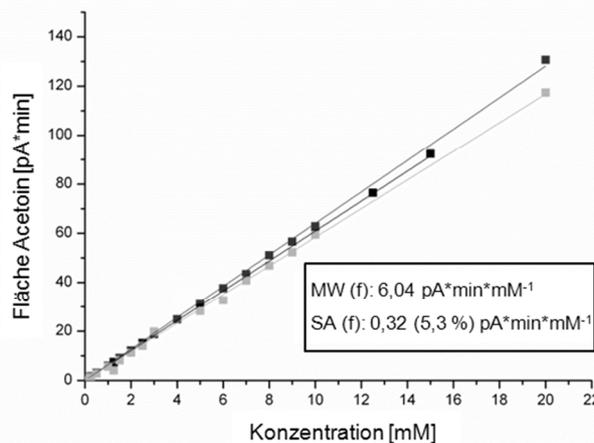


Abbildung 11: Kalibrierungen der chiralen GC mit Acetoin. Angegeben ist der Mittelwert (MW) des Umrechnungsfaktors (Steigung der Kalibriergeraden, f) und dessen Standardabweichung (SA) absolut und in Klammern in %. Der Umrechnungsfaktor bezieht sich auf einen mit dem internen Standard korrigierten Wert.

Der angegebene Umrechnungsfaktor (Steigung der Kalibriergeraden) bezieht sich auf einen über den internen Standard korrigierten Wert (Berechnung des korrigierten Werts: Fläche (Acetoin)/ Fläche (Decan) * Mittelwert der Flächen (Decan)). Der Mittelwert der Standardflächen wurde aus den anderen Werten der Messungen in diesem Durchlauf ermittelt, um dadurch den Fehler der GC-Injektion zu minimieren.

2.3.4.2 Achirale GC-MS

Trennsäule	Agilent HP-5, 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm
Trägergas	Helium
Ofentemperatur	0,5 mL/min
Injektion	1 µL (Split: 100)

Um während einer Synthese die Identität des Produkts bestätigen zu können, wurde ein GC-System (Varian CP 3800) mit gekoppeltem Massenspektrometer (Varian Saturn 2000 MS) verwendet. Durch die Fragmentierung der Moleküle nach der chromatographischen Trennung konnte so z.B. zwischen HPP (Massenpeaks: 51, 77, 105) und PAC (Massenpeaks: 51, 77, 107) differenziert werden. Auch die Qualität des verwendeten Substrats Benzaldehyd (Massenpeaks: 51, 77, 105) wurde mittels GC-MS überprüft, ob es eventuell durch das Oxidationsprodukt Benzoesäure (III.2.1.1, Massenpeaks: 51, 77, 105, 122) verunreinigt war.

2.4 Sonstige Methoden

2.4.1 Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR)

NMR-Spektren wurden in Kooperation mit dem Institut für Bioorganische Chemie (IBOC) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich mit einem Bruker ARX (^1H : 300 MHz; Bruker BioSpin GmbH, Deutschland) von Herrn Dipl.-Ing (FH) Rainer Goldbaum aufgenommen.

2.4.2 Modellierungen der Carboligation in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Die Modellierungen zur Affinität der Substrate und organischen Lösungsmittel zum aktiven Zentrum ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme wurde in Kooperation mit Dr. rer. nat. Marco Bocola aus dem Institut für Biotechnologie der RWTH Aachen unter Verwendung der jeweils aktuellsten Version der Software Yasara durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Festlegung der Rahmenbedingungen zur Untersuchung der Einflüsse von Additiven auf die Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme

1.1 Löslichkeit der Additive in wässrigem Puffer

1.1.1 Löslichkeit organischer Lösungsmittel

Um eventuelle Einflüsse von auftretenden Grenzflächen auf die Enzyme und deren Aktivität auszuschließen, wurden alle Untersuchungen ausschließlich in einphasigen Systemen durchgeführt. Zunächst mussten die Löslichkeitsgrenzen der jeweiligen einzusetzenden organischen Lösungsmittel überprüft werden. Die Löslichkeit wurde in Kpi- und TEA-Puffer untersucht (Tabelle 8), wobei sich TEA-Puffer im weiteren Verlauf der Arbeit als der geeignetere Puffer herausstellte.

Tabelle 8: Löslichkeit der verwendeten organischen Lösungsmittel in Kpi- und TEA-Puffer im Vergleich zu deren Löslichkeit in Wasser. Inkubation mind. 16 h, Kpi-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 7,0), TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 8,0). n.b.: nicht bestimmt.

Lösungsmittel	Löslichkeitsgrenze (%) (v/v) in		
	KPi-Puffer (30 °C)	TEA-Puffer (30 °C)	Wasser (20 °C) ¹
1,4-Dioxan	mischbar	mischbar	mischbar
Aceton	mischbar	mischbar	mischbar
Dichlormethan	1,4	1,4	1,5
Diisopropylether	1,0	1,0	1,3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	mischbar	mischbar	mischbar
Ethanol	mischbar	mischbar	mischbar
Ethylacetat	7,0	7,5	9,6
Isopropanol	mischbar	mischbar	mischbar
4-Methyl-pentan-2-on (MIBK)	1,8	2,0	2,5
<i>tert</i> -Butylmethylether (MTBE)	4,5	4,5	5,7
Trichlormethan	0,4	0,4	0,5
THF	n.b.	n.b.	mischbar
MTHF	n.b.	n.b.	16,4 ²

¹ Löslichkeitsgrenzen n. b., sondern der GESTIS-Stoffdatenbank (Stand März 2010) entnommen.

² aus (Aycock 2006)

Die Löslichkeiten in den beiden Puffersystemen lagen bei nicht vollständig mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln immer unterhalb der publizierten Löslichkeit in

Wasser. Alle wassermischbaren Lösungsmittel waren ebenfalls in den verwendeten Puffern löslich. Die Löslichkeitsgrenzen für das wassermischbare Tetrahydrofuran (THF) und 2-Methyltetrahydrofuran (MTHF) wurden nicht ermittelt, da sie äquivalent zu den bereits publizierten Studien mit der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* (PfBAL) in enzymatische Tests eingesetzt wurden (Shanmuganathan *et al.* 2010).

1.1.2 Löslichkeit ionischer Flüssigkeiten

Bei den ionischen Flüssigkeiten handelte es sich bis auf eine Ausnahme (IL-12, Abbildung 7) um wassermischbare ionische Flüssigkeiten. Eine Bestimmung der Löslichkeitsgrenze musste daher nicht durchgeführt werden.

1.2 Rahmenbedingungen der enzymatischen Anwendung

Nachdem der Einfluss ausgewählter Additive auf das Testsystem analysiert wurde, sollten im weiteren Verlauf die Rahmenbedingungen für den enzymatischen Einsatz festgelegt werden. Hierbei lag der Fokus darauf, bestmögliche Ausgangsbedingungen zu finden, welche eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung der Enzymaktivität bzw. Selektivität zuließen. Dadurch sollte es möglich sein, den möglichen Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten möglichst breit charakterisieren zu können.

1.2.1 pH-Optimum ThDP-abhängiger Carboligation

Zunächst wurde in diesem Rahmen die pH-Abhängigkeit der von ThDP-abhängigen Enzymen katalysierten Carboligation analysiert. Die feinen Abstufungen wurden mittels instrumenteller Analytik (III.2.3) bestimmt.

ApPDCE469G

Beispielhaft ist die pH-Abhängigkeit der Carboligation für die Variante *ApPDCE469G* (I.2.5.1.1) mittels instrumenteller Analytik gezeigt (Abbildung 12).

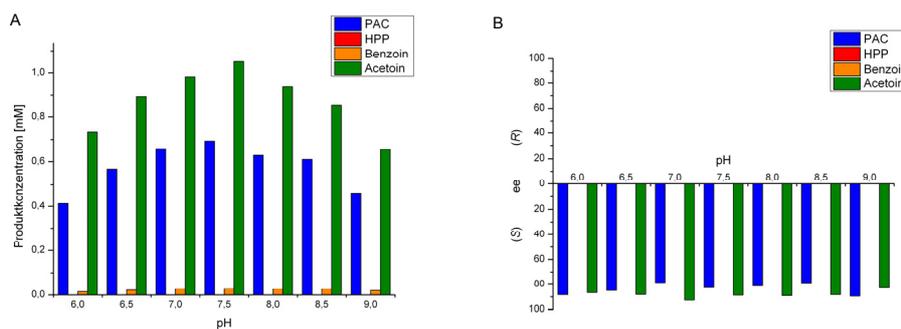


Abbildung 12: *ApPDCE469G*: pH-Optimum mittels instrumenteller Analytik. Reaktionsbedingungen: 18 mM Benzaldehyd, 18 mM Acetaldehyd, Reaktionszeit ca. 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, 20 °C, TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,0 – 9,0).

Hier konnten nun die gebildeten Produkte genau zugeordnet werden. Zudem war es möglich, die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* zu untersuchen (Abbildung 12B). Es zeigte sich, dass nicht über den ganzen pH-Bereich die gleiche Menge an 2-Hydroxyketonen gebildet wurde. Vielmehr findet sich ein Konzentrationsmaximum bei pH 7,5 für das Selbstligationsprodukt Acetoin und das gemischte Produkt PAC (Abbildung 12A). Benzoin wurde nur in sehr geringem Maße produziert und blieb für die Festlegung des pH-Optimums der *ApPDCE469G* unberücksichtigt.

Alle weiteren Vertreter ThDP-abhängiger Enzyme wurden ebenfalls pH-Analysen unterzogen (Abbildung 65 - Abbildung 68). Tabelle 9 fasst alle Ergebnisse zusammen.

Tabelle 9: Verwendeter pH-Wert für die Carboligation von Acetaldehyd und Benzaldehyd durch ThDP-abhängige Enzyme. Bei den angegebenen Werten handelt es sich teils um einen Kompromiss aus Aktivität und Stabilität und teils um eine Anpassung an die anderen Enzyme, um die Zahl der pH-Werte bei den Untersuchungen auf ein Minimum zu beschränken.

Enzym	pH	Referenz
<i>L/KdcA</i>	7,5	Anhang: Abbildung 68
<i>ApPDC</i>	7,5	Anhang: Abbildung 65
<i>ApPDCE469G</i>	7,5	Abbildung 12
<i>PpBFD</i>	7,5	Anhang: Abbildung 67
<i>PpBFDH281A</i>	7,5	Anhang: Abbildung 66
<i>PfBAL</i>	8,0	Stillger 2004

Die angegebenen pH-Optima waren nicht immer direkt aus den einzelnen Analysen abzuleiten. Es kam vor, dass die einzelnen Produkte einer Carboligation mit unterschiedlichen Optima gebildet wurden (z.B. *PpBFDH281A*: HPP-Optimum > pH 8,5, Benzoin-Optimum = pH 6,5, Abbildung 66). Ein Wert von pH 7,5 war als Kompromiss für alle untersuchten Enzyme geeignet. Jedoch wurde für die *PfBAL* pH 8,0 als Mittelwert aus Stabilität und Aktivität in der Carboligation ausgewählt

(Stillger 2004), weil ein Einsatz bei pH 7,5 für dieses Enzym wegen der zu geringen Aktivität nicht möglich war.

1.2.2 Optimale Substratkonzentration ThDP-abhängiger Carboligation

Neben dem optimalen pH-Wert muss auch die optimale Konzentration der Substrate in der bimolekularen Carboligation festgelegt werden. Hierbei konnte teilweise auf publizierte Untersuchungen zurückgegriffen werden (Lingen *et al.* 2002; Stillger 2004; Kokova 2008; Kolter 2010; Rother *et al.* 2011).

L/KdcA

Für die *L/KdcA* sowie die *ApPDCE469G* waren keine Daten verfügbar. Diese Enzyme wurden im TTC-Test (III.2.1.10) als auch mittels instrumenteller Analytik (III.2.3.3, III.2.3.4) untersucht. Abbildung 13 zeigt die Untersuchungen der *L/KdcA*.

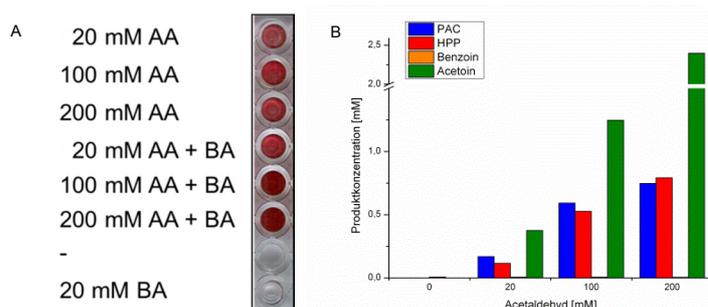


Abbildung 13: *L/KdcA*: Optimale Substratkonzentrationen mittels TTC-Test (A) und instrumenteller Analytik (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), 0,1 mg/mL *L/KdcA*, 24 h, Substratkonzentration: jeweils 20 mM Benzaldehyd (BA), Acetaldehyd (AA) variabel.

Getestet wurde eine Konzentration von 20 mM Benzaldehyd in Kombination mit Acetaldehyd in der gleichen Konzentration sowie in einem 5-fachen (100 mM) und einem 10-fachen (200 mM) Überschuss. Für die *L/KdcA* zeigte sich bereits im TTC-Test (Abbildung 13A), dass vor allem für die gemischten Carboligationsprodukte ein Überschuss an Acetaldehyd für gute Umsätze nötig war. In der detaillierten Analyse (Abbildung 13B) wurde deutlicher, dass die Produktkonzentration von Acetoin und den gemischten Carboligationsprodukten HPP und PAC ein Maximum mit einem 10-fachen Überschuss an Acetaldehyd, bezogen auf die eingesetzte Konzentration an Benzaldehyd, erreichte.

ApPDCE469G

Analoge Untersuchungen wurden für die *ApPDCE469G* durchgeführt (Abbildung 14).

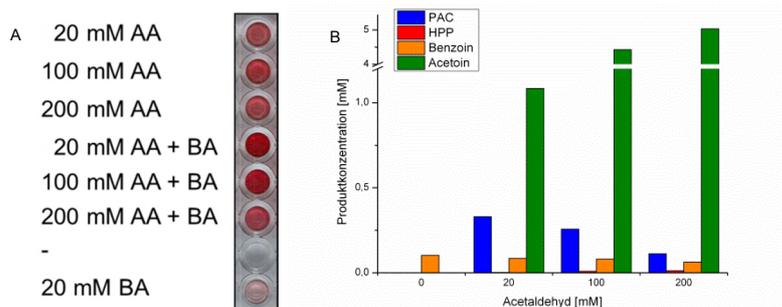


Abbildung 14: ApPDCE469G: Optimale Substratkonzentration mittels TTC-Test (A) und instrumenteller Analytik (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), 0,1 mg/mL ApPDCE469G, 24 h, Substratkonzentration: jeweils 20 mM Benzaldehyd (BA), Acetaldehyd (AA) variabel.

Die Analyse mittels TTC-Test (Abbildung 14A) ließ vermuten, dass für alle drei Kombination an Substratverhältnissen scheinbar gleich viel Produkt entstand. Lediglich in der Kombination 200 mM Acetaldehyd mit 20 mM Benzaldehyd scheint die Produktion leicht rückgängig. Ein Blick in die Detailanalysen (Abbildung 14B) zeigte, dass die Produktkonzentration für Acetoin mit steigendem Überschuss an Acetaldehyd verbessert wurde. Die Produktkonzentration von PAC nahm gleichzeitig ab. Auch wenn die gesamte Aktivität höher war, wenn mehr Acetaldehyd im Ansatz vorhanden war, so wurde ein äquimolares Verhältnis der beiden Substrate bevorzugt, da die gemischten Carboligationsprodukte im Fokus dieser Analysen standen.

Die letztlich eingesetzten Substratverhältnisse sind in Tabelle 10 für alle Enzyme zusammengefasst.

Tabelle 10: Optimale Substratkonzentrationen für die Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd ThDP-abhängiger Enzyme. Hierbei wurde immer die Gesamtaktivität und Chemoselektivität betrachtet. Bei anderen Substratverhältnissen ist es durchaus möglich, dass die Aktivität zu einem der möglichen Produkte erheblich gesteigert werden könnte (z.B. Abbildung 14 zeigt, dass eine höhere Acetaldehydkonzentration zu einer verstärkten Acetoinproduktion führen würde).

Enzym	Substratkonzentration (mM)		Referenz
	Benzaldehyd	Acetaldehyd	
<i>L/KdcA</i>	18	180	Abbildung 13
<i>ApPDC</i>	18	18	Rother <i>et al.</i> 2011
<i>ApPDCE469G</i>	18	18	Abbildung 14
<i>PpBFD</i>	18	180	Lingen <i>et al.</i> 2002
<i>PpBFDH281A</i>	18	180	Kokova 2008; Kolter 2010
<i>P/BAL</i>	18	18	Stillger 2004

Fazit

Die sechs verschiedenen ThDP-abhängigen Enzyme konnten nicht alle mit den gleichen Substratkonzentrationen vermessen werden. Es war wichtig, dass vor allem die im Fokus dieser Arbeit stehenden gemischten 2-Hydroxyketone in einer Konzentration gebildet wurden, die eine verlässliche Analytik erlaubten.

1.2.3 Temperaturabhängigkeit der Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme

Neben dem pH-Wert und dem Verhältnis der Substratkonzentrationen wurde die Carboligation auch in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Temperaturabhängigkeit der Carboligation verschiedener ThDP-abhängiger Enzyme. TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP) pH 7,5 (alle Enzyme)/pH 8,0 (*PfBAL*), Substratkonzentration 18 mM Benzaldehyd, 18 mM Acetaldehyd (*PfBAL*, *ApPDC*, *ApPDC*469G) bzw. 180 mM Acetaldehyd (*LfKdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*), Temperatur variabel, Reaktionszeit 24 h. Die Löslichkeit von 18 mM Benzaldehyd bei 5 °C wurde überprüft und war gegeben (III.2.1.2).

Enzym	Chemoselektivität	Stereoselektivität
<i>LfKdcA</i>		
<i>ApPDC</i> 469G		
<i>ApPDC</i>		
<i>PpBFDH281A</i>		
<i>PpBFD</i>		
<i>PfBAL</i>		

Für die Enzyme *LKdcA*, *PpBFDH281A*, *PpBFD* und *PfBAL* zeigten sich vergleichbare Trends für die temperaturabhängige Chemoselektivität. Mit steigender Temperatur erhöhte sich die Produktkonzentration der jeweils kleineren 2-Hydroxyketone im Vergleich zu den größeren 2-Hydroxyketonen. Im Falle der *LKdcA* etwa nahm die relative Produktverteilung (rpv) von HPP zu Gunsten der Acetoinkonzentration ab. Dasselbe galt für die *PpBFD*. Im Falle der *PfBAL* und der *PpBFDH281A* nahm die rpv für Benzoin mit steigender Konzentration ab, während die rpv für HPP gesteigert wurde. Für die *PpBFDH281A* wurde ebenfalls die Acetoinrpv gesteigert. Für die Enzyme *ApPDCE469G* und *ApPDC* zeigte sich kein Einfluss der Temperatur im gewählten Rahmen. Auffällig war zudem, dass das PAC-Produkt in keinem der Fälle signifikant beeinflusst wurde.

Dieses Phänomen ist mit dem bisherigen Verständnis des aktiven Zentrums in Einklang zu bringen (1.2). Die PDCs bevorzugen Acetaldehyd als Donor. Die Temperatur scheint die Enzyme besonders stark in der Position der Donorbindestelle zu beeinflussen. Bei den PDCs ist das kleine Substrat Acetaldehyd der bevorzugte Donor. Werden als Produkte HPP und Benzoin gebildet, so ist Benzaldehyd der Donor. Die Ergebnisse in Tabelle 11 zeigen, dass mit steigender Temperatur Benzaldehyd zunehmend gegen Acetaldehyd ausgetauscht wird, wodurch im Falle aller untersuchten Enzyme mit Ausnahme der *ApPDC* und deren Varianten eine Verschiebung von Benzoin zu HPP bzw. von HPP zu Acetoin beobachtet wurde.

Eine Möglichkeit, um den vorliegenden Sachverhalt zu erklären, wäre eine Flexibilitätserhöhung der Enzymstruktur durch die erhöhte Temperatur. Es ist vorstellbar, dass durch eine erhöhte Molekülbewegung der Platz besonders in der Donorbindestelle verkleinert wird, was zur Folge hat, dass ein im Vergleich großes Benzaldehydmolekül gegen ein kleineres Acetaldehydmolekül ausgetauscht werden muss, weil der ursprüngliche Donor keinen Platz mehr findet.

Fazit

In Tabelle 12 werden die Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme zusammengefasst.

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen der eingesetzten ThDP-abhängigen Enzyme in der gemischten Carboligation. Alle Reaktionen werden bei 20 °C und in TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP) durchgeführt.

Enzym	Konzentration (mg/mL)	Substratkonzentration (mM)		pH
		Benzaldehyd	Acetaldehyd	
<i>L/KdcA</i>	0,1	18	180	7,5
<i>ApPDC</i>	0,1	18	18	7,5
<i>ApPDCE469G</i>	0,1	18	18	7,5
<i>PpBFD</i>	0,1	18	180	7,5
<i>PpBFDH281A</i>	0,1	18	180	7,5
<i>PfBAL</i>	0,02	18	18	8,0

2 Charakterisierung der Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme

In den vorangehenden Abschnitten wurde beschrieben, wie die Rahmenbedingungen zum Einsatz organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten sowie die optimalen Operationspunkte für ThDP-abhängige Enzyme in der bimolekularen Carboligation festgelegt wurden. Im Folgenden werden die Aktivitäten der ausgewählten Enzyme in Gegenwart unkonventioneller Medien (I.3) untersucht. Zunächst wurde die Aktivität der Enzyme in einem Schnelltest (III.2.1.10) analysiert, um die Grenzen abstecken zu können, in denen Additivkonzentrationen toleriert werden und Messungen möglich waren (Beispiel *ApPDCE469G* und *L/KdcA* im Anhang Abbildung 69 - Abbildung 72). Mit dem TTC-Test konnte die Abnahme einer enzymatischen Aktivität grob bestimmt werden. Jedoch reicht die Sensitivität dieses Tests für die geplanten Untersuchungen nicht aus. Aus diesem Grund werden die detaillierten TTC-Analysen aller Enzyme hier nicht gesondert aufgeführt. Die Betrachtung der genaueren Untersuchungen mittels instrumenteller Analytik war aussagekräftiger und wird in den folgenden Kapiteln dargestellt. Dazu wurden 800 µL-Ansätze entsprechend Kapitel III.2.2.7 angesetzt und die Konzentration und Stereoselektivität aller möglichen gebildeten Produkte mittels achiraler, chiraler HPLC (Benzoin, HPP, PAC, III.2.3.3) bzw. chiraler GC (Acetoin, III.2.3.4) untersucht.

2.1 Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme in Gegenwart organischer Lösungsmittel

L/KdcA

Im TTC-Schnelltest der *L/KdcA* (Abbildung 69) zeigte sich, dass das Enzym in Anwesenheit organischer Lösungsmittel aktiv ist und hauptsächlich die Bildung von Acetoin und der gemischten Produkte PAC und/oder HPP katalysiert. Die detaillierten HPLC- und GC-Messungen ergaben ein genaueres Bild der Aktivität dieses Enzyms (Abbildung 15).

Die *L/KdcA* stellt eines der Enzyme mit dem weitesten Produktspektrum dar, denn HPP, PAC und Acetoin sind zugänglich (Gocke *et al.* 2007a). Dies liegt an einer geringen Chemoselektivität des Enzyms bezüglich der Donorsubstrate Acetaldehyd und Benzaldehyd. Lediglich die Produktion des sterisch anspruchsvollen Selbstligationsprodukts Benzoin wurde unter den hier gewählten Bedingungen nie beobachtet.

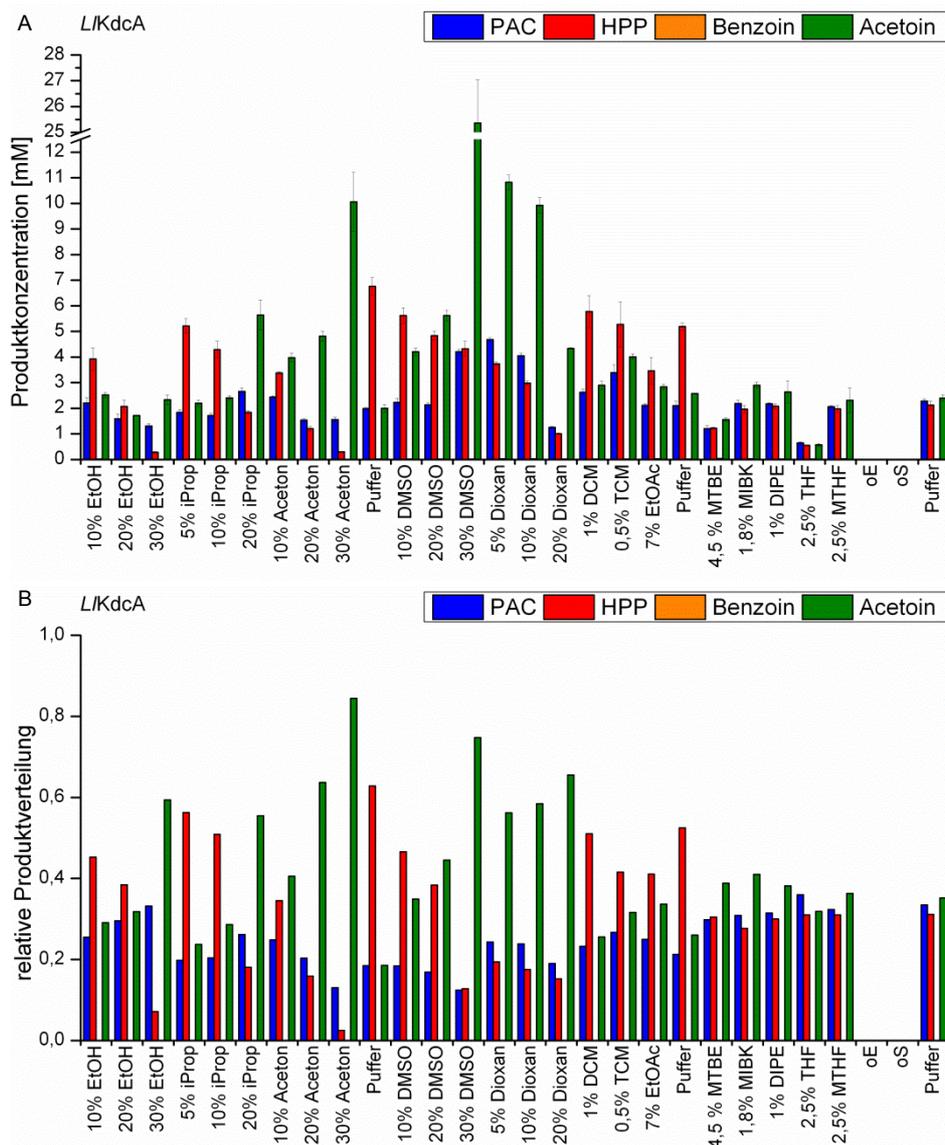


Abbildung 15: Chemoselektivität der *LKdcA* in Gegenwart organischer Lösungsmittel¹. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *LKdcA*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *LKdcA*; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 73).

LKdcA ist ein Beispiel dafür, dass die Anwesenheit organischer Lösungsmittel die Produktkonzentration erhöhen konnte. Dies war der Fall mit einigen Lösungsmitteln bei der Produktion von Acetoin und PAC, wohingegen die Produktkonzentration von

¹Um den Probenaufwand auch für die Analytik pro Experiment in einem sinnvollen Rahmen zu halten, mussten einige Messreihen getrennt voneinander durchgeführt werden. Für jede Teilreihe wurde eine separate Substratlösung angesetzt. Diese Substratkonzentrationen schwankten aufgrund von Pipettierungenauigkeiten und machten das Mitführen einer eigenen Referenz in Puffer (Puffer) sowie der beiden Negativkontrollen (oE und oS) unerlässlich. Es zeigte sich, dass die einzelnen Referenzen teils stark voneinander abwichen. Aus diesem Grund musste jede Messung mit der dazugehörigen Referenz verglichen und in Bezug auf diese bewertet werden. Diese befindet sich jeweilige stets am Ende einer Versuchsreihe. Die Negativkontrollen zeigten keine Produktbildung und wurden je nur einmal abgebildet.

HPP durch nahezu alle Lösungsmittel reduziert wurde (Abbildung 15A). Umsatzerhöhende Lösungsmittel für die Acetoinproduktion mit *L/KdcA* waren: 10 vol% EtOH, 10 – 30 vol% Aceton, 10 – 30 vol% DMSO, 10 und 20 vol% *i*Prop, 5 und 10 vol% Dioxan, 1 vol% DCM, 1 vol% DIPE, 7 vol% EtOAc, 0,5 vol% TCM und 1,8 vol% MIBK. Bei den Lösungsmitteln, die in verschiedenen Konzentrationen getestet wurden, verstärkte sich der umsatzsteigernde Effekt mit steigender Lösungsmittelkonzentration. In Gegenwart dieser Lösungsmittel konnte die Produktkonzentration für Acetoin nach 24 h von 2,3 mM in Puffer auf Werte von 2,9 - 25,4 mM (höchster Wert mit 30 vol% DMSO, Abbildung 15A) verbessert werden. Die PAC-Produktion in Puffer (2,1 mM) wurde auf Werte zwischen 2,2 und 4,7 mM gesteigert. Diese Zunahme konnte durch Zusatz von 0,5 vol% TCM, 1 vol% DCM, 10 vol% EtOH, 20 vol% *i*Prop, 10 und 30 vol% DMSO, 5 und 10 vol% Dioxan sowie 10 vol% Aceton erreicht werden.

Um Veränderungen der Chemoselektivität besser zu verstehen, war die Betrachtung der relativen Produktverteilung (r_{pv}) am besten geeignet (Abbildung 15B). Hierbei wurde die Konzentration des jeweiligen Produkts in Relation zur Gesamtproduktion aller gebildeten Produkte (= 1,0) gesetzt, um die Verteilung innerhalb der möglichen Produkte unterscheiden zu können (Berechnung: $[A]/([A]+[B]+[C]+[D])$). *L/KdcA* akzeptiert die aliphatischen und aromatischen Donorsubstrate Benzaldehyd und Acetaldehyd ungefähr gleich gut und ist aus diesem Grund unselektiv, wenn die Chemoselektivität dieses Enzyms betrachtet wird (Gocke *et al.* 2007a). Wurde z.B. die Relation der gebildeten Produkte zueinander betrachtet (Abbildung 15B), so zeigte sich, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen (18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd) und in Abwesenheit organischer Lösungsmittel, PAC und Acetoin mit einem ungefähr gleichen r_{pv}-Wert produziert wurden (PAC: r_{pv} = 0,24, Acetoin: r_{pv} = 0,27). HPP hingegen erreichte einen zweimal höheren r_{pv}-Wert (HPP: r_{pv} = 0,49). Mit steigender Konzentration an wassermischbaren organischen Lösungsmitteln (EtOH, *i*Prop, Aceton, DMSO und Dioxan) nahm die relative Produktverteilung von HPP stetig ab. Das Gleiche geschah für die r_{pv} von PAC im Fall von Aceton, Dioxan und DMSO. Steigende Konzentrationen an EtOH und *i*Prop veränderten die r_{pv} an PAC-Produkt nicht erheblich bzw. erhöhten diese sogar. Die r_{pv} des Acetoin wurde mit ansteigender Konzentration aller wassermischbarer organischer Lösungsmittel stetig gesteigert. Das bedeutet, dass sich durch diese Lösungsmittel die Chemoselektivität der *L/KdcA* auf Kosten von PAC und besonders

auf Kosten von HPP in Richtung des kleinsten Selbstligationsprodukts Acetoin verschob.

Außer der Chemoselektivität wurde auch der Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der *L/KdcA* betrachtet (Abbildung 16).

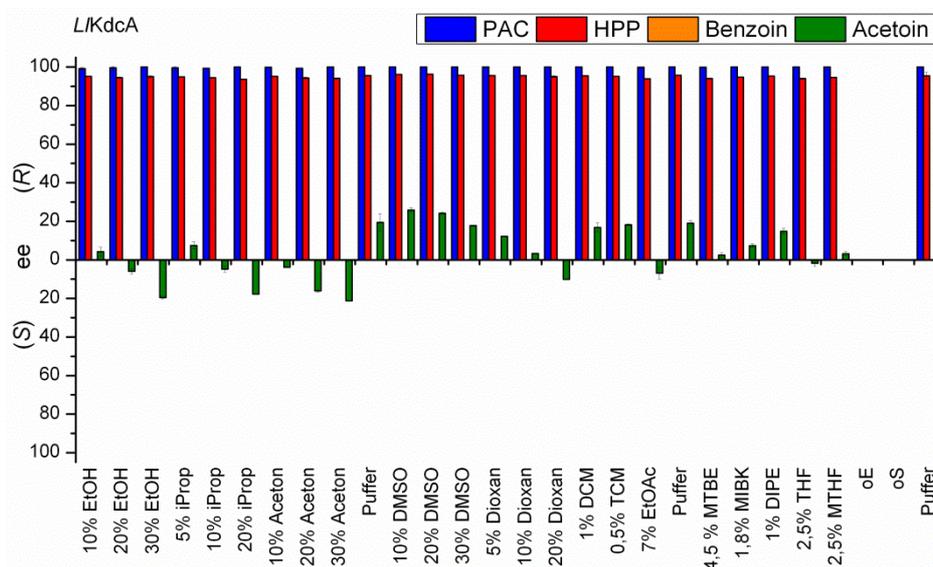


Abbildung 16: Stereoselektivität der *L/KdcA* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *L/KdcA*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *L/KdcA*; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Die Katalyse der *L/KdcA* führte zu den gemischten Produkten HPP und PAC mit sehr hohen ee-Werten (PAC ee > 99 % (R), HPP ee = 95 % (R)). Diese gute Stereoselektivität wurde in Gegenwart organischer Lösungsmittel nicht verändert. Im Gegensatz dazu war die Stereoselektivität der Acetoin synthese recht gering (19 % ee (R)). Es war nicht möglich, die Selektivität dieses Enzyms weiter in Richtung des R-Enantiomers zu verbessern. Allerdings führte die Zugabe von 10 – 30 vol% Aceton zu einem proportionalen Anstieg des S-Enantiomers mit einem ee-Wert von 21 % (S) (durch 30 vol% Aceton). Neben Aceton war eine Inversion der Stereoselektivität ebenfalls mit EtOH, *i*Prop und Dioxan möglich.

PpBFD

Mit der *PpBFD* wurden unter den gewählten Bedingungen in allen Fällen nur die Produkte HPP (Produktkonzentration nach 24 h: 9,8 mM) und Acetoin (Produktkonzentration nach 24 h: 2,8 mM) detektiert. Demgegenüber war Benzoin, obwohl es in vorangegangenen Arbeiten unter anderen Bedingungen gefunden

wurde (Siegert *et al.* 2005), nicht detektierbar. PAC konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17A).

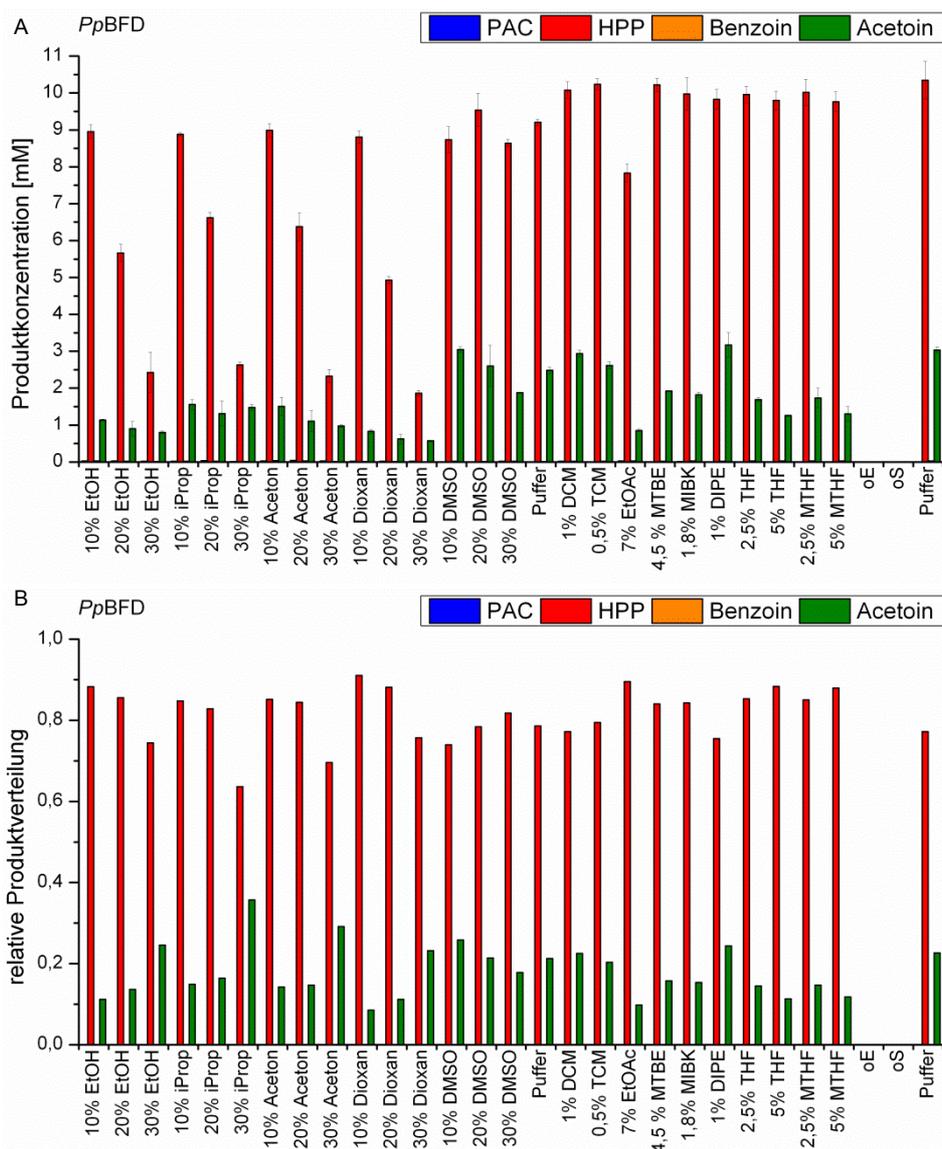


Abbildung 17: Chemoselektivität der PpBFD in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL PpBFD, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 74).

In fast allen Fällen wurde die Produktkonzentration der beiden Produkte HPP und Acetoin in Gegenwart der organischen Lösungsmittel leicht reduziert (Abbildung 17A).

Bei Betrachtung der relativen Produktverteilung (Abbildung 17B) zeigte sich besonders im Fall der mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel ein eindeutiger Trend. Mit Ausnahme von DMSO nahm die rpv für Acetoin mit steigender

Konzentration an organischem Lösungsmittel auf Kosten des rpv-Werts für HPP zu. Es trat also eine Verschiebung der Chemoselektivität in Gegenwart von EtOH, *i*Prop, Aceton und Dioxan zum kleineren Produkt Acetoin auf. Dabei verschoben 30 vol% *i*Prop den rpv-Wert für Acetoin von rpv = 0,22 (in Puffer) auf den maximalen Wert von rpv = 0,36. Im Fall der nicht wassermischbaren organischen Lösungsmittel zeigte die *Pp*BFD in Gegenwart von DIPE und DCM eine leicht gesteigerte Acetoin-rpv bzw. keine Veränderung. Alle weiteren organischen Lösungsmittel bewirkten bei der *Pp*BFD einen erniedrigten rpv-Wert für Acetoin und verschoben die Chemo-selektivität des Enzyms leicht in Richtung des gemischten Produkts HPP.

Die Stereoselektivität der *Pp*BFD (Abbildung 18) für das selektiv produzierte (*S*)-HPP (*ee* = 91 % (*S*) in Puffer) wurde im Vergleich zum unselektiven Produkt (*R*)-Acetoin (*ee* = 17 % (*R*) in Puffer) nur geringfügig beeinflusst. Der *ee* für (*R*)-Acetoin wurde z.B. durch 30 vol% *i*Prop mehr als verdoppelt (*ee* = 46 % (*R*)).

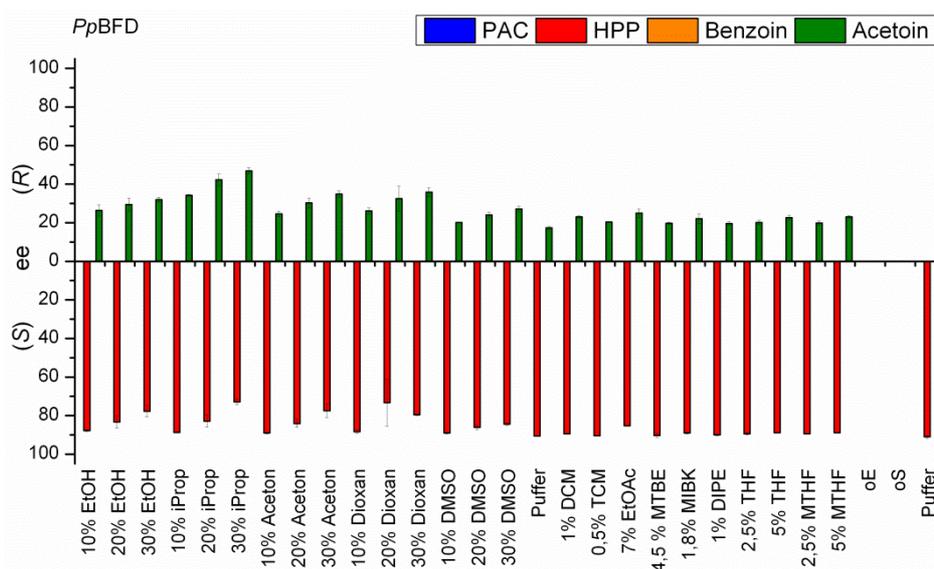


Abbildung 18: Stereoselektivität der *Pp*BFD in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der jeweilige *ee*-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *Pp*BFD; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Wie bereits für die Chemoselektivität dieses Enzyms gezeigt, findet sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Einfluss der wassermischbaren organischen Lösungsmittel auf die Stereoselektivität. Mit steigender Konzentration der Lösungsmittel EtOH, *i*Prop, Aceton, Dioxan und DMSO wurde der *ee* für (*R*)-Acetoin proportional verbessert (in Puffer *ee* = 17 % (*R*) auf maximal *ee* = 47 % (*R*) in Gegenwart von 30 vol% *i*Prop). Im Gegensatz dazu wurde der *ee* für (*S*)-HPP (in Puffer *ee* = 91 %

(S) auf $ee = 73\%$ (S) in Gegenwart von 30 vol% *i*Prop) stetig verschlechtert. Die Ergebnisse zeigen also eine Verschiebung der Stereoselektivität der *Pp*BFD in Richtung der *R*-Enantiomere durch wassermischbare organische Lösungsmittel. Im Gegensatz dazu fiel der Einfluss nicht wassermischbarer organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität weniger ausgeprägt aus, was auch an der geringen Konzentration liegen kann, mit der diese Lösungsmittel eingesetzt wurden. Mit Ausnahme von EtOAc blieb der ee für (S)-HPP mit 91 % (S) relativ stabil (maximale Reduktion auf $ee = 85\%$ (S) in Gegenwart von 7 % EtOAc). Im Falle des Acetoin kam es zu leichten Schwankungen (in Puffer $ee = 17\%$ (R), maximale Verbesserung auf $ee = 25\%$ (S) in Gegenwart von 7 vol% EtOAc), die allerdings nicht so ausgeprägt waren, wie die Änderungen, welche durch den Einfluss der wassermischbaren organischen Lösungsmittel verursacht wurden (Abbildung 18).

*Pp*BFDH281A

Die Variante *Pp*BFDH281A hat relativ zum Wildtyp-Enzym ein vergrößertes aktives Zentrum, da dieses Enzym rational zur verbesserten Produktion von Benzoin entworfen wurde (Polovnikova *et al.* 2003). Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd) katalysierte diese Variante die Bildung aller vier möglichen 2-Hydroxyketone (Abbildung 19A). Die *Pp*BFDH281A ist demnach bezüglich der Chemoselektivität sehr unselektiv.

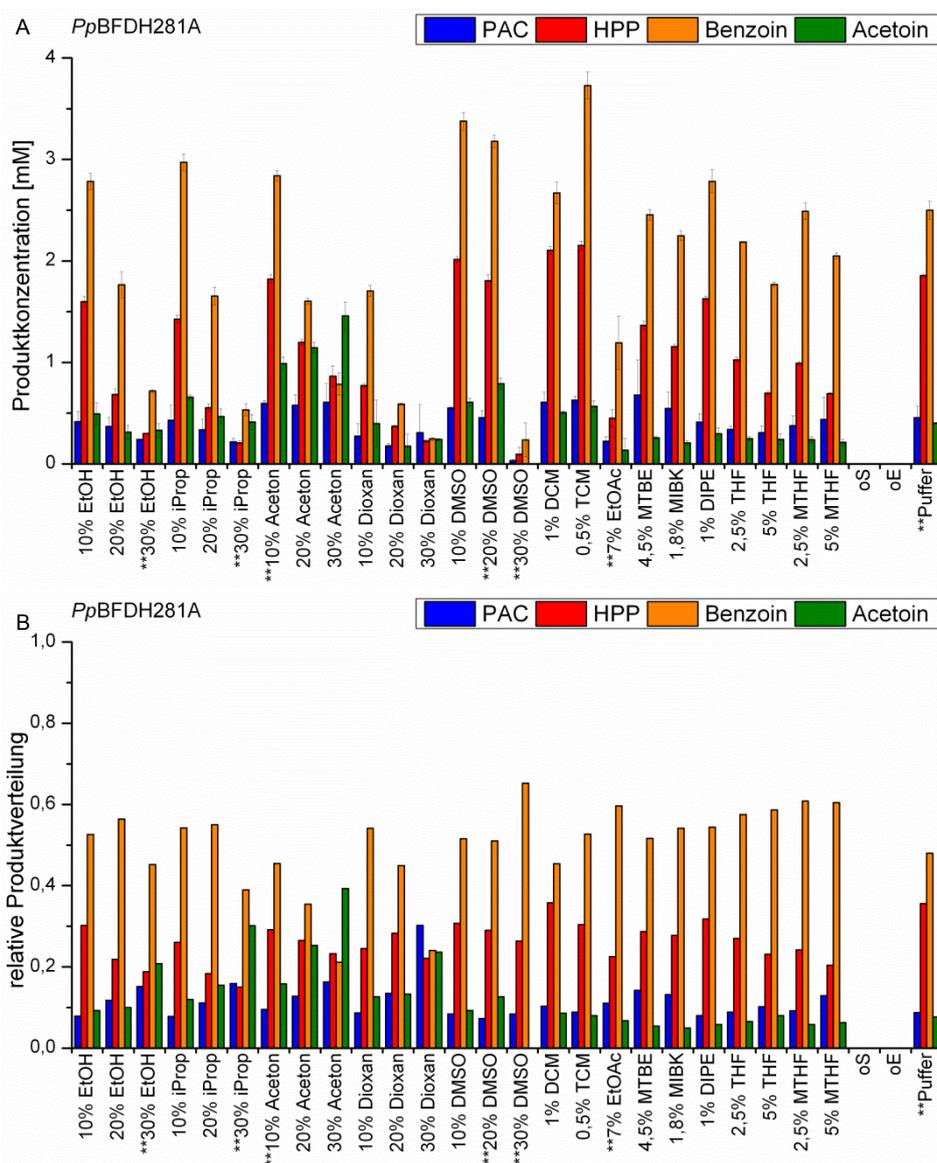


Abbildung 19: Chemoselektivität der *PpBFDH281A* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist die Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *PpBFDH281A*; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 75).

In Abwesenheit organischer Lösungsmittel wurden alle Produkte in einer Konzentration von je < 3 mM synthetisiert. Dies entspricht, bezogen auf das Substrat Benzaldehyd, einem Umsatz von ca. 16 %.

Wie im Falle der *PpBFD* wurden die Produktkonzentrationen auch in der *PpBFDH281A*-Katalyse durch nahezu alle organischen Lösungsmittel reduziert (Abbildung 19A). Dennoch konnte die HPP-Konzentration durch den Einfluss der Lösungsmittel 10 vol% DMSO, 0,5 vol% TCM und 1 vol% DIPE auf bis zu 2,2 mM erhöht werden. Zusätzlich erhöhten 10 – 20 vol% DMSO, 10 vol% EtOH, 10 vol%

*i*Prop, 10 vol% Aceton, 1 vol% DCM, 0,5 vol% TCM sowie 1 vol% DIPE die Benzoinkonzentration auf einen Wert von bis zu 3,7 mM (durch 0,5 vol% TCM) nach 24 h Reaktionszeit.

Zur Bewertung der Chemoselektivität wurde die relative Produktverteilung betrachtet (Abbildung 19B). Mit steigender Konzentration der wassermischbaren organischen Lösungsmittel wurde der rpv-Wert für HPP stets reduziert. Dies traf ebenfalls, mit Ausnahme des DMSO, auf den rpv-Wert für Benzoin zu. Dem steht eine stete Erhöhung des rpv-Werts für Acetoin und, wieder mit Ausnahme von DMSO, ebenso eine Erhöhung des rpv-Werts für PAC gegenüber. Benzoin und HPP wurden also zu Gunsten von Acetoin und PAC reduziert. Dies zeigt, dass die wassermischbaren organischen Lösungsmittel die Chemoselektivität der *Pp*BFDH281A so verändern, dass Acetaldehyd als Donor (Akzeptor Acetaldehyd = Acetoin; Akzeptor Benzaldehyd = PAC) gegenüber Benzaldehyd (Akzeptor Acetaldehyd = HPP; Akzeptor Benzaldehyd = Benzoin) bevorzugt wird. Im Fall der nicht wassermischbaren organischen Lösungsmittel zeigte sich im Durchschnitt eine Verschlechterung des rpv-Werts für HPP, während die enzymatische Bildung von Benzoin in keinem der Fälle abnahm.

Die Variante *Pp*BFDH281A war das einzige Enzym, welches den Zugang zu allen vier Produkten in so hohen Konzentrationen ermöglichte, dass eine Bestimmung der Stereoselektivität aller Produkte zulässig war (Abbildung 20).

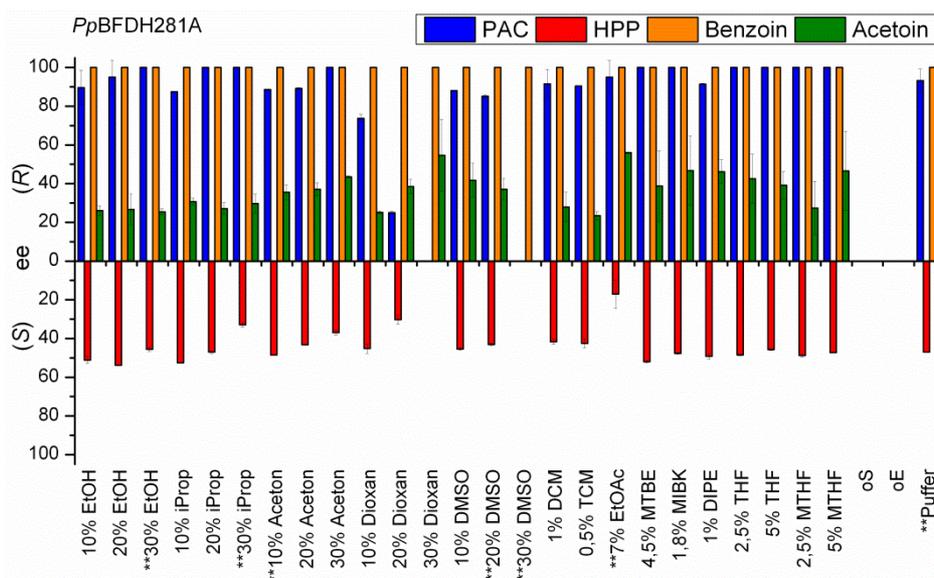


Abbildung 20: Stereoselektivität der *Pp*BFDH281A in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *Pp*BFDH281A; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. (Ausnahme: ** hier wurde der PAC-Wert für die Chemoselektivität lediglich aus zwei Messungen berechnet).

(*R*)-Benzoin wurde in enantiomerenreiner Form gebildet ($ee > 99\%$ (*R*)). Dies änderte sich auch nicht durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel. (*R*)-PAC wurde in Abwesenheit organischer Lösungsmittel mit einem ee von 93% (*R*) gebildet. Der Enantiomerenüberschuss des Enzyms für dieses Produkt wurde durch verschiedene Lösungsmittel, wie z.B. 20 vol% Dioxan in Richtung des *S*-Produkts verschoben ($ee = 25\%$ (*R*)). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für (*S*)-HPP. Der ee von 47% (*S*) wurde z.B. in Gegenwart von 7 vol% EtOAc auf einen Wert von $ee = 17\%$ (*S*) reduziert. Für das kleinste Produkt Acetoin verbesserte sich der ee von 25% (*R*) in Puffer zu einem Wert von $ee = 56\%$ (*R*) in Gegenwart von 7 vol% EtOAc. Dies ist eines der wenigen Beispiele in diesen Untersuchungen, in denen organische Lösungsmittel die Stereoselektivität eines Enzyms verbessern.

ApPDC

Acetoin, PAC und Spuren von Benzoin waren durch die Katalyse der *ApPDC* unter den gewählten Reaktionsbedingungen (18 mM Benzaldehyd, 18 mM Acetaldehyd) in Abwesenheit organischer Lösungsmittel zugänglich (Abbildung 21A).

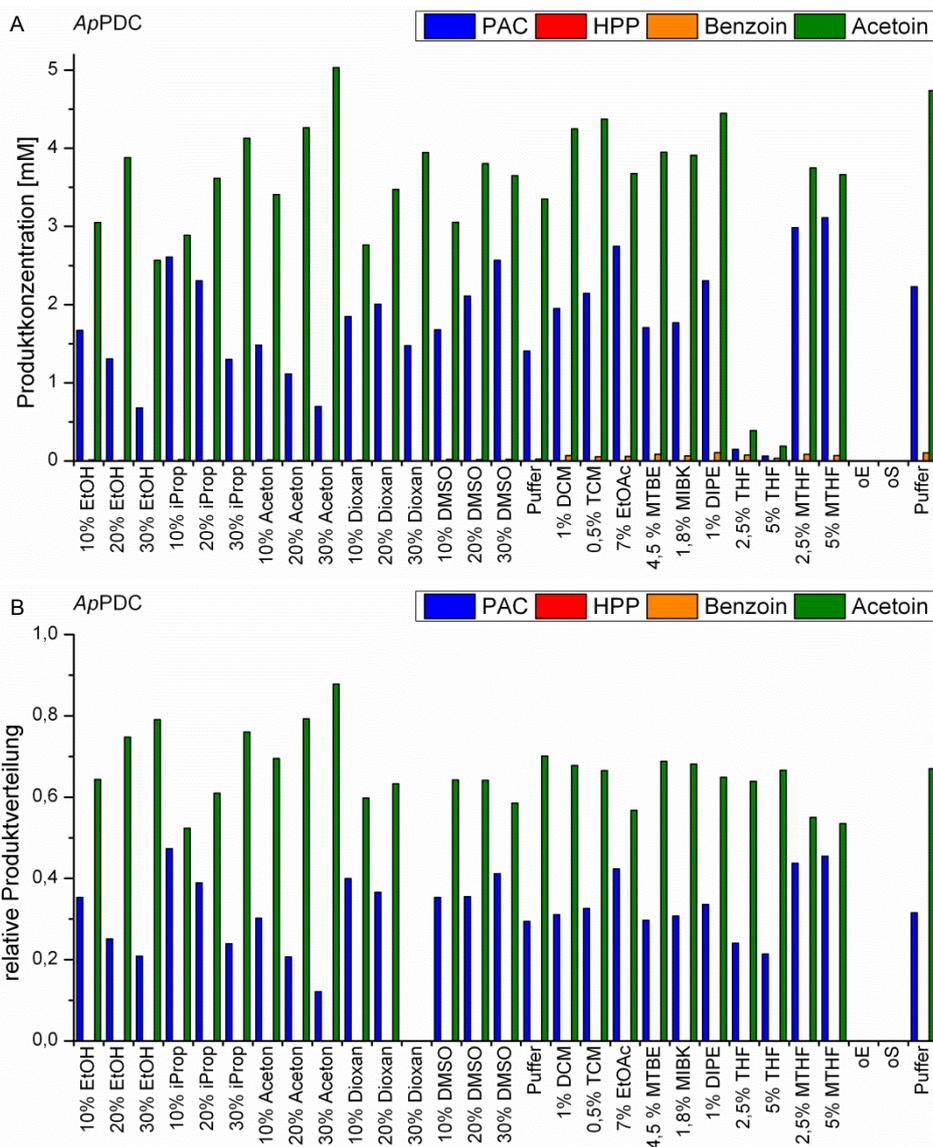


Abbildung 21: Chemoselektivität der *ApPDC* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDC*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Einfachbestimmungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 76).

In Puffer wurde Acetoin bis zu einer Konzentration von 4 mM nach 24 h produziert. Dieser Wert konnte in Gegenwart von 30 vol% Aceton auf eine Endkonzentration von 5 mM gesteigert werden. Obwohl einige Lösungsmittel die PAC-Produktion der *ApPDC* reduzierten, war eine Steigerung der Produktkonzentration von 1,8 mM in Puffer auf einen Wert von 3,1 mM durch Anwesenheit von 5 vol% MTHF ebenfalls möglich. Weitere Lösungsmittel, welche die PAC-Produktion des Enzyms verbessern konnten, waren DMSO, Dioxan, EtOAc und *i*Prop. Im Vergleich zu den anderen Produkten war die finale Produktkonzentration für Benzoin nach 24 h mit einem Wert

von 0,06 mM sehr gering und wurde durch die meisten organischen Lösungsmittel weiter reduziert.

Im Fall der Chemoselektivität der *ApPDC* zeigte sich wieder ein ähnliches Bild, wie schon bei den zuvor beschriebenen Enzymen (Abbildung 21B). Mit steigender Konzentration wassermischbarer organischer Lösungsmittel wurde die Chemoselektivität der *ApPDC* in Richtung des Acetoin verschoben, während die *rpv* für PAC reduziert wurde. Eine Ausnahme bildete erneut DMSO. Für die nicht wassermischbaren organischen Lösungsmittel zeigte sich, dass MTHF und EtOAc die Chemoselektivität des Enzyms im Gegensatz dazu auch in Richtung des PAC-Produkts verschieben konnten.

Im Vergleich zu den anderen getesteten Enzymen war der Effekt auf die Stereoselektivität der *ApPDC* sehr gering (Abbildung 22).

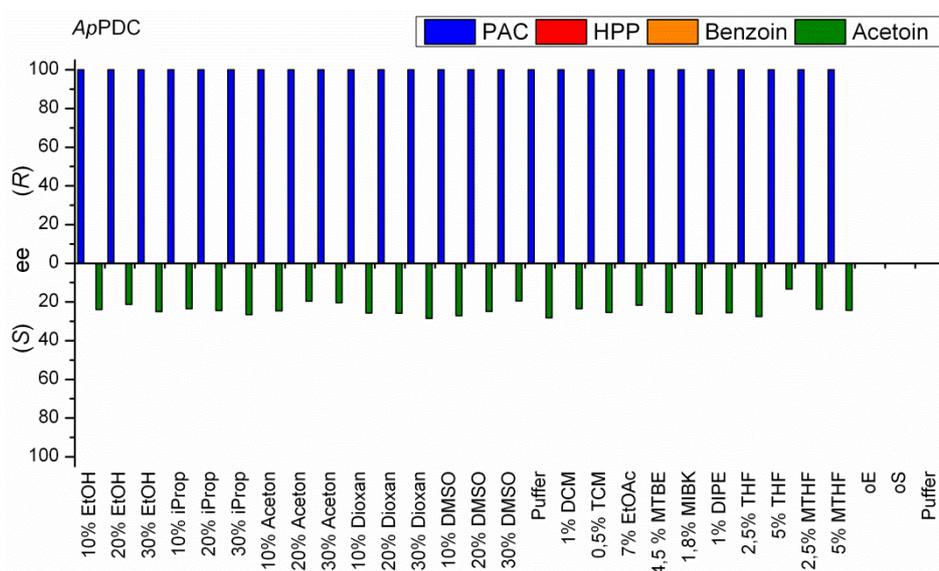


Abbildung 22: Stereoselektivität der *ApPDC* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDC*; Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Einfachbestimmungen.

PAC (ee > 99 % (*R*) in Puffer) und Benzoin (ee > 99 % (*R*) in Puffer) wurden mit sehr hohem Enantiomerenüberschuss produziert, der durch die organischen Lösungsmittel nicht beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu entstand (*S*)-Acetoin mit einem ee von 28 % (*S*) in Puffer, der in Gegenwart von 5 vol% THF auf einen ee von 13 % (*S*) reduziert wurde.

ApPDCE469G

In vorangegangenen Arbeiten wurde die *ApPDC* in Position 469 von Glutamat (E) zu Glycin (G) mutiert, um eine S-selektive Variante zur PAC-Produktion zu erhalten (Rother *et al.* 2011, I.2.5.1.1). Diese Variante wurde in Anwesenheit organischer Lösungsmittel untersucht (Abbildung 23A).

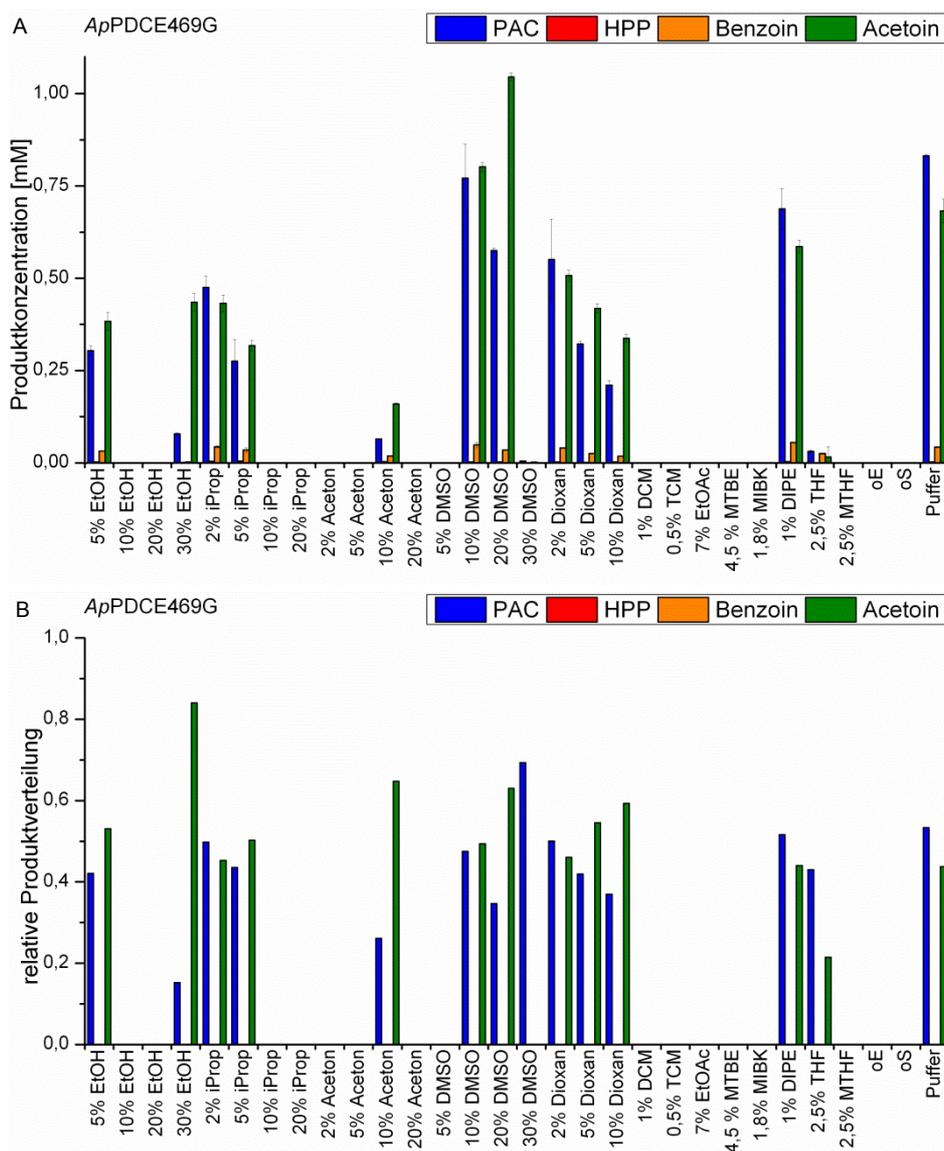


Abbildung 23: Chemoselektivität der *ApPDCE469G* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5; 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *ApPDCE469G*; Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 77).

Die Produktivität der *ApPDCE469G* wurde, unter den gewählten Reaktionsbedingungen (18 mM Benzaldehyd, 18 mM Acetaldehyd), durch fast alle getesteten

organischen Lösungsmittel reduziert. Eine Ausnahme bildete die Acetoinproduktion, welche durch die Anwesenheit von 10 und 20 vol% DMSO gesteigert werden konnte. Die Gesamtproduktivität des Enzyms wurde durch viele organische Lösungsmittel herabgesetzt. Zusätzlich war eine Beeinflussung der Chemoselektivität zu erkennen (Abbildung 23B). In weitestgehend allen messbaren Ansätzen zeigte sich eine Erhöhung des rpv-Werts für Acetoin auf Kosten von PAC. Auch mit diesem Enzym wurde somit eine Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren Produkt beobachtet.

Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym war die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* sehr empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln (Abbildung 24).

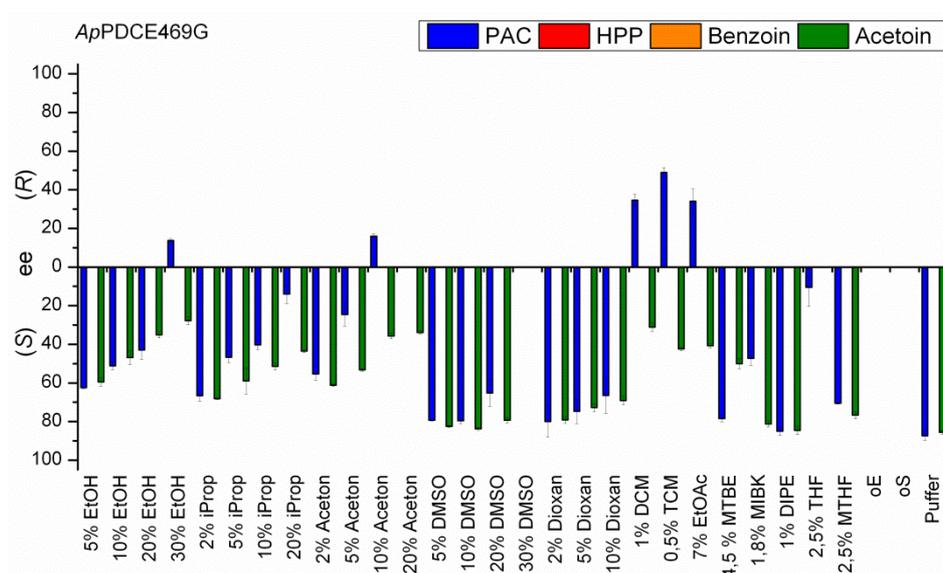


Abbildung 24: Stereoselektivität der *ApPDCE469G* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO_4 , 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *ApPDCE469G*; Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Stereoselektivität des Benzoins ist nicht abgebildet, weil die Produktkonzentrationen zu gering für eine verlässliche Enantiomerenzuordnung waren.

(S)-PAC wurde in Puffer mit einem ee von 87 % (S) gebildet. Die Zugabe von z.B. 0,5 vol% TCM führte zu einer Stereo-inversion und einem Überschuss des R-Enantiomers (ee = 49 % (R)). Dieses Beispiel beschreibt einen der stärksten Effekte, welcher durch organische Lösungsmittel in dieser Studie beobachtet wurde. Der gleiche Trend wurde für die *ApPDCE469G*-katalysierte Acetoinbildung festgestellt. Der ee von 85 % (S) in Puffer wurde durch Anwesenheit von 30 vol% EtOH auf einen Wert von ee = 28 % (S) reduziert. Für die *ApPDCE469G* wurde sehr

häufig ein Effekt gefunden, der mit steigender Konzentration des Lösungsmittels entsprechend proportional verstärkt werden konnte.

PfBAL

Die *PfBAL* ist eine hoch aktive Carboligase, welche bei der Carboligation Benzaldehyd als Donor bevorzugt (I.2.5.3, Janzen *et al.* 2006). Daher sind durch dieses Enzym in der bimolekularen Carboligation die Produkte HPP und Benzoin zugänglich. Einige Studien zeigten bereits, dass die *PfBAL* in Gegenwart organischer Lösungsmittel aktiv bleibt und ihre Stabilität z.B. durch DMSO verbessert werden kann (Dominguez de Maria *et al.* 2006). Die Ergebnisse der *PfBAL*-Katalyse in Gegenwart der ausgewählten organischen Lösungsmittel zeigt Abbildung 25A.

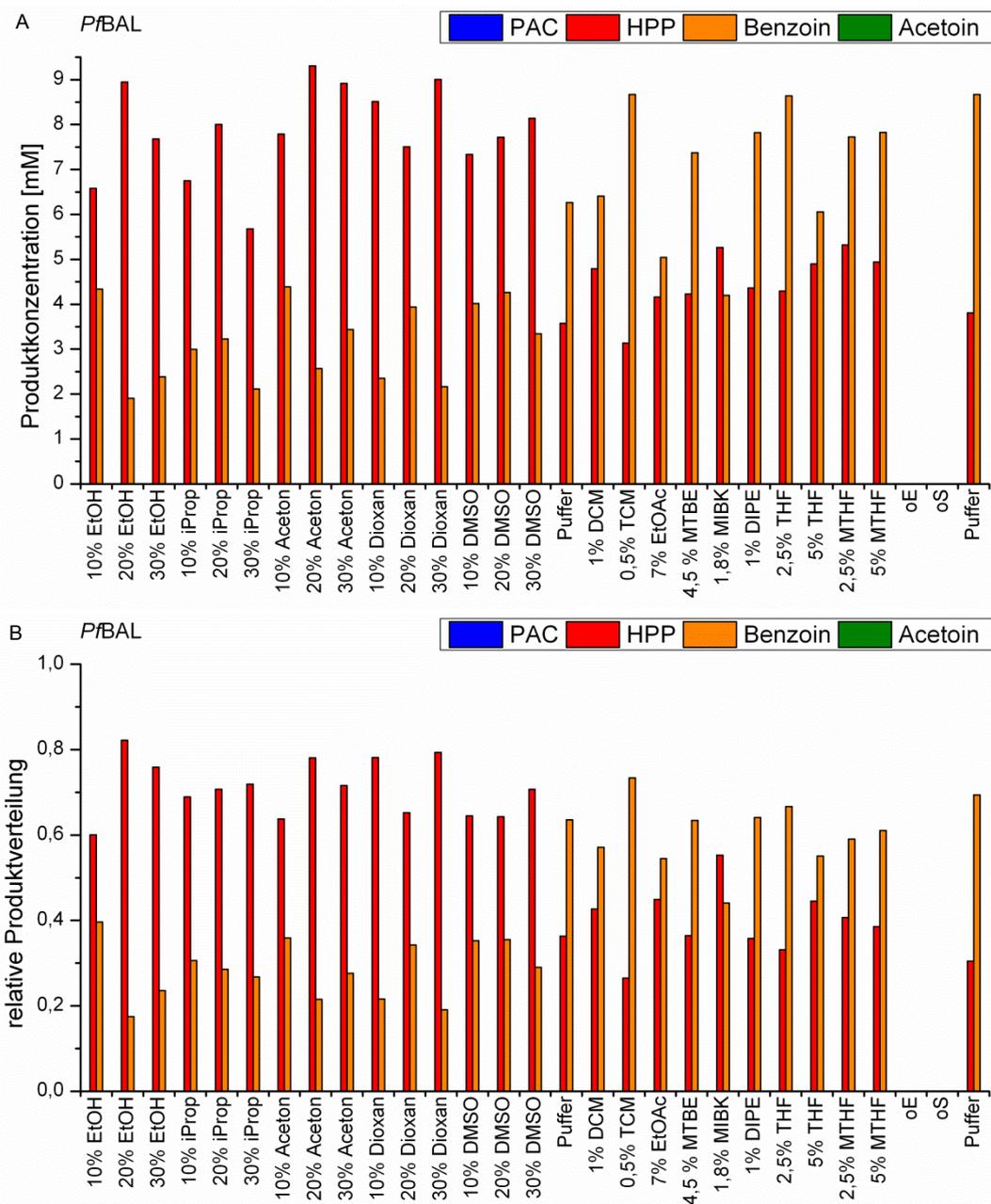


Abbildung 25: Chemoselektivität der *PfBAL* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h, 0,02 mg/mL *PfBAL*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Einzelbestimmungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 78).

In Puffer wurden innerhalb von 24 h 3,7 mM HPP und 7,5 mM Benzoin durch die *PfBAL* produziert. Zusätze von EtOH, *i*Prop, Aceton, Dioxan sowie DMSO konnten die HPP-Konzentration auf 8 - 9,3 mM steigern. Für DMSO war die Steigerung der HPP-Konzentration nach 24 h proportional zur eingesetzten Konzentration dieses Lösungsmittels. In Gegenwart von 10 vol% DMSO wurden 7,3 mM HPP synthetisiert, durch 20 vol% DMSO 7,7 mM und nach Zugabe von 30 vol% DMSO sogar 8,1 mM.

Im Gegensatz zur Chemo- und Stereoselektivität wurde die Stereoselektivität der *PfBAL* in Gegenwart organischer Lösungsmittel nicht beeinflusst (Abbildung 26).

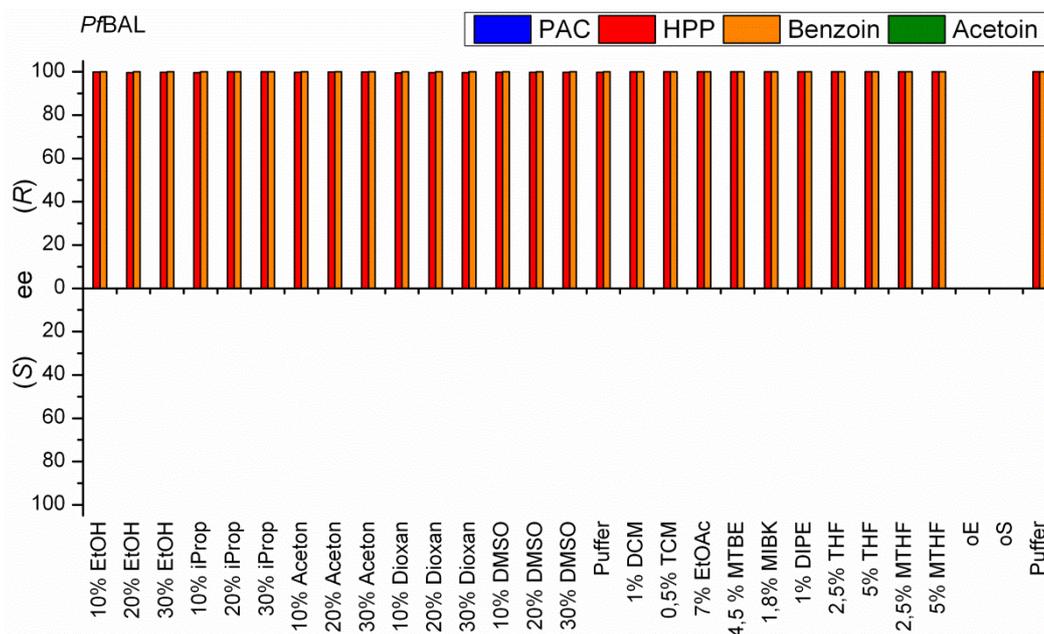


Abbildung 26: Stereoselektivität der *PfBAL* in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h, 0,02 mg/mL *PfBAL*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Einzelbestimmungen.

(*R*)-Benzoin sowie (*R*)-HPP wurden enantiomerenrein ($ee > 99\%$ (*R*)) gebildet, unabhängig davon, welches Lösungsmittel dem enzymatischen Ansatz zugesetzt wurde.

Fazit

Zusammenfassend können mehrere Tendenzen formuliert werden, die den Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Chemo- und Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme beschreiben:

- Die Produktivität und somit die Aktivität der Enzyme wird in Gegenwart organischer Lösungsmittel häufig reduziert. Es zeigen sich jedoch auch Beispiele, in denen eine Steigerung der Produktkonzentration verursacht wird, z.B. Acetoin bei der *L/KdcA*, HPP bei der *PfBAL* und PAC im Falle der *ApPDC*. Diese Steigerung wird durch den Einfluss verschiedener Lösungsmittel erreicht, eines davon ist jedoch immer DMSO. Die einzige Ausnahme ist die *PpBFD*, bei der keines der Lösungsmittel eine Konzentrationserhöhung bewirken konnte.

- Durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel zeigte sich im Falle der Chemo- und Stereoselektivität der Enzyme häufig eine Verschiebung zum kleineren 2-Hydroxyketon. Ausnahmen hierbei sind die PAC-Produktion durch *LKdcA* bzw. *PpBFDH281A*, bei denen die Bildung von HPP reduziert wird und die rpv-Werte für PAC sowie Acetoin gesteigert werden. Hier zeigt sich ein Trend zum kleineren Donorsubstrat. Die anderen Ausnahmen sind *PpBFD*, bei der die rpv-Werte für Acetoin und HPP variieren, allerdings keine Verschiebung in Richtung des Acetoin auftritt und *ApPDC*, bei der gar keine Verschiebung detektiert werden kann.
- Der Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme ist gering, wenn das Enzym das jeweilige Produkt in Puffer bereits mit einem sehr hohen ee bildet.

2.2 Carboligaseaktivität ThDP-abhängiger Enzyme in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

Analog zu den organischen Lösungsmitteln wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluss verschiedener ionischer Flüssigkeiten auf die Chemo- und Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme untersucht. Im Folgenden wird der Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die sechs Biokatalysatoren detailliert beschrieben.

LKdcA

Wie schon für die organischen Lösungsmittel beschrieben, ist durch die *LKdcA* der Zugang zu den 2-Hydroxyketonen Acetoin, PAC und HPP möglich. Die ionischen Flüssigkeiten Ammoeng 100 (IL-1), Ammoeng 101 (IL-2) sowie Ammoeng 102 (IL-3) setzten die Aktivität dieses Enzyms erheblich herab (Abbildung 27A).

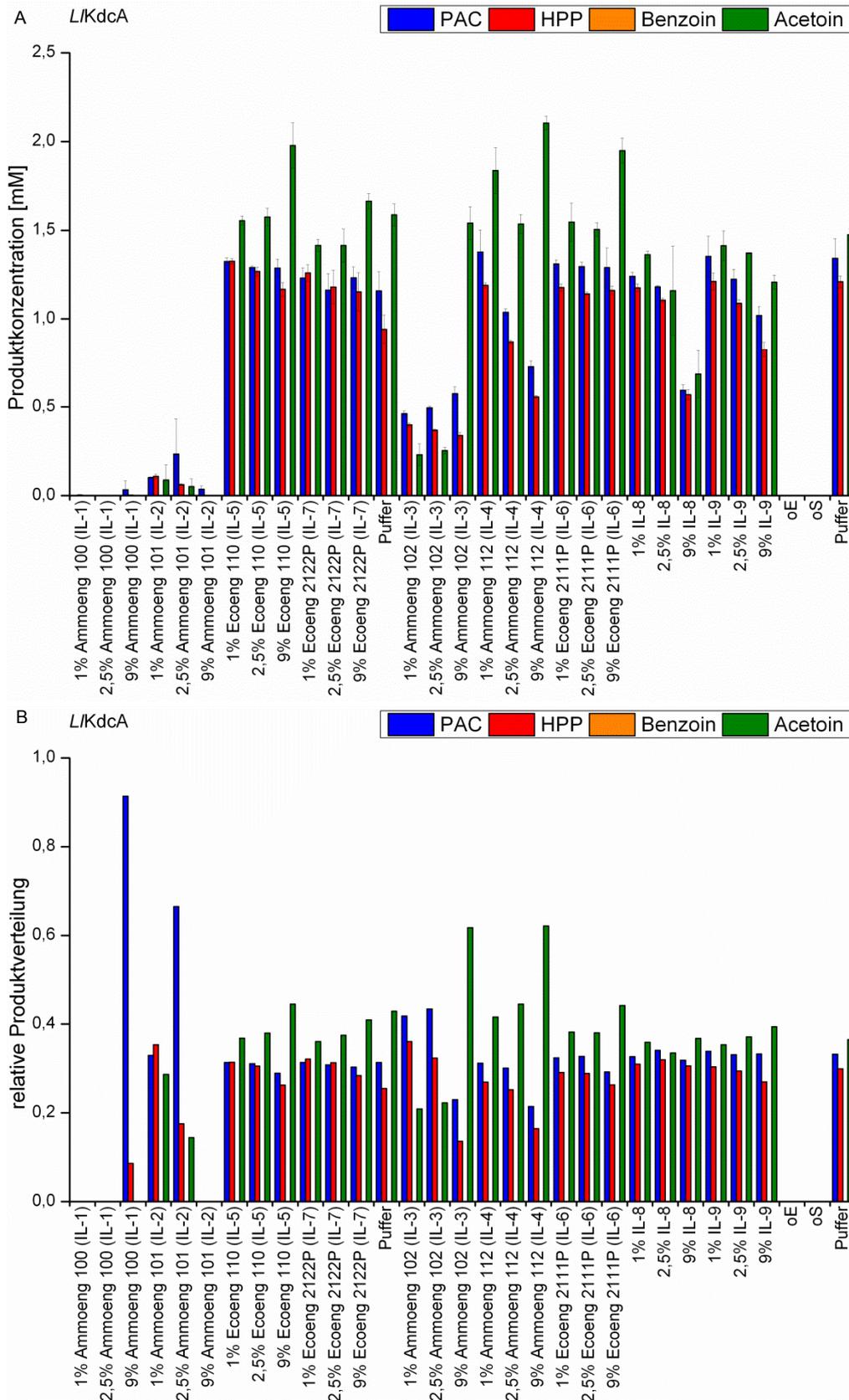


Abbildung 27: Chemoselektivität der *L/KdcA* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *L/KdcA*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *L/KdcA*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 79).

Während die Produktkonzentration von HPP und PAC im Vergleich zum gepufferten Referenzsystem meist reduziert wurde, wird die Endkonzentration an Acetoin durch die Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten häufig gesteigert. Dies zeigte sich auch für die relativen Produktverteilungen (rpv, Abbildung 27B). Die rpv für HPP und PAC wurden bei der *L/KdcA* mit steigender Konzentration an ionischer Flüssigkeit reduziert, während die Bildung von Acetoin in Relation zu den anderen Produkten gesteigert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass es auch in Gegenwart der ionischen Flüssigkeiten zu einer Verschiebung der enzymatischen Chemo Selektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon kam. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt mit Ammoeng 102 (IL-3) und Ammoeng 112 (IL-4). In den Untersuchungen zum Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der *L/KdcA* (Abbildung 28) zeigte sich ein ähnliches Bild, wie bei den organischen Lösungsmitteln (Abbildung 16).

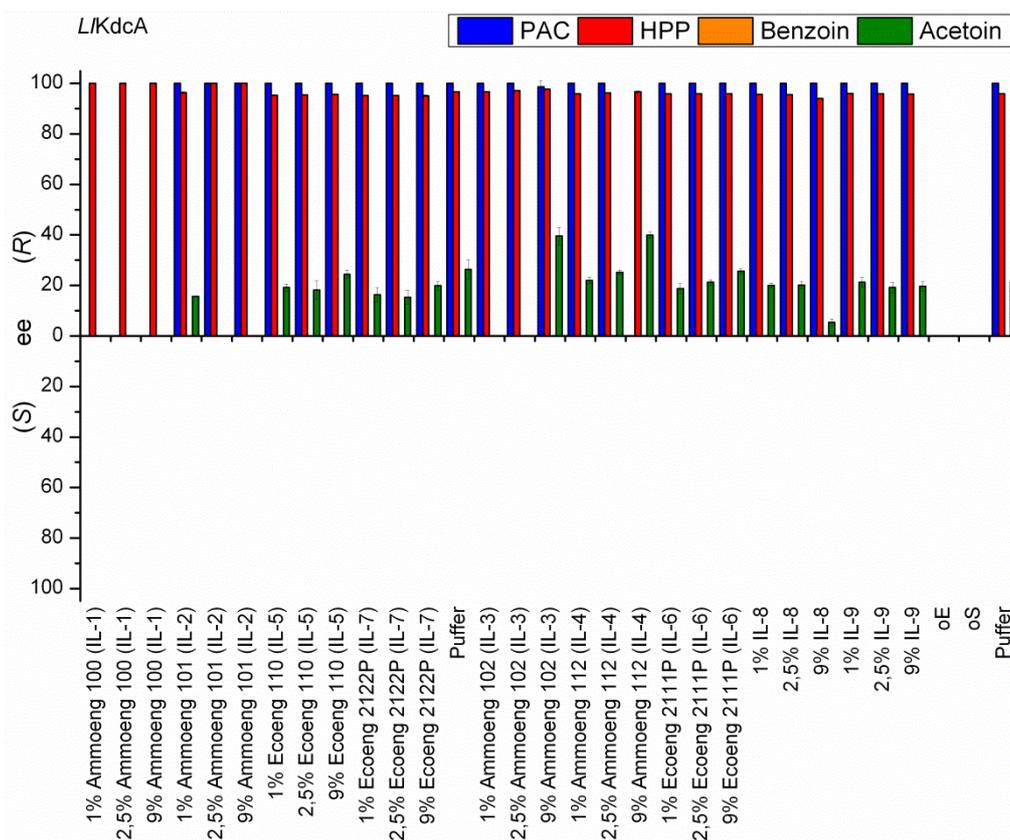


Abbildung 28: Stereoselektivität der *L/KdcA* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist jeweils der ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5; 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *L/KdcA*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *L/KdcA*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Die gemischten 2-Hydroxyketone HPP und PAC wurden mit sehr hoher Stereoselektivität produziert (HPP: ee = 97 % bzw. 96 % (R); PAC: ee > 99 % (R),

Abbildung 28). Solange der Umsatz zu diesen Produkten hoch genug war, um eine verlässliche chirale Analytik zu gewährleisten, zeigte sich keine signifikante Änderung dieser Werte. Wie auch schon im Fall der organischen Lösungsmittel wurde lediglich der *ee*-Wert für das Selbstligationsprodukt Acetoin stark beeinflusst. Im Gegensatz zu den Reaktionen in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (Abbildung 16), wurde die geringe Stereoselektivität von 21 - 26 % (*R*) in Puffer durch Zugabe von ionischen Flüssigkeiten nicht in einen Überschuss an (*S*)-Acetoin umgekehrt. Die geringe *R*-Selektivität der *L/KdcA* wurde lediglich weiter reduziert. Die ionischen Flüssigkeiten verursachten demnach in Bezug auf die Stereoselektivität der *L/KdcA* einen Trend zum *S*-Produkt, der in die gleiche Richtung geht wie der Einfluss organischer Lösungsmittel, jedoch dort stärker ausgeprägt zu sein scheint.

PpBFD

Untersuchungen mit *PpBFD* als Katalysator zeigten, dass die Produktkonzentration von HPP und Acetoin durch einige ionischen Flüssigkeiten gesteigert werden konnte (Abbildung 29A). Die deutlichste Steigerung in Bezug auf die HPP-Bildung dieses Enzyms (in Puffer ca. 8 mM auf 11 mM) wurde durch die höchste Konzentration an Ammoeng 112 (IL-4) ausgelöst. Steigerungen der Produktivität für Acetoin (in Puffer ca. 1,7 mM) fielen im Vergleich, mit maximaler Steigerung auf 2,5 mM (durch 1 % (w/v) Ecoeng 2122P (IL-7)), geringer aus. Dies wurde auch bei der Betrachtung der Chemoselektivität (Abbildung 29B) deutlich.

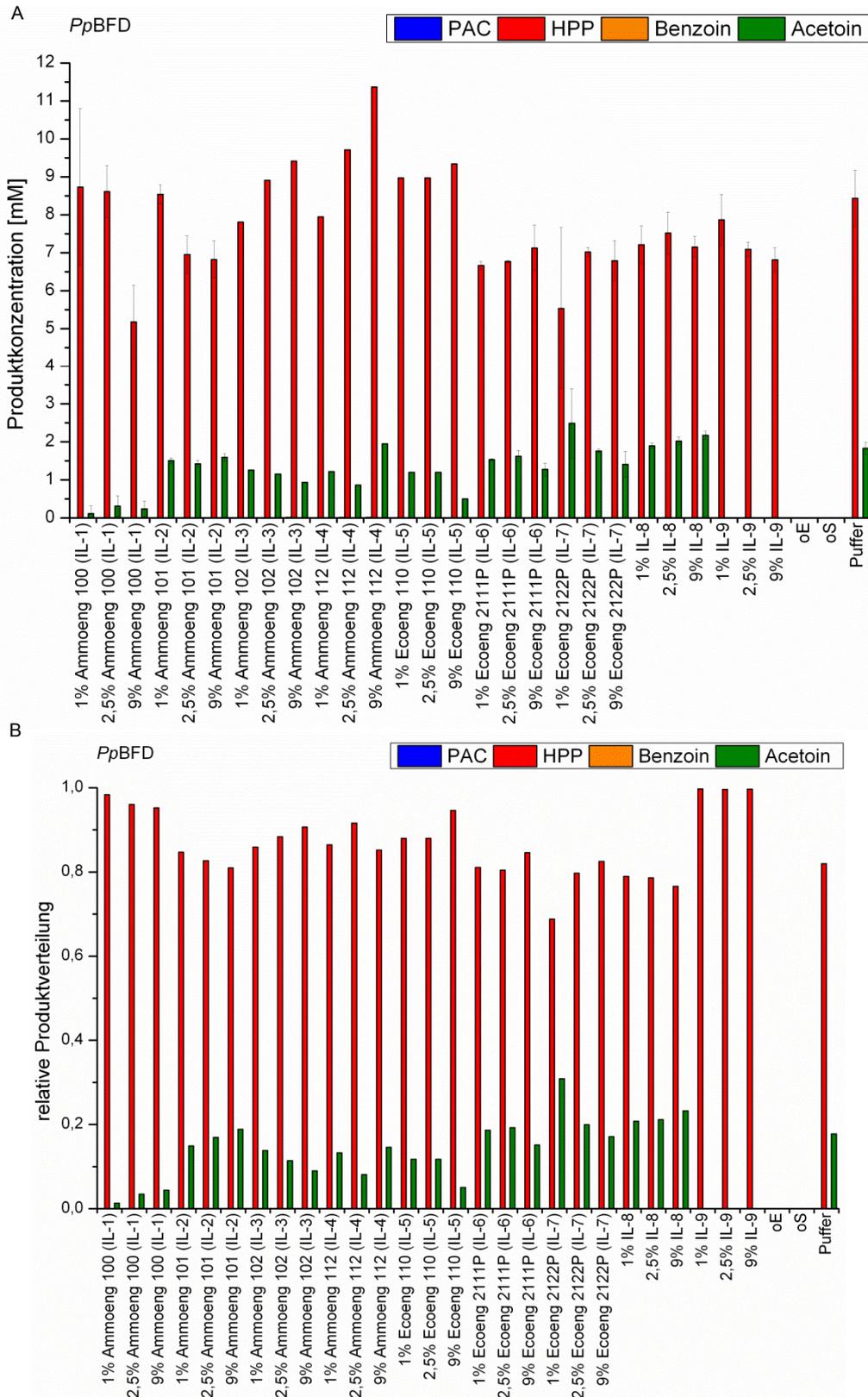


Abbildung 29: Chemoselektivität der PpBFD in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (B) und die relative Produktverteilung (A). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL PpBFD; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 80).

In den meisten Fällen wurde die Chemoselektivität der *PpBFD* auf Kosten des Acetoin zum HPP-Produkt verschoben. Dieser Effekt wurde mit steigender Additiv-Konzentration noch verstärkt. Eine Ausnahme stellte die Messung mit 1 % (w/v) Ecoeng 2122P (IL-7) dar. Hier war die Chemoselektivität der *PpBFD* im Vergleich zum gepufferten System zum Acetoin verschoben. Insgesamt stellte das Enzym in dieser Analyse eine Ausnahme bezüglich der bis hierhin formulierten Trends in der Chemoselektivität dar. Im Gegensatz zu vielen Beispielen wurde in diesem Fall die Selektivität nicht zum kleineren 2-Hydroxyketon, sondern zum Größeren verschoben. Bezüglich der Stereoselektivität der *PpBFD* (Abbildung 30) zeigte sich für HPP (in Puffer $ee = 85 - 90\%$ (S)) kaum ein Einfluss. Lediglich mit Ammoeng 100 (IL-1) und Ammoeng 101 (IL-2) wurde der ee für (S)-HPP leicht auf $ee = 81\%$ (S) reduziert (durch 2,5 % (w/v) Ammoeng 101 (IL-2)). Für Acetoin ($ee = 16,8 - 23\%$ (R)) wurde der ee durch 2,5 % (w/v) Ammoeng 101 (IL-2) maximal auf $ee = 42\%$ (R) gesteigert.

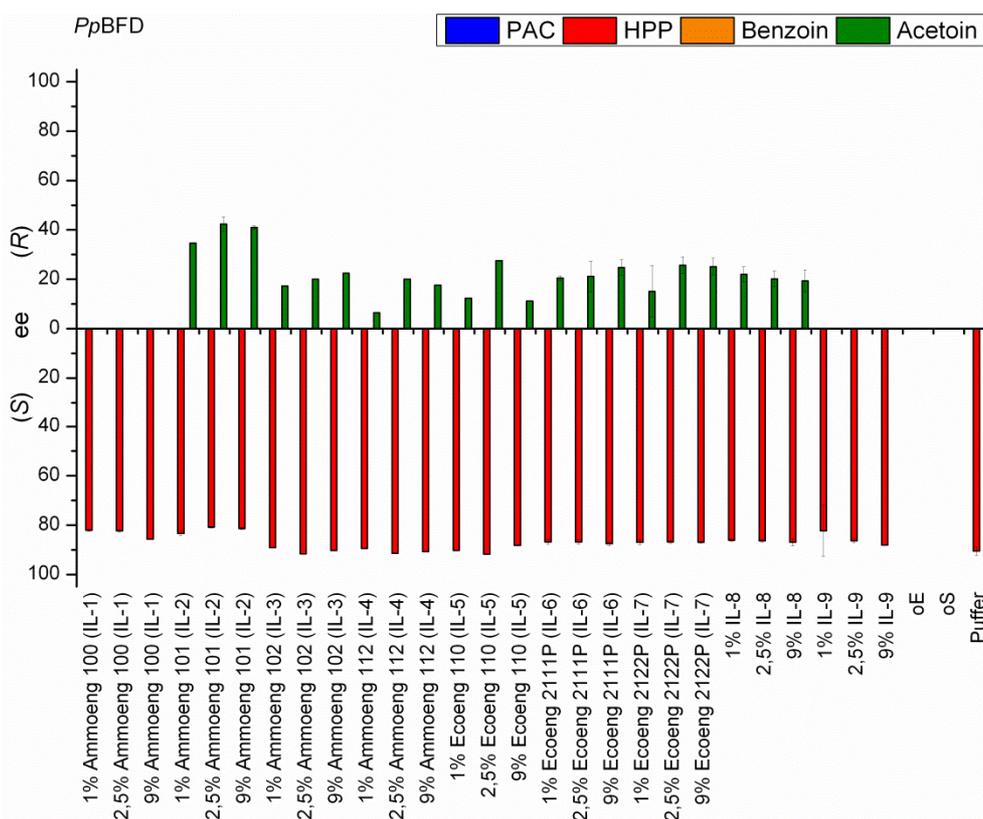


Abbildung 30: Stereoselektivität der *PpBFD* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist der jeweilige ee -Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *PpBFD*; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

PpBFDH281A

Auch in Gegenwart der ionischen Flüssigkeiten waren alle vier möglichen Produkte durch die *PpBFDH281A* zugänglich (Abbildung 31A).

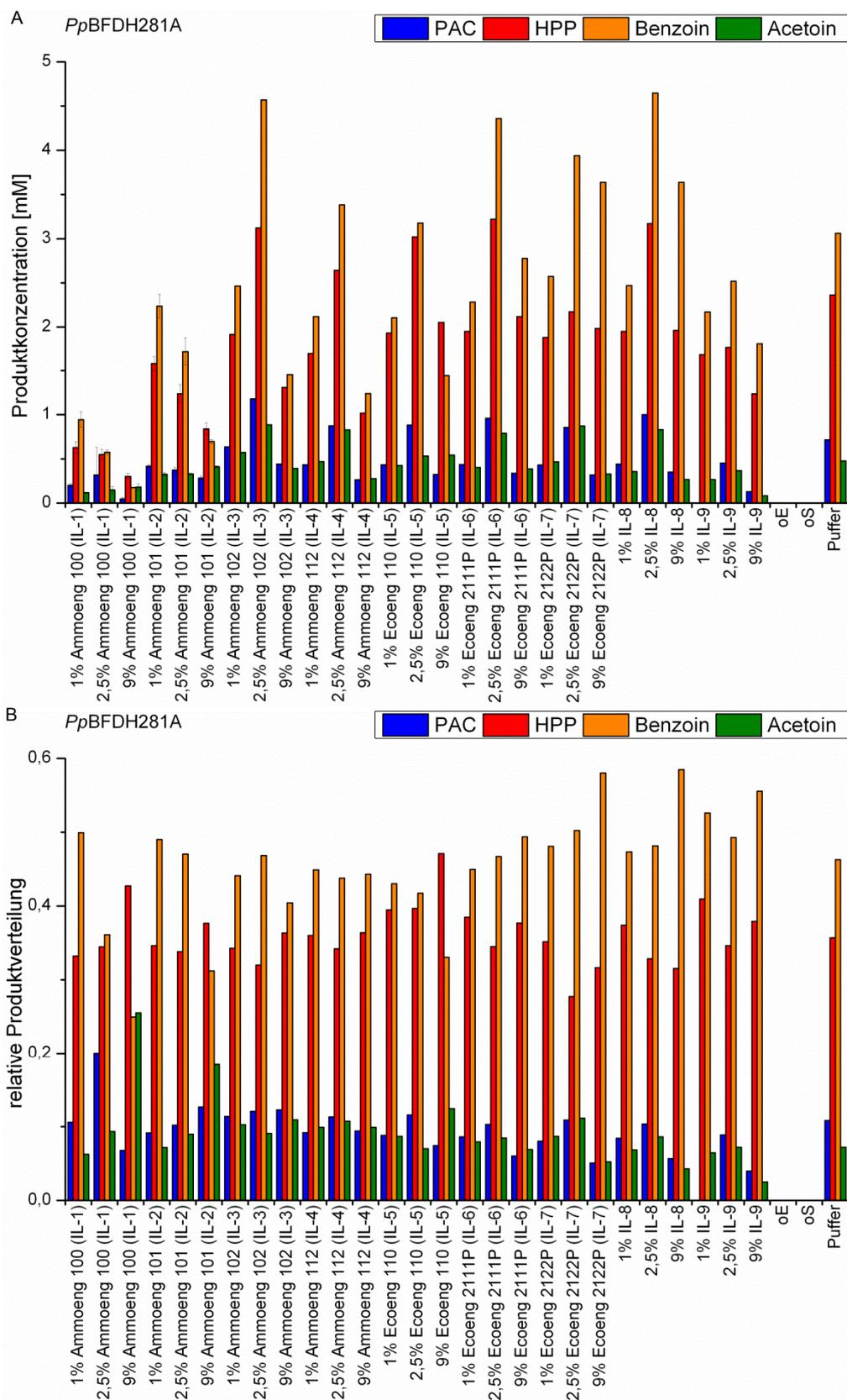


Abbildung 31: Chemoselektivität der *PpBFDH281A* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die jeweilige Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *PpBFDH281A*; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 101 (IL-2)/102 (IL-3)); für alle anderen Werte sind Einzelbestimmungen gezeigt (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 81).

Im Vergleich zur Messung ohne Additive wurde die Benzoinkonzentration durch verschiedene ionische Flüssigkeiten gesteigert, wobei die besten Ergebnisse mit 2,5 % (w/v) IL-8 erzielt wurden, was eine Erhöhung der Benzoinkonzentration von 2,5 - 3 mM auf max. 4,6 mM bewirkte.

Bezüglich der Chemoselektivität (Abbildung 31B) der *PpBFDH281A* zeigte sich im Fall von Ammoeng 100 (IL-1), 101 (IL-2), 102 (IL-3) und Ecoeng 110 (IL-5), dass die rpv des Enzyms für Benzoin minimiert wurde, während diese für Acetoin, HPP und teils auch für PAC gesteigert wurde. Auch hier erfolgte eine Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon. Demgegenüber wurde der umgekehrte Effekt durch die Additive Ecoeng 2111P (IL-6), 2122P (IL-7), IL-8 und IL-9 beobachtet, durch die die rpv für Benzoin auf Kosten der für Acetoin gesteigert wurde.

Die Stereoselektivität der *PpBFDH281A* für Benzoin wurde durch die verschiedenen ionischen Flüssigkeiten nicht beeinflusst (Abbildung 32).

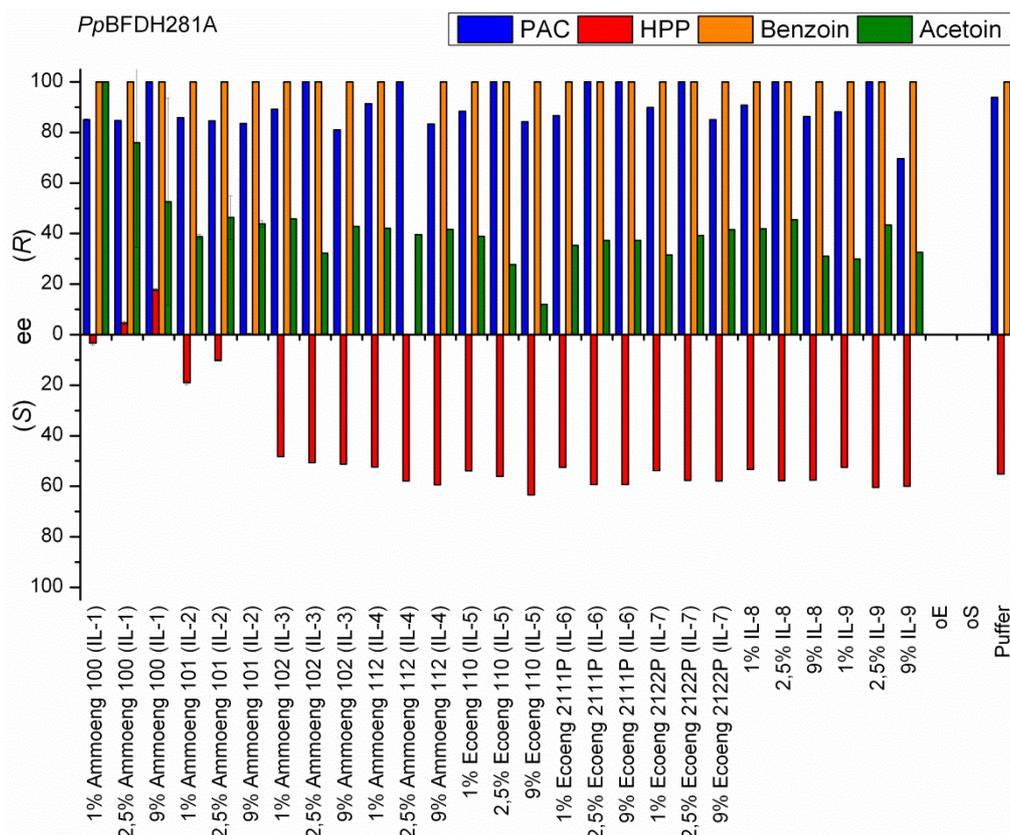


Abbildung 32: Stereoselektivität der *PpBFDH281A* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *PpBFDH281A*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 101 (IL-2)/102 (IL-3)); für alle anderen Werte sind Einzelbestimmungen gezeigt.

Die PAC- und die Acetoin synthese unterlagen in Bezug auf die Stereoselektivität in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten mäßigen Schwankungen. Der größte Einfluss wurde allerdings bei HPP durch Ammoeng 100 (IL-1) und Ammoeng 101 (IL-2) hervorgerufen. Der ee für (S)-HPP im Puffer betrug 55 % (S). Ammoeng 101 (IL-2) senkte diesen auf einen Wert von ee = 10 % (S). Demgegenüber entstand in Anwesenheit von Ammoeng 100 (IL-1) sogar ein geringfügiger Überschuss an (R)-HPP (ee = 18 % (R)).

ApPDC

Mit steigender Konzentration der ammoniumbasierten ionischen Flüssigkeiten (Ammoeng-ILs) zeigte sich besonders im Fall der *ApPDC* eine Reduktion der Produktkonzentration für PAC (Abbildung 33A). Alle anderen ionischen Flüssigkeiten beeinflussten die PAC-Konzentration nicht signifikant. Allerdings führte hier eine Erhöhung der Konzentrationen der ionischen Flüssigkeiten zu einer Steigerung der Acetoinbildung (Ausnahme Ammoeng 100 (IL-1)).

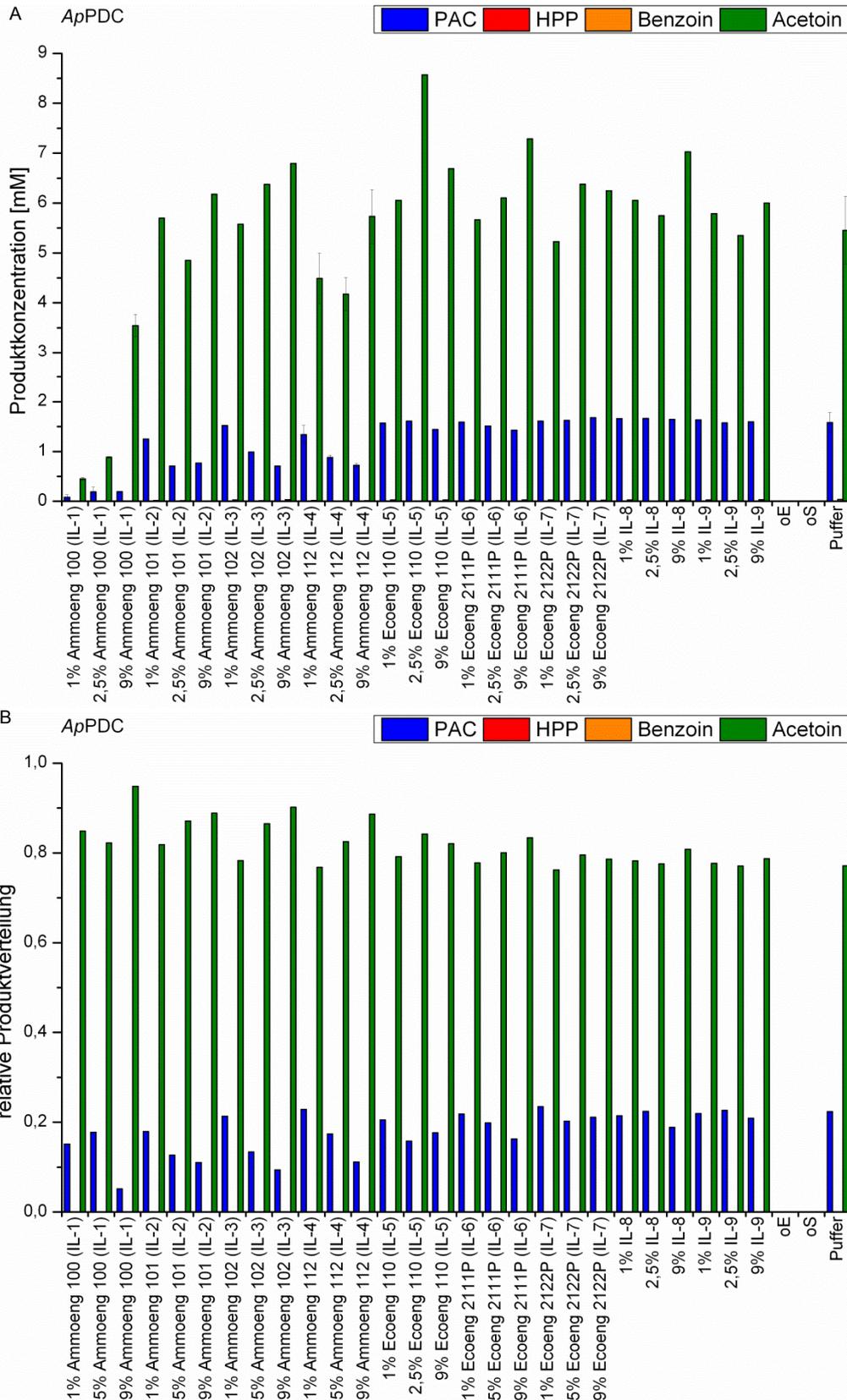


Abbildung 33: Chemoselektivität der *ApPDC* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDC*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 100 (IL-1)/112 (IL-4)/Puffer); für alle anderen Werte sind Einzelbestimmungen gezeigt (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 82).

Die Steigerung der enzymatischen Acetoinbildung und die Reduktion der PAC-Bildung hatte auch Auswirkungen auf die Chemoselektivität (Abbildung 33B). Jeweils mit steigender Konzentration der ionischen Flüssigkeiten wurde die *rpv* für PAC reduziert. Gleichzeitig wurde die *rpv* für Acetoin gesteigert. Folglich wurde durch Zugabe ionischer Flüssigkeiten die Chemoselektivität der *ApPDC* analog zu dem Einfluss organischer Lösungsmittel zum kleineren Produkt verschoben.

Für die Stereoselektivität der *ApPDC* (Abbildung 34) zeigte sich ein einheitliches Bild.

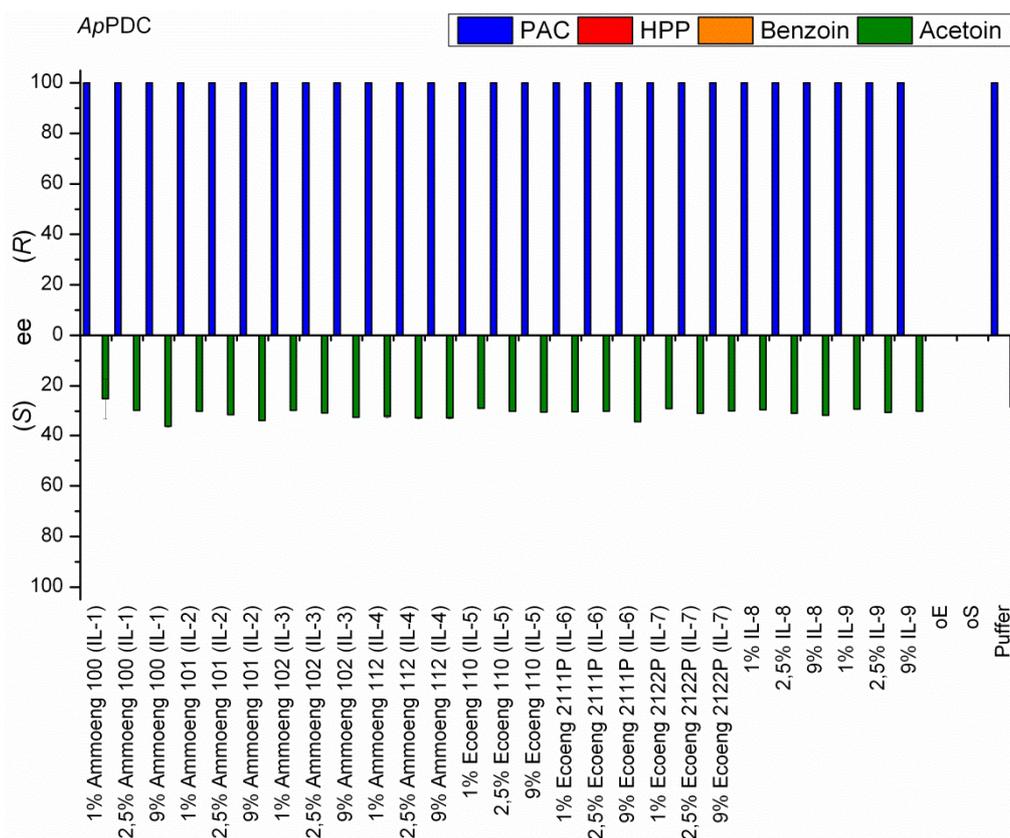


Abbildung 34: Stereoselektivität der *ApPDC* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist der *ee*-Wert unter Einfluss der jeweiligen ionischen Flüssigkeit. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 0,1 mg/mL *ApPDC*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 100 (IL-1)/112 (IL-4)/Puffer); für alle anderen Werte sind Einzelbestimmungen gezeigt.

Ebenso entsprechend dem Einfluss organischer Lösungsmittel (Abbildung 22) wurde durch ionische Flüssigkeiten bei der *ApPDC* keine signifikante Änderung der Stereoselektivität hervorgerufen. (*R*)-PAC wurde unverändert mit einem sehr guten Enantiomerenüberschuss gebildet ($ee > 99\%$ (*R*)). Der *ee*-Wert für das gebildete (*S*)-Acetoin ($ee = 28 - 31\%$ (*S*)) blieb ebenfalls in Gegenwart aller ionischen Flüssigkeiten nahezu unverändert.

ApPDCE469G

Die Variante *ApPDCE469G* war in Anwesenheit der ausgewählten ionischen Flüssigkeiten aktiv (Abbildung 35A), zeigte aber geringe Umsätze. Die Produktkonzentration von PAC (in Puffer 0,51 – 1,14 mM) wurde durch geringe Konzentrationen von Ecoeng 110 (IL-5) sowie Ammoeng 112 (IL-4) im Vergleich zum Puffer leicht verbessert. In allen anderen Fällen wurde die Produktkonzentration der enzymatischen Synthese reduziert. Bezogen auf die Kontrolle ohne Additive wurde die Acetoinkonzentration (0,57 – 0,91 mM) durch Anwesenheit hoher Ammoeng 112 (IL-4)-Konzentrationen signifikant auf 1,53 mM gesteigert.

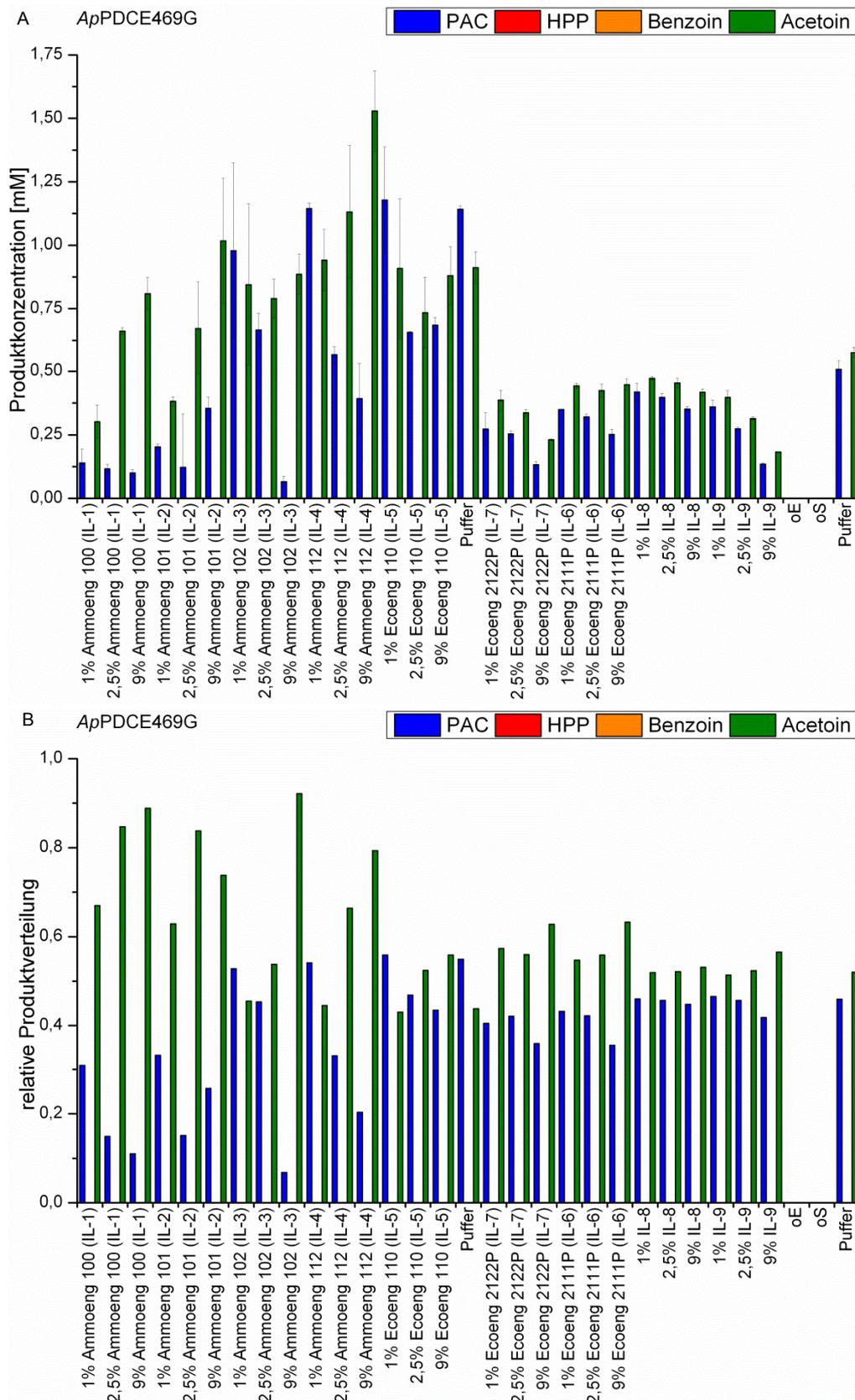


Abbildung 35: Chemoselektivität der *ApPDCE469G* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 83).

Der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität der *ApPDCE469G* folgte einem generellen Trend (Abbildung 35B), der sich in der Reduktion der rpv von PAC mit steigender Konzentration der ionischen Flüssigkeiten äußerte, während der rpv-Wert für Acetoin anstieg. Die einzige Ausnahme bildete hier IL-8. Diese ionische Flüssigkeit beeinflusste weder den rpv-Wert für PAC noch für Acetoin signifikant. Auch hier wurde die Verschiebung der Chemoselektivität in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten zum kleineren 2-Hydroxyketon beobachtet.

Wie im Fall der organischen Lösungsmittel, zeigten die ionischen Flüssigkeiten einen starken Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* (Abbildung 36).

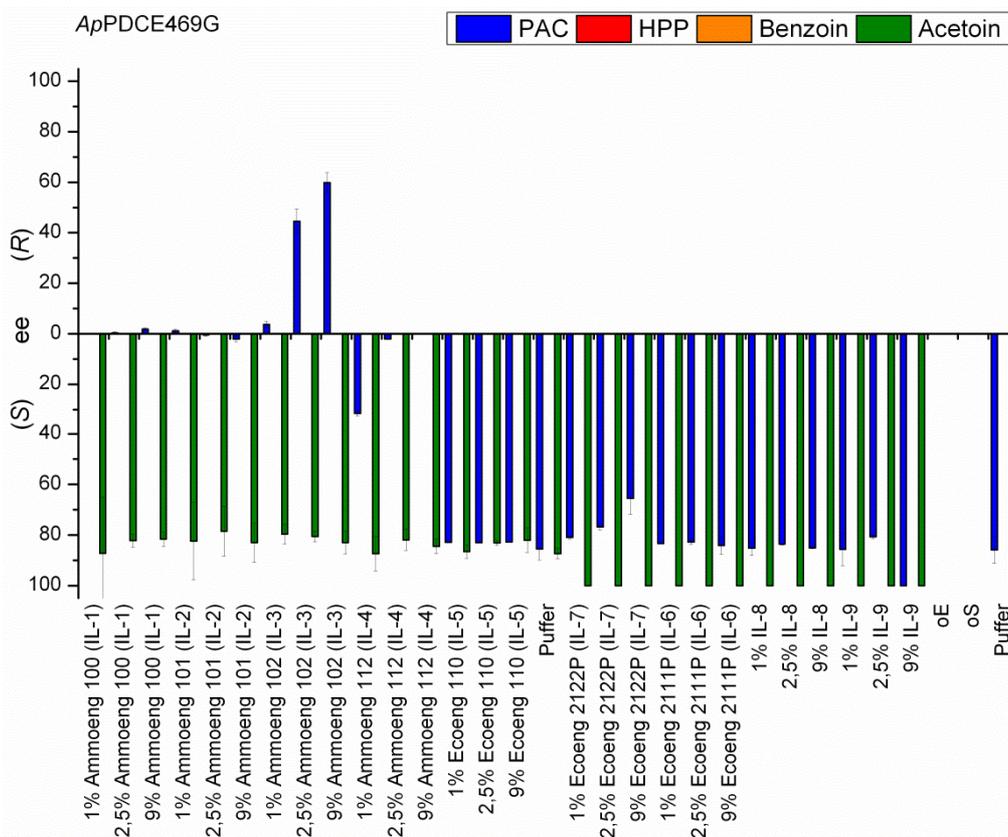


Abbildung 36: Stereoselektivität der *ApPDCE469G* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO_4 , 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDC469G*, bei zu geringem Umsatz 0,4 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

Im Vergleich zu der jeweiligen Referenzmessung wurde der ee-Wert für Acetoin ($ee = 87\% - 99\%$ (S)) durch die ionischen Flüssigkeiten nicht signifikant beeinflusst. Für die Stereoselektivität des PAC-Produkts ($ee = 86\%$ (S)) zeigte sich ein anderes Bild. Während Ecoeng 110 (IL-5), 2122P (IL-7), 2111P (IL-6) sowie IL-8 und IL-9 lediglich eine moderate Reduktion des Enantiomerenüberschusses auf $ee = 65\%$ für (S)-PAC im Reaktionsansatz mit *ApPDCE469G* bewirkten, wurde dieser Einfluss durch die

Ammoeng-ILs verstärkt. Ammoeng 100 (IL-1), 101 (IL-2) und 112 (IL-4) reduzierten die Stereoselektivität für (S)-PAC bis hin zu nahezu racemischen Verhältnissen. Durch Ammoeng 102 (IL-3) wurde im Gegensatz dazu, der Enantiomerenüberschuss des (S)-PACs mit steigender Konzentration in einen (R)-Überschuss umgekehrt. Ausgehend von einer stereoselektiven Synthese von (S)-PAC mit $ee = 86\%$ (S) (in Puffer) wurde die Enzymselektivität durch 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3) auf $ee = 60\%$ (R) verändert.

PfBAL

Die *PfBAL* blieb auch in Gegenwart der untersuchten ionischen Flüssigkeiten hoch aktiv (Abbildung 37A).

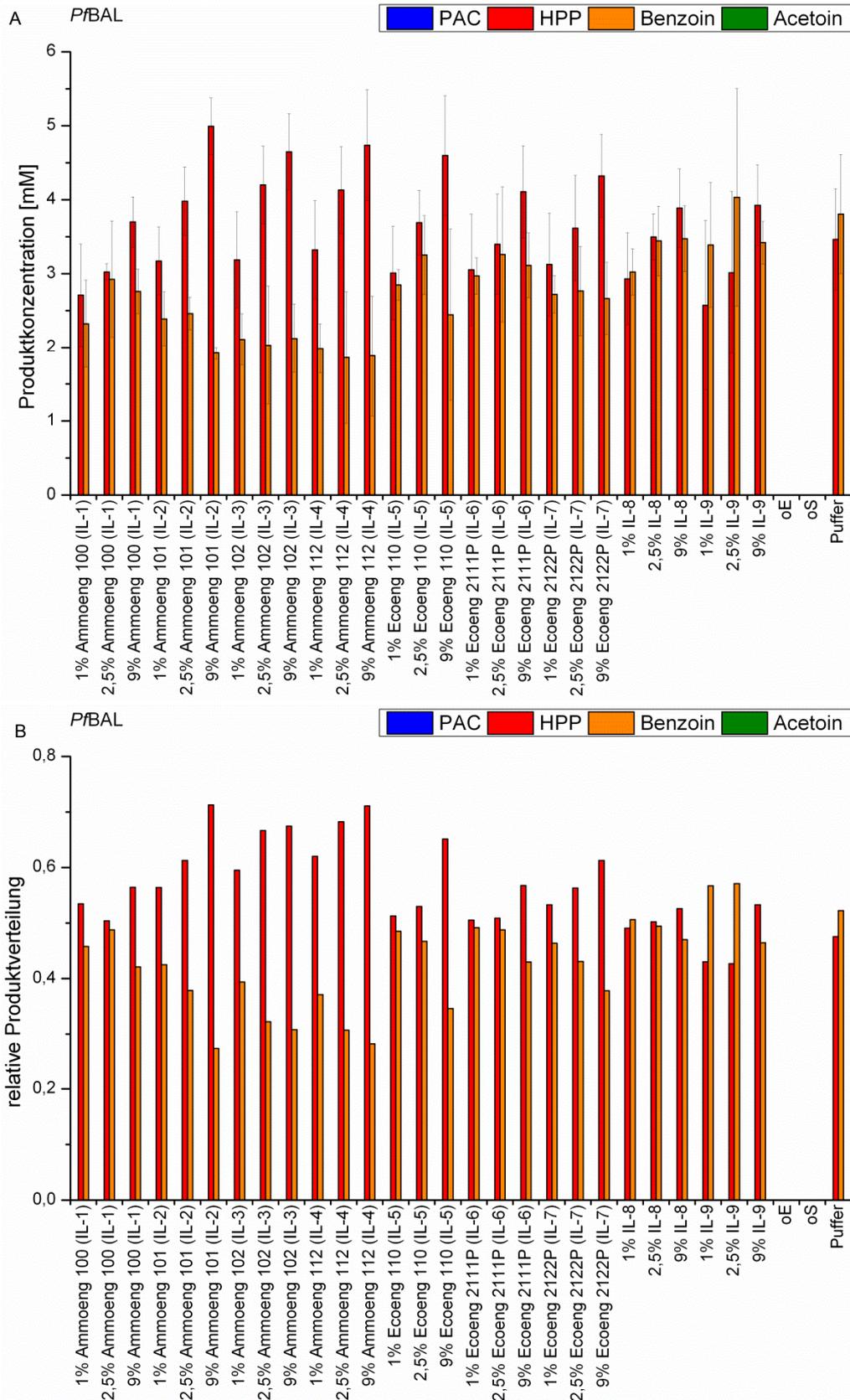


Abbildung 37: Chemoselektivität der PFBAL in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist die Produktkonzentration (A) und die relative Produktverteilung (B). Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h, 0,02 mg/mL PFBAL, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd; die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Darstellung der Ergebnisse in %: Abbildung 84).

Im Vergleich zur Messung ohne Additive zeigte sich jedoch, dass besonders durch Ammoeng 102 (IL-3) und Ammoeng 112 (IL-4) in nahezu allen Fällen die Produktkonzentration für Benzoin reduziert wurde. HPP hingegen wurde in allen Fällen mit steigender Konzentration an ionischer Flüssigkeit in höheren Konzentrationen produziert. Dabei steigerten besonders die höchsten Konzentrationen an ionischer Flüssigkeit die HPP-Bildung im Vergleich zur Referenz. Bei der Betrachtung der Chemoselektivität (Abbildung 37B) zeigte sich, dass der r_{PV} -Wert für Benzoin, bis auf eine Ausnahme (IL-9) durch alle ionischen Flüssigkeiten herabgesetzt wurde. Zudem zeigte sich erneut ein konzentrationsabhängiger Trend analog des Einflusses der organischen Lösungsmittel (IV.2.1): Mit steigender Konzentration der einzelnen ionischen Flüssigkeiten wurde die Chemoselektivität der *PfBAL* in Richtung des kleineren 2-Hydroxyketons, in diesem Fall des HPPs, verschoben.

Auch der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität (Abbildung 38) zeigte den Trend, der mit organischen Lösungsmitteln bereits beobachtet wurde.

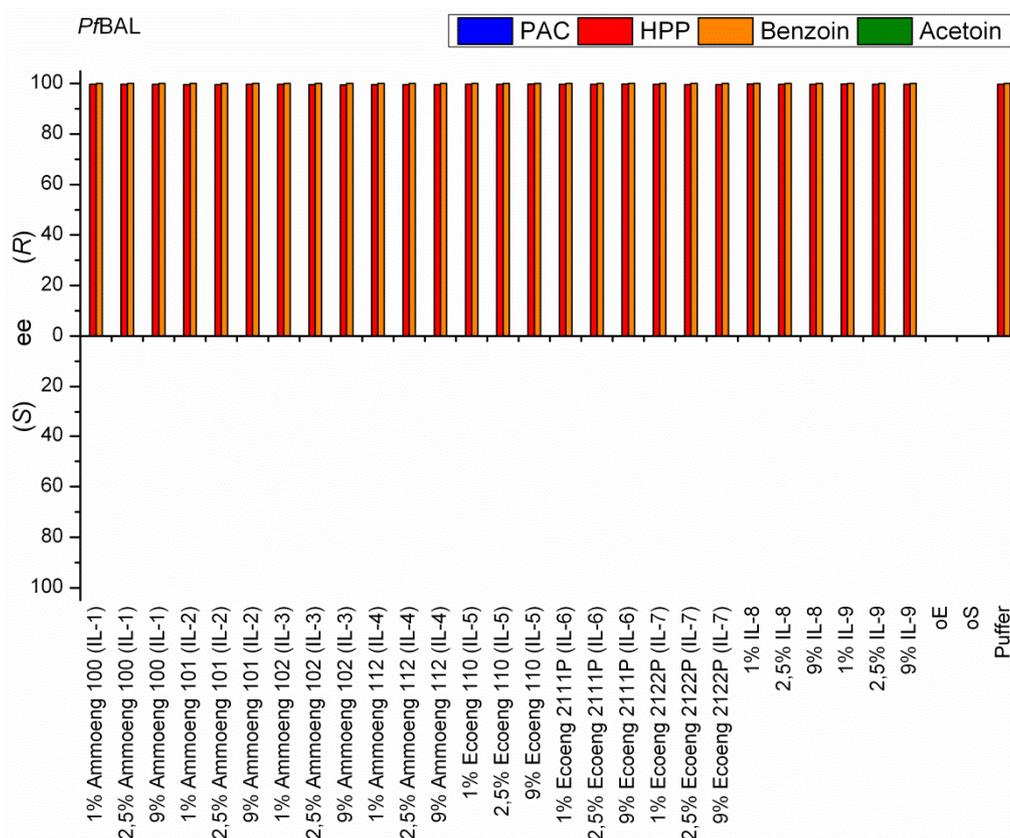


Abbildung 38: Stereoselektivität der *PfBAL* unter Einfluss ionischer Flüssigkeiten. Dargestellt ist der jeweilige ee-Wert für jedes gebildete Produkt. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h, 0,02 mg/mL *PfBAL*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

Die beiden Produkte HPP ($ee > 99\%$ (*R*)) und Benzoin ($ee > 99\%$ (*R*)) wurden mit einem sehr hohen ee -Wert produziert. Wie im Fall der organischen Lösungsmittel (Abbildung 26) zeigte keine der untersuchten Additive einen Einfluss auf die Stereoselektivität der *PfBAL*-katalysierten Synthesen.

Fazit

Zusammenfassend können mehrere Trends formuliert werden, die den Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Chemo- und Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme beschreiben:

- In Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten zeigt sich in den meisten Fällen eine Verschiebung der Chemoselektivität in Richtung des kleineren 2-Hydroxyketons (*LlKdcA*, *PpBFD*, *ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*). Es kann teilweise aber auch der gegenläufige Trend beobachtet werden (*PpBFDH281A*, Abbildung 31).
- Wie schon mit organischen Lösungsmitteln beobachtet, ist eine in Puffer hoch stereoselektive enzymatische Synthese weniger anfällig für Einflüsse durch ionische Flüssigkeiten, als eine weniger selektive Reaktion.

3 Einfluss von Additiven auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Im Folgenden werden die Beobachtungen der vorangegangenen Kapitel zusammengefasst, um generelle Tendenzen für die gesamte Gruppe ThDP-abhängiger Enzyme identifizieren zu können. Hierbei wird die Beeinflussung der Chemoselektivität jeweils in Gegenwart organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten umfassend und vergleichend betrachtet.

3.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Zur besseren Visualisierung der Einflüsse von organischen Lösungsmitteln auf die Chemoselektivität ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme, wurde die nach 24 h gemessene Produktkonzentration in Puffer in Relation zu der prozentualen Änderung dieses Werts in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels in einer definierten Konzentration gegenübergestellt (Abbildung 39A).

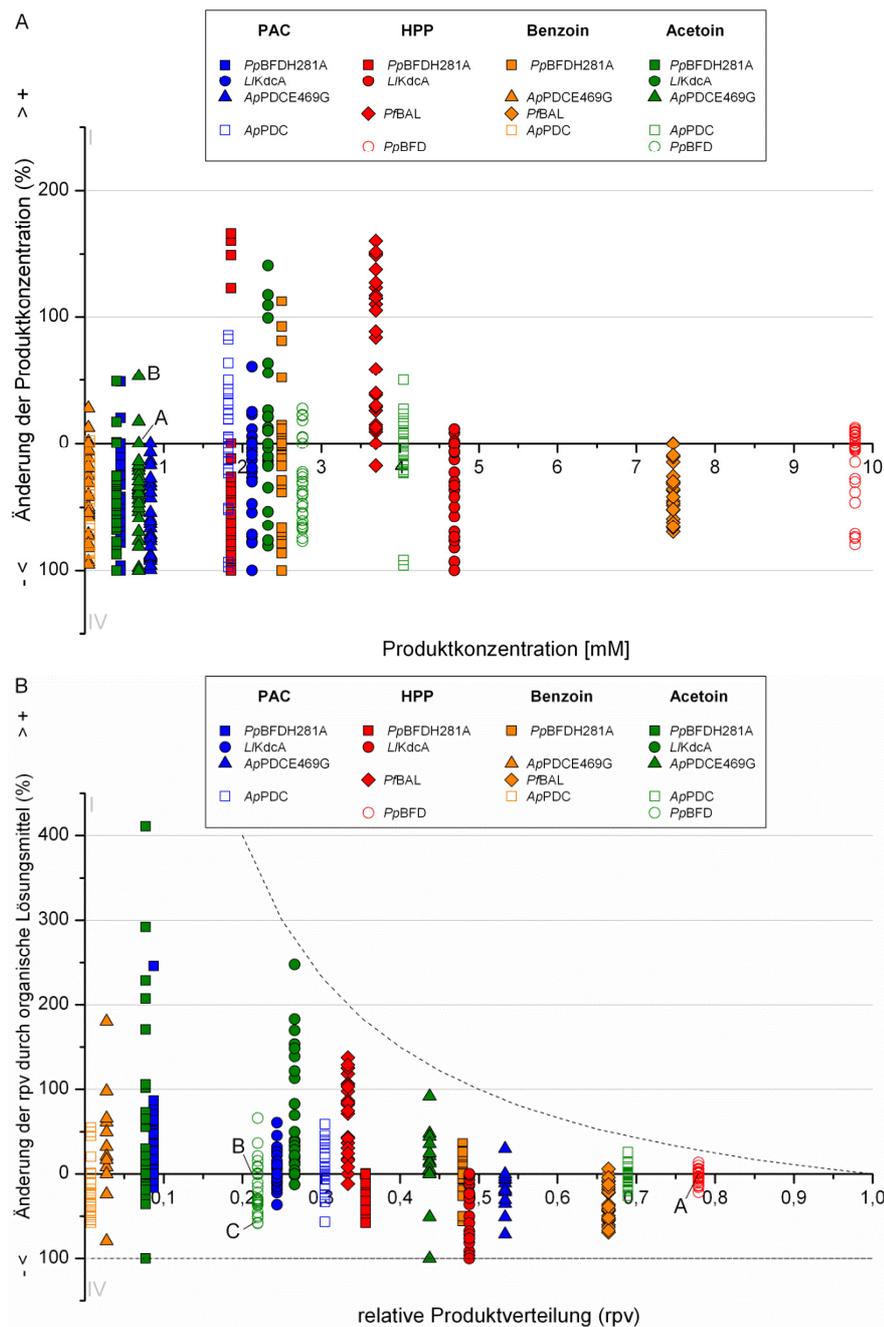


Abbildung 39: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch organische Lösungsmittel und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne Lösungsmittelzugabe. (B) Zusammenhang zwischen der Änderung der relativen Produktverteilung (rpv) durch organische Lösungsmittel (%) und der rpv ohne Lösungsmittelzusatz. Die Symbole repräsentieren jeweils das Enzym und die Farbe des Symbols das jeweilige gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt gibt den Einfluss eines organischen Lösungsmittels in einer bestimmten Konzentration wieder (für Details siehe IV.2.1). Datenpunkte im 1. Quadranten zeigen eine erhöhte Produktkonzentration nach 24 h (A) oder rpv (B) nach 24 h relativ zur Messung in Puffer. Punkte im 4. Quadranten geben eine reduzierte Produktkonzentration (A) oder rpv (B) in Abhängigkeit des Lösungsmittels an. A - B (A) und A - C (B) beziehen sich auf Beispiele, welche im Text genannt werden. Die gestrichelten Linien im 1. Quadranten und bei 100 % im 4. Quadranten zeigen die Grenze der maximal möglichen Änderung aufgrund der prozentualen Darstellung an. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*Ap*PDC, *Ap*PDCE469G, *Pf*BAL) oder 180 mM (*Ll*KdcA, *Pp*BFD, *Pp*BFDH281A) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 15, Abbildung 17, Abbildung 19, Abbildung 21, Abbildung 23, Abbildung 25 und III.2.2.7.7.

In diesem Graph wurden die vier möglichen Produkte unabhängig voneinander betrachtet. Auf der x-Achse wurde die Produktkonzentration nach 24 h in Puffer ohne Zugabe eines organischen Lösungsmittels aufgetragen. Die Veränderung der Produktkonzentration durch ein organisches Lösungsmittel wurde bezogen auf den Wert im Puffer (in %) berechnet. Werte $y > 0$ zeigen eine Steigerung der Produktkonzentration, hervorgerufen durch organische Lösungsmittel, Punkte bei $y < 0$ eine Reduktion dieses Werts. Wie dieser Plot zu lesen ist, wird an folgendem Beispiel deutlich: Die Enzymvariante ApPDCE469G produziert Acetoin in einer Endkonzentration von 0,68 mM (Abbildung 23, Abbildung 39A, Punkt A auf der x-Achse). Hierbei handelt es sich um die Messung ohne Zugabe eines organischen Lösungsmittels. Die Zugabe von beispielsweise 20 vol% DMSO steigert die Produktkonzentration von Acetoin auf einen Wert von 1,05 mM (Abbildung 23). Die prozentuale relative Steigerung um 54,4 % dieses Produkts durch das Additiv wird über der Startkonzentration von 0,68 mM aufgetragen (Abbildung 39A, Punkt B im 1. Quadranten). Der Einfluss von 20 vol% DMSO ist somit durch einen Punkt in diesem Graphen repräsentiert. Jedes weitere organische Lösungsmittel in einer bestimmten Konzentration wird durch einen der anderen Punkte repräsentiert.

Zusammengefasst war in 26 % aller Fälle eine Steigerung der Produktkonzentration nach 24 h möglich. Hingegen führte der Zusatz eines organischen Lösungsmittels bei 74 % der Messungen zu einer Reduktion der Produktkonzentration im Puffer.

Wie schon in IV.2.1 beschrieben, werden Änderungen der Chemoselektivität besonders gut durch Betrachtung der relativen Produktverteilung (rpv) deutlich, weil hier die Relation der einzelnen Produkte zueinander betrachtet wird (Abbildung 39B). Der Einfluss der einzelnen Lösungsmittel auf die verschiedenen ThDP-abhängigen Enzyme wurde bereits ausführlich diskutiert (IV.2.1). Hier werden nun die generellen Einflüsse betrachtet.

Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon

In Gegenwart organischer Lösungsmittel wurde häufig eine Verschiebung des Spektrums zu einem Produkt beobachtet, welches den kleineren Aldehyd (Acetaldehyd) als Donor enthält. Dies geschieht auf Kosten des Produkts mit dem größeren Donor (Benzaldehyd). Dieser Effekt gilt für die organischen Lösungsmittel generell.

So zeigte sich bei den Ergebnissen mit der *L/KdcA* in fast allen Fällen eine Reduktion der relativen Produktverteilung für HPP (Donor = Benzaldehyd), während Acetoin (Donor = Acetaldehyd) entsprechend zunahm. Im Fall der *PpBFDH281A* werden die Werte der rpv für Acetoin (Donor = Acetaldehyd) und PAC (Donor = Acetaldehyd) gesteigert, während die rpv für Benzoin (Donor = Benzaldehyd) und im Besonderen für HPP (Donor = Benzaldehyd) abnahm.

Neben der Donorposition scheint auch die Akzeptorposition durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel beeinträchtigt zu werden. So zeigen die folgenden beiden Beispiele, dass eine Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon erfolgt, der Donoraldehyd jedoch beibehalten wird. Dies wurde erstens bei der Variante *ApPDCE469G* in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln beobachtet, wobei die rpv für Acetoin (Akzeptor = Acetaldehyd) mit einigen Ausnahmen stieg, während die rpv für PAC (Akzeptor = Benzaldehyd) reduziert wurde (Abbildung 23). Zweitens zeigten die Ergebnisse mit der *PfBAL* eine Senkung der rpv für Benzoin (Akzeptor = Benzaldehyd) bei gleichzeitiger Erhöhung des HPP-Anteils (Akzeptor = Acetaldehyd) (Abbildung 25).

Geringe Chemoselektivität bedingt stärkeren Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die rpv

Neben der Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon, kann ein zweiter genereller Trend bezüglich des Einflusses organischer Lösungsmittel auf ThDP-abhängige Enzyme beobachtet werden. In mehreren Fällen zeigte sich, dass es bei einer chemoselektiven Synthese von nur ein bis zwei Produkten in Gegenwart organischer Lösungsmittel seltener zu einer Verschiebung des Produktspektrums kam.

Während in *PpBFD*-katalysierten Reaktionen die Konzentration an gebildetem HPP (in Puffer rpv = 0,78, Abbildung 39B, A) z.B. in Gegenwart von 30 vol% *i*Prop nur maximal um 22 % abnahm, zeigte sich für Acetoin (Abbildung 39B, B, in Puffer rpv = 0,22 Abbildung 17) eine Reduktion um bis zu 58 % relativ zur Referenz in Puffer (Abbildung 39B, C).

Für die *PpBFDH281A*-katalysierten Synthesen war erkennbar, dass die rpv von HPP relativ zu Benzoin eine stärkere Reduktion erfuhr (Abbildung 19), obwohl beide Produkte Benzaldehyd als Donorsubstrat enthalten. Auch im Fall der *ApPDC* wurde Acetoin mit einer hohen rpv = 0,69 weniger stark durch die Anwesenheit organischer

Lösungsmittel reduziert, als die Produkte mit den geringeren rpv-Werten PAC (rpv = 0,3) und Benzoin (rpv < 0,01) (Abbildung 21).

Fazit

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zur Chemoselektivität in Abbildung 39 lassen allgemeine Tendenzen bei den verschiedenen Enzymen und Lösungsmitteln erkennen. Insbesondere wird die Verschiebung der Chemoselektivität hin zum kleineren 2-Hydroxyketon als genereller Trend deutlich, der mit allen getesteten Lösungsmitteln beobachtet wurde, unabhängig von deren Konzentration. Weiterhin werden in Puffer hoch chemoselektive enzymatische Reaktionen bezüglich ihrer Selektivität deutlich weniger stark beeinflusst als solche mit geringerer Chemoselektivität.

Obwohl die Gegenwart organischer Lösungsmittel in den meisten Fällen zu einer Verringerung der Produktbildung führt, kann in einzelnen Fällen auch eine Zunahme der Produktkonzentrationen beobachtet werden.

Es kann verschiedene Gründe für die beschriebenen Einflüsse organischer Lösungsmittel auf ThDP-abhängige Enzyme geben. Im Folgenden werden die wahrscheinlichsten molekularen Ursachen diskutiert.

3.1.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Enzymflexibilität

Der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Flexibilität (als ein Maß für die Beweglichkeit der Struktur) von Enzymen wird in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Die Flexibilität von Enzymen wird mit der Wasseraktivität (I.3.1.1) korreliert. So scheint eine hohe Hydratation zu einer höheren Flexibilität und damit zu einem aktiveren Enzym zu führen (Jönsson *et al.* 1998). In der Literatur wird durch Erhöhung der Wasseraktivität von einer erhöhten Stereoselektivität berichtet (Högberg *et al.* 1993). Es gibt Beispiele, dass eine erhöhte Wasseraktivität die Stereoselektivität aber auch herabsetzte (Orrenius *et al.* 1995). Andererseits gibt es Literaturstellen, die den Einfluss der Flexibilität auf die Selektivität eines Enzyms ausschließen, zumindest in reinen organischen Lösungsmitteln (Rariy und Klivanov 2000). Unter der Voraussetzung einer präzisen Versuchsdurchführung und –analytik scheint der Einfluss abhängig zu sein vom Enzym, dessen Struktur sowie dem Reaktionsmechanismus. Darüber hinaus scheinen wassermischbare organische Lösungsmittel Enzyme anfälliger für Entfaltungen zu machen (Secundo *et al.* 2011)

und die allgemeine Aktivität herabzusetzen. Zusammenfassend gibt es keine zu verallgemeinernde Tendenz zum Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Flexibilität und das Verhalten von Biokatalysatoren.

Um zumindest für ThDP-abhängige Enzyme einen Eindruck zu erhalten, wie die organischen Lösungsmittel Einfluss auf die Enzyme nehmen, wurde die temperaturabhängige Chemoselektivität untersucht (IV.1.2.3, Tabelle 11). Mit einer erhöhten Temperatur kann innerhalb des Enzyms eine Erhöhung der Molekülbewegung und damit eine gesteigerte Flexibilität erreicht werden. So sollten Hinweise zum Einfluss einer erhöhten Enzymflexibilität auf die Carboligaseaktivität abgeleitet werden. Die Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd wurde dazu in Abwesenheit organischer Lösungsmittel bei verschiedenen Temperaturen untersucht (IV.1.2.3, Tabelle 11). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Temperaturerhöhung einen signifikanten Einfluss auf die Chemoselektivität der Enzyme hat. Im Fall der *LKdcA* wurde mit steigender Temperatur die Chemoselektivität von HPP zum Acetoin verschoben (IV.1.2.3, Tabelle 11). Derselbe Zusammenhang wurde mit der *PpBFD* beobachtet (IV.1.2.3, Tabelle 11). Im Fall der *PpBFDH281A* nahm die *r_{pv}* für Benzoin mit steigender Temperatur ab, während dieser Wert für Acetoin und HPP zunahm (IV.1.2.3, Tabelle 11). Auch in *PfBAL*-katalysierten Reaktionen zeigte sich eine Verschiebung der Chemoselektivität von Benzoin zu HPP mit steigender Temperatur (IV.1.2.3, Tabelle 11). Zusammenfassend werden also durch Temperaturerhöhung und Lösungsmittelzusätze synchrone Effekte auf die Chemoselektivität der ThDP-abhängigen Enzyme *PfBAL*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*, *LKdcA* bewirkt. Im Gegensatz dazu ist die Chemoselektivität der *ApPDC* und der Variante *ApPDCE469G* nicht temperaturempfindlich (IV.1.2.3, Tabelle 11), obwohl mit organischen Lösungsmitteln eine Veränderung dieser Selektivität beobachtet werden konnte (IV.2.1). Dies könnte darin begründet sein, dass diese beiden Enzyme die einzigen in der untersuchten Reihe sind, welche Acetaldehyd in der Donorposition bevorzugen und Benzaldehyd dort so gut wie nicht akzeptieren. Falls eine höhere molekulare Bewegung aufgrund erhöhter Temperatur zur Verkleinerung der Donorbindetasche führt, kann dies bei den *ApPDCs* nicht zu einem Wechsel des Donoraldehyds führen, weil ein kleinerer als Acetaldehyd in der Reaktion nicht verfügbar ist. Alle anderen getesteten Enzyme haben jedoch zwei Möglichkeiten die Donorposition zu besetzen, entweder mit Benzaldehyd oder mit Acetaldehyd. Hier

wird durch die Temperatursteigerung die Verschiebung der Donorpräferenz von Benzaldehyd zu Acetaldehyd induziert.

Es gibt mehrere mögliche Begründungen, warum organische Lösungsmittel einen ähnlichen Effekt wie eine Temperaturerhöhung auf ThDP-abhängige Enzyme bewirken. Einerseits könnte das organische Lösungsmittel die Flexibilität der Enzyme beeinflussen, so wie es auch durch Temperaturverschiebung möglich ist. Es ist denkbar, dass die Bindung eines kleineren Donoraldehyds dadurch erzwungen wird, dass es zu sterischen Behinderungen aufgrund einer erhöhten molekularen Bewegung der Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum der Enzyme kommt. Andererseits können die organischen Lösungsmittel, ebenso wie die Temperatur einen Einfluss auf die Mikroreaktionsraten der Reaktion und die Affinität der Substrate zum Enzym nehmen. Dies ist durch eine Änderung der dreidimensionalen Struktur, veränderte Molekülbewegungen sowie eine veränderte Löslichkeit von Substraten und Produkten möglich. Dies würde in einer entsprechenden Verschiebung des möglichen Produktspektrums resultieren.

3.1.2 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Löslichkeit von Substraten, Intermediaten und Produkten

Organische Lösungsmittel beeinflussen die Löslichkeit aller Komponenten eines Reaktionsansatzes, besonders wenn schwer wasserlösliche aromatische Substanzen wie Benzaldehyd oder Benzoin involviert sind. Die Änderung der Löslichkeit von Komponenten kann auch zu einer Beeinflussung der kinetischen Parameter für diese Komponente und damit der Reaktion führen. Die temperaturabhängige Chemoselektivität der *PfBAL* (IV.1.2.3, Tabelle 11) ist ein sehr gutes Beispiel, um den Einfluss der Löslichkeit der Komponenten auf das Verhalten des Enzyms zu untersuchen. Der Grund für diese Eignung ist das Auftreten eines schwer löslichen Zwischenprodukts während der HPP-Synthese dieses Enzyms. Vorangegangene Studien zeigten, dass die Katalyse von HPP durch die *PfBAL* nur über Benzoin erfolgt (Demir *et al.* 2001, Abbildung 40).

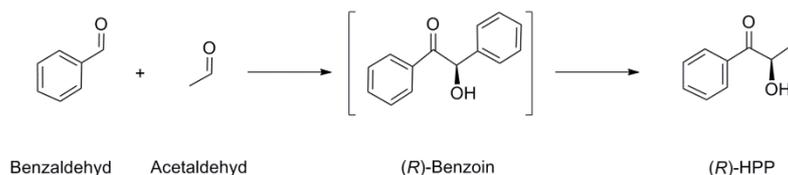


Abbildung 40: Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd durch die *PfBAL* zu (R)-HPP. Bei dieser Carboligation entsteht zunächst (R)-Benzoin aus der Selbstligation von zwei Benzaldehydmolekülen als Zwischenprodukt. Dieses wird im Anschluss wieder gespalten und das ThDP-gebundene Benzaldehydmolekül mit einem Molekül Acetaldehyd zu (R)-HPP verknüpft (Demir *et al.* 2001).

Zuerst werden zwei Moleküle Benzaldehyd zu Benzoin ligiert, bevor dieses wieder gespalten werden kann und ein ThDP-gebundenes Benzaldehyd vorliegt. Dieser gebundene Donor kann dann mit dem Akzeptor Acetaldehyd zu HPP reagieren (Demir *et al.* 2001). Benzoin allerdings zeigt nur eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Medien (< 1 mM) und fällt während der bimolekularen Reaktion als weißer Niederschlag aus. Eine Konsequenz daraus ist, dass jedes Molekül Benzoin, welches ausfällt, der Reaktion zwei Moleküle Benzaldehyd entzieht. Natürlich ist der Donor dadurch dem System nicht dauerhaft entzogen, weil Benzoin wieder in Lösung gehen kann. Jedoch wird temporär die Verfügbarkeit des Benzaldehyds verringert.

Im Fall der *PfBAL* kann bei erhöhter Temperatur beobachtet werden, dass die Konzentration für Benzoin nach 24 h reduziert wird, während diese Konzentration für HPP deutlich gesteigert wird. Dies ist möglicherweise auf die erhöhte Löslichkeit von Benzoin zurückzuführen. Eine erhöhte Temperatur, die hier gleichgesetzt wird mit einer erhöhten Komponentenlöslichkeit, verschiebt die Chemo Selektivität der *PfBAL* in gleichem Maße in Richtung des kleineren 2-Hydroxyketons, wie dies in Anwesenheit organischer Lösungsmittel beobachtet wurde. Die Ergebnisse stützen daher die Vermutung, dass die organischen Lösungsmittel die Löslichkeit der einzelnen Komponenten beeinflussen und dadurch Einfluss auf die Chemo Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme nehmen.

Es muss andere mögliche Erklärungen für den beobachteten Sachverhalt geben, denn die *PfBAL* ist das einzige der ausgewählten Enzyme, welches über die beschriebene Besonderheit in seinem Reaktionszyklus verfügt und dadurch anfällig für Löslichkeitsschwankungen ist. Allerdings ist diese Biotransformation aufgrund der Bildung des schwer löslichen Benzoins ein gut messbares Beispiel. Wahrscheinlich wird auch bei den anderen Reaktionen eine veränderte Löslichkeit der Substrate und Produkte zu veränderten Mikroreaktionsraten führen. Wie stark dieser Einfluss neben

den anderen Einflüssen ist, konnte mit den verfügbaren Messmethoden nicht nachgewiesen werden.

3.1.3 Direkte Interaktion der organischen Lösungsmittel mit dem aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme

Des Weiteren kann eine direkte Interaktion der organischen Lösungsmittel mit den Aminosäureresten des aktiven Zentrums ThDP-abhängiger Enzyme auftreten. Die aktiven Zentren besitzen alle hydrophobe Bereiche, mit denen eine Interaktion stattfinden könnte. Werden die Lösungsmittelausschluss-Volumina der verschiedenen organischen Lösungsmittel mit den Volumina der Substrate und Produkte verglichen (Tabelle 13), so zeigt sich deutlich, dass die meisten Lösungsmittel kleiner sind als das kleinste mögliche Produkt Acetoin. Keines der Lösungsmittel ist zudem größer als die gemischten 2-Hydroxyketone HPP, PAC oder Benzoin. Theoretisch müsste es also allen Lösungsmitteln möglich sein, sich in den aktiven Zentren der Enzyme zu arrangieren und durch direkte Interaktion mit Teilen des aktiven Zentrums lokale Blockaden zu verursachen. Diese Blockaden, etwa im Bereich der Donorbindestelle, könnten erklären, warum eine generelle Tendenz zum kleineren Donoraldehyd zu beobachten ist.

Auf die Möglichkeit der selektiven Blockade wird im Verlauf dieser Arbeit mit weiteren Untersuchungen noch genauer eingegangen (IV.4.1.1).

3.2 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Analog zu den organischen Lösungsmitteln wurde auch der Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität zusammenfassend grafisch dargestellt (Abbildung 41).

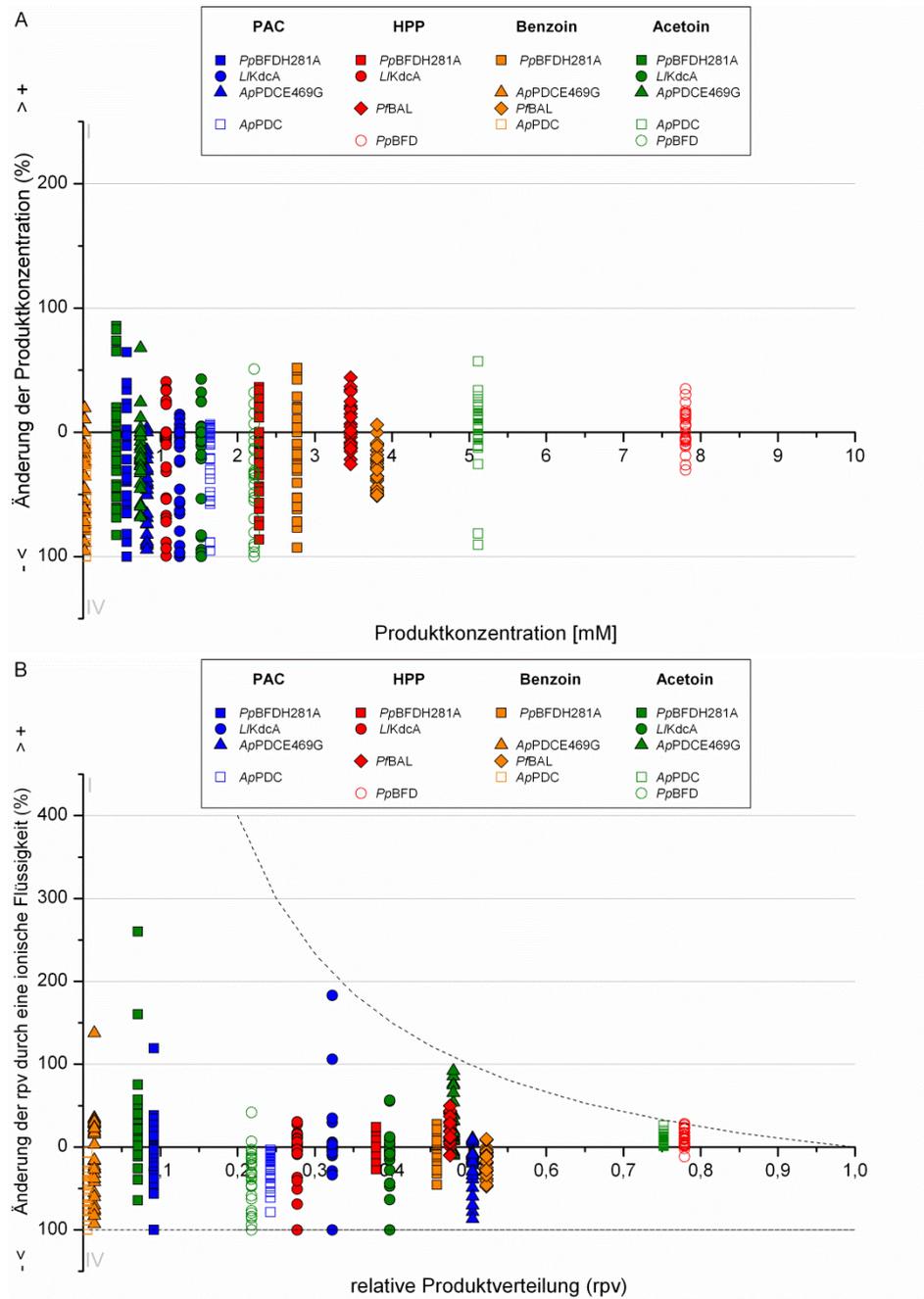


Abbildung 41: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch ionische Flüssigkeiten (ILs) und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne IL-Zugabe. (B) Zusammenhang zwischen der Änderung der relativen Produktverteilung (rpv) durch ionische Flüssigkeiten (%) und der rpv ohne IL-Zugabe. Die Symbole repräsentieren jeweils das Enzym und die Farbe des Symbols das jeweilige gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt gibt den Einfluss einer ionischen Flüssigkeit in einer bestimmten Konzentration wieder (für Details siehe IV.2.2). Datenpunkte im 1. Quadranten zeigen eine erhöhte Produktkonzentration (A) oder rpv (B) nach 24 h relativ zur Messung in Puffer. Punkte im 4. Quadranten geben eine reduzierte Produktkonzentration (A) oder rpv (B) in Abhängigkeit des ILs an. Die gestrichelte Linie im 1. Quadranten und bei 100 % im 4. Quadranten zeigt die Grenze der maximal möglichen Änderung aufgrund der prozentualen Darstellung an. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*) oder 180 mM (*LlKdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 27, Abbildung 29, Abbildung 31, Abbildung 33, Abbildung 35, Abbildung 37 und III.2.2.7.8.

In den meisten Fällen wurde die Produktkonzentration durch Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten relativ zur Referenz in Puffer minimiert (Abbildung 41A), was darauf hindeutet, dass ionische Flüssigkeiten die Enzymaktivität negativ beeinflussen. Demgegenüber konnte eine Konzentrationssteigerung der Produkte durch einige ionische Flüssigkeiten erreicht werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit organischen Lösungsmitteln, wo die HPP-Produktion der *PfBAL*, mit einer Ausnahme, durch alle organischen Lösungsmittel gesteigert wurde (Abbildung 39), konnte keines der Produkte durch den Einfluss aller ionischer Flüssigkeiten in seiner Endkonzentration gesteigert werden. Wird die relative Produktverteilung (Abbildung 41B) berücksichtigt, so zeigt sich ein ähnliches Bild wie beim Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Chemoselektivität (Abbildung 39B).

Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon

Auch ionische Flüssigkeiten bewirken allgemein eine Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren Produkt. Während die rpv für HPP durch *PfBAL* in Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten verbessert wurde, wurde die Benzoinproduktion reduziert (Abbildung 37). Im Fall der *ApPDCE469G* und der *ApPDC* wurde die rpv für Acetoin auf Kosten der PAC-Bildung gesteigert (Abbildung 35, Abbildung 33).

Geringe Chemoselektivität bedingt stärkeren Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die rpv

Während die rpv für Acetoin in der *PpBFD*-Synthese durch die ionischen Flüssigkeiten herabgesetzt wurde, steigt der rpv-Wert für HPP (Abbildung 29). Hier scheint es eventuell wieder zu einem wie bereits in IV.3.1 beschriebenen Effekt zu kommen: Die relativen Produktverteilungen von Produkten mit einer hohen rpv in Puffer werden weniger stark durch ionische Flüssigkeiten beeinflusst, als Produkte mit einem niedrigeren rpv-Wert. Im Fall der *PpBFD* zeigte HPP in Puffer eine rpv = 0,78, während die rpv von Acetoin bei 0,2 lag (Abbildung 29). Die Chemoselektivität wurde in diesem Fall nicht zum kleineren Produkt verschoben, sondern zum Größeren, welches in Puffer schon eine höhere relative Produktverteilung zeigte.

Bezüglich der molekularen Einflüsse ionischer Flüssigkeiten auf die Chemo- selektivität ThDP-abhängiger Enzyme kommen ebenfalls die bereits für die organischen Lösungsmittel diskutierten möglichen Einflussfaktoren (IV.3.1) in Frage.

3.2.1 Einfluss kleiner achiraler sowie chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Neben den auch in den Kapiteln IV.2.2 und IV.3.2 bereits beschriebenen Additiven wurden kleine achirale bzw. chirale ionische Flüssigkeiten eingesetzt und in der bimolekularen Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme getestet. Die Vermutung lag nahe, dass die Größe der Additive eine entscheidende Rolle dafür spielt, ob es zu einer Beeinflussung der Chemo- oder Stereoselektivität kommt (dass dem so ist, wird in IV.4.1.1 ausführlich diskutiert). Kleine Additive können möglicherweise besser ins aktive Zentrum gelangen als Große. Der Einsatz speziell von chiralen Additiven war vor dem Hintergrund, dass Enzyme selbst aus chiralen Aminosäuren aufgebaut sind, die die Struktur des aktiven Zentrums bestimmen, interessant. Aus diesem Grund ist es evtl. möglich, dass sich chirale ionische Flüssigkeiten anders im aktiven Zentrum anlagern als achirale ionische Flüssigkeiten. Die zusätzlichen Additive sind noch mal in Abbildung 42 dargestellt.

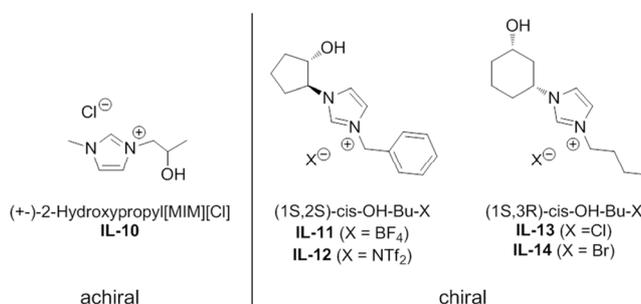


Abbildung 42: Struktur der verwendeten kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten. Bei IL-10 handelt es sich um die kleinste verwendete achirale ionische Flüssigkeit. IL-11/-12 und IL-13/-14 sind chirale ionische Flüssigkeiten.¹

Da sich der Einfluss dieser speziellen ionischen Flüssigkeiten nicht deutlich von dem der anderen Additive unterschied, wurde in diesem Fall darauf verzichtet, die Einflüsse für jedes Enzym einzeln zu zeigen. Wie für die Analysen der weiteren

¹ Diese ionischen Flüssigkeiten wurden durch Caroline E. Paul aus der Arbeitsgruppe von Dr. Vicente Gotor Fernández als Kooperationspartner der Universität Oviedo (Institut für organische und anorganische Chemie) zur Verfügung gestellt.

Additive, wird zunächst die Produktkonzentration nach 24 h Reaktionszeit für alle Enzyme zusammenfassend betrachtet (Abbildung 43A).

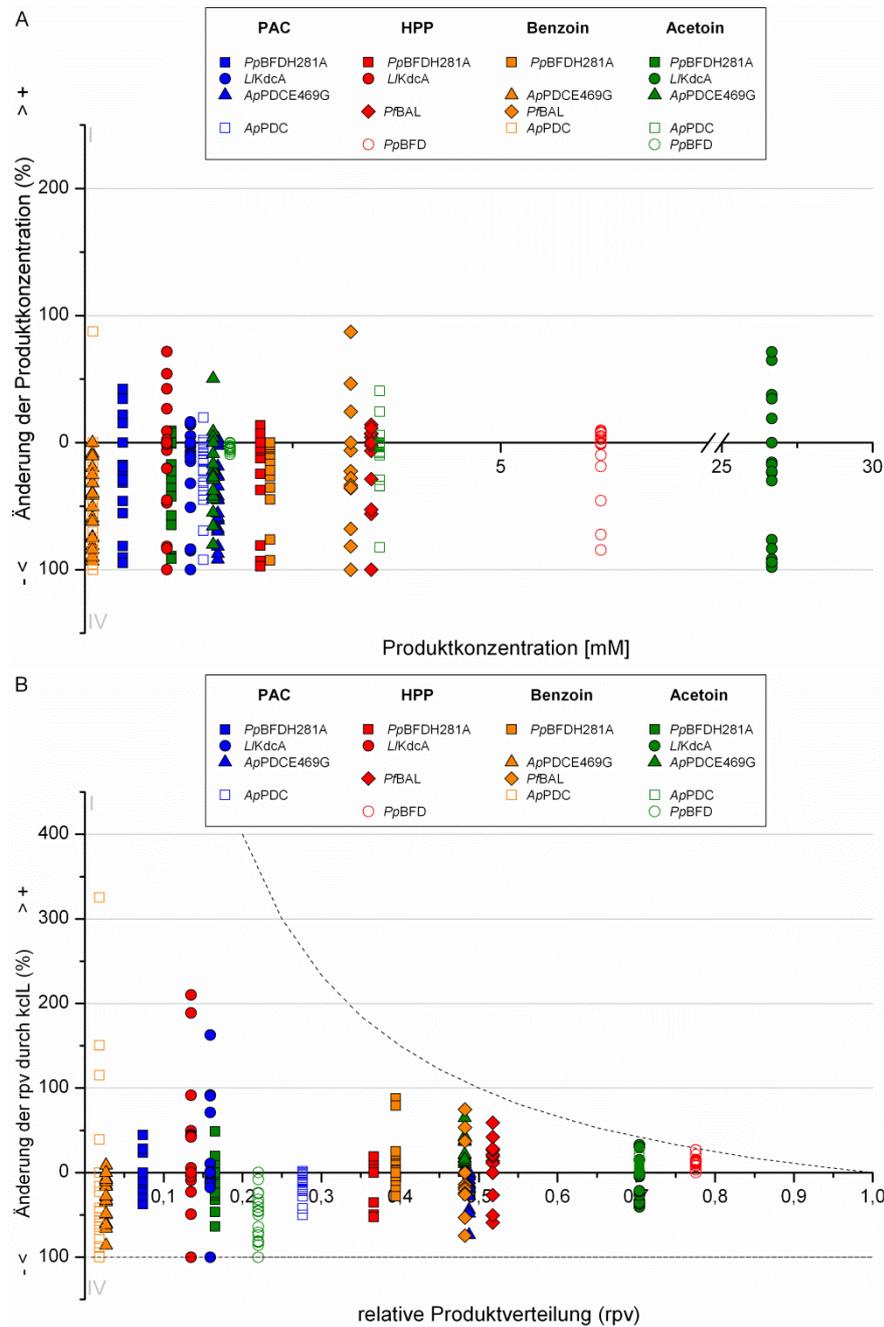


Abbildung 43: (A) Zusammenhang zwischen der Änderung der Produktkonzentration (%) hervorgerufen durch kleine und chirale ionische Flüssigkeiten (kclLs) und der Produktkonzentration nach 24 h in wässrigem Puffer (mM) ohne Zugabe von kclLs. (B) Zusammenhang zwischen der Änderung der relativen Produktverteilung (rpv) durch kclLs (%) und der rpv ohne Zugabe von kclLs. Die Symbole repräsentieren jeweils das Enzym und die Farbe des Symbols das jeweilige gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt gibt den Einfluss eines kclLs in einer bestimmten Konzentration wieder. Datenpunkte im 1. Quadranten zeigen eine erhöhte Produktkonzentration (A) oder rpv (B) nach 24 h relative zur Messung in Puffer. Punkte im 4. Quadranten geben eine reduzierte Produktkonzentration (A) oder rpv (B) in Abhängigkeit des kclLs an. Die gestrichelte Linie im 1. Quadranten und bei 100 % im 4. Quadranten zeigt die Grenze der maximal möglichen Änderung aufgrund der prozentualen Darstellung an. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*) oder 180 mM (*LlKdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Kapitel III.2.2.7.9.

Die kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten bewirkten, ebenso wie die bereits oben beschriebenen ionischen Flüssigkeiten, überwiegend eine Verminderung der Produktkonzentrationen im Vergleich zu der Messung in wässrigem Puffer. Nur im Falle der Benzoinproduktion der *PfBAL* oder der Acetoin synthese der *L/KdcA* wurden gesteigerte Produktkonzentrationen beobachtet. Die Auftragung der relativen Produktverteilung (rpv, Abbildung 43B) zeigte nicht die nach den Messungen der organischen Lösungsmittel und ionischen Flüssigkeiten erwarteten Ergebnisse. Im Falle von *ApPDC* wurde zwar die Verschiebung der Chemoselektivität zum kleineren 2-Hydroxyketon beobachtet (PAC reduziert, Acetoin leicht gesteigert), der gegenläufige Trend war allerdings häufiger erkennbar (*PpBFD*: Acetoin reduziert, HPP leicht gesteigert; *PpBFDH281A*: HPP reduziert, Benzoin gesteigert). In den Fällen, in denen auch mit den anderen Additiven der Trend zum kleineren 2-Hydroxyketon gefunden wurde, wie etwa im Fall der *PfBAL* (Verschiebung von Benzoin zu HPP) zeigte sich keine zu verallgemeinernde Tendenz. Es schien sowohl eine Verschiebung zu HPP als auch zu Benzoin stattzufinden.

Bei den kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten kann aus diesen Beobachtungen keine direkte Interaktion mit den aktiven Zentren abgeleitet werden, vielmehr ist eher ein Einfluss der anderen in den Abschnitten IV.3.1.1 und IV.3.1.2 diskutierten Parameter, wie Enzymflexibilität und löslichkeitsvermittelnde Effekte wahrscheinlich.

Fazit

Der Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten folgt nicht den mit organischen Lösungsmitteln und größeren achiralen ionischen Flüssigkeiten beobachteten Tendenzen. Es wurde keine generelle Verschiebung hin zum kleineren 2-Hydroxyketon beobachtet.

4 Einfluss von Additiven auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Neben den in Kapitel IV.3 beschriebenen Einflüssen der verschiedenen Additive auf die Chemoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme wurde im Folgenden der Einfluss dieser Additive auf die Stereoselektivität untersucht. Der Einfluss der einzelnen Zusätze auf die jeweiligen Enzyme wurde in den Kapiteln IV.2.1 und IV.2.2 detailliert beschrieben und wird hier zusammenfassend diskutiert.

4.1 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

Der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der bimolekularen Carboligation ThDP-abhängiger Enzyme war von zentralem Interesse, um das Potential des *solvent engineering* für die asymmetrische Katalyse beschreiben zu können. Der Einfluss der Additive auf die Stereoselektivitäten ist in Abbildung 44 dargestellt.

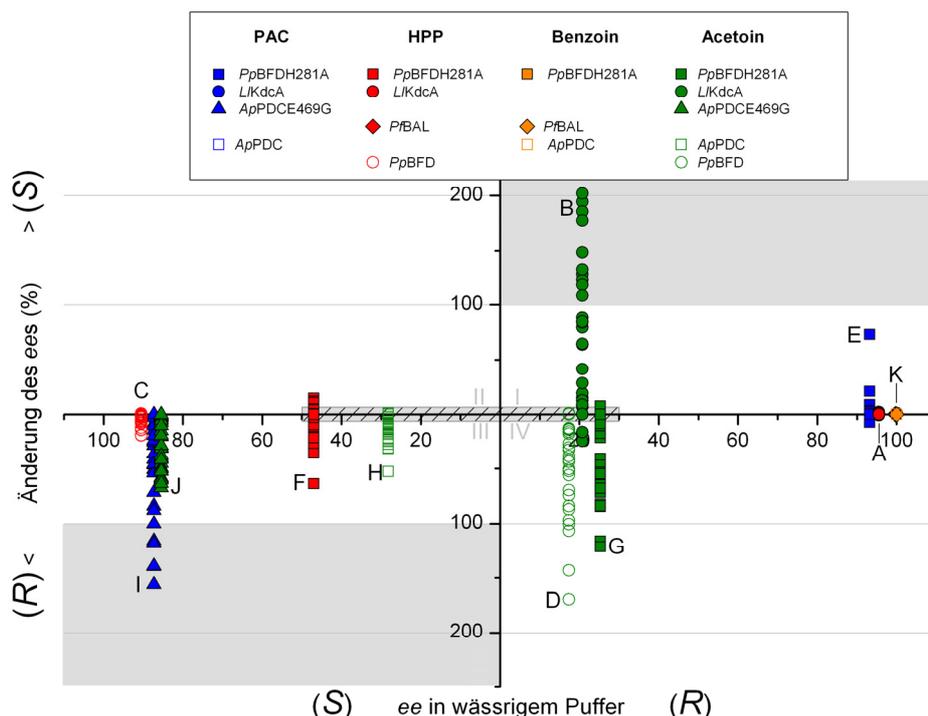


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss eines Lösungsmittels in einer bestimmten Konzentration (Details in IV.2.1). Die grauen Bereiche zeigen eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der ee in wässrigem Puffer ohne Zugabe eines Lösungsmittels im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den ee in Puffer gezeigt. A-K beziehen sich auf Beispiele im Text. Der gestreifte graue Bereich bezieht sich auf die Diskussion im Vergleich mit Abbildung 46. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (ApPDC, ApPDCE469G, PfBAL) oder 180 mM (LIKdcA, PpBFD, PpBFDH281A) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 24, Abbildung 26 und III.2.2.7.7.

Es zeigte sich sehr deutlich, dass die Variationen der Stereoselektivität, bedingt durch die Anwesenheit organischer Lösungsmittel, sehr unterschiedlich ausgeprägt sind. Der Einfluss hängt vom jeweiligen Enzym und dessen Stereoselektivität in wässrigem Puffer ab. Es wurden sowohl Änderungen in Richtung des R-Enantiomers (3. und 4. Quadrant) als auch Änderungen in Richtung des S-Enantiomers (1. und 2.

Quadrant) beobachtet. Alle Datenpunkte in den Quadranten 1 und 3 die über 100 % liegen, zeigen eine Stereoinversion an (graue Bereiche). Alle Werte in den Quadranten 2 und 4, die über 100 % liegen, zeigen einen mehr als verdoppelten Enantiomerenüberschuss (*ee*) in Bezug auf den *ee*-Wert in Puffer (*x*-Achse) an. Die deutlichsten Effekte organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme werden im Folgenden zusammenfassend diskutiert:

Verbesserung der Stereoselektivität

Im Fall der *PpBFD* wurde der *ee* für das in wässriger Umgebung unselektiv produzierte Acetoin (*ee* = 17 % (*R*) in Puffer) etwa durch 30 vol% *i*Prop (*ee* = 46 % (*R*)) mehr als verdoppelt (Abbildung 18, Abbildung 44 C und D).

Auch in der Biotransformation mit der Variante *PpBFDH281A* konnte für das kleinste Produkt (*R*)-Acetoin die Stereoselektivität signifikant von 25 % (*R*) in Puffer auf 56 % (*R*) in Gegenwart von 7 vol% EtOAc gesteigert werden (Abbildung 20, Abbildung 44 G). Eine Stereoselektivität von 56 % für (*R*)-Acetoin stellt die höchste *R*-Selektivität für Acetoin dar, die je mit einem ThDP-abhängigen Enzym erzielt werden konnte (Dominguez de Maria *et al.* 2007).

Die Verbesserung einer *S*-Selektivität war durch Zugabe organischer Lösungsmittel, mit Ausnahme einer geringen Steigerung in der *S*-selektiven Synthese der *PpBFDH281A* für HPP, nicht zu beobachten.

Verschlechterung der Stereoselektivität

Acetoin wurde durch die *LKdcA* nur mit einem geringen *ee* produziert (19 % *ee* (*R*)). Eine weitere Verbesserung in *R*-Richtung war nicht möglich, jedoch konnten z.B. 10 – 30 vol% Aceton proportional die *S*-Selektivität verbessern. Dies führte maximal zu einem *ee* von 21 % (*S*) mit 30 vol% Aceton (Abbildung 16, Abbildung 44 B).

Die *R*-selektive Synthese der *PpBFDH281A* für PAC (in Puffer *ee* = 93 % (*R*), Abbildung 20) wurde z.B. durch 20 vol% Dioxan verschlechtert, dadurch jedoch in Richtung des *S*-Produkts verschoben (*ee* = 25 % (*R*) Abbildung 20, Abbildung 44 E). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich für (*S*)-HPP. In dieser Reaktion wurde der *ee* in Puffer von 47 % (*S*) etwa durch 7 vol% EtOAc auf einen Wert von *ee* = 17 % (*S*) reduziert (Abbildung 20, Abbildung 44 F).

Auch die Stereoselektivität der *ApPDC* wurde durch organische Lösungsmittel herabgesetzt. (*S*)-Acetoin, welches in Puffer mit einem *ee* von 28 % (*S*) produziert

wurde, entstand in Gegenwart von z.B. 5 vol% THF nur noch mit einem ee von 13 % (S) (Abbildung 22, Abbildung 44 H).

Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym war die S-selektive Variante *ApPDCE469G* gegenüber der Zugabe von organischem Lösungsmittel sehr sensibel. Der ee für (S)-PAC (ee = 87 % in Puffer) wurde durch Anwesenheit von z.B. 0,5 vol% TCM reduziert und in einen Überschuss des *R*-Enantiomers umgewandelt (ee = 49 % (*R*)) (Abbildung 24, Abbildung 44 I). Dieses Beispiel beschreibt einen der größten Effekte eines organischen Lösungsmittels auf den ee-Wert in dieser umfassenden Untersuchung. Derselbe Effekt wurde auch für Acetoin beobachtet. In Puffer wurde Acetoin mit einem ee von 85 % (S) produziert, jedoch reduzierte sich dieser Wert in Gegenwart von 30 vol% EtOH auf ee = 28 % (S) (Abbildung 24, Abbildung 44 J). Für die *ApPDCE469G* stieg die Änderung der Stereoselektivität proportional mit steigender Konzentration des Lösungsmittels an.

Kein Einfluss auf die Stereoselektivität

LKdcA macht die gemischten 2-Hydroxyketone HPP und PAC mit einem sehr guten ee zugänglich (PAC > 99 % ee (*R*), HPP 95 % ee (*R*)). Diese Selektivität wurde durch die organischen Lösungsmittel nicht beeinflusst (Abbildung 16, Abbildung 44 A).

Ein ähnlicher Trend zeigte sich in Ansätzen mit *PpBFD*. Die Stereoselektivität des Enzyms für (S)-HPP (ee = 91 % in Puffer) wurde nur leicht beeinflusst.

Die Variante *PpBFDH281A* katalysiert ohne Zusatz organischer Lösungsmittel die Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Benzoin (ee > 99 % (*R*), Abbildung 20), was durch organische Lösungsmittel nicht beeinflusst wurde.

Der Effekt organischer Lösungsmittel auf *ApPDC* war ebenfalls gering. PAC (ee > 99 % (*R*) in Puffer (Abbildung 22, Abbildung 44)) und Benzoin (ee > 99 % (*R*) in Puffer (Abbildung 22, Abbildung 44)) wurden unabhängig von eventuellen Additiven sehr stereoselektiv produziert.

Ebenso wurde die hochselektive *PfBAL* in ihrer Stereoselektivität durch organische Lösungsmittel nicht beeinflusst. (*R*)-Benzoin und (*R*)-HPP wurden, unabhängig vom hinzugegebenen Lösungsmittel, enantiomerenrein produziert (ee > 99 % (*R*)) (Abbildung 26, Abbildung 44 K).

Fazit

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in allen Fällen, in denen die Stereoselektivität zu einem Produkt in der wässrigen Kontrolle bereits sehr hoch war ($ee > 95\%$), die Zugabe eines organischen Lösungsmittels kaum einen Einfluss auf diese Stereoselektivität hatte. Im Gegensatz dazu neigen enzymatische Synthesen, die weniger stereoselektiv ablaufen, zu einer stärkeren Beeinflussung durch organische Lösungsmittel. Ausgehend von einer *R*-Selektivität kann diese zum einen verbessert werden und zum anderen in Richtung des *S*-Enantiomers verschoben werden. Es treten Fälle auf, wo der Zusatz organischer Lösungsmittel sogar eine *S*-Selektivität induziert. Auch eine *S*-Selektivität kann durch verstärkte Bildung des *R*-Enantiomers reduziert und sogar bis zum *R*-Überschuss verschoben werden. Im Gegensatz dazu scheint die Verbesserung einer *S*-Selektivität unmöglich.

Molekulare Erklärungsmodelle

Die Frage, warum eine *S*-Selektivität nicht verbessert werden konnte, sondern je nach Enzym, in Richtung des *R*-Enantiomers verschoben wurde, wird in Kapitel IV.4.1.1 ausführlich besprochen. Wenn aber die *S*-Selektivität nicht verbessert werden kann, wie kann dann eine *R*-Selektivität in eine *S*-Selektivität umgekehrt werden, wie es etwa bei der Acetoinproduktion durch die *L/KdcA* beobachtet wurde (Abbildung 16)?

Um diese Frage zu beantworten, muss zunächst die Stereoselektivität der (*S*)-HPP-Synthese betrachtet werden. In diesem Fall muss Acetaldehyd als Akzeptor antiparallel zum Donormolekül Benzaldehyd angeordnet werden (I.2.3). Die *S*-Tasche der *L/KdcA* ist durch Aminosäureseitenketten blockiert und laut Kristallstruktur nicht zugänglich (Gocke *et al.* 2007a). Dennoch wird auch im wässrigen System eine geringe Bildung des *S*-Produkts beobachtet, was zu einem ee von 95,6 % an (*R*)-HPP führt. Dies wiederum bedeutet, dass 97,8 % des *R*-Produkts und damit 2,2 % des *S*-Produkts durch die *L/KdcA* produziert werden. Es scheint, als sei eine antiparallele Anordnung des Acetaldehyds im aktiven Zentrum der *L/KdcA* trotz blockierter *S*-Tasche möglich. Diese Anordnung könnte durch die geringe Größe der Methylgruppe des Acetaldehyds erreichbar sein. Nur diese Methylgruppe müsste in der *S*-Tasche Platz finden, um (*S*)-HPP zu bilden. Auf der anderen Seite könnte es auch der Fall sein, dass in der *L/KdcA* ein alternativer *S*-Weg zur Verfügung steht. Dieser alternative *S*-Weg wurde bereits für die *ApPDC*

diskutiert (Rother *et al.* 2011). Hierbei würde nicht wie üblich ein *re*-Seitenangriff das S-Produkt zugänglich machen, sondern ein paralleler *si*-Seitenangriff von der Rückseite des ThDPs (Abbildung 45).

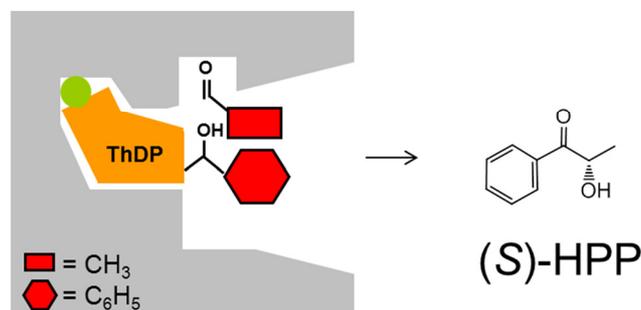


Abbildung 45: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der LKdcA. Es ist die Situation vor C-C-Knüpfung gezeigt. Der *si*-Seiten Angriff des Acetaldehyds als Akzeptor könnte einen alternativen Weg zur Produktion von (S)-HPP darstellen.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass nicht etwa die *S*-Selektivität durch die organischen Lösungsmittel verbessert wurde, sondern dass der *R*-Weg selektiv blockiert wird. Resultierend würde die Konzentration des *R*-Produkts verringert und damit der *ee* für das *S*-Produkt verbessert werden. Ein Hinweis auf diese Erklärung ist die Tatsache, dass die Anwesenheit von EtOH (20 vol%) sowie THF (2,5 vol%) nicht nur die *S*-selektive Produktion von Acetoin verbessern (5,9 % *ee* bzw. unselektiv), sondern auch die Gesamtaktivität des Enzyms bezüglich der Acetoinbildung minimieren (Abbildung 15, Abbildung 16). Diese Erklärung wird außerdem gestützt durch Beobachtungen bei der PpBFDH281A: Die Anwesenheit von 7 vol% EtOAc verschiebt den *ee* von 47 % (S)-HPP auf 17 % (S)-HPP. Hier scheint auch eine partielle Blockade des *S*-Weges eine Erklärung zu sein, denn die Gesamtproduktkonzentration von HPP wird ebenfalls von 1,85 mM in Puffer auf 0,45 mM in Gegenwart von 7 vol% EtOAc reduziert.

Energetische Betrachtungen zur Stereoselektivität

Um die beobachteten Veränderungen im *ee*-Wert adäquat bewerten zu können, ist eine Betrachtung der Gibbs freien Energie (ΔG) aufschlussreicher als die prozentualen *ee*-Änderungen. In Abbildung 85 (Anhang) ist der Zusammenhang zwischen *ee*-Änderung und Energie dargestellt. Sie zeigt, dass die Energiebarrieren in einem moderaten *ee*-Bereich sehr viel geringer sind im Vergleich zu denen im Bereich *ee* >90 % (Abbildung 85). Dieser Unterschied ist darin begründet, dass ΔG exponentiell mit steigendem *ee* wächst (Anhang, Abbildung 85).

In Abbildung 46 werden die Veränderungen der ee-Werte, repräsentiert durch die Veränderung der Gibbs freien Energie ($\Delta\Delta G$), in Korrelation zu den ee-Werten in Puffer gesetzt.

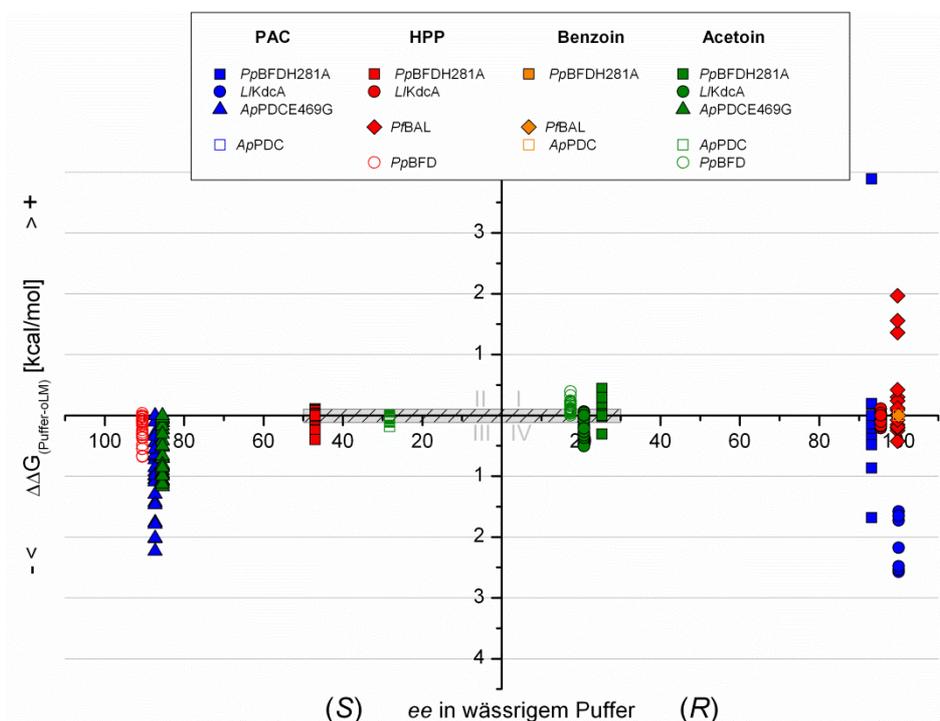


Abbildung 46: Zusammenhang zwischen dem Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Enantiomerenüberschuss (ee) repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{\text{(Puffer-oLM)}}$ (kcal/mol) und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss eines Lösungsmittels in einer bestimmten Konzentration (Details in IV.2.1). Die grauen Bereiche zeigen eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der ee in wässrigem Puffer ohne Zugabe eines Lösungsmittels im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den ee, repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{\text{(Puffer-oLM)}}$, in wässrigem Puffer gezeigt. Die Werte wurden berechnet durch: $\Delta G_{(R/S)} = -RT \ln(100+ee) \cdot (100-ee)^{-1}$. Der gestreifte graue Bereich bezieht sich auf die Diskussion im Text (siehe auch Abbildung 44). Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*) oder 180 mM (*L/KdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 24, Abbildung 26 und III.2.2.7.7.

Obwohl sich für die ee-Werte im moderat selektiven Bereich von 50 % (S) bis 30 % (R) (Abbildung 44, grau schraffierter Bereich auf der x-Achse) signifikante ee-Verschiebungen bezogen auf die Enantiomerenüberschüsse zeigen, korrelieren diese nur mit kleinen Änderungen in der freien Energie (Abbildung 46, grau schraffierter Bereich auf der x-Achse). Diese Situation ist anders für hohe ee-Werte (> 90 %), bei denen die Energie, die benötigt wird um einen ee-Wert weiter zu erhöhen, sehr viel größer ist (vgl. Abbildung 85).

Abbildung 44 und Abbildung 46 zeigten, dass organische Lösungsmittel in der Lage sind, große Einflüsse auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme zu

induzieren. Die Energiedifferenzen reichen aus, einen moderaten *ee*-Wert in das entgegengesetzte Enantiomer umzuwandeln (*L/KdcA* in Puffer 19,7 % (*R*)-Acetoin wird zu 21 % (*S*)-Acetoin durch 30 vol% Aceton) oder auch einen hohen *ee* weiter zu verbessern (*PfBAL* in Puffer: 99,8 % (*R*)-HPP wird zu 99,9 % (*R*)-HPP durch 30 vol% Aceton). Dennoch werden sehr hohe *ee*-Werte (> 99,9 %) nicht vermindert. Dies hat wahrscheinlich besonders mit der Struktur dieser Enzyme im aktiven Zentrum zu tun, die sehr stereoselektiv sind (z.B. *PfBAL*). Die hohe Stereoselektivität geht sehr wahrscheinlich mit einer optimalen Stabilisierung des Akzeptorsubstrats im aktiven Zentrum einher, denn dessen relative Orientierung zum Donor bestimmt die Stereoselektivität der Carboligation (Abbildung 5). Diese optimale Stabilisierung scheint durch Additive wenig störanfällig zu sein, da deren energetischer Einfluss nur gering ist. Wird bedacht, dass eine Wasserstoffbindung eine Stärke von -8,6 kcal/mol (Vargas *et al.* 2001) hat, so ist der größte Einfluss, der in dieser Arbeit gefunden wurde, nur halb so groß wie die Energie einer Wasserstoffbrückenbindung (*PpBFDH281A*: $\Delta\Delta G$ -Veränderung für PAC von 1,98 in Puffer auf 5,87 durch u.a. 30 vol% EtOH, 20 vol% *i*Prop und 30 vol% Aceton).

Abbildung 44 zeigt, dass der *ee*-Wert, oberhalb dessen keine Änderung durch die organischen Lösungsmittel beobachtet wurde, bei *ee* > 95 % liegt. In Abbildung 46 zeigt sich ein differenzierteres Bild und macht deutlich, dass dieser Grenzwert erheblich höher liegt (bei *ee* > 99 %).

4.1.1 Einfluss der Größe und des logPs organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der ApPDCE469G

Wie bereit in IV.3.1.3 angedeutet, wurde eine mögliche direkte Interaktion der organischen Lösungsmittel mit dem aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme untersucht. Dazu wurden zunächst die Ausschlussvolumina der Substrate und Produkte sowie der organischen Lösungsmittel ermittelt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Überblick über die Substrate und Produkte der bimolekularen Carboligation (hell grau) und alle eingesetzten organischen Lösungsmittel, sortiert nach ihrem Ausschlussvolumen (berechnet durch ChemDraw Add-In für Excel). Die Konzentrationsbereiche und logP-Werte der organischen Lösungsmittel sind ebenfalls angegeben. Werte in Klammern beziehen sich auf Abbildung 47.

Name	% (v/v)	logP	Lösungsmittelausschluss-Volumen (Å ³)
Acetaldehyd			42.7
EtOH	5-30 (30)	-0.28	48.3
DCM	1 (1)	1.25	49.4
Aceton	2-30 (10)	-0.24	59.1
TCM	0.5 (0.5)	1.94	59.1
DMSO	5-30 (20)	-1.35	61.5
<i>i</i> Prop	5-30 (20)	0.05	62.5
THF	2.5-5 (2.5)	0.34	71.2
Dioxan	5-30 (10)	-0.35	79.0
Acetoin			80.5
EtOAc	7 (7)	0.85	82.7
MTHF	2.5-5 (2.5)	1.39	85.0
MTBE	4.5 (4.5)	0.94	86.2
Benzaldehyd			94.6
MIBK	1.8 (1.8)	1.15	105.5
DIPE	1 (1)	1.52	106.6
PAC			127.3
HPP			128.9
Benzoin			175.7

Es zeigte sich, dass keines der Lösungsmittel größer als die Produkte HPP, PAC und Benzoin ist. Lediglich DIPE und MIBK waren größer als das Substrat Benzaldehyd. Ein Großteil der Lösungsmittel war zudem kleiner als das kleinste Produkt Acetoin. Folglich müssten, bezogen auf ihr Ausschlussvolumen, alle organischen Lösungsmittel in der Lage sein, in die aktiven Zentren der untersuchten Enzyme einzudringen. Es gab jedoch kein organisches Lösungsmittel, welches kleiner war als das kleinste Substrat Acetaldehyd.

Besonders für die *Ap*PDCE469G wurden intensive Struktur-Funktionsuntersuchungen durchgeführt, die zur Erstellung eines Modells des aktiven Zentrums führten und die Chemo- und Stereoselektivität der Variante für die bimolekulare Carboligation sehr gut erklären kann (Rother *et al.* 2011). In dieser Variante wurde durch rationales Enzymdesign eine sehr große S-Tasche erzeugt, die die optimale Stabilisierung des Benzaldehydmoleküls in der antiparallelen Form zum Acetaldehyd ermöglicht. Keines der anderen hier untersuchten Enzyme verfügt über solch eine große S-Tasche (I.2.4).

Die Tatsache, dass es offenbar unmöglich ist, eine *S*-Selektivität durch Zugabe organischer Lösungsmittel weiter zu verbessern, kann durch eine selektive Blockade der *S*-Tasche durch kleine organische Lösungsmittel erklärt werden. Dann ist es dem Akzeptoraldehyd nicht mehr möglich, sich in die *S*-Tasche einzulagern und der *S*-Syntheseweg wäre verschlossen. Dies würde zu einem Anstieg der *R*-Enantiomerenkonzentration führen.

Außer MIBK und DIPE waren alle eingesetzten Lösungsmittel kleiner als das Substrat Benzaldehyd (Tabelle 13) und demnach theoretisch in der Lage, in der *S*-Tasche der ApPDCE469G Platz zu finden. Dieses Enzym ist zurzeit das einzige, was den Zugang zu (*S*)-PAC durch eine antiparallele Anordnung von Benzaldehyd als Akzeptor an Acetaldehyd als Donor ermöglicht (Abbildung 4). Daher ist es auch das einzige Enzym, bei dem durch die Blockierung der *S*-Tasche ein Rückgang der *S*-Selektivität beobachtet werden kann.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, wurde genau dieser Zusammenhang beobachtet: Eine *S*-Selektivität wird in einen Überschuss des *R*-Enantiomers umgekehrt. Um den Zusammenhang zwischen den einzelnen organischen Lösungsmitteln und dem Übergang der Stereoselektivität der ApPDCE469G von (*S*)-PAC zu (*R*)-PAC besser abzubilden, wurde dieser Übergang gegen die Größe des jeweiligen Lösungsmittels aufgetragen (Abbildung 47).

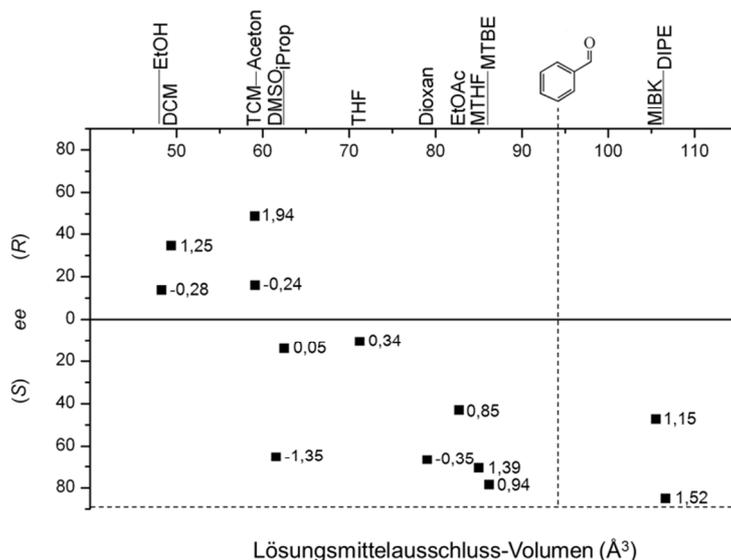


Abbildung 47: Einfluss der verschiedenen organischen Lösungsmittel (Konzentration in Klammern, Tabelle 13) auf die Stereoselektivität der PAC-Bildung durch ApPDCE469G. Die jeweiligen logP-Werte sind am Datenpunkt vermerkt. In wässrigem Puffer wird (*S*)-PAC mit einem ee = 87 % (*S*) gebildet (horizontale gestrichelte Linie). Die Größe von Benzaldehyd wird durch die vertikale gestrichelte Linie angegeben, denn die Phenylseitenkette dieses Substrats muss in der *S*-Tasche lokalisiert sein, um (*S*)-PAC zu bilden.

Abbildung 47 zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Größe eines Lösungsmittels und dessen Einfluss auf die Stereoselektivität der PAC-Produktion der *ApPDCE469G*: Kleine Lösungsmittel reduzierten den in Puffer guten *ee* von 87 % (*S*) stärker als größere organische Lösungsmittel. Eine Umkehrung der Stereoselektivität des Enzyms wurde unter Einsatz von EtOH, DCM, Aceton und TCM beobachtet. Je kleiner das Lösungsmittel, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es die *S*-Tasche besetzt. Dies resultiert in einer Blockade der antiparallelen Anordnung der beiden Substrate zueinander, wodurch die parallele Anordnung und damit die *R*-Selektivität bevorzugt wird. Eine ähnliche Korrelation wurde bereits für die Stereoselektivität von Lipasen, allerdings in reinen organischen Lösungsmitteln beschrieben (Ottosson *et al.* 2002).

Allerdings war die Größe der Lösungsmittel nicht die einzige erkennbare Korrelation. Wie Abbildung 47 zeigt, existieren einige Paare von organischen Lösungsmitteln, welche nahezu die gleiche Größe haben, allerdings unterschiedlich stark Einfluss auf die Stereoselektivität nehmen. Somit scheint die Polarität der organischen Lösungsmittel, repräsentiert durch den $\log P$ -Wert (I.3.1.2), ein zweiter wichtiger Parameter bei der Anlagerung der Additive im aktiven Zentrum, speziell in der *S*-Tasche, zu sein. Bei der alleinigen Auftragung der *ee*-Änderung gegen den $\log P$ -Wert des entsprechenden organischen Lösungsmittels (nicht gezeigt) ergab sich kein logischer Trend. Werden allerdings beide Faktoren, die Größe des organischen Lösungsmittels und dessen $\log P$ in Kombination betrachtet, so wird eine Korrelation deutlich. Ein Beispiel, an dem diese Korrelation gut sichtbar wird, ist EtOH und DCM. Beide haben ungefähr das gleiche Ausschlussvolumen. DCM, welches weniger polar ist als EtOH, hat einen stärkeren Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G*. Weitere solcher Paare sind: Aceton und TCM, DMSO und *i*Prop sowie THF und Dioxan. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass sich weniger polare Lösungsmittel besser in der unpolaren *S*-Tasche anlagern, da diese hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäure Seitenketten aufgebaut ist (Pohl *et al.* 2009).

Im Falle der (*S*)-PAC-Produktion der *ApPDCE469G* kann davon ausgegangen werden, dass es stets zu einer Konkurrenz zwischen dem organischen Lösungsmittel und dem Benzaldehydmolekül um die Anlagerung in der *S*-Tasche kommt. Werden nun zusätzlich die molaren Verhältnisse der beiden Konkurrenten betrachtet (Tabelle 18), so zeigte sich, dass die Reaktion 18 mM Benzaldehyd jedoch z.B. 8,24 M EtOH (bei 30 vol%) und damit einen 500-fachen Überschuss an Lösungsmittel enthielt.

Selbst die geringste Konzentration in den Testreihen, 0,5 vol% TCM, bedeutete immer noch 0,03 M TCM und damit einen 1,7-fachen Überschuss im Vergleich zum konkurrierenden Substrat Benzaldehyd (Tabelle 18). Daher ist eine Verdrängung des Substrats bei solch hohen Überschüssen wahrscheinlich.

4.1.2 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der *PpBFD*

Ein zweiter Hinweis für die in IV.4.1.1 beschriebene Theorie wurde durch die Betrachtung eines weiteren S-selektiven Enzyms, der *PpBFD* (I.2.5.2), gegeben. Dieses Enzym macht (S)-HPP zugänglich (Knoll *et al.* 2006). Hierbei fungiert Benzaldehyd als Donor der Reaktion. Acetaldehyd als Akzeptor muss sich antiparallel an den Donor anlagern, damit das S-Enantiomer gebildet werden kann. Die Selektivität für (S)-HPP (in Puffer $ee = 91\%$ (S)) konnte durch Zugabe der verschiedenen Lösungsmittel nicht verbessert werden (Abbildung 18). Im Gegensatz zur *ApPDCE469G* wurde in diesem Fall jedoch auch keine Verschiebung zum R-Enantiomer beobachtet. Keines der organischen Lösungsmittel nahm einen signifikanten Einfluss auf die Stereoselektivität der *PpBFD*-katalysierten Produktion von (S)-HPP. Dies ist wie folgt zu erklären: Die S-Tasche der *PpBFD* ist sehr viel kleiner als die der *ApPDCE469G* (I.2.5.1.1). Im Verlauf einer Synthese muss lediglich ein Teil des Acetaldehyds in dieser Tasche Platz finden. Demzufolge könnten nur sehr kleine Lösungsmittel in die S-Tasche eindringen und die antiparallele S-Konfiguration stören. Im gewählten Versuchsaufbau war kein organisches Lösungsmittel vorhanden, welches kleiner war als das Substrat Acetaldehyd (Tabelle 13). Dies erklärte auch die relativ konstante Stereoselektivität der *PpBFD* in der (S)-HPP-Synthese in Anwesenheit organischer Lösungsmittel (Abbildung 48).

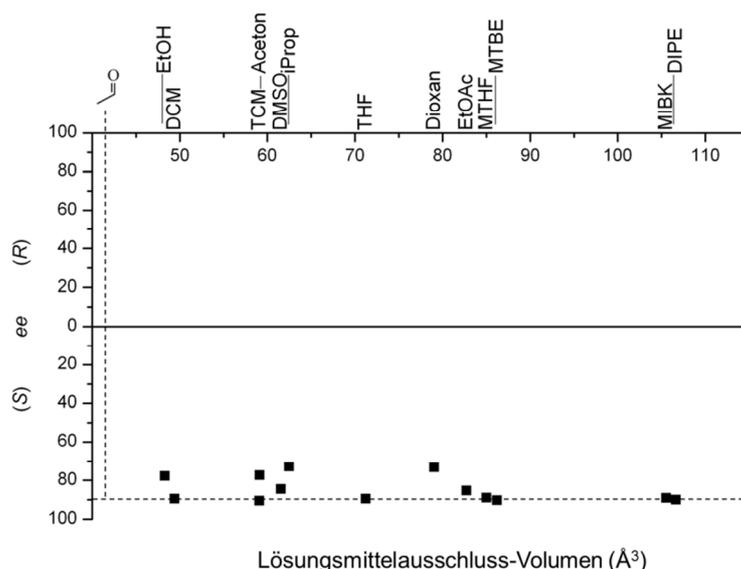


Abbildung 48: Einfluss der verschiedenen organischen Lösungsmittel auf die Stereoselektivität der HPP-Bildung durch *PpBFD*. In wässrigem Puffer wird (*S*)-HPP mit einem ee = 91 % (*S*) gebildet (horizontale gestrichelte Linie). Die Größe des Acetaldehyds wird durch die vertikale gestrichelte Linie angegeben, denn die Seitenkette dieses Substrats muss in der *S*-Tasche lokalisiert sein, um (*S*)-HPP zu bilden.

Die Lösungsmittel waren alle deutlich größer als Acetaldehyd und konnten die Anlagerung dieses Substrats in der *S*-Tasche nicht stören. Aus diesem Grund konnte es nicht zur Verschiebung der Stereoselektivität in Richtung des *R*-Enantiomers kommen.

4.1.3 Zeitlicher Verlauf der Carboligation ausgewählter Reaktionen

Bei den bis hierher durchgeführten Messungen handelte es sich stets um Endpunktbestimmungen, bei denen die Reaktion nach 24 h gestoppt und mittels instrumenteller Analytik untersucht wurde. An zwei ausgewählten Beispielen sollte die zeitliche Entwicklung der Stereoselektivität untersucht werden. Die interessantesten Biotransformationen waren die PAC-Produktion durch *ApPDCE469G* sowie die *LKdcA*-katalysierte Acetoin synthese. Diese fielen in Gegenwart einiger Lösungsmittel durch eine Umkehrung ihrer Stereoselektivität auf und wurden daher jeweils mit und ohne Zugabe der entsprechenden organischen Lösungsmittel über 24 h kontinuierlich untersucht.

LKdcA

Der zeitliche Verlauf der *LKdcA*-katalysierten Acetoin synthese mit den Lösungsmitteln, welche die Stereoselektivität umkehren, ist in Abbildung 49 dargestellt.

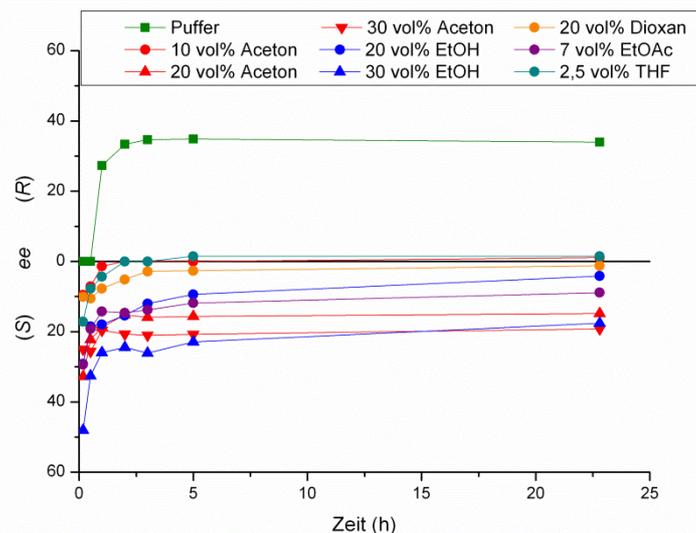


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der Acetoin synthese durch *L/KdcA*. Dargestellt ist nur die Stereoselektivität für Acetoin über einen Zeitraum von 24 h. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO_4 , 0,1 ThDP), pH 7,5, 0,1 mg/mL *L/KdcA*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die jeweiligen Lösungsmittel in der gewählten Konzentration werden durch unterschiedliche Farben repräsentiert.

Die Stereoselektivität der *L/KdcA*-katalysierten Acetoinbildung zeigte in allen untersuchten Lösungsmitteln eine deutliche Zunahme der *R*-Selektivität über die Reaktionszeit. In der Referenz ohne Additive entsteht Acetoin anfangs racemisch. Erst nach einer Reaktionszeit von etwa 3 h pendelte sich dieser Wert konstant bei $ee = 35\%$ (*R*) ein. In Gegenwart der Lösungsmittel startete die Reaktion stets mit einem Überschuss des *S*-Enantiomers, wurde aber ebenfalls über die Zeit in Richtung des *R*-Produkts verschoben. In allen Fällen wurde nach ca. 3 h ein konstanter ee -Wert erreicht. Die unterschiedlichen Lösungsmittelzusätze hatten dabei keinen Einfluss auf die Kinetik dieses Prozesses, wohl aber auf den initialen und den finalen ee -Wert. Es sollte an dieser Stelle betont werden, dass eine Ungenauigkeit der ee -Bestimmung, aufgrund der teilweise geringen Acetoinkonzentration, ausgeschlossen werden kann. In jedem Fall wurde das Detektionslimit der GC-Analytik überschritten und die Peaks konnten eindeutig zugeordnet werden. Eine weitere Tatsache, die nicht unberücksichtigt bleiben darf, ist die Änderung der Substratkonzentration über die Zeit. Die Menge der in der Reaktion vorhandenen Substrate kann die Stereoselektivität der *L/KdcA* beeinflussen. Dieser Einfluss kann hier jedoch vernachlässigt werden, da etwa THF die Aktivität der *L/KdcA* erheblich herabsetzt, so dass kaum Unterschiede zwischen der Anfangs- und Endkonzentration der Substrate im Reaktionsansatz auftreten (Abbildung 15). Dennoch zeigt sich derselbe Verlauf bezüglich der Stereoselektivität wie in der

Referenz ohne organische Lösungsmittel (Abbildung 49). In dieser Messung ist die Aktivität der *L/KdcA* größer und damit auch der Unterschied zwischen Anfangs- und Endkonzentration der Substrate und Produkte. Auch der Startpunkt der Messungen kann nicht durch eine unterschiedliche Substratkonzentration in den einzelnen Ansätzen bedingt sein, denn zu Reaktionsbeginn (erste Messung nach 10 min Reaktionszeit) sollte diese in allen Ansätzen noch nahezu den Startbedingungen entsprechen.

Daher ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete zeitabhängige Veränderung der Stereoselektivität der *L/KdcA* auf eine Adaption des Enzyms an die, durch die organischen Lösungsmittel veränderten Umgebungsbedingungen zurückzuführen ist.

ApPDCE469G

Das zweite Enzym, welches zeitabhängig untersucht wurde, war die *ApPDCE469G* (Abbildung 50).

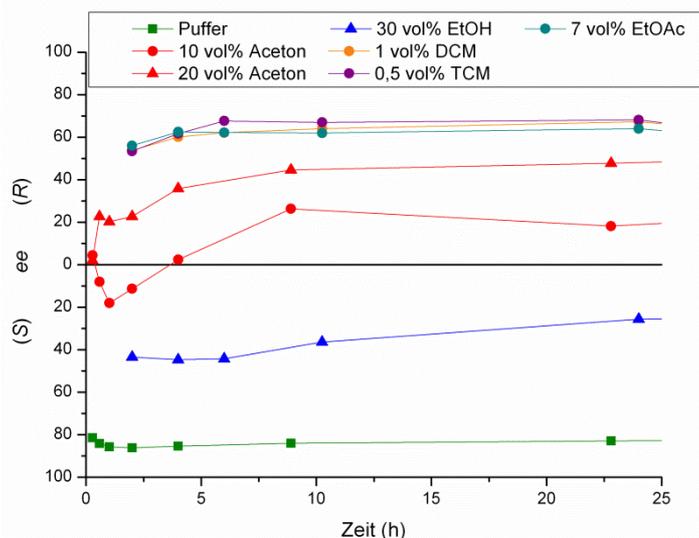


Abbildung 50: Zeitlicher Verlauf der PAC-Synthese durch *ApPDCE469G*. Dargestellt ist nur die Stereoselektivität für PAC über einen Zeitraum von 48 h. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 ThDP), pH 7,5, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die jeweiligen Lösungsmittel in der gewählten Konzentration werden durch unterschiedliche Farben repräsentiert.

Für die *ApPDCE469G*-katalysierte PAC-Synthese ergab sich im Vergleich zur *L/KdcA* ein anderes Bild. Die Referenz in Puffer sowie die meisten Messungen in Gegenwart organischer Lösungsmittel zeigten einen konstanten ee über den Messzeitraum. Eine Ausnahme war hier Aceton. Sowohl 10 als auch 20 vol% dieses Lösungsmittels induzierten in der *ApPDCE469G* eine zeitliche Variation der Stereoselektivität für PAC. Es zeigte sich am Start der Messungen ein racemisches

Verhältnis. 10 vol% Aceton führten anschließend zu einer erhöhten *S*-Selektivität, um schließlich in einer geringen *R*-Selektivität zu enden. Da die Messung in Puffer keine Zeitabhängigkeit zeigte, scheint zum einen der Übergang der Selektivität von einem leichten *S*-Überschuss zu einem *R*-Überschuss, als auch der zeitliche Verlauf dieser Synthese durch Aceton induziert worden zu sein. Aceton dringt vermutlich in das aktive Zentrum ein und beeinflusst dort die Stereoselektivität. Dieser Effekt wurde in Kapitel IV.4.1.1 ausführlich beschrieben. Der Einfluss scheint aber ebenfalls einem Gleichgewicht zu unterliegen, was sich innerhalb von 12 h eingestellt, denn nach etwa dieser Zeit blieben die *ee*-Werte konstant.

Wie bereits für die *L/KdcA* diskutiert, können Substrat- und Produktkonzentrationen, welche sich während des Reaktionsverlaufs ändern, einen Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* nehmen. Allerdings wird mit diesem Enzym ein so geringer Umsatz erzielt (vgl. Abbildung 23), dass die Substratkonzentration über den Messzeitraum nahezu konstant bleibt. Trotzdem muss betont werden, dass in allen Fällen ausreichend Produktkonzentration vorhanden war, um mittels instrumenteller Analytik zu eindeutigen Resultaten zu gelangen.

4.2 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

In Abbildung 51 wird der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme zusammenfassend betrachtet. Zunächst wurde die Stereoselektivität wieder in Bezug auf Veränderungen des *ee*-Werts untersucht.

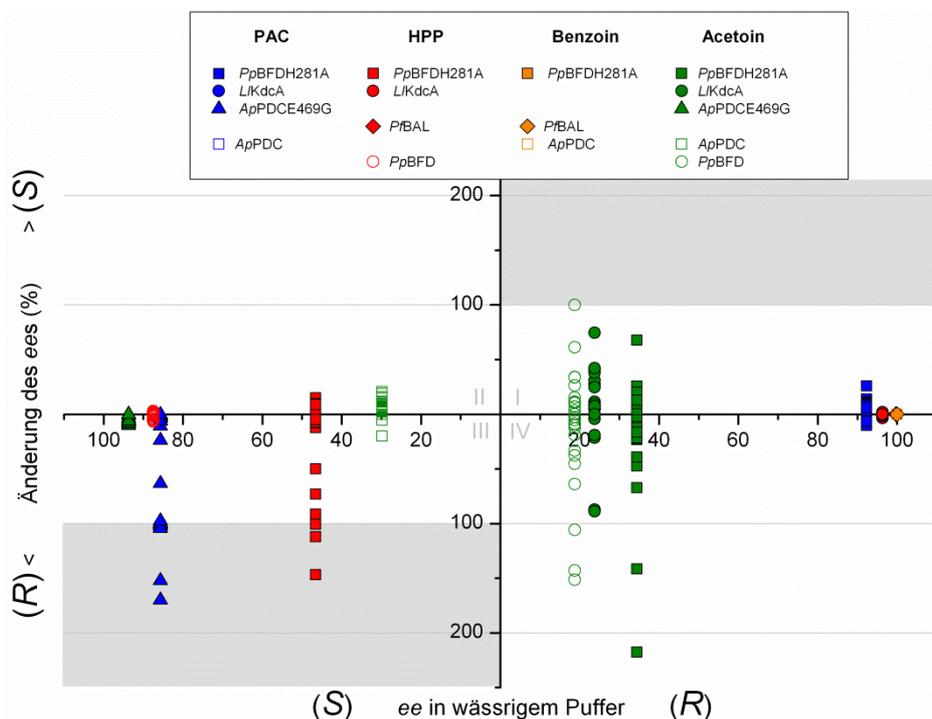


Abbildung 51: Zusammenhang zwischen dem Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss einer ionischen Flüssigkeit in einer bestimmten Konzentration (Details in IV.2.2). Die grauen Bereiche zeigen eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der ee in wässrigem Puffer ohne Zugabe einer ionischen Flüssigkeit im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den ee in wässrigem Puffer gezeigt. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (ApPDC, ApPDCE469G, PpBAL) oder 180 mM (LKdcA, PpBFD, PpBFDH281A) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 28, Abbildung 30, Abbildung 32, Abbildung 34, Abbildung 36, Abbildung 38 und III.2.2.7.8.

Verbesserung der Stereoselektivität

Die Stereoselektivität der Acetoinproduktion¹ (in Puffer ee = 24 % (R)) der LKdcA wurde durch die Anwesenheit einiger ionischer Flüssigkeiten, wie 9 % (w/v) Ammoeng 112 (IL-4) auf bis zu ee = 40 % (R) verbessert. Im Falle der organischen Lösungsmittel war eine solch starke Verbesserung nicht zu beobachten (Abbildung 44).

Durch Zugabe ionischer Flüssigkeiten zu Biotransformationen mit PpBFD konnten die ee-Werte für Acetoin verbessert werden. Auch im Fall der Variante PpBFDH281A wurde die R-selektive Synthese von Acetoin weiter in Richtung des R-Enantiomers

¹ Der ee in Puffer variiert im Vergleich zu dem in Abbildung 44, da auf der x-Achse immer der jeweilige Mittelwert der zugehörigen Referenz in Puffer aufgetragen wurde. Wie schon bei den Detailanalysen in IV.2.1, zeigten bereits diese Referenzen Unterschiede zueinander.

auf $ee = 76\%$ (*R*) verschoben. Für dieses Enzym wurde auch die *S*-Selektivität des HPPs auf $ee = 60\%$ (*S*) leicht verbessert (vgl. Abbildung 32).

Bei *Ap*PDc-katalysierten Biotransformationen zeigte sich eine leichte Besserung des (*S*)-Acetoin auf $ee = 36\%$ (*S*) durch Anwesenheit von 9 % (w/v) Ammoeng 100 (IL-1). Diese Verbesserung der *S*-Stereoselektivität war mit organischen Lösungsmitteln nicht beobachtet worden. Dort zeigte sich lediglich eine Verschlechterung der *S*-Selektivität (Abbildung 44).

Verschlechterung der Stereoselektivität

In der *LKdcA*-Synthese von Acetoin konnten Schwankungen der Stereoselektivität hin zu niedrigeren ee -Werten festgestellt werden. Während allerdings mit organischen Lösungsmitteln eine Umkehrung der *R*-Selektivität zum *S*-Enantiomer initiiert werden konnte, fällt der Einfluss ionischen Flüssigkeiten geringer aus.

Im Fall der Variante *Ap*PDCE469G wurde die Selektivität für (*S*)-PAC (ee in Puffer 87 % (*S*)) durch organische Lösungsmittel hauptsächlich in Richtung des *R*-Produkts verschoben (Abbildung 24). Auch durch ionische Flüssigkeiten kam es zu einer Umkehrung des Enantiomerenverhältnisses für dieses Produkt. Am ausgeprägtesten war der Effekt mit 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3), dessen Zusatz eine Verschiebung des ee -Werts auf 60 % (*R*) bewirkte.

Für die *Pp*BFDH281A zeigten sich mit ionischen Flüssigkeiten und organischen Lösungsmitteln ähnliche Einflüsse (Abbildung 44). HPP ($ee = 47\%$ (*S*)) und Acetoin ($ee = 34\%$ (*R*)) wurden recht stark beeinflusst. Durch die ionischen Flüssigkeiten wurde die Selektivität für diese Reaktionen herabgesetzt. Während allerdings durch organische Lösungsmittel eine Umkehrung der *S*-Selektivität für HPP nicht in einen Überschuss an *R*-Produkt mündete, war das mit ionischen Flüssigkeiten möglich.

Im Fall der *Pp*BFD waren die Einflüsse durch die ionischen Flüssigkeiten auf die HPP-Produktion ähnlich ausgeprägt, wie nach Addition von organischen Lösungsmitteln. Für die Acetoinproduktion war mit organischen Lösungsmitteln keine Verschiebung der *R*-Selektivität zum *S*-Enantiomer möglich (Abbildung 44). Durch Zugabe ionischer Flüssigkeiten ergab sich ein anderes Bild. Hier konnte eine Verschiebung in Richtung der *S*-Selektivität beobachtet werden und zwar maximal bis zu $ee = 12\%$ (*R*) in Gegenwart von 9 % (w/v) Ecoeng 110 (IL-5). Eine Umkehrung des Enantiomerenverhältnisses zur vorwiegenden Bildung des *S*-Produkts wurde, auch in Gegenwart ionischen Flüssigkeiten, nicht beobachtet.

Kein Einfluss auf die Stereoselektivität

Für die *L/KdcA* wurden, wie schon mit organischen Lösungsmitteln beobachtet (Abbildung 44), die *ee*-Werte für PAC und HPP in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten nicht beeinflusst. Gleiches gilt für die Selektivität der *PfBAL* (Abbildung 44).

In Abbildung 52 werden die induzierten Energiedifferenzen betrachtet, welche durch die Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten hervorgerufen werden, um einen *ee*-Wert zu beeinflussen.

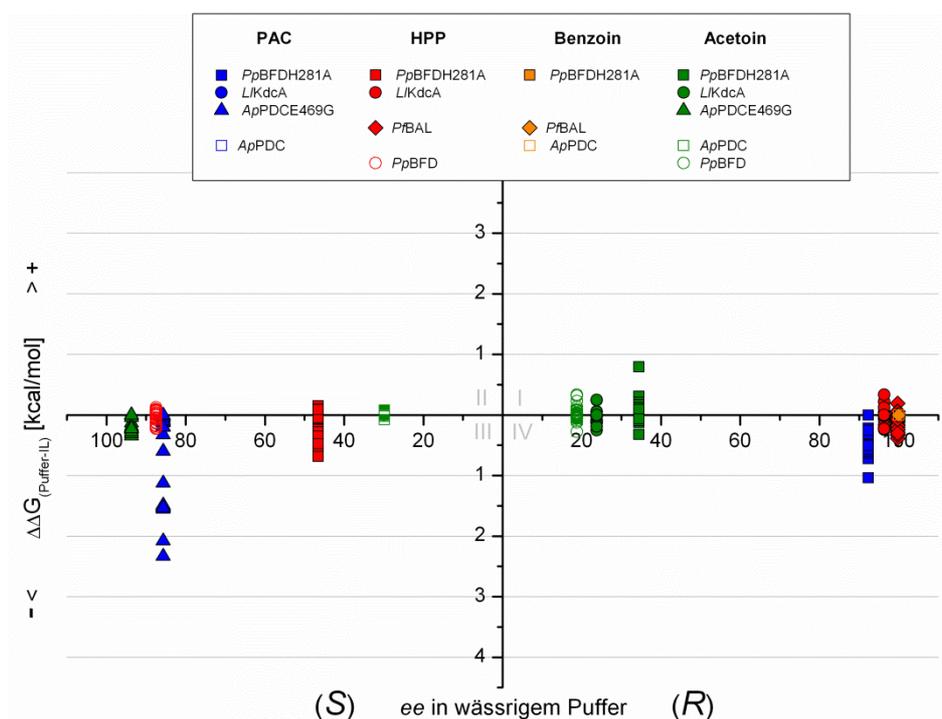


Abbildung 52: Zusammenhang zwischen dem Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (*ee*), repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-IL})}$ (kcal/mol) und dem *ee* in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss einer ionischen Flüssigkeit in einer bestimmten Konzentration (Details in IV.2.2). Die grauen Bereiche zeigen eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der *ee* in wässrigem Puffer ohne Zugabe einer ionischen Flüssigkeit im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den *ee*, repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-IL})}$ in wässrigem Puffer gezeigt. Die Werte wurden berechnet durch: $\Delta G_{(R/S)} = -RT \ln(100 + ee) * (100 - ee)^{-1}$. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*) oder 180 mM (*L/KdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Abbildung 28, Abbildung 30, Abbildung 32, Abbildung 34, Abbildung 36, Abbildung 38 und III.2.2.7.8.

Im moderaten *ee*-Bereich von 50 % (S) bis 50 % (R) wurden durch die ionischen Flüssigkeiten Energiedifferenzen hervorgerufen, die den Wert +/- 1 kcal/mol nicht überschritten. In Abbildung 51 zeigt sich jedoch, dass diese Energiedifferenzen ausreichen, um einen Überschuss an S-Enantiomer in einen Überschuss an R-Enantiomer umzuwandeln (Beispiel: *PpBFDH281A*, HPP von *ee* = 47 % (S) in

Puffer bis $ee = 17\%$ (R) durch Anwesenheit von 9% (w/v) durch Ammoeng 100 (IL-1)) sowie eine R -Selektivität weiter zu verbessern (Beispiel: *PpBFDH281A*, Acetoin von $ee = 34\%$ (R) in Puffer bis $ee = 76\%$ (R) in Anwesenheit von $2,5\%$ (w/v) Ammoeng 100 (IL-1)). Der Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* in der Acetoin synthese (durch ionische Flüssigkeiten $-0,34$ kcal/mol $- +0$ kcal/mol) sowie für die HPP-Produktion (durch ionische Flüssigkeiten $-0,2$ kcal/mol $- +0,1$ kcal/mol) in Ansätzen mit *PpBFD* fiel geringer aus als mit organischen Lösungsmitteln beobachtet (Acetoin: $-1,2$ kcal/mol $- +0$ kcal/mol; HPP: $-0,7$ kcal/mol $- +0$ kcal/mol Abbildung 46). Der Einfluss auf die PAC-Synthese mit *ApPDCE469G* war allerdings vergleichbar. Anders war dies bei der Betrachtung der hohen R -Selektivitäten. Die induzierten Energiedifferenzen bei der Synthese von PAC mit *PpBFDH281A*, HPP mit *PfBAL* und *LKdcA* erreichten nicht mehr als 1 kcal/mol, während es durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln besonders für die *PfBAL*-katalysierte Synthese von HPP die *LKdcA*-katalysierte PAC-Synthese sowie die PAC-Synthese mittels *PpBFDH281A* erheblich größere Werte von bis zu 4 kcal/mol erreicht wurden (Abbildung 46).

Bezogen auf die hervorgerufenen Energiedifferenzen schien der Einfluss ionischer Flüssigkeiten insgesamt geringer zu sein als der organischer Lösungsmittel.

4.2.1 Einfluss kleiner achiraler sowie chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme

In Kapitel IV.3.2.1 wurde der Einfluss weiterer kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die bimolekulare Carboligation getestet. Analog ist in Abbildung 53 deren Einfluss auf den ee -Wert gezeigt.

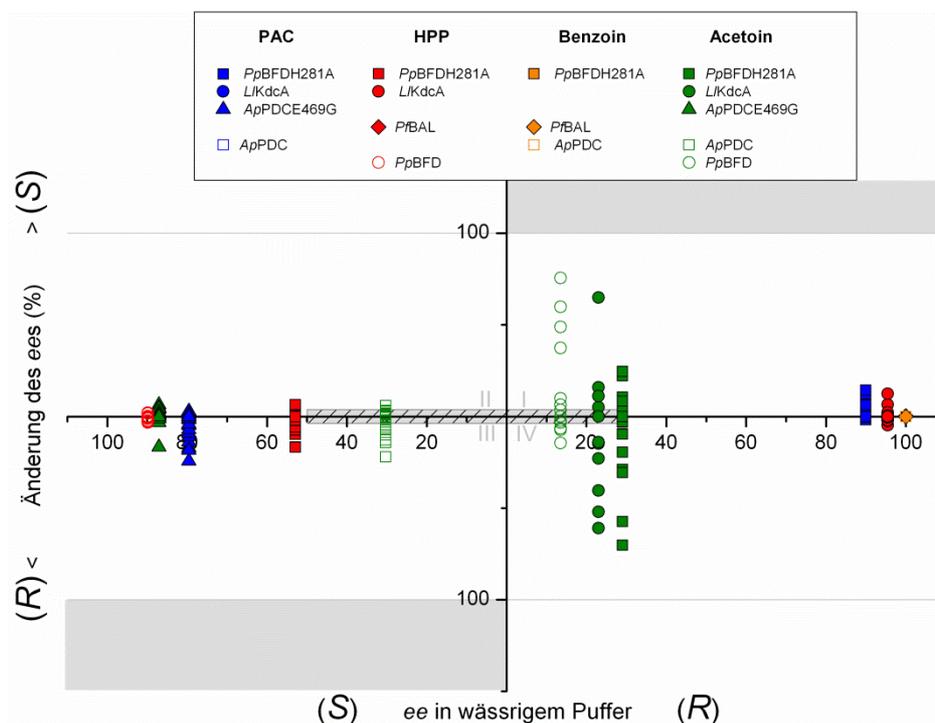


Abbildung 53: Zusammenhang zwischen dem Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten auf den Enantiomerenüberschuss (ee) in % und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss einer kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeit (kclL) in einer bestimmten Konzentration. Die grauen Bereiche markieren eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der ee in wässrigem Puffer ohne Zugabe einer kclL im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den ee in wässrigem Puffer gezeigt. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (*ApPDC*, *ApPDCE469G*, *PfBAL*) oder 180 mM (*LlKdcA*, *PpBFD*, *PpBFDH281A*) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Kapitel III.2.2.7.9.

Es zeigte sich, dass der Einfluss auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme weniger ausgeprägt war, als in Gegenwart organischer Lösungsmittel oder der größeren ionischen Flüssigkeiten. Sehr hohe ee-Werte wurden auch hier nicht beeinflusst, aber auch moderate Werte konnten nicht in einen Überschuss des anderen Enantiomers umgekehrt werden. Des Weiteren gab es keinen Fall, bei dem ein kleiner ee-Wert durch Zugabe der Additive verdoppelt wurde. Alle Werte bewegten sich in einem Rahmen unterhalb einer Änderung von 100 % in Richtung des S- als auch in Richtung des R-Enantiomers. Leider erfüllte sich die Erwartung nicht, dass sehr kleine und vor allem chirale ionische Flüssigkeiten einen signifikanten Einfluss auf die Stereoselektivität der untersuchten Enzyme nehmen würden. Ein möglicher Erklärungsansatz wird in Abschnitt IV.4.2.2 diskutiert.

Dennoch soll auch hier die Energiedifferenz betrachtet werden, welche durch diese Additive bei stereoselektiven Transformationen induziert wird (Abbildung 54).

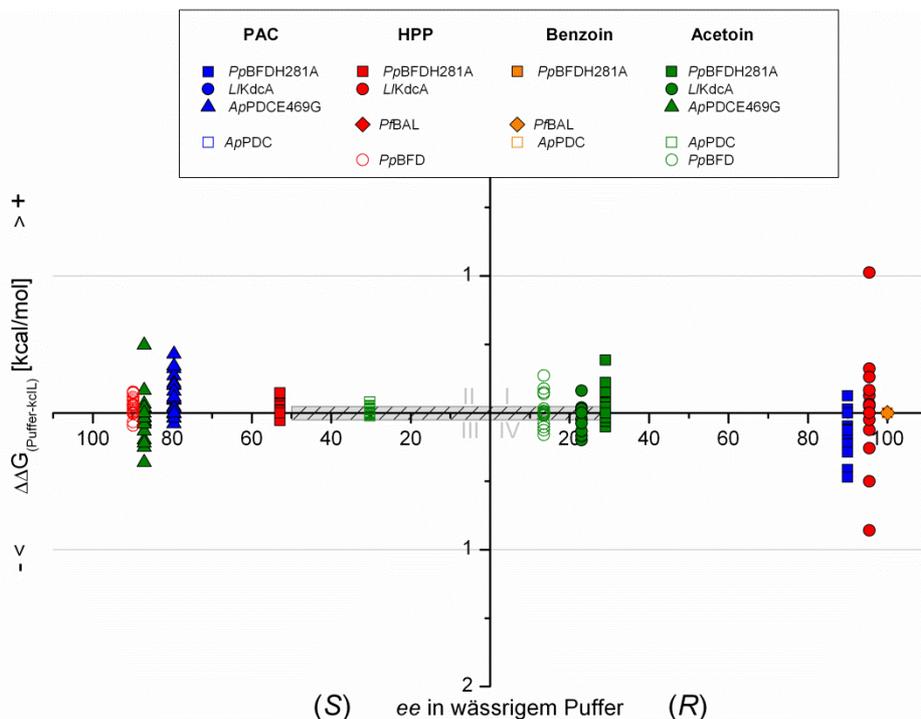


Abbildung 54: Zusammenhang zwischen dem Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten (kclLs) auf den Enantiomerenüberschuss (ee), repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-kclL})}$ (kcal/mol) und dem ee in wässrigem Puffer (auf der x-Achse). Die Symbole repräsentieren das jeweilige Enzym und die Farbe des Symbols das jeweils gebildete Produkt. Jeder Datenpunkt zeigt den Einfluss einer kclL in einer bestimmten Konzentration. Die grauen Bereiche markieren eine Inversion der Stereoselektivität. Auf der x-Achse ist der ee in wässrigem Puffer ohne Zugabe kclLs im Bereich von 100 % (S) bis 100 % (R) dargestellt. Auf der y-Achse ist die Veränderung bezogen auf den ee, repräsentiert durch $\Delta\Delta G_{(\text{Puffer-kclL})}$ in wässrigem Puffer gezeigt. Die Werte wurden berechnet durch: $\Delta G_{(R/S)} = -RT \ln(100+ee) \cdot (100-ee)^{-1}$. Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd (alle Enzyme) und 18 mM (ApPDC, ApPDCE469G, PfBAL) oder 180 mM (LlKdcA, PpBFD, PpBFDH281A) Acetaldehyd. Reaktionsbedingungen: vgl. Kapitel III.2.2.7.9.

Die meisten Werte in Abbildung 54 bewegen sich in einem Rahmen von $+/- 0,5$ kcal/mol. Nur eine Messung erreichte einen Wert von bis zu 1 kcal/mol (HPP in LlKdcA: 1 kcal/mol durch 9 % IL-11). Nach der Auftragung der ee-Änderung war dieses Ergebnis zu erwarten. Es bestätigt nochmals den geringen Einfluss kleiner und chiraler ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der untersuchten Enzyme anhand von freien Energien.

4.2.2 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der ApPDCE469G

Die nicht vorhandene Möglichkeit, eine S-Selektivität mit organischen Lösungsmitteln zu verbessern, wurde in den Kapiteln IV.4.1.1 und IV.4.1.2 mit einem Eindringen der Lösungsmittel in die S-Tasche der ThDP-abhängigen Enzyme erklärt. In Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten war es in den meisten Fällen ebenfalls nicht

möglich, die S-Selektivität zu verbessern. Um in diesem Fall zu untersuchen, ob dies auch mit einer eventuellen Blockade der S-Tasche zusammenhängen könnte, wurde erneut das Beispiel der *ApPDCE469G* herangezogen.

4.2.2.1 Einfluss der Ammoeng-ILs auf die PAC-Produktion durch *ApPDCE469G*

Da ionischen Flüssigkeiten immer aus einem Anion und einem Kation bestehen (1.3.2), mussten auch immer zwei Ausschlussvolumina berechnet werden. Unabhängig davon, welche der beiden Ionen für die Sortierung der Einflüsse auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* herangezogen wurde, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Größe des einzelnen Ions und dessen Einfluss auf die Stereoselektivität der Synthese von (S)-PAC. Wurde allerdings nur der ee betrachtet (Abbildung 55), so zeigte sich, dass lediglich die ammoniumbasierten ionischen Flüssigkeiten (Ammoeng-ILs) einen signifikanten Einfluss auf den ee von 86 % (S) nehmen.

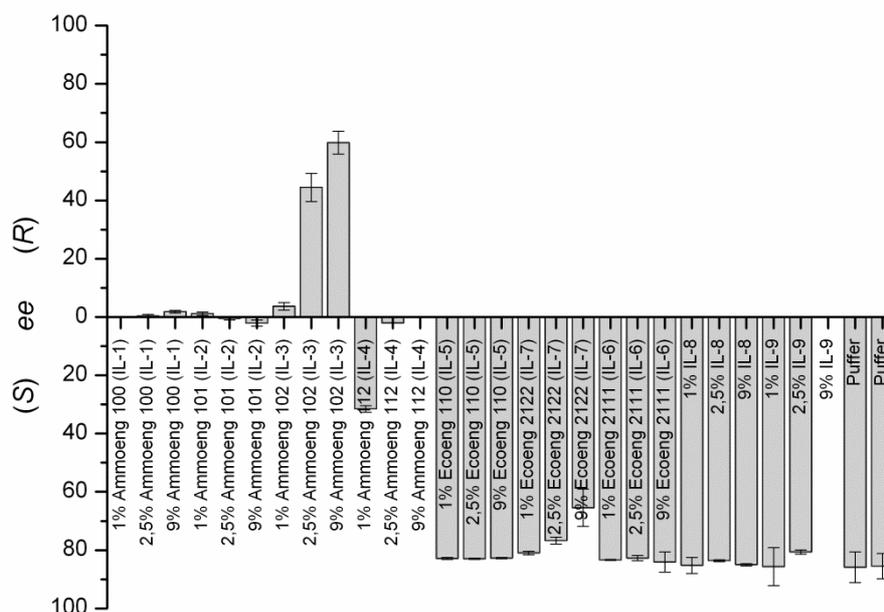


Abbildung 55: Stereoselektivität der *ApPDCE469G* für die PAC-Produktion in Anwesenheit ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (diese Werte entsprechen den Werten aus Abbildung 36).

Die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* wurde durch die Anwesenheit von 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3) von einem ee = 86 % (S)-PAC auf einen Überschuss des R-Enantiomers mit einem ee = 60 % (R) verschoben (siehe auch Abbildung 36). Die

ionischen Flüssigkeiten Ammoeng 100 (IL-1) und Ammoeng 101 (IL-2) zeigten ebenfalls einen großen Einfluss auf die Stereoselektivität der ApPDCE469G, beeinträchtigten aber auch die Aktivität der Variante erheblich (Abbildung 36). Der Einfluss ist daher eventuell nicht auf eine Verschiebung der Selektivität zum *R*-Produkt, sondern auf eine Reduzierung der Aktivität zum *S*-Enantiomer zurückzuführen. Die *ee*-Werte zeigten bei Ammoeng 100 (IL-1) und 101 (IL-2) keinen Überschuss eines der beiden Enantiomere. PAC wird unter Einfluss dieser ionischen Flüssigkeiten schlecht und unselektiv produziert. Ammoeng 102 (IL-3) sowie Ammoeng 112 (IL-4) bewirken, vermutlich wegen negativen Einflüssen auf die Enzymaktivität und/oder Stabilität, vor allem bei höheren Konzentrationen eine starke Verringerung der nach 24 h bestimmten PAC-Konzentration. Allerdings war, besonders durch Ammoeng 102 (IL-3), die beobachtete Selektivitätsänderung auf die ApPDCE469G ausgeprägt, wie die Ergebnisse in Tabelle 14 zeigen.

Tabelle 14: ApPDE469G-katalysierte PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Ammoeng 102 (IL-3)-Konzentrationen. Angegeben sind die Konzentrationen und *ee*-Werte, die nach 24 h in Biotransformationen mit dem angegebenen Anteil an Ammoeng 102 (IL-3) bestimmt wurden. Weitere experimentelle Bedingungen s. Legende Abbildung 36.

Ammoeng 102 (IL-3) (% w/v)	PAC (mM)	Enantiomerenüberschuss PAC (%)	(R)-PAC		(S)-PAC	
			%	mM	%	mM
0	1,1 (±0,01)	86 (±4,3) (<i>R</i>)	93	1,0	7	0,1
1	1,0 (±0,4)	4 (±1,0) (<i>S</i>)	52	0,52	48	0,48
2,5	0,7 (±0,1)	45 (±5,0) (<i>S</i>)	72,5	0,51	27,5	0,19
9	0,07 (±0,0)	60 (±4,0) (<i>S</i>)	80	0,06	20	0,01

Es zeigt sich im Vergleich der resultierenden Werte für die Addition von 1 und 2,5 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3) (Tabelle 14, Zeile 2 und 3) sehr deutlich, dass die prozentuale Konzentration des *R*-Enantiomers quasi konstant bleibt, obwohl die PAC-Konzentration durch 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3) um 30 % sinkt. Der Aktivitätsverlust der ApPDCE469G geht also mit einer selektiven Blockade der Produktion des *S*-Enantiomers einher. Fraglich war nun, welche Komponente der ionischen Flüssigkeit den *S*-Weg und damit letztlich die *S*-Tasche blockiert. Wie die Strukturformel in Abbildung 56 zeigt, ist das Kation viel zu groß, um in die *S*-Tasche zu passen. In Frage käme demnach das Anion Ethylsulfat bzw. mögliche Verunreinigungen.

Im Herstellungsprozess ionischer Flüssigkeiten können Polyethylenglykole sowie organische Lösungsmittel Anwendung finden. Besonders eine Verunreinigung mit

organischen Lösungsmitteln könnte, wie in IV.4.1 beschrieben, die *S*-Selektivität der *Ap*PDCE469G herabsetzen. Um auszuschließen, dass die beobachteten signifikanten Effekte der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3) lediglich auf den Einfluss einer möglichen Verunreinigung zurückzuführen sind, wurde eine Headspace-GC-MS-Analyse sowie eine Untersuchung mittels Fließinjektionsanalyse-Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FIA-FTICR-MS) vorgenommen (Abbildung 86, Abbildung 87).¹ Diese Analysen konnten die Anwesenheit von Polyglykolen ausschließen. Ethanol wurde jedoch mit einer Konzentration von ca. 0,02 % (w/v) nachgewiesen. Diese Menge kann für die Verschiebung der Stereoselektivität nicht ausschlaggebend sein, denn die Zugabe von 5 vol% EtOH zu der Biotransformation mit *Ap*PDCE469G induzierten lediglich eine geringe *R*-Verschiebung und einen resultierenden ee von 62 % (*S*) für das PAC-Produkt (Abbildung 24). In den Analysen zeigte sich eine zweite Substanz, die in der Gasphase über Ammoeng 102 (IL-3) gefunden wurde, jedoch konnte dieses Signal keinem Lösungsmittel zugeordnet werden. Da die geschätzte Konzentration dieser Substanz nur mit 0,06 % (w/v) angegeben wird, ist diese Beobachtung zu vernachlässigen. Der Einfluss der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3) wird also hauptsächlich durch die Substanz selber und nicht durch Verunreinigungen verursacht.

Um zunächst die Ursache des Einflusses der Ammoeng-ILs klären zu können, wird die Struktur dieser ionischen Flüssigkeiten nochmals betrachtet (Abbildung 56).

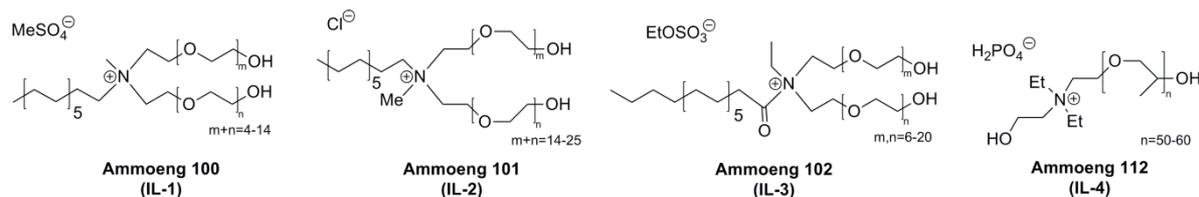


Abbildung 56: Struktur der verwendeten ammoniumbasierten ionischen Flüssigkeiten (Ammoeng-ILs).

Wenn, wie für die organischen Lösungsmittel bereits diskutiert, ein Einfluss eines Additivs durch Einlagerung wahrscheinlich ist (IV.4.1.1), dann könnten die Kationen der dargestellten ionischen Flüssigkeiten aufgrund ihrer Größe bereits ausgeschlossen werden. Die zugehörigen Anionen allerdings sind prinzipiell klein genug,

¹ Diese Messungen wurden durch die Zentralabteilung für chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich GmbH durchgeführt.

um in das aktive Zentrum und auch in die S-Tasche der ApPDCE469G eindringen zu können (Tabelle 15).

Tabelle 15: Größe der Ammoeng-IL-Anionen sortiert nach ihrem Ausschlussvolumen im Vergleich zu Benzaldehyd.

Anion	Ausschlussvolumen (Å ³)
Chlorid	29,3
Methylsulfat	67,7
Ethylsulfat	71,6
Dihydrogenphosphat	92,6
Benzaldehyd	94,6

Damit überprüft werden kann, ob die Anionen der Ammoeng-ILs alleine einen Einfluss auf die Stereoselektivität der ApPDCE469G nehmen, wurden sie in Kombination mit einem anderen Kation erneut in enzymatische Tests eingesetzt. Um einen Effekt durch das Kation auszuschließen, wurden nur Natriumsalze untersucht (Abbildung 57).

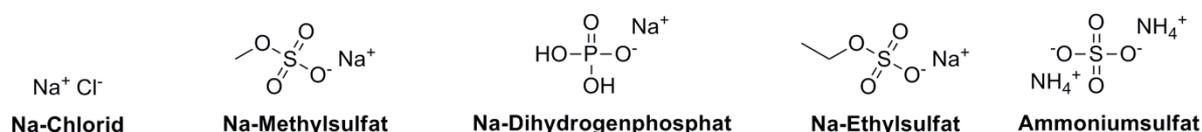


Abbildung 57: Struktur der verwendeten Natriumsalze.

Die Natriumsalze Natriumchlorid, Natriummethylsulfat, Natriumdihydrogenphosphat sowie Natriummethylsulfat repräsentieren im weiteren Verlauf den Einfluss der Anionen der Ammoeng-ILs. Ammoniumsulfat soll den Einfluss der Kationen dieser ionischen Flüssigkeiten darstellen. Um den Einfluss der einzelnen Komponenten der Ammoeng-ILs beschreiben zu können, wurde die Stereoselektivität der ApPDCE469G unter Zugabe verschiedener Konzentrationen der in Abbildung 57 dargestellten Natriumsalze untersucht (Abbildung 58).

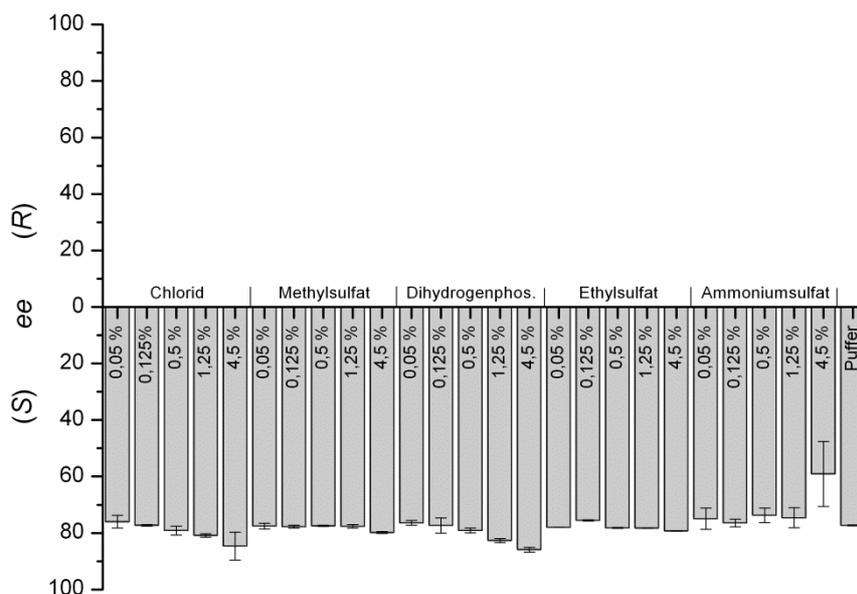


Abbildung 58: Stereoselektivität der *ApPDCE469G* für die PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Natriumsalze. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die Salzkonzentrationen sind in den Balken angegeben.¹ Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen an. Reaktionsbedingungen: III.2.2.7.9.

Abbildung 58 zeigt, dass die verschiedenen Natriumsalze keinen signifikanten Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* bezüglich der (S)-PAC-Synthese nehmen. Weder die Repräsentanten für die Anionen, noch der für das Kation der Ammoeng-ILs zeigten alleine betrachtet den gleichen Einfluss wie die entsprechenden ionischen Flüssigkeiten (Abbildung 55).

Diese Beobachtung lässt folgende Schlüsse zu:

- Die Anionen der Ammoeng-ILs alleine sind nicht für die Beeinflussung der Stereoselektivität der *ApPDCE469G* verantwortlich
- Ebenso wenig verursacht das Kation diesen Einfluss
- Konsequenterweise muss es also die Kombination von Anion und Kation sein, die den Einfluss auf die Stereoselektivität bewirkt

Dass die sehr großen Kationen der Ammoeng-ILs direkten Einfluss auf die Stereoselektivität der *ApPDCE469G* durch ein Eindringen in das aktive Zentrum nehmen können, ist sehr unwahrscheinlich, da sie zu groß sind, um in das aktive Zentrum zu gelangen (IV.4.1.1). Wenn überhaupt wäre es den flexiblen Seitenketten der Kationen möglich, den Substratkanal der Enzyme teilweise zu blockieren – dann

¹ Die Konzentrationen der Salze (w/v) decken die molaren Konzentrationen der entsprechenden Ammoeng-ILs ab (Tabelle 19).

wäre aber eine komplette Reduzierung der Aktivität und keine Verschiebung der Stereoselektivität zu beobachten. Wahrscheinlicher ist, dass Interaktionen zwischen Anionen und Kationen verantwortlich für die Stereoselektivitätsverschiebung sind. So wäre denkbar, dass etwa das Anion der ionischen Flüssigkeiten Ammoeng 102 (IL-3) (Ethylsulfat), welches theoretisch in das aktive Zentrum passen würde, nur in dieses oder die S-Tasche der *ApPDCE469G* eindringt, wenn es frei in Lösung vorliegen würde. Im Fall von Ammoeng 102 (IL-3) bildet Ethylsulfat mit dem entsprechenden Kation lediglich eine sehr schwache Ionenpaarbindung aus. Diese Eigenschaft ist dafür verantwortlich, dass diese Kombination einen Schmelzpunkt unter 100 °C hat und bei Raumtemperatur flüssig vorliegt. Daher handelt es sich bei Ammoeng 102 (IL-3) per Definition um eine ionische Flüssigkeit (I.3.2). Natriumethylsulfat hingegen liegt bei Raumtemperatur als Kristall, also in fester Form vor. Die durch die Raumtemperatur angebotene Energie reicht nicht aus, die Kristallgitterenergie zu überwinden und den Kristall zu schmelzen. Demzufolge ist Ethylsulfat in der Kombination Natriumethylsulfat stärker an sein Kation gebunden als in Ammoeng 102 (IL-3).

4.2.2.2 Beeinflussung der Stereoselektivität der *ApPDCE469G* je nach Ionenpaarbindungsstärke

Die starke Ionenpaarbindung zwischen zwei Ionen kann dazu führen, dass stabile Ionenpaare auch in wässriger Lösung erhalten bleiben. Durch die unterschiedlich starke Bindung des Ethylsulfations, einmal in Form von Natriumethylsulfat und einmal im Ammoeng 102 (IL-3) ist es denkbar, dass das Ethylsulfation in Verbindung mit Ammoeng 102 (IL-3) eine große Bindungsaffinität zu dem Protein ausbildet, weil es frei vorliegt. Im Fall des Natriumethylsulfats ist die Bindungsaffinität zum Natrium sehr groß und das Ethylsulfation steht nicht so häufig für Wechselwirkungen mit dem Enzym bzw. seinem aktiven Zentrum zur Verfügung. Um diese These zu untermauern, wurden die Einflüsse ionischer Flüssigkeiten mit einem gleichen (oder ähnlichen) Anion in Abhängigkeit der Stärke ihrer Ionenpaarbindung im Vergleich zu dem entsprechenden Natriumsalz untersucht.

Zunächst wurde die Gruppe der ionischen Flüssigkeiten und Salze mit einem Sulfatanion untersucht. Hierzu gehören Ecoeng 110 (IL-5), IL-9, Ammoeng 100 (IL-1), Ammoeng 102 (IL-3), Natriumethylsulfat sowie Natriummethylsulfat (Abbildung 59).

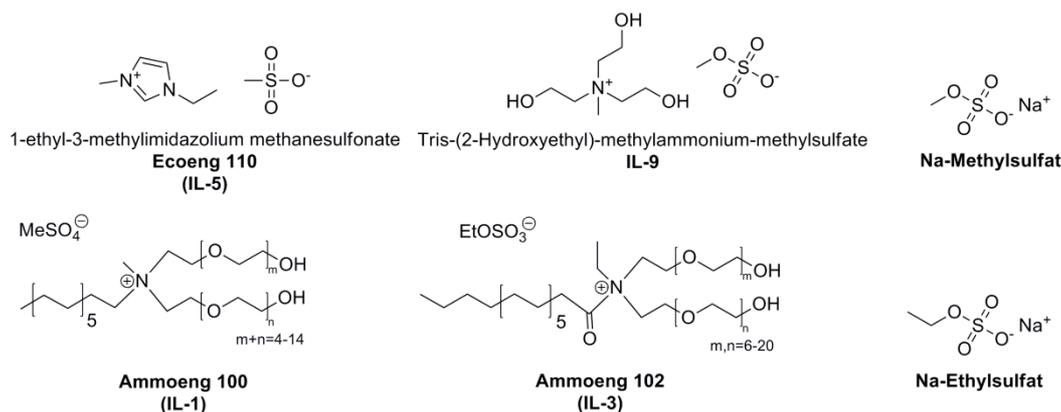


Abbildung 59: Struktur der verwendeten ionischen Flüssigkeiten und Natriumsalze mit einem Sulfatanion oder dessen Derivaten.

Die Stärke der Ionenpaarbindung dieser Salze sollte in folgender Reihenfolge ansteigen: Ammoeng 102 (IL-3) < Ammoeng 100 (IL-1) < Ecoeng 110 (IL-5) < IL-9 < Natriumethylsulfat < Natriummethylsulfat. Dementsprechend müsste auch der Einfluss auf die Stereoselektivität der *Ap*PDCE469G in gleicher Reihenfolge abnehmen. Der Einfluss der ausgewählten Salze ist in Abbildung 60 dargestellt.

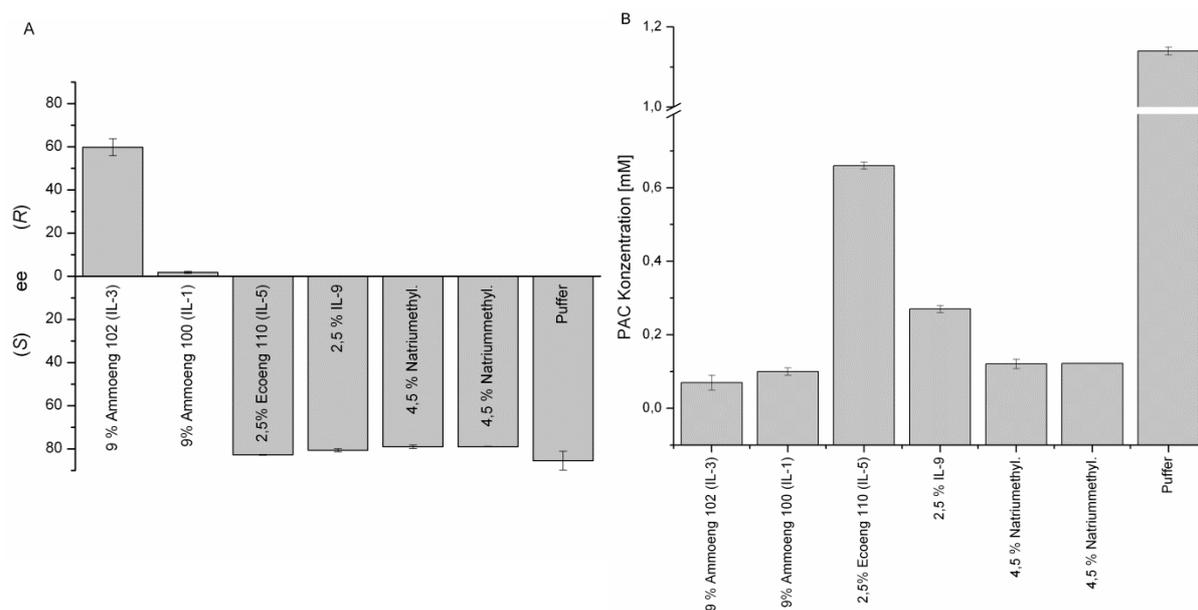


Abbildung 60: Stereoselektivität der *Ap*PDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten und Natriumsalze mit Sulfatanion oder Sulfatanion-Derivaten (A). B zeigt die dazugehörigen Produktkonzentrationen. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *Ap*PDCE469G, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben jeweils den höchsten gemessenen Wert an. Die Additive sind nach der geschätzten Stärke ihrer Ionenpaarbindung sortiert. Reaktionsbedingungen: III.2.2.7.8 und III.2.2.7.9.

Bis auf Ammoeng 102 (IL-3) und Ammoeng 100 (IL-1) zeigte sich für die anderen Salze kein signifikanter Einfluss auf die Stereoselektivität der *Ap*PDCE469G. Für Ammoeng 102 (IL-3) und Ammoeng 100 (IL-1) kann der erwartete Trend, dass die

Ionen aus schwächeren Ionenpaarbindungen einen größeren Einfluss nehmen beobachtet werden. Unter Zugabe der anderen ionischen Flüssigkeiten und Salze konnte keine Stereoselektivitätsverschiebung beobachtet werden. Möglicherweise war hier bereits eine zu starke Interaktion von Anion und Kation vorhanden. Die Theorie, dass es einen Einfluss gibt, je nachdem ob das freie Anion für eine Bindung mit und in dem Enzym zur Verfügung steht, wird durch diese Messreihe verstärkt, ist aber nicht komplett aussagekräftig, da auch die Konzentration an gebildetem PAC-Produkt variierte.

Als zweites wurde eine Gruppe mit Chlorid als Anion untersucht. Zu dieser Gruppe gehören Ammoeng 101 (IL-2), Natriumchlorid, IL-13 und IL-10 (Abbildung 61).

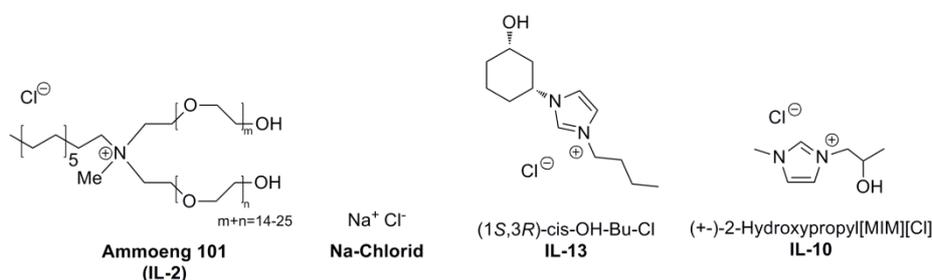


Abbildung 61: Struktur der verwendeten ionischen Flüssigkeiten und Salze mit Chloridanion.

Die Stärke der Ionenpaarbindung dieser Salze sollte in folgender Reihenfolge ansteigen: Ammoeng 101 (IL-2) < IL-13 < IL-10 < Natriumchlorid. Entsprechend wurde hier eine Abnahme des Einflusses auf die Stereoselektivität in gleicher Reihenfolge erwartet (Abbildung 62).

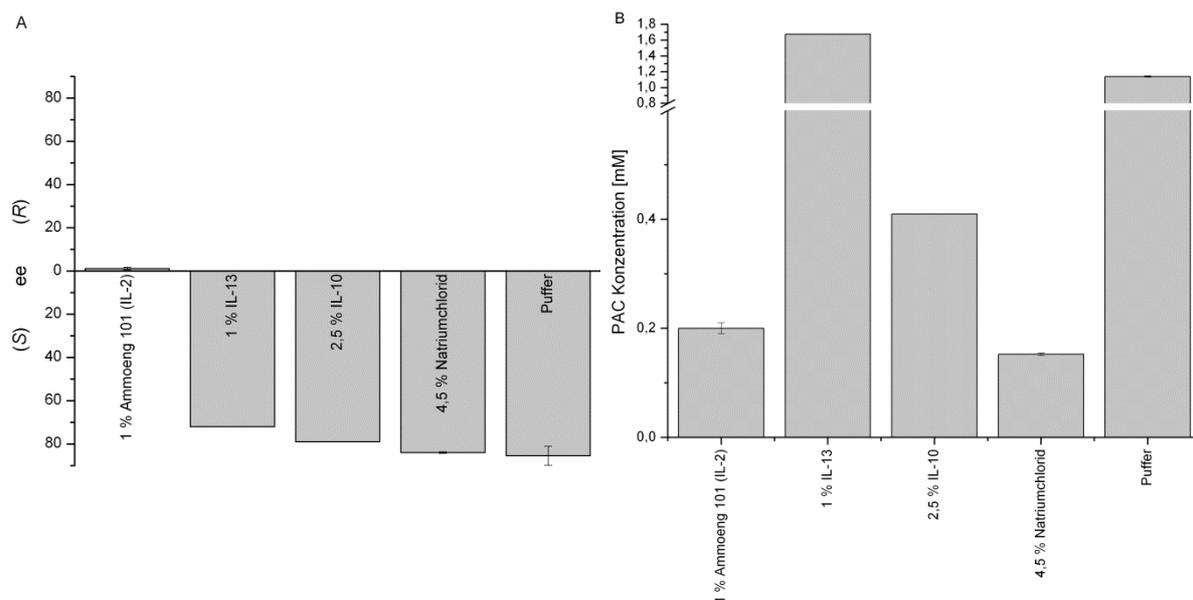


Abbildung 62: Stereoselektivität der ApPDCE469G für die PAC-Produktion in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten und Natriumsalze mit Chloridanion (A). B zeigt die dazugehörigen Produktkonzentrationen. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL ApPDCE469G; Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben jeweils den höchsten gemessenen Wert an. Die Additive sind nach der geschätzten Stärke ihrer Ionenpaarbindung sortiert.

Auch im Fall der Salze mit Chlorid als Anion zeigte sich der vermutete Zusammenhang, wenn auch wie im Fall der Natriumsalze mit Sulfatanion (Abbildung 60) nicht sehr deutlich. Erneut nimmt die Verschiebung der Stereoselektivität der ApPDCE469G in Richtung des *R*-Enantiomers mit steigender geschätzter Ionenpaarbindungsstärke ab. Allerdings kann hier keine Verschiebung zu einem *R*-Überschuss gezeigt werden. Ammoeng 101 (IL-2) induziert lediglich eine unselektive Produktion von PAC. Zudem beeinflusst auch hier die Art des Additivs die Bildung an PAC-Produkt.

Es ist trotz des schwachen Einflusses der betrachteten Salze wahrscheinlich, dass aufgrund der geringen Größe nur die Anionen der ionischen Flüssigkeiten einen Einfluss auf die Stereoselektivität der ApPDCE469G nehmen. Die Ergebnisse verstärken die Vermutung, dass, je nach Ionenpaarbindungspartner und der Stärke der Bindung, es nur einigen Anionen möglich ist, die *S*-Tasche zu blockieren. Werden speziell die beiden Anionen Chlorid und Sulfationen betrachtet, so wird deutlich, dass hier die Größe des Anions (IV.4.1.1) neben der Grundvoraussetzung getrennt vom Bindungspartner in das aktive Zentrum einzudringen, ein wichtiger Faktor des Einflusses ist. Allerdings erklärt diese Vermutung die Ergebnisse nicht umfassend, denn Salze mit dem größeren Anion (Sulfatanion) zeigen eine

ausgeprägtere maximale Verschiebung der Stereoselektivität der ApPDCE469G, als die Salze mit dem viel kleineren Chlorid (Abbildung 60, Abbildung 62).

4.2.2.3 Veränderung des Mediums durch die Kationen der Ammoeng-ILs

Bisher wurde die Funktion des Kations, als schlechter oder guter Bindungspartner und damit Anker für das Anion zu fungieren, untersucht. Es ist auch möglich, dass das Kation Einfluss auf das gesamte Reaktionsmedium nehmen kann. Denkbar ist beispielsweise eine erhöhte Hydrophobizität des Puffermediums durch die Anwesenheit des großen, teils hydrophoben Kations der ionischen Flüssigkeiten Ammoeng 102 (IL-3). Das freie Wasser könnte durch dieses Molekül zu großen Teilen gebunden werden, was eine Hydratisierung des Anions (hier: Ethylsulfatanion) erschweren würde. Wenn wiederum das Anion nicht vollständig oder dauerhaft hydratisiert vorliegt, würden möglicherweise verstärkt Anionen in die hydrophobe S-Tasche der ApPDCE469G eindringen, um die mangelnde Hydratisierung zu umgehen.

Um die induzierte Hydrophobizität des Ammoeng 102 (IL-3)-Kations zu simulieren, wurde Polyethylenglycol (PEG) mit einer Kettenlänge, welche der längsten Kette in Ammoeng 102 (IL-3) entspricht, eingesetzt (längste Kette im Ammoeng 102 (IL-3) Kation: C/O₇₀, diese Länge entspricht einem PEG-Molekül mit einem Molekulargewicht von 1030 g/mol, die Konzentration dieses Moleküls ist entsprechend der von 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3) 52 mmol/L). PEG 1000 wurde zusammen mit Ethylsulfat-Natriumsalz dem Ansatz zugefügt (vgl. Abbildung 58).

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 63 zusammengefasst.

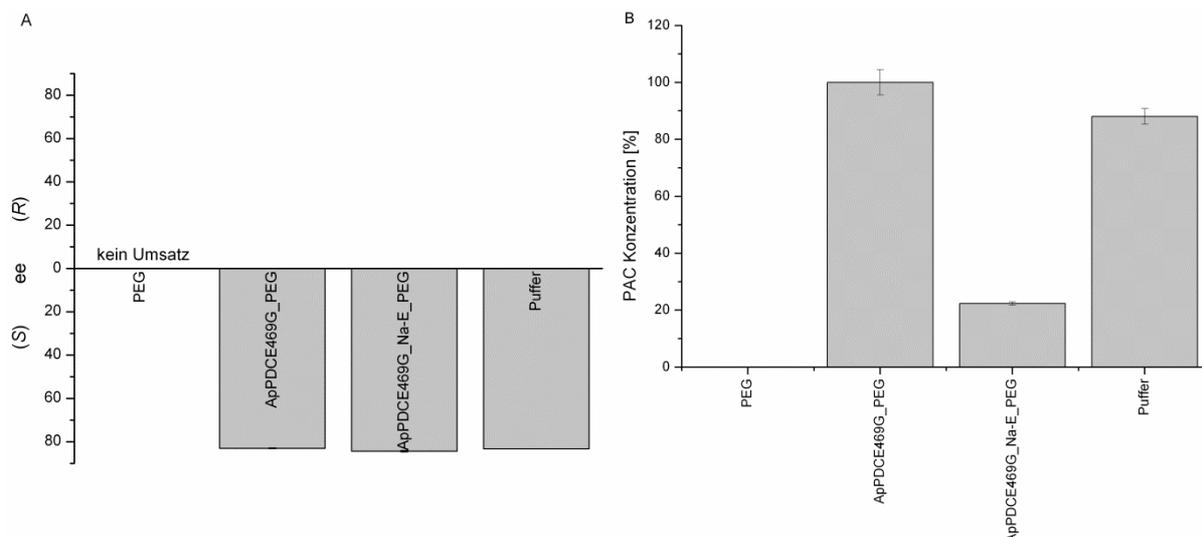


Abbildung 63: Stereoselektivität der *ApPDCE469G* für die PAC-Produktion in Gegenwart von PEG 1000 (*ApPDCE469G_PEG*) sowie von PEG 1000 und Natriumethylsulfat (*ApPDCE469G_Na-E_PEG*) (A). B zeigt die dazugehörigen Produktkonzentrationen an. Die Eigenkatalyse des PEGs ist mit dem Ansatz „PEG“, welcher kein Enzym enthielt ausgeschlossen. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM $MgSO_4$, 0,1 ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL *ApPDCE469G*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, 52 mM PEG, 0,5 % (w/v) Natriumethylsulfat. Reaktionsbedingungen: III.2.2.7.8 und III.2.2.7.9.

Es zeigte sich, dass die in diesem Versuch verwendeten Additive keinen signifikanten Einfluss auf die Stereoselektivität der PAC-Produktion durch die *ApPDCE469G* hatten. Der ee-Wert konnte nicht, wie durch Ammoeng 102 (IL-3) (Abbildung 55) beeinflusst und umgekehrt werden. Falls die induzierte Hydrophobizität des Puffers, verursacht durch das Kation des Ammoeng 102 (IL-3), den ee der PAC-Produktion indirekt beeinflusst, schien PEG 1000 in gleicher Größe und Konzentration nicht den gleichen Effekt auslösen zu können. Allerdings liegt in diesem System noch eine zusätzliche Komponente vor, das Natriumkation. Selbst wenn PEG 1000 die Hydrophobizität des Puffers auf die vermutete Weise steigern könnte, scheint es weiterhin sehr wahrscheinlich, dass Natrium mit Ethylsulfat eine starke Ionenpaarbindung eingeht, welche verhindert, dass das Anion frei vorliegt und in die S-Tasche der *ApPDCE469G* eindringen kann, um eine Beeinflussung der Stereoselektivität zu verursachen. Reicht die wasserziehende Kraft des PEGs nicht aus, um das Ionenpaar zu trennen und nur noch eine Solvation des Kations zuzulassen, läge das Anion noch immer in Verbindung mit seinem Kation vor, unfähig in die S-Tasche der *ApPDCE469G* einzudringen. Der durchgeführte Versuch war somit nicht geeignet, eine mögliche Hydratisierung des Anions nachzuweisen.

Fazit

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Anionen der ionischen Flüssigkeiten je nach Bindungspartner in der Lage sind, die Stereoselektivität der *Ap*PDCE469G signifikant zu beeinflussen. Innerhalb der verschiedenen Anionen kann der Einfluss jedoch nicht mit deren Größe korreliert werden. Diese beiden Aspekte können aber nicht die einzigen möglichen Erklärungen sein, denn sie können nicht beschreiben, warum nur die Ammoeng-ILs einen Einfluss auf die Selektivität der *Ap*PDCE469G haben und alle anderen getesteten ionischen Flüssigkeiten nicht.

Der Versuch, die durch das Kation der ionischen Flüssigkeiten ausgelösten Effekte durch die Addition von Polyethylenglycol zu simulieren, konnte eine mögliche Steigerung der Hydrophobizität des Puffers nicht bestätigen. Allerdings konnten für diese Untersuchung nicht alle Unsicherheitsfaktoren ausgeschlossen werden.

Der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme und hier vor allem auf die der *Ap*PDCE469G kann durch die durchgeführten Untersuchungen teilweise erklärt werden. Ein zweifelsfreier Beweis der aufgestellten Theorien zum Einfluss der ionischen Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der Carboligation mit ThDP-abhängigen Enzymen ist aber mit den vorhandenen Messmethoden nicht möglich. Der Einfluss ionischer Flüssigkeiten scheint umfassender zu sein, als lediglich die Summe der Einflüsse der beiden Komponenten aus denen sich diese Additive zusammensetzen.

5 Simulation der Interaktion ausgewählter Additive mit dem aktiven Zentrum ThDP-abhängiger Enzyme

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die *Ap*PDCE469G ein sehr gutes Beispiel ist, um den Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten auf die *S*-Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme zu beschreiben. Besonders für den Einfluss organischer Lösungsmittel zeichneten sich sehr plausible Erklärungen ab (IV.4.1.1). Experimentell konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss eines Lösungsmittels von dessen Größe aber auch von dessen log*P*-Wert, also der Polarität, abhängt. Der Einfluss von Größe und Hydrophobizität des Lösungsmittels legt den Schluss nahe, dass eine spezifische Interaktion mit einer hydrophoben Bindetasche im aktiven Zentrum, genauer mit der *S*-Tasche des Enzyms stattfindet. Da die Erklärungen des Einflusses organischer Lösungsmittel mit Hilfe von Computersimulationen sehr viel besser und belegter sind (Kulschewski und

Pleiss 2012) als die der ionischen Flüssigkeiten, wurde im Folgenden der Versuch unternommen, die Wechselwirkung organischer Lösungsmittel und ThDP-abhängiger Enzyme strukturell und thermodynamisch mittels Computersimulationen zu stützen.

5.1 Interaktion organischer Lösungsmittel mit der S-Tasche der *ApPDCE469G*

Die aus den experimentellen Ergebnissen abgeleiteten Vermutungen (IV.4.1.1) sollten mithilfe computergestützter Simulation bestätigt werden. In Kooperation mit Dr. Marco Bocola aus dem Institut für Biotechnologie der RWTH Aachen und aufgrund seiner Expertise im Bereich der computergestützten Biologie war es möglich, die Gegebenheiten im aktiven Zentrum der *ApPDCE469G* strukturell und thermodynamisch mit Hilfe von moleküldynamischen (MD) Kraftfeldsimulation zu untersuchen und zu beschreiben.

Zunächst wurde geprüft, ob das gewählte Modell generell geeignet war, die Stereoselektivität der Enzyme zu beschreiben. Dazu wurden die Enthalpien (H in kcal/mol) des Benzaldehyds in der pro-*S*- bzw. der pro-*R*-Konfiguration in den Enzymen *ApPDC* und deren Variante *ApPDCE469G* untersucht. Aus experimentellen Daten war bekannt, dass das Wildtyp-Enzym für die PAC-Produktion *R*-selektiv und die Variante *S*-selektiv ist (I.2.5.1). Dies konnte durch die MD-Simulationen mit Hilfe des AMBER03/GAFF Kraftfeldes mit dem Programm Yasara Structure 12.2.22 bestätigt werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Enthalpie eines Benzaldehydmoleküls in der pro-*S*- und pro-*R*-Konfiguration in *ApPDC* und *ApPDCE469G*. Diese Werte wurden in wässriger Umgebung ohne Lösungsmittelzugabe simuliert. $\Delta H_{(S-R)}$ gibt den Energieunterschied zwischen der pro-*R*- und der pro-*S*-Konformation an.

Enzym	Enthalpie H (kcal/mol) des Benzaldehyds in		$\Delta H_{(S-R)}$
	pro- <i>R</i> -Konfiguration	pro- <i>S</i> -Konfiguration	
<i>ApPDC</i>	5,6	8,8	+3,2 (pro (<i>R</i>))
<i>ApPDCE469G</i>	8,8	6,2	- 2,6 (pro (<i>S</i>))

In der *ApPDC* zeigte sich für die pro-*R*-Konfiguration, also für die parallele Anordnung des Benzaldehyds an den bereits ThDP-gebundenen Acetaldehyd (Abbildung 5), eine Enthalpie von 5,6 kcal/mol. Die modellierte pro-*S*-Konformation in der Simulation brachte eine höhere Energie von 8,8 kcal/mol hervor. Aufgrund der günstigeren Bindungsenergie war die *R*-Konformation in der *ApPDC* mit einer Differenz von 3,2 kcal/mol bevorzugt. Ein anderes Bild zeigte sich für die *ApPDCE469G*. Hier lag die Bindungsenergie der pro-*R*-Konformation mit einem Wert

von 8,8 kcal/mol energetisch höher als die *S*-Konformation mit einer Enthalpie von 6,2 kcal/mol. Hier lag somit für die *S*-Konformation eine niedrigere Bindungsenergie mit einem Energievorteil von 2,6 kcal/mol vor, was in einer bevorzugten Bildung des *S*-Enantiomers des Produkts resultiert. Die durch Struktur-Funktionsbeziehungen aufgestellte Vermutung zur Determination der Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme mit Hilfe der *S*-Tasche konnte durch diese Simulationen, am Beispiel der *Ap*PDCE und deren Variante bestätigt werden (I.2.5.1). Das so validierte Modell wurde nun weiter verwendet, um den Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Stereoselektivität zu erklären.

Hierbei wurde wie in Kapitel IV.4.2.2 ausführlich beschrieben vermutet, dass die organischen Lösungsmittel je nach Größe und Polarität in der *S*-Tasche kompetitiv zu Benzaldehyd binden können und somit die antiparallele Anordnung des Benzaldehyds in eben dieser Tasche verhindert können. Das Resultat aus solch einer selektiven Blockade hätte eine Verschiebung der *S*-Selektivität hin zu einem Überschuss des *R*-Enantiomers zur Folge. Bestätigt wurde diese Vermutung bereits durch die experimentell gewonnenen Daten (Abbildung 47). Nun sollten Simulationen durchgeführt werden, um weitere strukturelle und energetische Beweise für die Vermutung zu liefern. Die Ergebnisse für ausgewählte Lösungsmittel sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Enthalpie von Benzaldehyd und ausgewählten organischen Lösungsmitteln außerhalb des Enzyms und in der *S*-Tasche der *Ap*PDCE469G. Daraus berechnet wird $\Delta H_{(ST-Med)}$, der die Bindungsenthalpie als Differenz zwischen der Enthalpie in der *S*-Tasche (ST) und dem Medium (Med) angibt. $\Delta\Delta G_{(P-oLM)}$ beschreibt die durch das Lösungsmittel induzierte experimentell bestimmte Energiedifferenz (vgl. Abbildung 46) in Bezug auf die Stereoselektivität (mit P: Puffer und oLM: organisches Lösungsmittel). Entsprechend dieser Werte ist der *ee* nach Zugabe der Lösungsmittel aufgeführt. sim.: simulierte Werte, exp.: experimentell gewonnene Werte.

Name	Enthalpie H (kcal/mol) in		$\Delta H_{(ST-Med)}$ (kcal/ mol, sim.)	$\Delta\Delta G_{(P-oLM)}$ (kcal/ mol, exp.)	<i>ee</i> (exp.)
	Medium ¹	<i>S</i> -Tasche ²			
Benzaldehyd	9,1	6,2	-2,9	-	87 % (<i>S</i>)
DMSO	-30,3	-29,9	0,5	-0,7	65 % (<i>S</i>)
Dioxan	21,7	20,5	-1,1	-0,6	66 % (<i>S</i>)
Aceton	-21,7	-23,9	-1,9	-1,7	16 % (<i>R</i>)
EtOAc	-17	-19,4	-2,0	-2,0	34 % (<i>R</i>)
TCM	-2,9	-6,7	-3,2	-2,2	49 % (<i>R</i>)

¹ Hierbei handelt es sich im Fall von Benzaldehyd nur um Wasser, im Fall der Lösungsmittel immer um die mittlere Energie eines Moleküls in einer 30 %igen Mischung DMSO, 30 %igen Mischung Dioxan, 30 %igen Mischung Aceton, 7 %igen Mischung EtOAc bzw. 0,5 %igen Mischung TCM.

² Hierbei handelt es sich um die mittlere Energie eines Moleküls in der *S*-Tasche der *Ap*PDCE469G.

Untersucht wurden die Lösungsmittel DMSO, Dioxan, Aceton, EtOAc sowie TCM. Hierbei wurde jeweils die mittlere Enthalpie von einem Lösungsmittelmolekül in Gegenwart von 30 vol% DMSO, Dioxan bzw. Aceton sowie 7 vol% EtOAc und 0,5 vol% TCM untersucht. Dem gegenübergestellt wurde die mittlere Enthalpie, die dieses eine Lösungsmittelmolekül in der *S*-Tasche der *Ap*PDCE469G hatte. Zum Vergleich sind auch die Energie eines Benzaldehydmoleküls in wässriger Umgebung und die Enthalpie in der *S*-Tasche, also in der antiparallelen Anordnung, aufgeführt. Die Ergebnisse aus den MD-Simulationen sind in den letzten beiden Spalten (Tabelle 16) noch mal den aus den Experimenten gewonnenen $\Delta\Delta G$ -Werten bzw. den jeweiligen absoluten *ee*-Werten zugeordnet.

Zuerst müssen die Enthalpien der einzelnen Moleküle im Medium (Tabelle 17, 2. Spalte) mit den Enthalpien in der *S*-Tasche verglichen werden (Tabelle 17, 3. Spalte). Wie schon in Tabelle 16 beschrieben, zeigte sich, dass Benzaldehyd bevorzugt in der *S*-Tasche der *Ap*PDCE469G bindet, sofern kein Lösungsmittel anwesend ist. Bis auf das DMSO-Molekül zeigten die anderen simulierten Lösungsmittel alle eine negative Bindungsenergie in der *S*-Tasche. Sie neigten also in Abwesenheit von Benzaldehyd eher dazu die *S*-Tasche zu besetzen, als in freier Lösung zu verbleiben. Die Unterschiede in den Energien außerhalb des Enzyms und innerhalb der *S*-Tasche steigen in folgender Reihenfolge: DMSO < Dioxan < Aceton < EtOAc < TCM. In der gleichen Reihenfolge erfolgt, wie in den letzten beiden Spalten von Tabelle 17 gezeigt, die Reduktion der *S*-Selektivität (Tabelle 17, Zeile 1-Benzaldehyd) bis hin zu einer induzierten *R*-Selektivität der *Ap*PDCE469G für die PAC-Produktion. Dabei korreliert die Energie, die durch die Verdrängung des Lösungsmittels zur Besetzung der *S*-Tasche durch Benzaldehyd aufgebracht werden muss, mit der experimentell gemessenen Energiedifferenz der verringerten Stereoselektivität. Werden die durch die Lösungsmittel induzierten Energiedifferenzen detaillierter betrachtet (Tabelle 17, vorletzte Spalte), zeigen sich in den simulierten (Tabelle 17, sim.) und experimentell (Tabelle 17, exp.) gewonnenen Werten teilweise Unterschiede. Während die durch beispielweise DMSO induzierte Energiedifferenz durch die Simulation unterrepräsentiert wird, wird sie für TCM überrepräsentiert. Ein Grund für die Divergenz zwischen simulierten und experimentell gewonnenen Werten könnte in der Ausführung der Simulation liegen. In dieser wurde von einer vollen Besetzung der *S*-Tasche mit je einem Lösungsmittelmolekül ausgegangen. Beim Beispielpaar DMSO und TCM sind experimentell

jedoch erhebliche Unterschiede in der eingesetzten Konzentration zu verzeichnen. Während DMSO in Konzentrationen bis zu 30 vol% (3,49 mol/L, Tabelle 18) eingesetzt wurde, war ein TCM-Einsatz lediglich bis zu einer Konzentration von 0,5 vol% (0,03 mol/L, Tabelle 18) möglich. Es wird also statistisch aufgrund der geringen Konzentration seltener zu einer Besetzung der S-Tasche der *Ap*PDCE469G durch TCM kommen, als in den Simulationen angenommen. Im Vergleich dazu, wird durch die höhere DMSO-Konzentration theoretisch eine viel höhere Wahrscheinlichkeit vorliegen, die S-Tasche durch das Lösungsmittel zu besetzen. Der zweite Punkt, der die Unterschiede in den simulierten und experimentell gewonnenen Energien erklärt, ist die Tatsache, dass die gemessenen Stereoselektivitäten freie Energiedifferenzen repräsentieren, während in der Simulation die entropischen Anteile der freien Bindungsenergien nicht berücksichtigt wurden. Diese Vernachlässigung der entropischen Anteile bei der Bindung kleiner Lösungsmittel, kann durch die verringerte Zahl der (Rotations-) Freiheitsgrade begründet werden. Die Reduktion der Freiheitsgrade wirkt sich auf die untersuchten nicht-aromatischen Lösungsmittel (DMSO, Aceton, EtOAc, TCM) in ähnlicher Weise aus. Lediglich für das aromatische Dioxan wird so die freie Bindungsenergie leicht überschätzt. In den Simulationen wurden die Energien für Benzaldehyd und das jeweilige Lösungsmittel separat voneinander bestimmt. Die auftretende Konkurrenz im chemischen Gleichgewicht um die Besetzung der S-Tasche kann durch diese Werte also nicht abgeleitet und abgebildet werden. Trotz der vereinfachten Simulation zeigte sich, wie oben beschrieben, eine starke Korrelation zwischen der treibenden Kraft des Lösungsmittels in die S-Tasche und der Verschiebung der Stereoselektivität der *Ap*PDCE469G in Richtung des *R*-Enantiomers der PAC-Synthese. Dies wird in Abbildung 64 graphisch verdeutlicht.

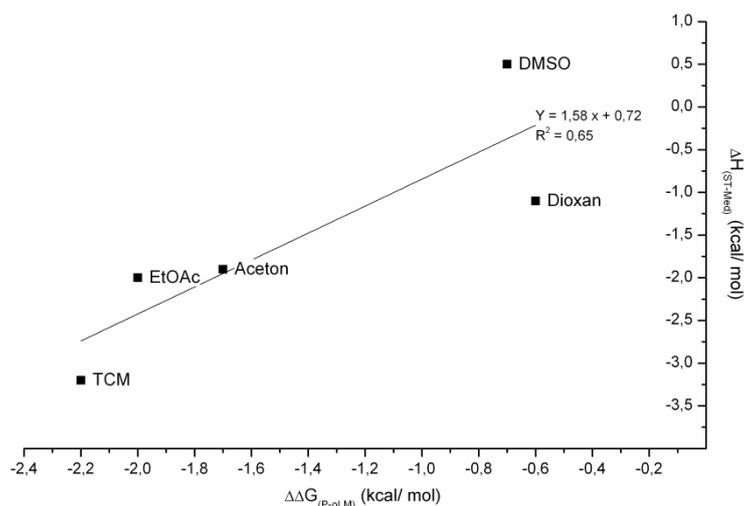


Abbildung 64: Korrelation zwischen den simulierten und experimentell gewonnenen Energiewerten für die ApPDCE469G-katalysierte PAC-Produktion in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel.

Durch die Auftragung der simulierten ($\Delta H_{(ST-Med)}$) gegen die experimentell ($\Delta\Delta G_{(Puffer-olLM)}$) gewonnenen Energiewerte ergab sich ein annähernd linearer Zusammenhang. Die Bindungsenergie, welche die Lösungsmittel dazu bringt die S-Tasche der ApPDCE469G zu besetzen, verringert demnach gleichzeitig die S-Selektivität des Enzyms.

Fazit

Nicht nur die experimentellen Daten und deren Interpretation deuten auf eine Anlagerung der organischen Lösungsmittel in der S-Tasche der ApPDCE469G hin, auch die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse der Simulation organischer Lösungsmittel innerhalb des aktiven Zentrums dieses Enzyms belegen sehr fundiert, dass dieses Konzept zumindest für diese Enzymvariante den Einfluss der organischen Lösungsmittel beschreiben kann.

Organische Lösungsmittel dringen je nach Größe und Polarität in das aktive Zentrum der ApPDCE469G ein und blockieren dort selektiv die S-Tasche des Enzyms. Durch diese Blockade wird die S-selektive Synthese von PAC immer weiter in Richtung des R-Enantiomers verschoben, bis schließlich ein R-Überschuss durch die organischen Lösungsmittel induziert werden kann, da das Substrat im Gleichgewicht immer seltener in der pro-S Konformation binden kann.

6 Zusammenfassende Diskussion

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass sowohl organische Lösungsmittel als auch ionische Flüssigkeiten einen signifikanten Einfluss auf die Chemo- und Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzymen haben. Für einige Einflüsse konnten mechanistische Erklärungen auf molekularer Ebene gefunden werden. Die Hauptergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden zusammengefasst:

Einfluss der Additive auf die Chemoselektivität

Organische Lösungsmittel und ionische Flüssigkeiten verschieben die Chemo-selektivität ThDP-abhängiger Enzyme häufig in Richtung des kleineren 2-Hydroxyketons. Das heißt, die relative Produktverteilung des kleineren Produkts steigt auf Kosten eines größeren 2-Hydroxyketons. Neben dieser Verschiebung der Chemoselektivität zeigte sich, dass selektive Reaktionen, in denen eines der Produkte nahezu exklusiv gebildet wird, seltener durch Kosolventien beeinflusst werden als weniger selektive Reaktionen.

Als Ursache für die Einflüsse der Additive auf die Chemoselektivität kommt eine Veränderung der Enzymflexibilität, eine Verschiebung der Löslichkeiten der Substrate, Intermediate und Produkte sowie eine direkte Interaktion der Additive mit den aktiven Zentren der Enzyme in Frage. Der Einfluss aufgrund einer veränderten Flexibilität ist durch ähnliche Verschiebungen in Reaktionen ohne Lösungsmittelzusatz, aber durch Temperaturerhöhung wahrscheinlich. Allerdings kommen auch veränderte Mikroreaktionskonstanten durch veränderte Löslichkeiten für diese Verschiebung in Betracht. Für die Löslichkeitsstudien bot sich die PfBAL mit ihrem besonderen Reaktionsmechanismus an. Die direkte Interaktion von Additiven konnte eindrucksvoll für die ApPDCE469G gezeigt werden, sowohl für ionische Flüssigkeiten als auch im Besonderen für organische Lösungsmittel.

Einfluss der Additive auf die Stereoselektivität

Neben dem Einfluss auf die Chemoselektivität nehmen organische Lösungsmittel und ionische Flüssigkeiten auch einen deutlichen Einfluss auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme. Es wurden jeweils die Änderungen der Enantiomerenüberschüsse betrachtet sowie die durch die Additive induzierten Energiedifferenzen. Wurde eine Reaktion in Puffer mit einem ee > 99 % stereoselektiv katalysiert, so konnte diese sehr gute Selektivität durch Additive nicht beeinflusst werden.

Unabhängig davon, welches organische Lösungsmittel oder welche ionische Flüssigkeit der Biotransformation zugesetzt wurde, blieb die Reaktion so stereoselektiv wie ohne Zugabe eines der Additive. Für in Puffer weniger selektive Reaktionen wurden demgegenüber vielfach deutliche Beeinflussungen der Stereoselektivitäten beobachtet. Es zeigte sich, dass in Puffer *R*-selektive Synthesen sowohl in Richtung eines *S*-Überschusses, als auch in Richtung einer erhöhten *R*-Selektivität gelenkt werden konnten. Im Fall einer *S*-selektiven Reaktion führten Additive meist zu einer Reduktion dieser *S*-Selektivität. Die induzierten Energiedifferenzen und damit die Beeinflussung eines *ee*-Werts waren signifikanter durch organische Lösungsmittel als durch ionische Flüssigkeiten.

Die unmögliche Verbesserung einer *S*-Selektivität konnte insbesondere für den Einfluss organischer Lösungsmittel experimentell als auch simulationsgestützt erklärt werden. Im Fall der Variante *ApPDCE469G* konnte eine selektive Blockade der *S*-Tasche, durch die verschiedenen organischen Lösungsmittel, als Ursache für eine immer stärkere Verschlechterung der in Puffer beobachteten *S*-Selektivität identifiziert werden. Je nach Größe und Polarität des Lösungsmittels kommt es zu dessen selektiver Anlagerung in der *S*-Tasche des jeweiligen Enzyms. Durch die kompetitive Einlagerung von Substrat und organischem Lösungsmittel in der *S*-Tasche wird die antiparallele Anordnung der Substrate zueinander zunehmend verhindert und deren parallele Anordnung favorisiert, wodurch der Anteil des *R*-Enantiomers steigt. Die meisten Kationen der untersuchten ionischen Flüssigkeiten sind zu groß, um ebenfalls in das aktive Zentrum einzudringen und dort eine selektive Blockade der *S*-Tasche bewirken zu können. Für die ionischen Flüssigkeiten wurde ein Erklärungsmodell entwickelt, dass die Wechselwirkungen der kleinen Anionen mit dem aktiven Zentrum und der *S*-Tasche ThDP-abhängiger Enzyme annimmt. Allerdings muss hier jeweils die Stärke der Ionenpaarbindung berücksichtigt werden, die darüber entscheidet, ob die Ionen einer ionischen Flüssigkeit in Puffer frei vorliegen und getrennt voneinander mit dem Enzym interagieren können. Wenn die Ionenpaarbindung zum jeweiligen Kation sehr hoch ist, gibt es keine treibende Kraft des Anions in die *S*-Tasche. Ist dieses allerdings durch ein schwaches Kation koordiniert, so besteht die Möglichkeit, dass das Anion frei vorliegt und in die *S*-Tasche eindringen kann. Experimentell wurden deutliche Hinweise auf die Korrektheit dieses Modells gesammelt. Computersimulationen bzw.

tiefere experimentelle Untersuchungen müssen dieses Modell im weiteren Verlauf jedoch stützen.

Ein Hauptergebnis dieser Arbeit ist der Beleg der direkten Interaktion der organischen Lösungsmittel mit dem aktiven Zentrum des ThDP-abhängigen Enzyms *ApPDCE469G*. Es gab bereits einige Studien, die eine direkte Interaktion von Lösungsmitteln mit dem aktiven Zentrum von untersuchten Enzymen (meist Lipasen) vorschlugen (Hirose *et al.* 1992; Secundo *et al.* 1992; Carrea *et al.* 1995). Der Haupteffekt organischer Lösungsmittel auf Enzyme soll jedoch die indirekte Interaktion durch Beeinflussung des am Enzym gebundenen Strukturwassers sein (Carrea und Riva 2000). Mit der vorliegenden Untersuchung konnte nun sehr deutlich gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von organischen Lösungsmitteln mit dem aktiven Zentrum eines ThDP-abhängigen Enzyms stattfinden kann und so die Stereoselektivität erheblich beeinflusst wird. Diese These wurde nicht nur durch experimentelle Daten, sondern auch durch Computersimulationen der Gegebenheiten im aktiven Zentrum belegt. Für die ionischen Flüssigkeiten wurde ebenfalls ein Modell entwickelt, welches die Beeinflussung der Stereoselektivität durch Interaktionen im aktiven Zentrum beschreiben kann.

Die durchgeführten Studien zeigen eindrucksvoll den Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten auf die Gruppe der ThDP-abhängigen Enzyme. Sowohl Stereo- und Chemoselektivität als auch die Produktausbeute werden in unterschiedlichem Maße beeinflusst, obwohl sich die Enzyme strukturell (vor allem im aktiven Zentrum) sehr ähnlich sind. Im Falle der beiden Varianten, welche im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Enzym untersucht wurden, liegt der Unterschied nur in einer einzigen Mutation. Es konnte gezeigt werden, dass diese Beeinflussung auf verschiedene, teilweise überlagernde Effekte von direkter Interaktion bis hin zu Einflüssen auf Löslichkeiten und Flexibilität der Enzymstruktur zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Einflüsse für alle Enzyme, wenn auch in sehr unterschiedlicher Ausprägung, gelten. Daher sollte die Auswahl von Löslichkeitsvermittlern überlegt und überprüft werden. Des Weiteren ist der Einsatz von Additiven ein Werkzeug, um Ausbeuten und Selektivitäten durch Veränderungen der Reaktionsparameter zu beeinflussen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit beschreibt die erste umfassende Untersuchung zum Einfluss organischer Lösungsmittel und ionischer Flüssigkeiten auf die Selektivität Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängiger Enzyme. Der Fokus lag auf der Analyse der Chemo- sowie Stereoselektivität in Gegenwart verschiedener Additive unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen. In diesem Rahmen wurden die Einflüsse von 13 organischen Lösungsmitteln und 14 ionischen Flüssigkeiten in verschiedenen Konzentrationen auf sechs verschiedene ThDP-abhängige Enzyme untersucht. Es wurden knapp 900 Biotransformationen durchgeführt, um die gemischte Carboligation von Benzaldehyd und Acetaldehyd zu untersuchen. Vier verschiedene Produkte (Acetoin, PAC, HPP und Benzoin) können theoretisch bei dieser C-C-knüpfenden Reaktion gebildet werden, jedes in beiden enantiomeren Formen. Aus Änderungen der Chemo- und Stereoselektivität konnten Rückschlüsse auf die molekulare Wechselwirkung der organischen Lösungsmittel und ionischen Flüssigkeiten mit den Enzymen gezogen werden.

Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Chemoselektivität

Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse ThDP-abhängiger Enzyme unter Einfluss organischer Lösungsmittel zeigt, dass diese zwei Trends folgen. Je ausgeprägter die Chemoselektivität der Enzyme bereits in Puffer ist, d.h. je exklusiver ein Produkt im Vergleich zu den anderen drei Produkten der Carboligation gebildet wird, desto robuster ist diese Reaktion gegenüber Einflüssen durch organische Lösungsmittel (Abbildung 39B). Darüber hinaus wurde in vielen Fällen eine Verschiebung der Chemoselektivität der Enzyme zum kleineren Produkt beobachtet. Dies geschieht auf Kosten der Synthese des größeren Produkts in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Abbildung 39B). Diese beiden dominanten Tendenzen werden allerdings zum Teil durch weitere, weniger dominante Effekte beeinflusst.

Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität

Die zusammenfassende Betrachtung der Einflüsse organischer Lösungsmittel auf die Stereoselektivität ThDP-abhängiger Enzyme zeigte ebenfalls zwei Trends (IV.4.1): Ein Enzym, welches in Puffer die Bildung eines Produkts mit sehr gutem ee (> 99 %) katalysiert, lässt sich in seiner Stereoselektivität für dieses Produkt durch organische Lösungsmittel nicht beeinflussen (Abbildung 44). Dies liegt vermutlich an der relativ hohen Stabilisierungsenergie der Akzeptoraldehyde unmittelbar vor der Carboligation. Reaktionen mit geringerer Stereoselektivität unterliegen demgegenüber größeren Schwankungen, weil in diesem Fall die Orientierung der Akzeptoraldehyde nicht eindeutig ist. So wurde eine Verschiebung der Selektivität von einer *R*-Selektivität in Puffer hin zu einer *S*-Selektivität genauso beobachtet wie gegenläufige Selektivitätsverschiebungen. Auch eine Verbesserung der in Puffer gemessenen *R*-Selektivität war möglich. Die Verbesserung einer *S*-Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme wurde hingegen durch organische Lösungsmittel nicht beobachtet (Abbildung 44). Als Erklärung hierfür konnte die selektive Blockade einer speziellen Struktur, der sogenannten *S*-Tasche, verantwortlich gemacht werden, die in fünf von sechs untersuchten Enzymen vorhanden ist (IV.4.1). Durch experimentelle sowie computergestützte (IV.5) Untersuchungen zur Stabilisierung organischer Lösungsmittel in der *S*-Tasche der Enzyme wurde gezeigt, dass organische Lösungsmittel in Abhängigkeit ihrer Größe sowie ihrer Polarität in der Lage sind, mit dem Substrat um die Besetzung der *S*-Tasche zu konkurrieren und damit eine *S*-selektive Synthese von 2-Hydroxyketonen zu beeinträchtigen.

Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Chemoselektivität

Der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf ThDP-abhängige Enzyme ist analog zu dem von organischen Lösungsmitteln, jedoch schwächer ausgeprägt. Die Chemoselektivität von sehr selektiven Synthesen wird weniger stark beeinflusst als unselektivere Reaktionen. Zudem scheint in vielen Fällen eine Verschiebung zum kleineren Produkt aufzutreten.

Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität

Auch der Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Stereoselektivität der untersuchten Enzyme entspricht dem der organischen Lösungsmittel. Wie beim Einfluss auf die Chemoselektivität ist die Ausprägung der Effekte nicht so groß wie die durch

organische Lösungsmittel hervorgerufene. Jedoch zeigt sich auch hier, dass eine sehr selektive Synthese nicht durch ionische Flüssigkeiten beeinträchtigt wird (Abbildung 51). Unselektive Synthesen unterliegen durch ionische Flüssigkeiten induzierten Schwankungen. Für die S-selektive Carboligation zeigt sich auch bei Zugabe ionischer Flüssigkeiten keine signifikante Verbesserung. Untersuchungen die Verminderung der S-Selektivität mit einer selektiven Blockade der S-Tasche zu belegen (IV.4.2.2), waren nicht so eindeutig wie im Fall der organischen Lösungsmittel. Ionengröße sowie Interaktion der Ionen mit ihrem Gegenion scheinen bei ionischen Flüssigkeiten eine zentrale Rolle zu spielen. Allerdings zeigt sich der Einfluss dieser Additive komplexer als der von organischen Lösungsmitteln. Diese Tatsache ist wahrscheinlich durch den komplizierteren chemischen Aufbau und weitere, bisher unverstandene Effekte bedingt.

VI. ABSTRACT

This work constitutes the first comprehensive study on the influence of organic solvents and ionic liquids on the selectivity of thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes. The focus of this work was the analysis of chemo- and stereoselectivity in the presence of various additives under comparable experimental conditions. In this context the influence of 13 organic solvents and 14 ionic liquids in various concentrations on six different ThDP-dependent enzymes was examined. Almost 900 biotransformations were performed to analyze the mixed carbonylation of benzaldehyde and acetaldehyde. Here, theoretically four different products (acetoin, PAC, HPP and benzoin) are formed, each in both enantiomeric forms. From changes in the chemo- and stereoselectivity conclusions can be drawn concerning the molecular interaction of organic solvents and ionic liquids. The results are summarized below:

Influence of organic solvents on the chemoselectivity

The analysis of the results shows, that the influence of organic solvents on ThDP-dependent enzymes follows two general trends. The more pronounced the chemoselectivity of an enzyme in buffer, meaning the more exclusively a product is formed in comparison to the other three possible products of the carbonylation, the more robust this reaction is against influences due to organic solvent addition (Figure 39B). Moreover, in many cases a shift in the chemoselectivity of the enzymes was observed in the direction of the smaller product. This happens at the expense of the synthesis of the larger product in the presence of organic solvents (Figure 39B). However, these two major trends are influenced by other, less dominant effects.

Influence of organic solvents on the stereoselectivity

The overall consideration of the effects of organic solvents on the stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes also followed two trends (IV.4.1): An enzyme that catalyzes the formation of a product with excellent ee (> 99 %) in buffer cannot be influenced concerning its stereoselectivity for this product by organic cosolvents (Figure 44). This is probably due to the relatively high energy of stabilization of the acceptor aldehyde directly before carbonylation. Reactions with lower

stereoselectivity are underlying comparatively large changes because in this case the orientation of the acceptor aldehyde is not decisive. Selectivity shifts of an initial *R*-selectivity in buffer towards *S*-selectivity were observed as well as shifts in the opposite direction. Also, an improvement of initial *R*-selectivity in buffer was possible by some solvents. However, an improvement of an *S*-selectivity could not be observed (Figure 44). This observation could be explained by a selective blockade of the so-called *S*-pocket, a structural element, which is present in five of the six enzymes (IV.4.1). By experimental and computational (IV.5) investigations, a direct interaction of the organic solvent molecules with the *S*-pocket was demonstrated, depending on the size and polarity of the solvent.

Influence of ionic liquids on the chemoselectivity

The influence of ionic liquids on ThDP-dependent enzymes corresponds to the influence of organic solvents. The effects observed in the presence of ionic liquids, were similar but less pronounced compared to effects of organic solvents. A comparable trend is that the chemoselectivity of highly selective biotransformation is less affected than the selectivity of nonselective biotransformations. Moreover, in many cases a shift to the smaller product occurs.

Influence of ionic liquids on the stereoselectivity

Also the influence of ionic liquids on the stereoselectivity of the studied enzymes corresponds to the influence observed with organic cosolvents, but are again less pronounced. A very selective synthesis is not influenced by ionic liquids (Figure 51). Less selective syntheses underlie fluctuations induced by ionic liquids. For the *S*-selective carbonylation, there is also no significant improvement due to the addition of ionic liquids. Studies, explaining the decrease of the *S*-selectivity with a selective blockade of the *S*-pocket (IV.4.2.2), were not as clear as in case of organic solvents. Ion size, as well as the interaction with the counter ion appears to play a crucial role. However, the influence of ionic liquids seems to be more sophisticated than the influence of organic solvents. This fact is probably due to their complex chemical structure and currently unknown effects.

VII. ANHANG

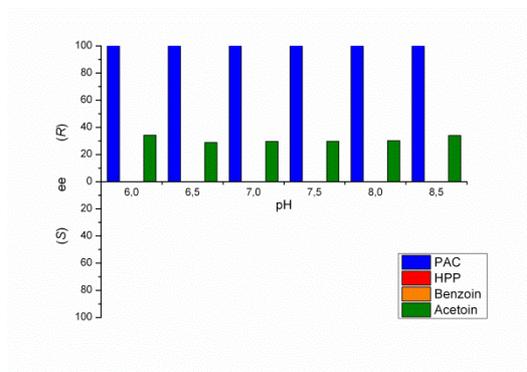
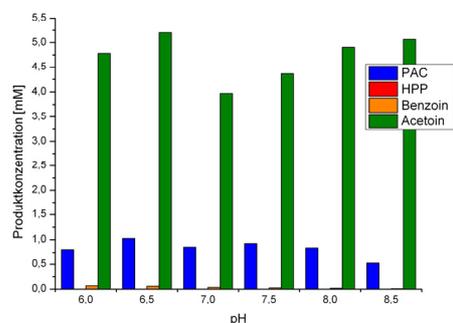


Abbildung 65: pH-Abhängigkeit der Carboligierung der ApPDC. Reaktionsbedingungen: 18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd, 20 °C, ca. 24 h, 0,1 mg/mL ApPDC, TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,0 – 8,5).

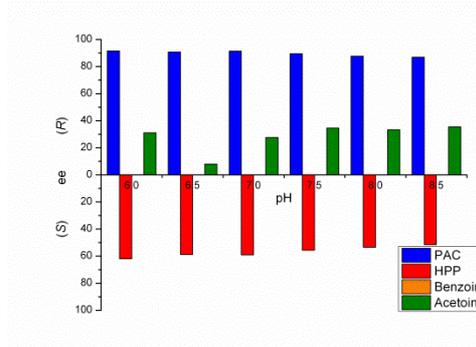
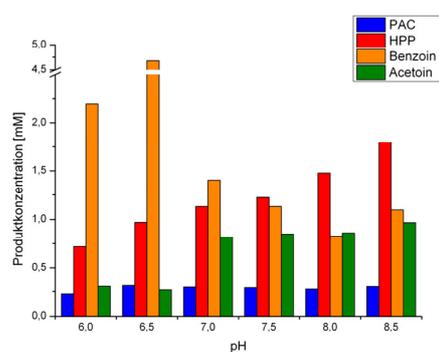


Abbildung 66: pH-Abhängigkeit der Carboligierung der PpBFDH281A. Reaktionsbedingungen: 18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd, 20 °C, ca. 24 h, 0,1 mg/mL PpBFDH281A, TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,0 – 8,5).

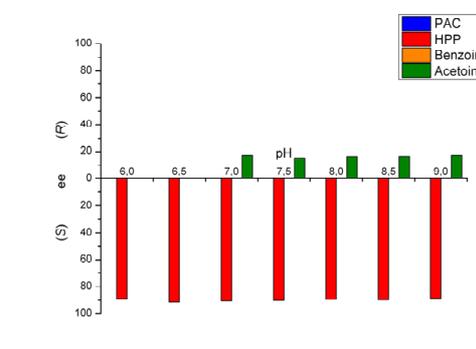
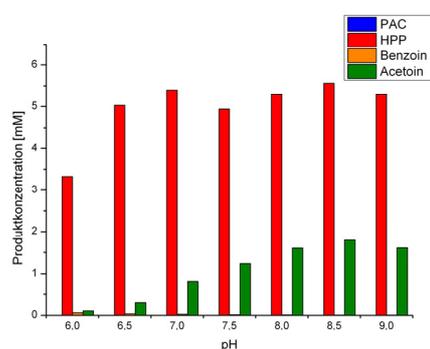


Abbildung 67: pH-Abhängigkeit der Carboligierung der PpBFD. Reaktionsbedingungen: 18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd, 20 °C, ca. 24 h, 0,1 mg/mL PpBFD, TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP, pH 6,0 – 9,0).

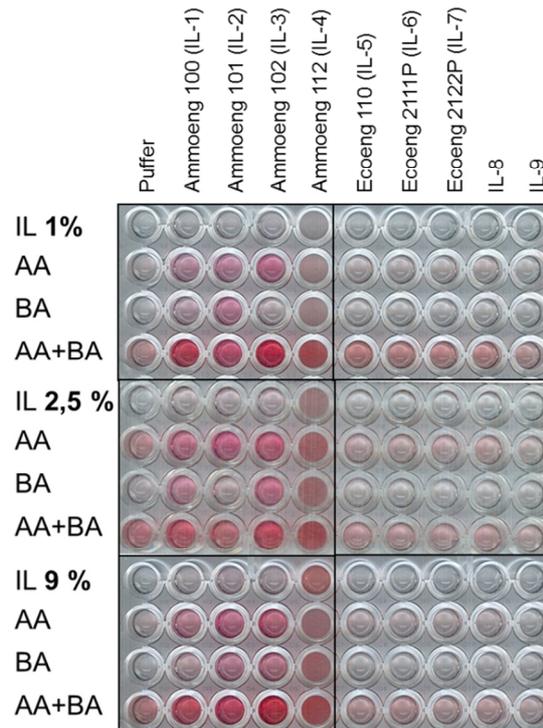


Abbildung 71: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Carboligation der *L/KdcA* mittels TTC-Test. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 20 h, Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd, 180 mM Acetaldehyd. Konzentration der ILs: 1 % (w/v) (oben), 2,5 % (w/v) (mitte) und 9 % (w/v) (unten) (Ammoeng 140 wurde nach dem TTC-Test nicht mehr eingesetzt, weil durch den Hersteller keine neue Lieferung möglich war).

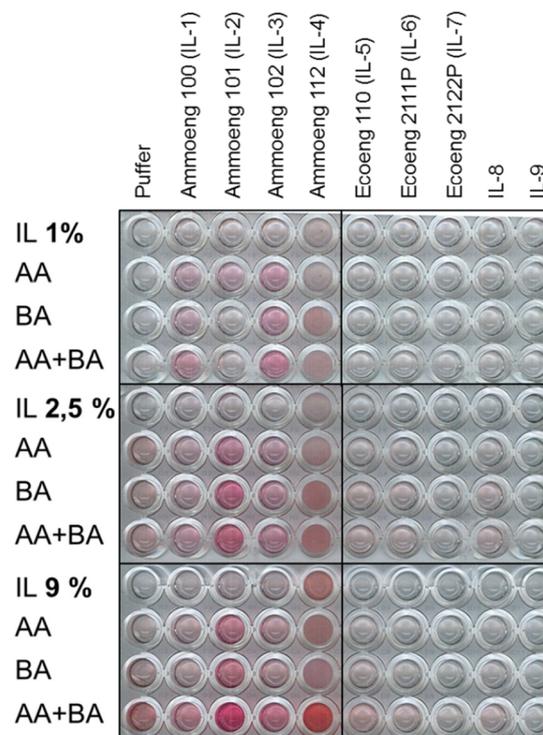


Abbildung 72: Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf die Carboligation der *ApPDCE469G* mittels TTC-Test. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 20 h, Substratkonzentration: 18 mM Benzaldehyd, 18 mM Acetaldehyd. Konzentration der ILs: 1 % (w/v) (oben), 2,5 % (w/v) (mitte) und 9 % (w/v) (unten) (Ammoeng 140 wurde nach dem TTC-Test nicht mehr eingesetzt, weil durch den Hersteller keine neue Lieferung möglich war).

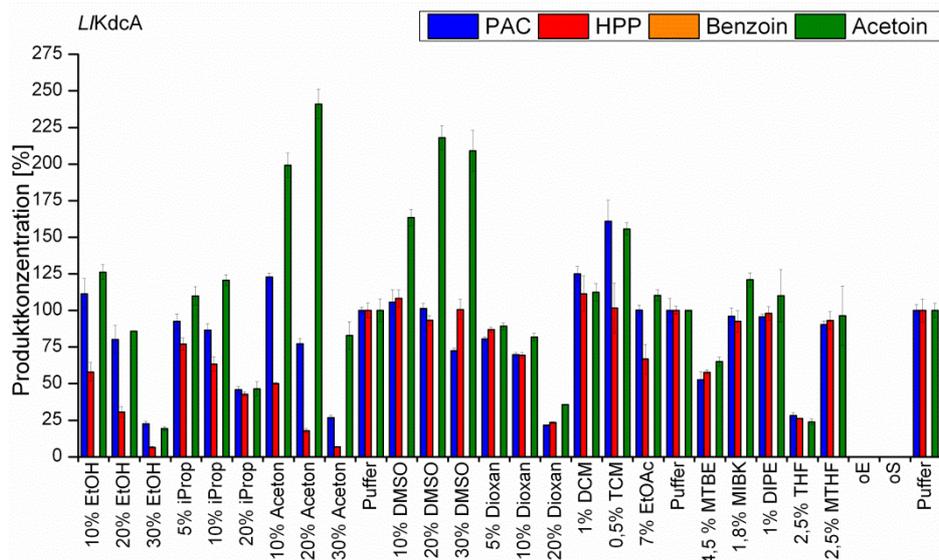


Abbildung 73: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der L/KdcA in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h 0,1 mg/mL L/KdcA, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

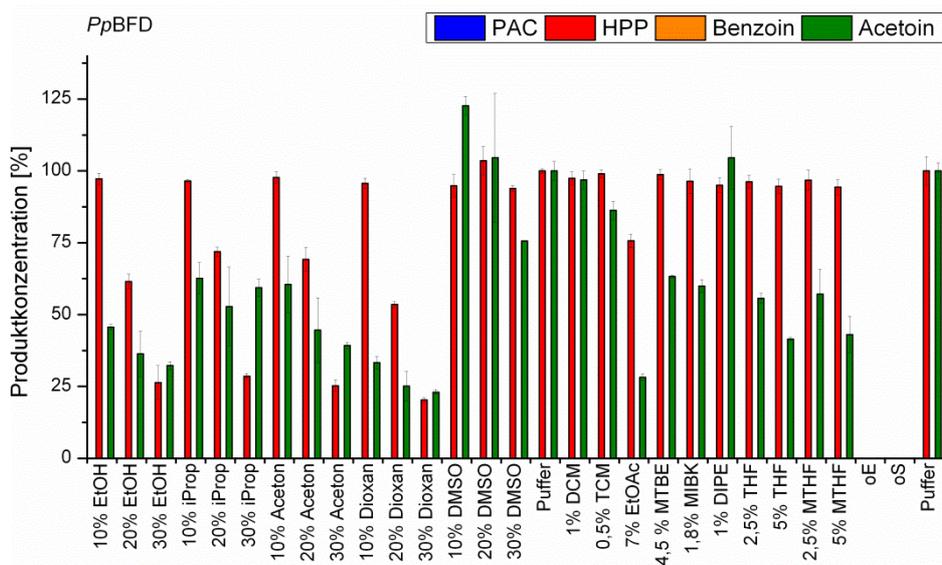


Abbildung 74: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der PpBFD in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h, 0,1 mg/mL PpBFD; Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

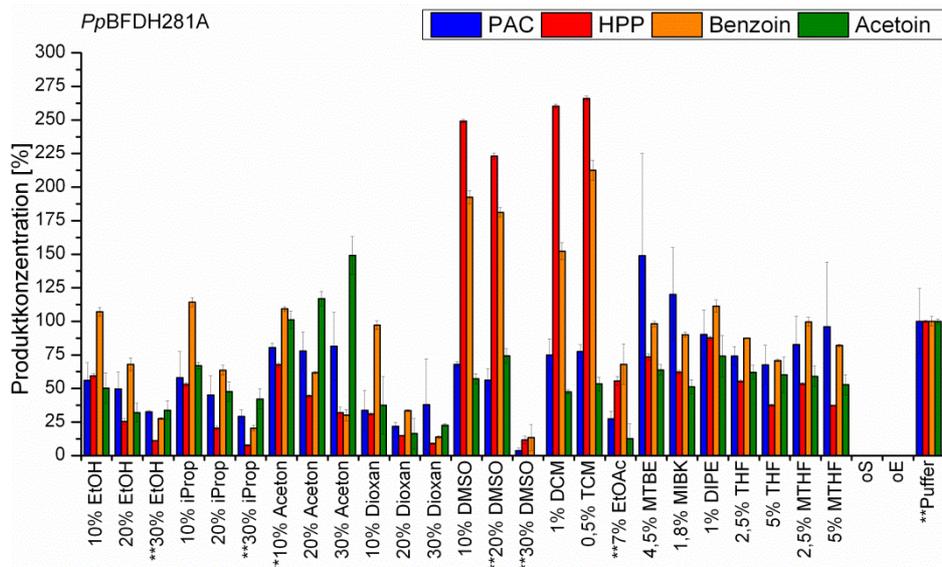


Abbildung 75: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der PpBFDH281A durch Anwesenheit organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL PpBFDH281A, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

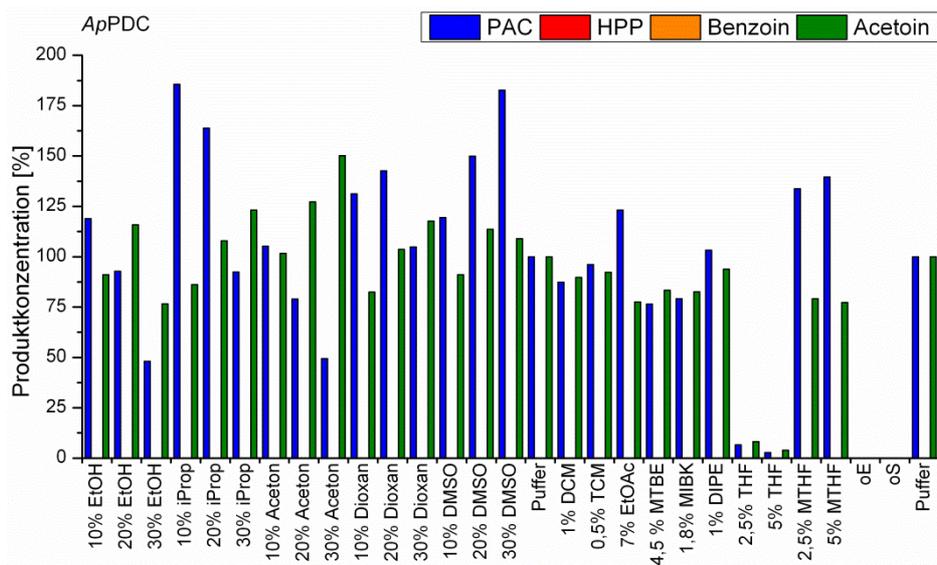


Abbildung 76: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der ApPDC in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL ApPDC, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, die Werte geben Einzelbestimmungen wieder.

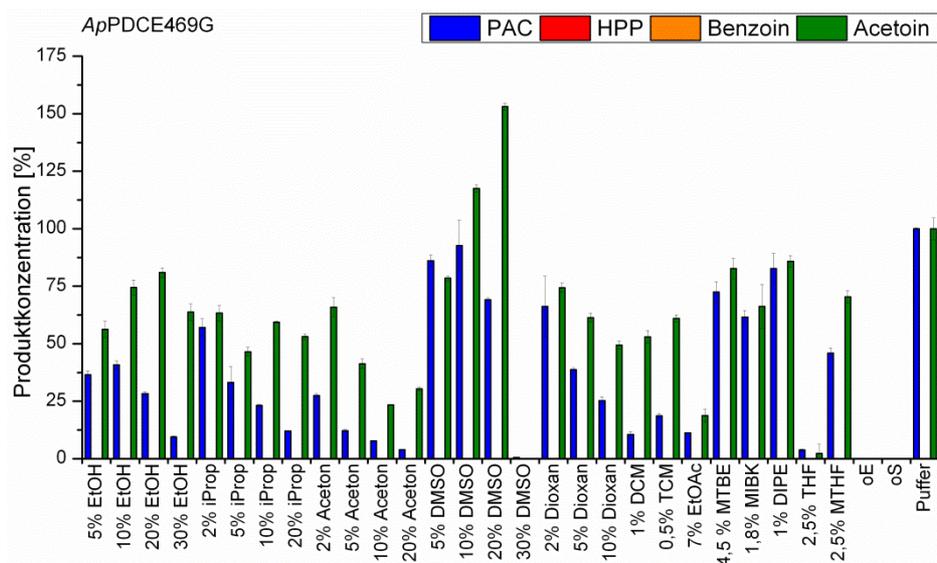


Abbildung 77: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der ApPDCE469G in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL ApPDCE469G, wenn nicht genug Umsatz 0,4 mg/mL ApPDCE469G, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

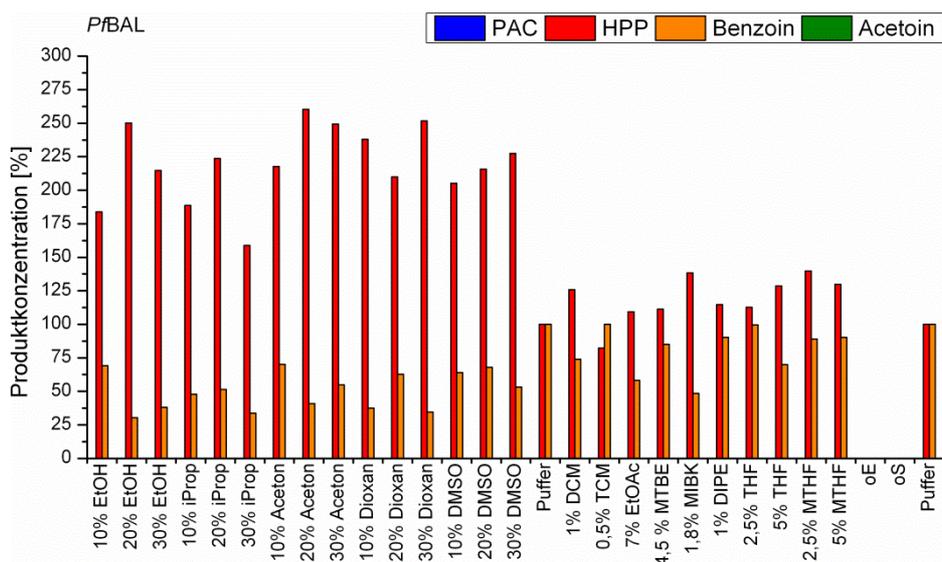


Abbildung 78: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der PfBAL in Gegenwart organischer Lösungsmittel. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h; 0,02 mg/mL PfBAL, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd, Einzelbestimmungen.

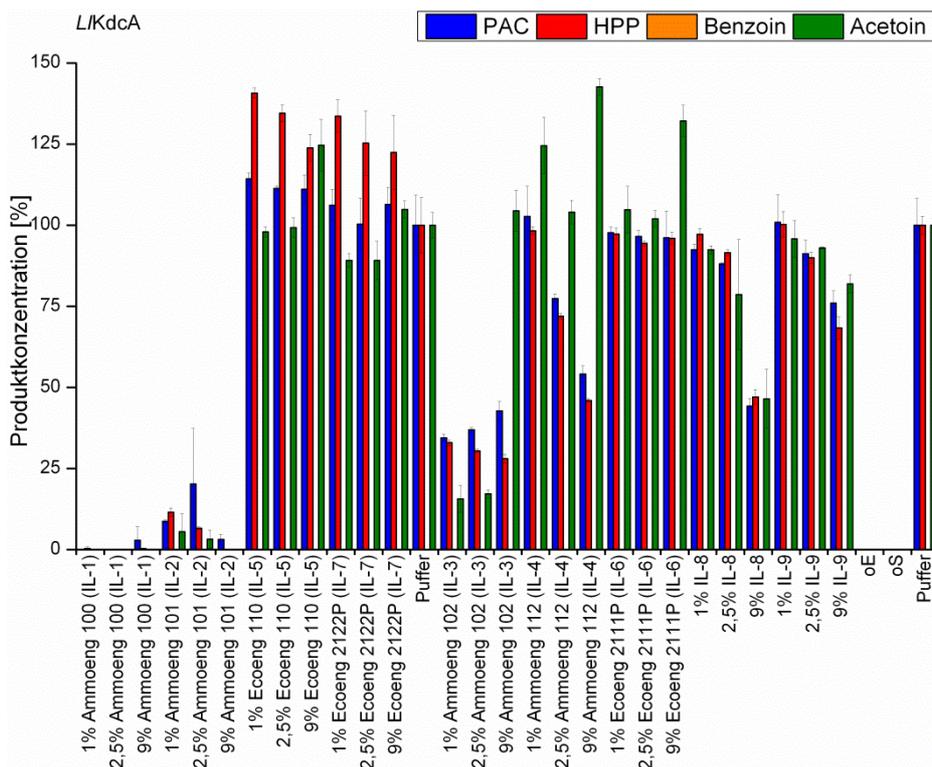


Abbildung 79: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der *L/KdcA* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL *L/KdcA*, wenn Umsatz zu gering 0,4 mg/mL *L/KdcA*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

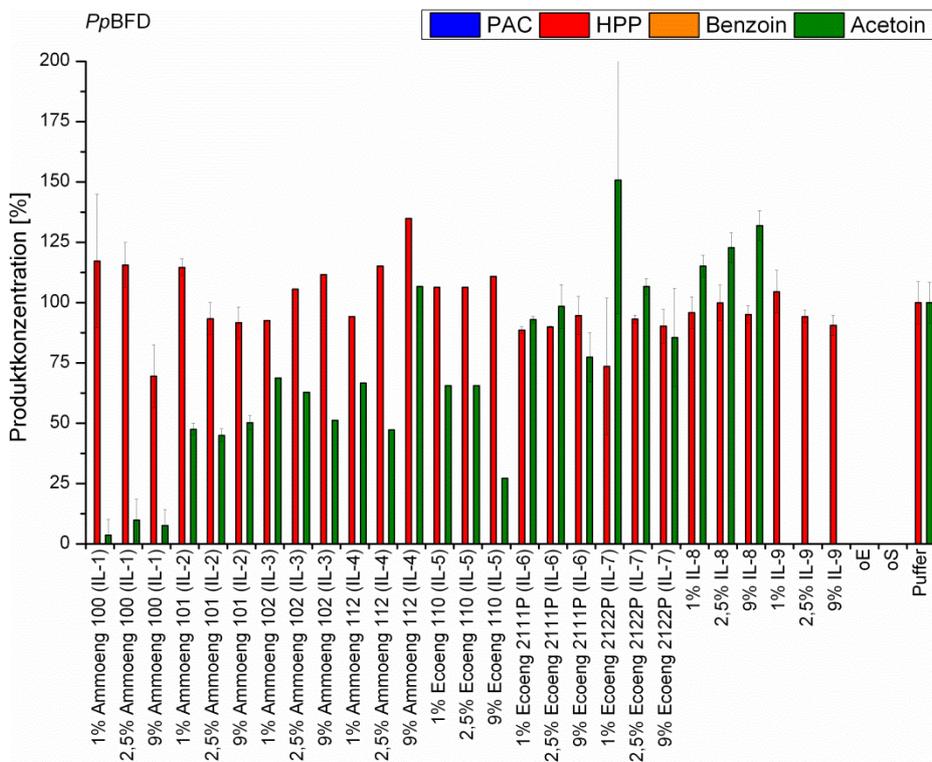


Abbildung 80: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der *PpBFD* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL *PpBFD*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

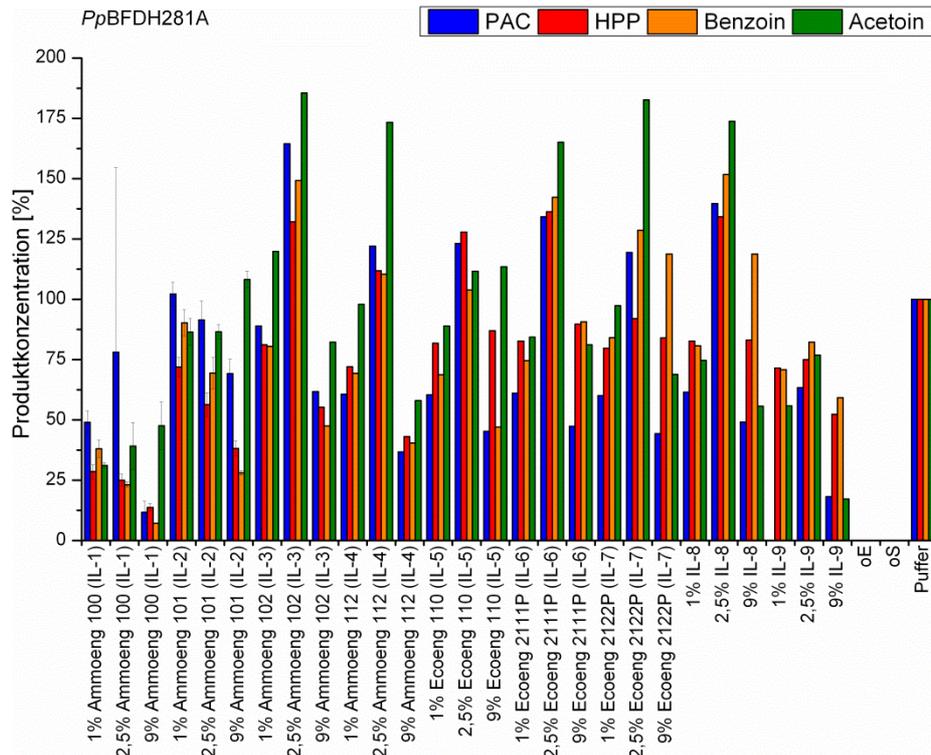


Abbildung 81: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der *PpBFDH281A* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL *PpBFDH281A*, Substratkonzentration: 180 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 101 (IL-2)/102 (IL-3)), im Fall der anderen ILs sind Einfachbestimmungen durchgeführt worden.

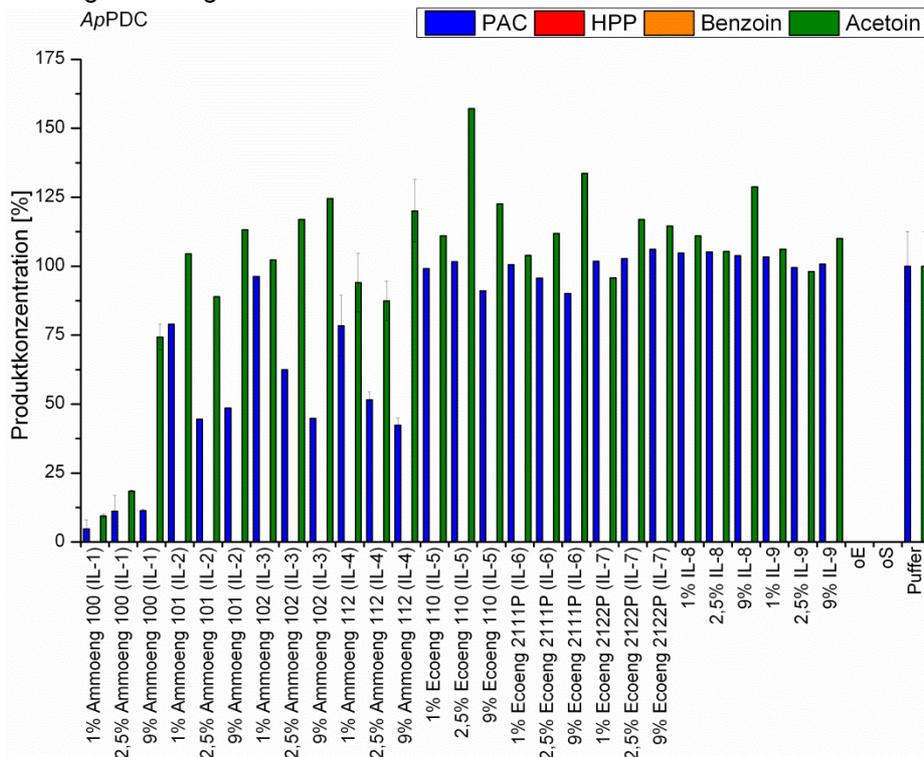


Abbildung 82: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der *ApPDC* in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL *ApPDC*, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben teilweise den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an (Ammoeng 100 (IL-1)/112 (IL-4)/Puffer), im Fall der anderen ILs sind Einfachbestimmungen durchgeführt worden.

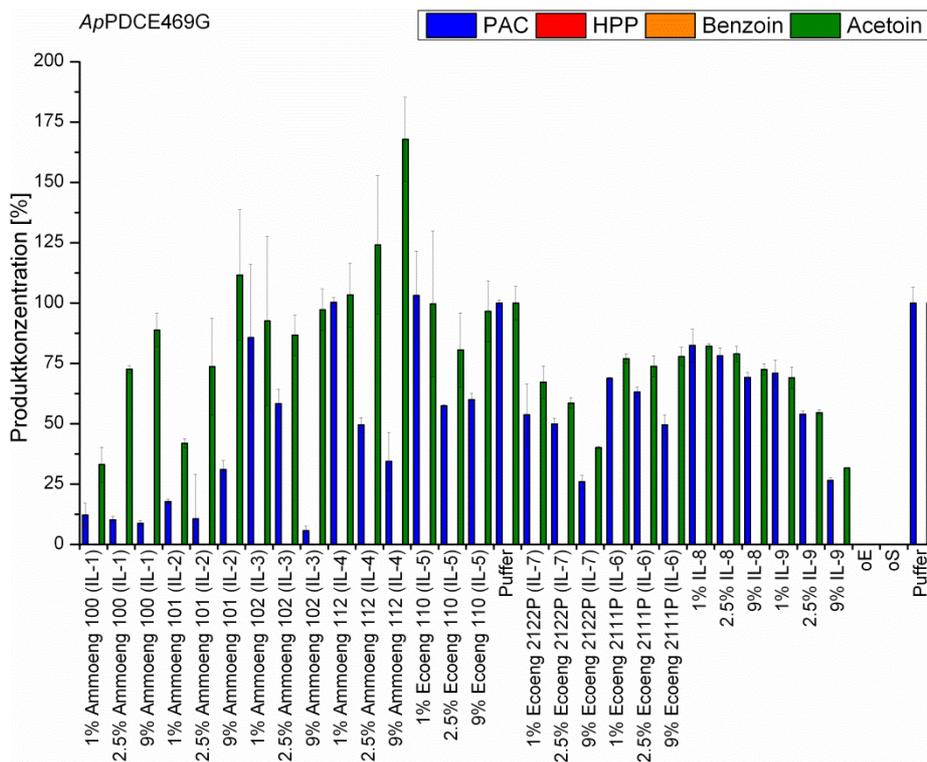


Abbildung 83: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der ApPDCE469G in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 7,5, 20 °C, 24 h; 0,1 mg/mL ApPDCE469G, wenn nicht genug Umsatz 0,4 mg/mL ApPDCE469G, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

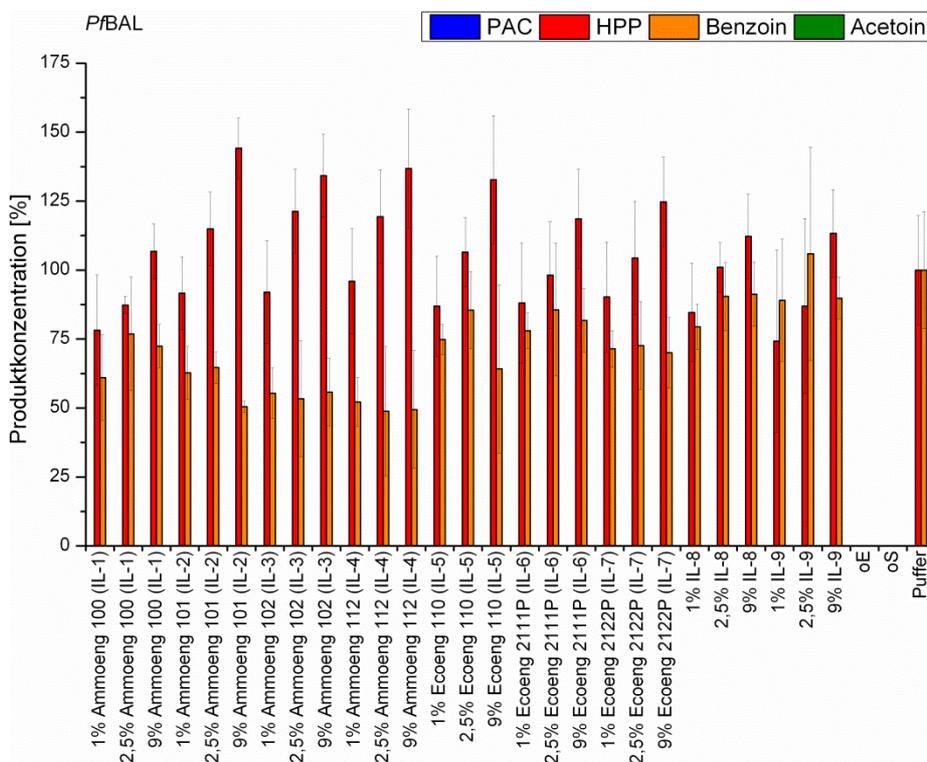


Abbildung 84: Produktkonzentration (% bezogen auf Konzentration des Produkts im Puffer) der PfBAL in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten. Reaktionsbedingungen: TEA-Puffer (50 mM, 2,5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP), pH 8,0, 20 °C, 24 h; 0,02 mg/mL PfBAL, Substratkonzentration: 18 mM Acetaldehyd, 18 mM Benzaldehyd. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen an.

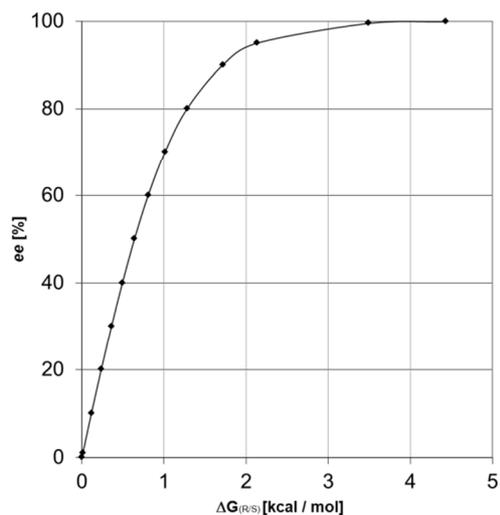


Abbildung 85: Zusammenhang zwischen dem Enantiomerenüberschuss (ee) und $\Delta G_{(R/S)}$.

Tabelle 18: Verwendete organische Lösungsmittel und deren Konzentrationen in vol% und mol/L.

Name	Konzentration % (v/v)	Konzentration mol/L
EtOH	5	1,37
	10	2,75
	20	5,50
	30	8,24
DCM	1	0,09
Aceton	2	0,44
	5	1,09
	10	2,18
	20	4,36
	30	6,54
TCM	0.5	0,03
DMSO	5	0,58
	10	1,16
	20	2,33
	30	3,49
<i>i</i> Prop	5	1,07
	10	2,13
	20	4,27
	30	6,40
THF	2,5	0,39
	5	0,78
Dioxan	5	0,55
	10	1,10
	20	2,20
	30	3,31
EtOAc	7	0,89
MTHF	2,5	0,34
	5	0,68
MTBE	4,5	0,69
MIBK	1,8	0,22
DIPE	1	0,14

Tabelle 19: Verwendete Ammoeng-ILs und Natriumsalze sowie deren Konzentration in % (w/v) und mol/L.

Name	Konzentration % (w/v)	Konzentration mol/L	Anmerkung
Ammoeng 100 (IL-1)	9	0,1	
	2,5	0,03	
	1	0,01	
Ammoeng 101 (IL-2)	9	0,07	
	2,5	0,02	
	1	0,007	
Ammoeng 102 (IL-3)	9	0,05	
	2,5	0,01	
	1	0,005	
Ammoeng 112 (IL-4)	9	0,03	
	2,5	0,008	
	1	0,003	
Natriumchlorid	4,5	0,77	
	1,25	0,21	
	0,5	0,09	≈ 9 % (w/v) Ammoeng 101 (IL-2)
	0,125	0,02	= 2,5 % (w/v) Ammoeng 101 (IL-2)
	0,05	0,009	≈ 1 % (w/v) Ammoeng 101 (IL-2)
Natriummethylsulfat	4,5	0,33	
	1,25	0,09	
	0,5	0,04	≈ 2,5 % (w/v) Ammoeng 100 (IL-1)
	0,125	0,009	≈ 1 % (w/v) Ammoeng 100 (IL-1)
	0,05	0,004	
Na-Dihydrogenphosphat	4,5	0,38	
	1,25	0,1	
	0,5	0,04	≈ 9 % (w/v) Ammoeng 112 (IL-4)
	0,125	0,01	≈ 2,5 % (w/v) Ammoeng 112 (IL-4)
	0,05	0,004	≈ 1 % (w/v) Ammoeng 112 (IL-4)
Natriumethylsulfat	4,5	0,3	
	1,25	0,08	≈ 9 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3)
	0,5	0,03	≈ 2,5 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3)
	0,125	0,008	≈ 1 % (w/v) Ammoeng 102 (IL-3)
	0,05	0,003	
Ammoniumsulfat	4,5	0,34	Dieses Salz sollte stellvertretend für die Kationen der Ammoeng-ILs eingesetzt werden und wurde aus dem Grund in den gleichen Konzentrationen eingesetzt, wie die anderen Natriumsalze.
	1,25	0,09	
	0,5	0,04	
	0,125	0,009	
	0,05	0,004	

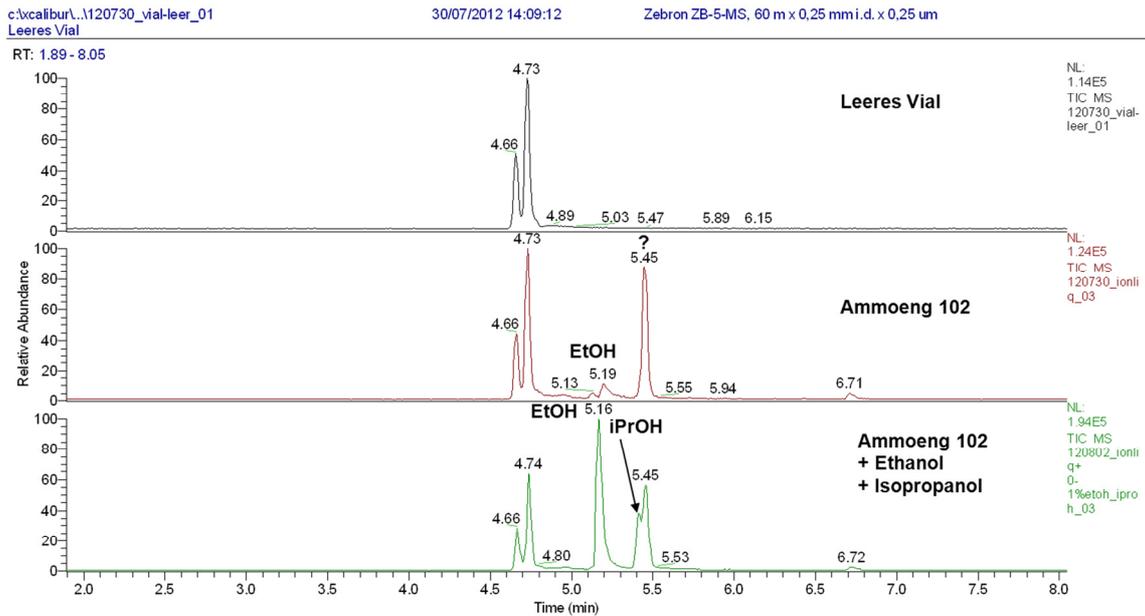
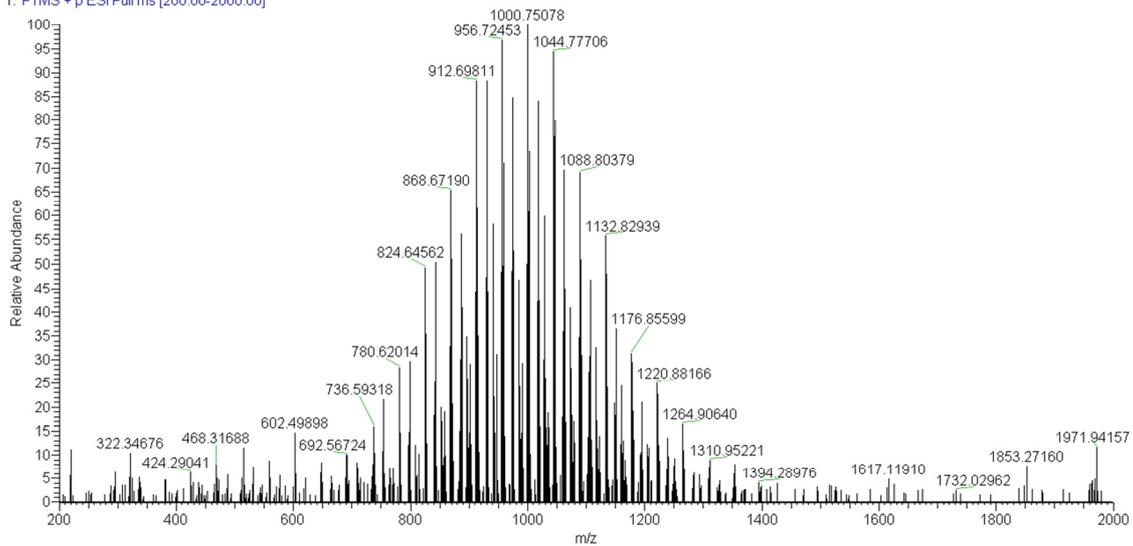


Abbildung 86: Headspace-GC-MS Messung der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3). Im oberen Chromatogramm sind die Signale des leeren Probengefäßes gezeigt. Bei Messung der ionischen Flüssigkeit (mittleres Chromatogramm) zeigten sich zwei zusätzliche Signale bei 5,19 min und 5,45 min. Durch zusätzliche Injektion der Lösungsmittel Ethanol und Isopropanol (unteres Chromatogramm) kann Ethanol als Verunreinigung zugeordnet werden. Die Identität der zweiten Komponente kann nicht geklärt werden. Geschätzte Mengen: EtOH: 0,02 % (w/v) und unbekannte Substanz: 0,06 % (w/v). Diese Messung wurde durchgeführt durch die Zentralabteilung für chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich GmbH.

120808_Ammoeng102_FTMS_TL250_06

08/08/2012 12:05:20

120808_Ammoeng102_FTMS_TL250_06 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.31E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

120808_Ammoeng102_FTMS_TL250_06

08/08/2012 12:05:20

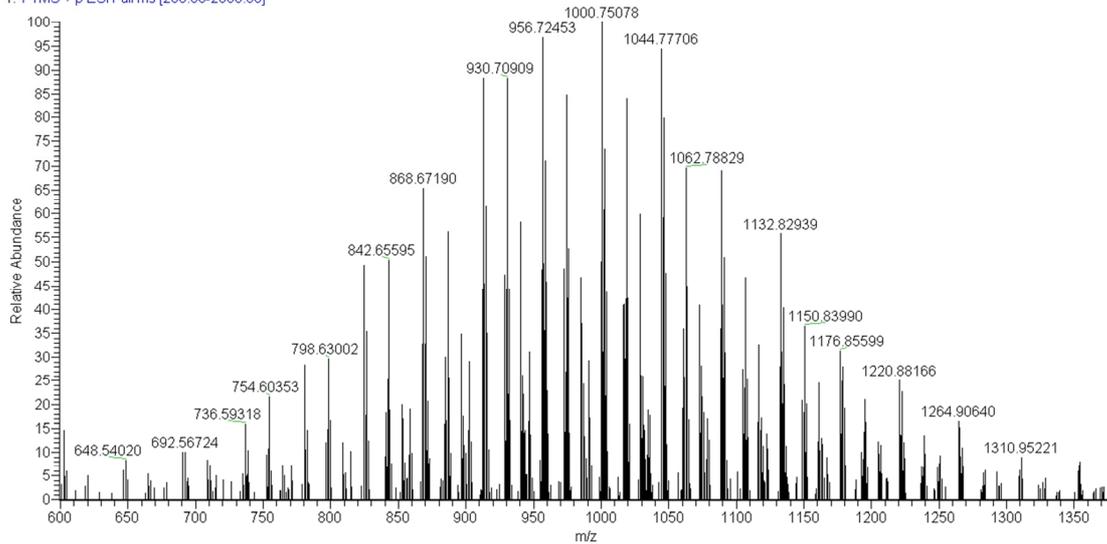
120808_Ammoeng102_FTMS_TL250_06 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.31E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]

Abbildung 87: FIA-FTICR-MS-Messung der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 (IL-3). Oben sind die Signale im Massenbereich 200 - 2000 m/z dargestellt, unten im Bereich 600 - 1400 m/z. Es zeigen sich mehrere homologe Reihen vom Typus Ammoeng 102 (IL-3), Hinweise auf Polyglykole gibt es nicht. Diese Messung wurde durchgeführt durch die Zentralabteilung für chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich GmbH.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alvarez, M. E.; Rosa, A. L.; Temporini, E. D.; Wolstenholme, A.; Panzetta, G.; Patrito, L. und Maccioni, H. J. F. (1993).** "The 59-kDa Polypeptide Constituent of 8-10-nm Cytoplasmic Filaments in *Neurospora crassa* Is a Pyruvate Decarboxylase." *Gene* 130(2) 253-258.
- Amarita, F.; Fernandez-Espla, D.; Requena, T. und Pelaez, C. (2001).** "Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*." *FEMS Microbiol Lett* 204(1) 189-195.
- Andersson, R. E. (1980).** "Microbial Lipolysis at Low-Temperatures." *Appl Environ Microb* 39(1) 36-40.
- Ansorge-Schumacher, M. B.; Greiner, L.; Schroeper, F.; Mirtschin, S. und Hischer, T. (2006).** "Operational concept for the improved synthesis of (*R*)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase." *J Biotechnol* 564-568.
- Arjunan, P.; Umland, T.; Dyda, F.; Swaminathan, S.; Furey, W.; Sax, M.; Farrenkopf, B.; Gao, Y.; Zhang, D. und Jordan, F. (1996).** "Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 angstrom resolution." *J Mol Biol* 256(3) 590-600.
- Aycock, D. F. (2006).** "Solvent Applications of 2-Methyltetrahydrofuran in Organometallic and Biphasic Reactions." *Org Process Res Dev* 11(1) 156-159.
- Barrowman, M. M. und Fewson, C. A. (1985).** "Phenylglyoxylate Decarboxylase and Phenylpyruvate Decarboxylase from *Acinetobacter calcoaceticus*." *Curr Microbiol* 12(4) 235-239.
- Barrowman, M. M.; Harnett, W.; Scott, A. J.; Fewson, C. A. und Kusel, J. R. (1986).** "Immunological Comparison of Microbial TPP-Dependent Nonoxidative Alpha-Keto Acid Decarboxylases." *FEMS Microbiol Lett* 34(1) 57-60.
- Belyaeva, E. A.; Gra, D. V. und Ereemeev, N. L. (2002).** "On the mechanism of interaction of organic solvents with the active site of alpha-chymotrypsin." *Biochemistry (Moscow)* 67(9) 1032-1036.
- Berthold, C. L.; Gocke, D.; Wood, D.; Leeper, F. J.; Pohl, M. und Schneider, G. (2007).** "Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carbonylation reaction." *Acta Crystallogr D* 63 1217-1224.
- Bica, K. und Gaertner, P. (2008).** "Applications of chiral ionic liquids." *Eur J Org Chem*(19) 3235-3250.
- Boersma, Y. L.; Dröge, M. J. und Quax, W. J. (2007).** "Selection strategies for improved biocatalysts." *FEBS J* 274(9) 2181-2195.
- Bornemann, S.; Crout, D. H. G.; Dalton, H.; Hutchinson, D. W.; Dean, G.; Thomson, N. und Turner, M. M. (1993).** "Stereochemistry of the Formation of Lactaldehyde and Acetoin Produced by the Pyruvate Decarboxylases of Yeast (*Saccharomyces Sp*) and *Zymomonas mobilis* - Different Boltzmann Distributions between Bound Forms of the Electrophile, Acetaldehyde, in the 2 Enzymatic Reactions." *J Chem Soc Perk T* 1(3) 309-311.

- Bornemann, S.; Crout, D. H. G.; Dalton, H.; Kren, V.; Lobell, M.; Dean, G.; Thomson, N. und Turner, M. M. (1996).** "Stereospecific formation of *R*-aromatic acylolins by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase." *J Chem Soc Perk T* 1(5) 425-430.
- Bornscheuer, U. T.; Herar, A.; Kreye, L.; Wendel, V.; Capewell, A.; Meyer, H. H.; Scheper, T. und Kolisis, F. N. (1993).** "Factors Affecting the Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions of 3-Hydroxy Esters in Organic Solvents." *Tetrahedron-Asymmetr* 4(5) 1007-1016.
- Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C. und Robins, K. (2012).** "Engineering the third wave of biocatalysis." *Nature* 485(7397) 185-194.
- Bradford, M. M. und Williams, W. L. (1976).** "New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination." *Fed Proc* 35(3) 274-274.
- Breuer, M.; Pohl, M.; Hauer, B. und Lingen, B. (2002).** "High-throughput assay of (*R*)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase." *Anal Bioanal Chem* 374(6) 1069-1073.
- Breuer, M. und Stürmer, R. (2006).** "Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren." *Chemie in unserer Zeit* 40(2) 104-111.
- Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1988).** "Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Sacharomyces carlsbergensis*." *Biocatalysis* 1 321-331.
- Bringer-Meyer, S.; Schimz, K. L. und Sahm, H. (1986).** "Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - Isolation and Partial Characterization." *Arch Microbiol* 146(2) 105-110.
- Broos, J.; Visser, A. J. W. G.; Engbersen, J. F. J.; Verboom, W.; vanHoek, A. und Reinhoudt, D. N. (1995).** "Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility." *J Am Chem Soc* 117(51) 12657-12663.
- Brosi, H. (2006).** "Klonierung und Charakterisierung neuer Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme", Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Bruhn, H.; Pohl, M.; Grotzinger, J. und Kula, M. R. (1995).** "The Replacement of Trp392 by Alanine Influences the Decarboxylase/Carboligase Activity and Stability of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*." *Eur J Biochem* 234(2) 650-655.
- Buchner, E. (1897).** "Alkoholische Gärung ohne Hefezellen." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 30(1) 1110-1113.
- Cantone, S.; Hanefeld, U. und Basso, A. (2007).** "Biocatalysis in non-conventional media - ionic liquids, supercritical fluids and the gas." *Green Chem* 9(9) 954-971.
- Carrea, G.; Ottolina, G. und Riva, S. (1995).** "Role of Solvents in the Control of Enzyme Selectivity in Organic Media." *Trends Biotechnol* 13(2) 63-70.
- Carrea, G. und Riva, S. (2000).** "Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents." *Angew Chem Int Edit* 39(13) 2226-2254.
- Castro, G. R. und Knubovets, T. (2003).** "Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures." *Crit Rev Biotechnol* 23(3) 195-231.
- Chang, C. S. und Hsu, C. S. (2005).** "Enhancement of enantioselectivity and reaction rate on the synthesis of (*S*)-ketoprofen hydroxyalkyl ester in organic solvents via isopropanol-dried immobilized lipase." *J Chem Technol Biot* 80(5) 537-544.

- Chen, C. Q.;Feng, X. H.;Zhang, G. Z.;Zhao, Q. und Huang, G. S. (2008).** "An Efficient Method for the Synthesis of alpha-Hydroxyalkyl Aryl Ketones." *Synthesis*(20) 3205-3208.
- Ciuffreda, P.;Alessandrini, L.;Terraneo, G. und Santaniello, E. (2003).** "Lipase-catalyzed selective benzylation of 1,2-diols with vinyl benzoate in organic solvents." *Tetrahedron-Asymmetr* 14(20) 3197-3201.
- Clouthier, C. M. und Pelletier, J. N. (2012).** "Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis." *Chem Soc Rev* 41(4) 1585-1605.
- Cull, S. G.;Holbrey, J. D.;Vargas-Mora, V.;Seddon, K. R. und Lye, G. J. (2000).** "Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations." *Biotechnol Bioeng* 69(2) 227-233.
- Demir, A. S.;Dünnwald, T.;Iding, H.;Pohl, M. und Müller, M. (1999).** "Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase." *Tetrahedron-Asymmetr* 10(24) 4769-4774.
- Demir, A. S.;Pohl, M.;Janzen, E. und Müller, M. (2001).** "Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage." *J Chem Soc Perk T* 1(7) 633-635.
- Demir, A. S.;Sesenoglu, O.;Dünnwald, P. und Müller, M. (2003).** "Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde." *Org Lett* 5(12) 2047-2050.
- Demir, A. S.;Sesenoglu, O.;Eren, E.;Hosrik, B.;Pohl, M.;Janzen, E.;Kolter, D.;Feldmann, R.;Dünnwald, P. und Müller, M. (2002).** "Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction." *Adv Synth Catal* 344(1) 96-103.
- Dimoula, K. (2009).** "Thermodynamic and Kinetic Phenomena in the Enzymatic Conversion of Acetophenone to 1-(R)-Phenylethanol in a Continuous Gas/Solid Reactor", Doktorarbeit, Rheinisch westfälische technische Hochschule (RWTH), Aachen.
- Dobritzsch, D.;König, S.;Schneider, G. und Lu, G. (1998).** "High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases." *J Biol Chem* 273(32) 20196-20204.
- Dominguez de Maria, P. (2008b).** "'Nonsolvent' Applications of Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis." *Angew Chem Int Ed*(47) 6960-6968.
- Dominguez de Maria, P., Ed. (2012).** "Ionic liquids in biotransformations and organocatalysis", Wiley-VCH.
- Dominguez de Maria, P.;Kossmann, B.;Potgrave, N.;Buchholz, S.;Trauthwein, H.;May, O. und Gröger, H. (2005).** "Improved process for the enantioselective hydrolysis of prochiral diethyl malonates catalyzed by pig liver esterase." *Synlett*(11) 1746-1748.
- Dominguez de Maria, P. und Maugeri, Z. (2011).** "Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents." *Curr Opin Chem Biol* 15(2) 220-225.
- Dominguez de Maria, P.;Pohl, M.;Gocke, D.;Gröger, H.;Trauthwein, H.;Stillger, T.;Walter, L. und Müller, M. (2007).** "Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes." *Eur J Org Chem*(18) 2940-2944.
- Dominguez de Maria, P.;Stillger, T.;Pohl, M.;Kiesel, M.;Liese, A.;Gröger, H. und Trauthwein, H. (2008a).** "Enantioselective C-C bond ligation using recombinant *Escherichia coli*-whole-cell biocatalysts." *Adv Synth Catal* 350(1) 165-173.

- Dominguez de Maria, P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Gröger, H.; Trauthwein, H. und Liese, A. (2006).** "Preparative enantioselective synthesis of benzoin and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase." *J Mol Catal B-Enzym* 38(1) 43-47.
- Dreyer, S. und Kragl, U. (2008).** "Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes." *Biotechnol Bioeng* 99(6) 1416-1424.
- Duggleby, R. G. (2006).** "Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes." *Acc Chem Res* 39(8) 550-557.
- Dünkelmann, P.; Kolter-Jung, D.; Nitsche, A.; Demir, A. S.; Siegert, P.; Lingen, B.; Baumann, M.; Pohl, M. und Müller, M. (2002).** "Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: The first asymmetric cross-benzoin condensation." *J Am Chem Soc* 124(41) 12084-12085.
- Dyda, F.; Furey, W.; Swaminathan, S.; Sax, M.; Farrenkopf, B. und Jordan, F. (1993).** "Catalytic Centers in the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase at 2.4-Angstrom Resolution." *Biochemistry* 32(24) 6165-6170.
- Earle, M. J.; Esperanca, J. M. S. S.; Gilea, M. A.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N.; Magee, J. W.; Seddon, K. R. und Widegren, J. A. (2006).** "The distillation and volatility of ionic liquids." *Nature* 439(7078) 831-834.
- Earle, M. J. und Seddon, K. R. (2000).** "Ionic liquids. Green solvents for the future." *Pure Appl Chem* 72(7) 1391-1398.
- Eijkman, C. (1897a).** "Eine Beri-Beri-ähnliche Krankheit der Hühner." *Virchows Archiv* 148(3) 523-532.
- Eijkman, C. (1897b).** "Ein Versuch zur Bekämpfung der Beri-Beri." *Virchows Archiv* 149(1) 187-194.
- Erbeldinger, M.; Mesiano, A. J. und Russell, A. J. (2000).** "Enzymatic catalysis of formation of *Z*-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents." *Biotechnol Progr* 16(6) 1129-1131.
- Frank, R. A. W.; Leeper, F. J. und Luisi, B. F. (2007).** "Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes." *Cell Mol Life Sci* 64(7-8) 892-905.
- Fukumoto, K.; Yoshizawa, M. und Ohno, H. (2005).** "Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids." *J Am Chem Soc* 127(8) 2398-2399.
- Gerhards, T. (2009).** "Klonierung und Charakterisierung neuer Thiamindiphosphat-abhängiger Enzyme", Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Gocke, D. (2007b).** "New and optimised thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes", Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Gocke, D.; Nguyen, C. L.; Pohl, M.; Stillger, T.; Walter, L. und Müller, M. (2007a).** "Branched-chain keto acid decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a valuable thiamine diphosphate-dependent enzyme for asymmetric C-C bond formation." *Adv Synth Catal* 349(8-9) 1425-1435.
- Gocke, D.; Walter, L.; Gauchenova, E.; Kolter, G.; Knoll, M.; Berthold, C. L.; Schneider, G.; Pleiss, J.; Müller, M. und Pohl, M. (2008).** "Rational protein design of ThDP-dependent enzymes-engineering stereoselectivity." *ChemBioChem* 9(3) 406-412.
- Gonzalez, B.; Merino, A.; Almeida, M. und Vicna, R. (1986).** "Comparative Growth of Natural Bacterial Isolates on Various Lignin-Related Compounds." *Appl Environ Microb* 52(6) 1428-1432.
- Gonzalez, B. und Vicuna, R. (1989).** "Benzaldehyde Lyase, a Novel Thiamine Ppi-Requiring Enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* Biovar-I." *J Bacteriol* 171(5) 2401-2405.

- Gorke, J.;Srienc, F. und Kazlauskas, R. (2010).** "Toward Advanced Ionic Liquids. Polar, Enzyme-friendly Solvents for Biocatalysis." *Biotechnol Bioproc E* 15(1) 40-53.
- Graenacher, C. (1934).** "Cellulose solution", US 1934176.
- Graf, T. (2005).** "Charakterisierung der Pyruvatdecarboxylase aus *Acetobacter pasteurianus*", Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen, Jülich.
- Grant, W. D. (2004).** "Life at low water activity." *Philos T Roy Soc B* 359(1448) 1249-1266.
- Gupta, M. N. (1992).** "Enzyme Function in Organic Solvents." *Eur J Biochem* 203(1-2) 25-32.
- Gupta, M. N. und Roy, I. (2004).** "Enzymes in organic media - Forms, functions and applications." *Eur J Biochem* 271(13) 2575-2583.
- Halling, P. J. (1987).** "Biocatalysis in Multiphase Reaction Mixtures Containing Organic Liquids." *Biotechnol Adv* 5(1) 47-84.
- Halling, P. J. (1990).** "Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic-Systems - Predictions of Effects on Equilibrium Position." *Biotechnol Bioeng* 35(7) 691-701.
- Hasson, M. S.;Muscate, A.;McLeish, M. J.;Polovnikova, L. S.;Gerlt, J. A.;Kenyon, G. L.;Petsko, G. A. und Ringe, D. (1998).** "The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 angstrom resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes." *Biochemistry* 37(28) 9918-9930.
- Hawkins, C. F.;Borges, A. und Perham, R. N. (1989).** "A Common Structural Motif in Thiamin Pyrophosphate-Binding Enzymes." *FEBS Lett* 255(1) 77-82.
- Hegeman, G. D. (1966).** "Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type." *J Biotechnol* 91(3) 1140-1154.
- Henning, H.;Leggewie, C.;Pohl, M.;Müller, M.;Eggert, T. und Jaeger, K. E. (2006).** "Identification of novel benzoylformate decarboxylases by growth selection." *Appl Environ Microb* 72(12) 7510-7517.
- Hildebrand, F.;Kühl, S.;Pohl, M.;Vasic-Racki, D.;Müller, M.;Wandrey, C. und Lütz, S. (2007).** "The production of (*R*)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor." *Biotechnol Bioeng* 96(5) 835-843.
- Hill, A. C. (1898).** "LXVI.-Reversible zymohydrolysis." *J Chem Soc, Trans* 73 634-658.
- Hinrichsen, P.;Gomez, I. und Vicuna, R. (1994).** "Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Benzaldehyde Lyase from *Pseudomonas-Fluorescens* Biovar-I." *Gene* 144(1) 137-138.
- Hirose, Y.;Kariya, K.;Sasaki, I.;Kuronno, Y.;Ebiike, H. und Achiwa, K. (1992).** "Drastic Solvent Effect on Lipase-Catalyzed Enantioselective Hydrolysis of Prochiral 1,4-Dihydropyridines." *Tetrahedron Lett* 33(47) 7157-7160.
- Hischer, T.;Gocke, D.;Fernandez, M.;Hoyos, P.;Alcantara, A. R.;Sinisterra, J. V.;Hartmeier, W. und Ansorge-Schumacher, M. B. (2005).** "Stereoselective synthesis of novel benzoin catalysed by benzaldehyde lyase in a gel-stabilised two-phase system." *Tetrahedron* 61(31) 7378-7383.
- Högberg, H. E.;Edlund, H.;Berglund, P. und Hedenström, E. (1993).** "Water Activity Influences Enantioselectivity in a Lipase-Catalyzed Resolution by Esterification in an Organic-Solvent." *Tetrahedron-Asymmetr* 4(10) 2123-2126.

- Holbrey, J. D.; Reichert, W. M.; Swatloski, R. P.; Broker, G. A.; Pitner, W. R.; Seddon, K. R. und Rogers, R. D. (2002).** "Efficient, halide free synthesis of new, low cost ionic liquids: 1,3-dialkylimidazolium salts containing methyl- and ethyl-sulfate anions." *Green Chem* 4(5) 407-413.
- Holzer, H.; Schultz, G.; Villarpalasi, C. und Juntgensell, J. (1956).** "Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen." *Biochem Z* 327(5) 331-344.
- Hossain, M. A.; Huq, E.; Grover, A.; Dennis, E. S.; Peacock, W. J. und Hodges, T. K. (1996).** "Characterization of pyruvate decarboxylase genes from rice." *Plant Mol Biol* 31(4) 761-770.
- Howarth, J.; James, P. und Dai, J. F. (2001).** "Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF₆ and water mix." *Tetrahedron Lett* 42(42) 7517-7519.
- Iding, H.; Dünnwald, T.; Greiner, L.; Liese, A.; Müller, M.; Siegert, P.; Grotzinger, J.; Demir, A. S. und Pohl, M. (2000).** "Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones." *Chem Eur J* 6(8) 1483-1495.
- Iding, H.; Siegert, P.; Mesch, K. und Pohl, M. (1998).** "Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations." *BBA-Protein Struct M* 1385(2) 307-322.
- Itoh, T.; Han, S. H.; Matsushita, Y. und Hayase, S. (2004).** "Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids." *Green Chem* 6(9) 437-439.
- Janzen, E.; Müller, M.; Kolter-Jung, D.; Kneen, M. M.; McLeish, M. J. und Pohl, M. (2006).** "Characterization of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*: A versatile enzyme for asymmetric C-C bond formation." *Bioorg Chem* 34(6) 345-361.
- Jönsson, Å.; van Breukelen, W.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1998).** "The influence of water activity on the enantioselectivity in the enzyme-catalyzed reduction of 2-pentanone." *J Mol Catal B-Enzym* 5(1-4) 273-276.
- Jordan, F. (2003).** "Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate dependent enzymatic reactions." *Nat Prod Rep* 20(2) 184-201.
- Kaul, P. und Banerjee, U. C. (2008).** "Predicting enzyme behavior in nonconventional media: correlating nitrilase function with solvent properties." *J Ind Microbiol Biotech* 35(7) 713-720.
- Ke, T.; Wescott, C. R. und Klibanov, A. M. (1996).** "Prediction of the solvent dependence of enzymatic prochiral selectivity by means of structure-based thermodynamic calculations." *J Am Chem Soc* 118(14) 3366-3374.
- Kern, D.; Kern, G.; Neef, H.; Tittmann, K.; Killenberg-Jabs, M.; Wikner, C.; Schneider, G. und Hübner, G. (1997).** "How thiamine diphosphate is activated in enzymes." *Science* 275(5296) 67-70.
- Kim, K. W.; Song, B.; Choi, M. Y. und Kim, M. J. (2001).** "Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase." *Org Lett* 3(10) 1507-1509.
- Kim, M. J.; Choi, M. Y.; Lee, J. K. und Ahn, Y. (2003).** "Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity." *J Mol Catal B-Enzym* 26(3-6) 115-118.
- Kitazume, T. (2001).** "Optically active ionic liquids", US 2001/0031875.

- Klibanov, A. M. (2000).** "Answering the question: 'Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s?'" *Trends Biotechnol* 18(3) 85-86.
- Klibanov, A. M. (2001).** "Improving enzymes by using them in organic solvents." *Nature* 409(6817) 241-246.
- Klibanov, A. M. (2003).** "Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents." *Curr Opin Biotech* 14(4) 427-431.
- Kluger, R. und Tittmann, K. (2008).** "Thiamin diphosphate catalysis: Enzymic and nonenzymic covalent intermediates." *Chem Rev* 108(6) 1797-1833.
- Knoll, M.; Müller, M.; Pleiss, J. und Pohl, M. (2006).** "Factors mediating activity, selectivity, and substrate specificity for the thiamin diphosphate-dependent enzymes benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase." *ChemBioChem* 7(12) 1928-1934.
- Kohlmann, C. und Greiner, L. (2012).** "Ionic Liquids in Biotransformations: Motivation and Development." *Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis: Solvents and Beyond.* P. Dominguez de Maria, Wiley-VCH.
- Kohlmann, C.; Greiner, L.; Leitner, W.; Wandrey, C. und Lütz, S. (2009).** "Ionic Liquids as Performance Additives for Electroenzymatic Syntheses." *Chem Eur J* 15(43) 11692-11700.
- Kokova, M. (2008).** "Characterization of benzaldehyde lyase and benzoylformate decarboxylase in non-conventional media", Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kokova, M.; Zavrel, M.; Tittmann, K.; Spiess, A. C. und Pohl, M. (2009).** "Investigation of the carbonylase activity of thiamine diphosphate-dependent enzymes using kinetic modeling and NMR spectroscopy." *J Mol Catal B-Enzym* 61(1-2) 73-79.
- Kolter, G. (2010).** "Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone", Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- König, S. (1998).** "Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms." *Bba-Protein Struct M* 1385(2) 271-286.
- Krishna, S. H. (2002).** "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media." *Biotechnol Adv* 20(3-4) 239-267.
- Kulschewski, T. und Pleiss, J. (2012).** "Simulation of enzymes in organic solvents." *Protein engineering handbook.* S. Lutz und U. T. Bornscheuer, Wiley-VCH.
- Kurlemann, N. und Liese, A. (2004).** "Immobilization of benzaldehyde lyase and its application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of a chiral 2-hydroxy ketone." *Tetrahedron-Asymmetr* 15(18) 2955-2958.
- Laane, C.; Boeren, S. und Vos, K. (1985).** "On Optimizing Organic-Solvents in Multi-Liquid-Phase Biocatalysis." *Trends Biotechnol* 3(10) 251-252.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. und Veeger, C. (1987).** "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents." *Biotechnol Bioeng* 30(1) 81-87.
- Lau, R. M.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R. und Sheldon, R. A. (2000).** "Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids." *Org Lett* 2(26) 4189-4191.
- Leo, A.; Hansch, C. und Elkins, D. (1971).** "Partition Coefficients and Their Uses." *Chem Rev* 71(6) 525-616.
- Lie, M. A.; Celik, L.; Jorgensen, K. A. und Schiott, B. (2005).** "Cofactor activation and substrate binding in pyruvate decarboxylase. Insights into the reaction mechanism from molecular dynamics simulations." *Biochemistry-Us* 44(45) 14792-14806.

- Lingen, B.;Grotzinger, J.;Kolter, D.;Kula, M. R. und Pohl, M. (2002).** "Improving the carboligase activity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by a combination of directed evolution and site-directed mutagenesis." *Protein Eng* 15(7) 585-593.
- Lingen, B.;Kolter-Jung, D.;Dünelmann, P.;Feldmann, R.;Grotzinger, J.;Pohl, M. und Müller, M. (2003).** "Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution." *ChemBioChem* 4(8) 721-726.
- Lohmann, K. und Schuster, P. (1937).** "Examinations on cocarboxylase." *Biochemische Zeitschrift* 294 188-214.
- Luque, S.;Ke, T. und Klibanov, A. M. (1998).** "On the role of transition-state substrate desolvation in enzymatic enantioselectivity in aqueous-organic mixtures." *Biocatal Biotransfor* 16(3) 233-248.
- Magnuson, D. K.;Bodley, J. W. und Evans, D. F. (1984).** "The Activity and Stability of Alkaline-Phosphatase in Solutions of Water and the Fused Salt Ethylammonium Nitrate." *J Solution Chem* 13(8) 583-587.
- Maraite, A.;Schmidt, T.;Ansorge-Schumacher, M. B.;Brzozowski, A. M. und Grogan, G. (2007).** "Structure of the ThDP-dependent enzyme benzaldehyde lyase refined to 1.65 angstrom resolution." *Acta Crystallogr F* 63 546-548.
- Masterson, D. S.;Rosado, D. A. und Nabors, C. (2009).** "Development of a practical mass spectrometry based assay for determining enantiomeric excess. A fast and convenient method for the optimization of PLE-catalyzed hydrolysis of prochiral disubstituted malonates." *Tetrahedron-Asymmetr* 20(13) 1476-1486.
- Matsuda, T.;Watanabe, K.;Harada, T. und Nakamura, K. (2004).** "Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification." *Catal Today* 96(3) 103-111.
- Maugard, T.;Lamare, S. und Legoy, M. D. (2001).** "Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast." *Biotechnol Bioeng* 73(2) 164-168.
- McGuffee, S. R. und Elcock, A. H. (2010).** "Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm." *PLoS Comput Biol* 6(3).
- McSweeney, P. L. H. und Sousa, M. J. (2000).** "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review." *Lait* 80(3) 293-324.
- Miczka, G.;Vernau, J.;Kula, M. R.;Hofmann, B. und Schomburg, D. (1992).** "Purification and Primary Structure of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*." *Biotechnol Appl Bioc* 15(2) 192-206.
- Mine, Y.;Fukunaga, K.;Itoh, K.;Yoshimoto, M.;Nakao, K. und Sugimura, Y. (2003).** "Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins." *J Biosci Bioeng* 95(5) 441-447.
- Moniruzzaman, M.;Nakashima, K.;Kamiya, N. und Goto, M. (2010).** "Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids." *Biochem Eng J* 48(3) 295-314.
- Morrissey, S.;Pegot, B.;Coleman, D.;Garcia, M. T.;Ferguson, D.;Quilty, B. und Gathergood, N. (2009).** "Biodegradable, non-bactericidal oxygen-functionalised imidazolium esters: A step towards 'greener' ionic liquids." *Green Chem* 11(4) 475-483.

- Mosbacher, T. G.; Müller, M. und Schulz, G. E. (2005).** "Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*." *FEBS J* 272(23) 6067-6076.
- Müller, M.; Gocke, D. und Pohl, M. (2009).** "Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis." *FEBS J* 276(11) 2894-2904.
- Nara, S. J.; Mohile, S. S.; Harjani, J. R.; Naik, P. U. und Salunkhe, M. M. (2004).** "Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal." *J Mol Catal B-Enzym* 28(1) 39-43.
- Neale, A. D.; Scopes, R. K.; Wettenhall, R. E. H. und Hoogenraad, N. J. (1987).** "Pyruvate Decarboxylase of *Zymomonas mobilis* - Isolation, Properties, and Genetic Expression in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 169(3) 1024-1028.
- Oku, H. und Kaneda, T. (1988).** "Biosynthesis of Branched-Chain Fatty-Acids in *Bacillus subtilis* - a Decarboxylase Is Essential for Branched-Chain Fatty-Acid Synthetase." *J Biol Chem* 263(34) 18386-18396.
- Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L. und Morvan, D. (2010).** "Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications." *Appl Catal A-Gen* 373(1-2) 1-56.
- Olofsson, L.; Nicholls, I. A. und Wikman, S. (2005).** "TBADH activity in water-miscible organic solvents: correlations between enzyme performance, enantioselectivity and protein structure through spectroscopic studies." *Org Biomol Chem* 3(5) 750-755.
- Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K. und Carrea, G. (1995).** "The *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity." *Tetrahedron-Asymmetr* 6(12) 3023-3030.
- Ottosson, J.; Fransson, L.; King, J. W. und Hult, K. (2002).** "Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantio selectivity." *Biochim Biophys Acta, Prot Struct* 1594(2) 325-334.
- Pang, S. S.; Duggleby, R. G. und Guddat, L. W. (2002).** "Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors." *J Mol Biol* 317(2) 249-262.
- Pang, S. S.; Duggleby, R. G.; Schowen, R. L. und Guddat, L. W. (2004).** "The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzyme-bound cofactor and with an unusual intermediate." *J Biol Chem* 279(3) 2242-2253.
- Park, S. und Kazlauskas, R. J. (2001).** "Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations." *J Org Chem* 66(25) 8395-8401.
- Parvulescu, V. I. und Hardacre, C. (2007).** "Catalysis in ionic liquids." *Chem Rev* 107(6) 2615-2665.
- Pei, X. Y.; Erixon, K. M.; Luisi, B. F. und Leeper, F. J. (2010).** "Structural Insights into the Prereaction State of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*." *Biochemistry-Us* 49(8) 1727-1736.
- Pilissao, C. und Nascimento, M. D. (2006).** "Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases." *Tetrahedron-Asymmetr* 17(3) 428-433.
- Plechkova, N. V. und Seddon, K. R. (2008).** "Applications of ionic liquids in the chemical industry." *Chem Soc Rev* 37(1) 123-150.
- Pohl, M.; Dresen, C.; Beigi, M. und Müller, M. (2012).** "Enzymatic Acyloin and Benzoin Condensations." *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. K. Drauz, H. Gröger und O. May. Weinheim, Wiley-VCH. 2: 919-945.

- Pohl, M.; Gocke, D. und Müller, M. (2009).** "Thiamin-based Enzymes for Biotransformations." Handbook of Green Chemistry. P. T. Anastas. Weinheim, Wiley-VCH. 3: 75-114.
- Pohl, M.; Grotzinger, J.; Wollmer, A. und Kula, M. R. (1994).** "Reversible Dissociation and Unfolding of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*." *Eur J Biochem* 224(2) 651-661.
- Pohl, M.; Mesch, K.; Rodenbrock, A. und Kula, M. R. (1995).** "Stability Investigations on the Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas-Mobilis*." *Biotechnol Appl Bioc* 22 95-105.
- Pohl, M.; Siegert, P.; Mesch, K.; Bruhn, H. und Grotzinger, J. (1998).** "Active site mutants of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* - A site-directed mutagenesis study of L112, I472, I476, E473 and N482." *Eur J Biochem* 257(3) 538-546.
- Pohl, M.; Sprenger, G. A. und Müller, M. (2004).** "A new perspective on thiamine catalysis." *Curr Opin Biotech* 15(4) 335-342.
- Polovnikova, E. S.; McLeish, M. J.; Sergienko, E. A.; Burgner, J. T.; Anderson, N. L.; Bera, A. K.; Jordan, F.; Kenyon, G. L. und Hasson, M. S. (2003).** "Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase." *Biochemistry-US* 42(7) 1820-1830.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I. und Belfrage, G. (1975).** "Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation." *Nature* 258(5536) 598-599.
- Prechtel, M. H. G.; Scholten, J. D.; Neto, B. A. D. und Dupont, J. (2009).** "Application of Chiral Ionic Liquids for Asymmetric Induction in Catalysis." *Curr Org Chem* 13(13) 1259-1277.
- Quijano, G.; Couvert, A. und Amrane, A. (2010).** "Ionic liquids: Applications and future trends in bioreactor technology." *Bioresource Technology* 101(23) 8923-8930.
- Raj, K. C.; Ingram, L. O. und Maupin-Furlow, J. A. (2001).** "Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*." *Arch Microbiol* 176(6) 443-451.
- Raj, K. C.; Talarico, L. A.; Ingram, L. O. und Maupin-Furlow, J. A. (2002).** "Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (pdc) and comparison to bacterial homologues." *Appl Environ Microb* 68(6) 2869-2876.
- Rariy, R. V. und Klibanov, A. M. (2000).** "On the relationship between enzymatic enantioselectivity in organic solvents and enzyme flexibility." *Biocatal Biotransfor* 18(5) 401-407.
- Roosen, C.; Müller, P. und Greiner, L. (2008).** "Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations." *Appl Microbiol Biot* 81(4) 607-614.
- Rother, D.; Kolter, G.; Gerhards, T.; Berthold, C. L.; Gauchenova, E.; Knoll, M.; Pleiss, J.; Müller, M.; Schneider, G. und Pohl, M. (2011).** "S-Selective Mixed Carbonylation by Structure-Based Design of the Pyruvate Decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*." *ChemCatChem* 3(10) 1587-1596.
- Saehuan, C.; Rojanarata, T.; Wiyakrutta, S.; McLeish, M. J. und Meeyootisom, V. (2007).** "Isolation and characterization of a benzoylformate decarboxylase and a NAD⁺/NADP⁺-dependent benzaldehyde dehydrogenase involved in D-phenylglycine metabolism in *Pseudomonas stutzeri* ST 201." *Bba-Gen Subjects* 1770(11) 1585-1592.
- Sanchez-Gonzalez, M. und Rosazza, J. P. N. (2003).** "Mixed aromatic acyloin condensations with recombinant benzaldehyde lyase: Synthesis of alpha-hydroxydihydrochalcones and related alpha-hydroxy ketones." *Adv Synth Catal* 345(6-7) 819-824.

- Santaniello, E.; Ferraboschi, P. und Grisenti, P. (1993).** "Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: Applications to the preparation of enantiomerically pure compounds." *Enzyme Microb Technol* 15(5) 367-382.
- Schmidt, T.; Zavrel, M.; Spiess, A. und Ansorge-Schumacher, M. B. (2009).** "Biochemical peculiarities of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I in the dependency on pH and cosolvent concentration." *Bioorg Chem* 37(1-3) 84-89.
- Schöfer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P. und Kragl, U. (2001).** "Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity." *Chem Comm*(5) 425-426.
- Schütz, A.; Sandalova, T.; Ricagno, S.; Hübner, G.; König, S. und Schneider, G. (2003).** "Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid." *Eur J Biochem* 270(10) 2312-2321.
- Schwarz, M. (2011).** "Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligationsreaktionen mit aromatischen Aldehyden", Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Secundo, F.; Fiala, S.; Fraaije, M. W.; de Gonzalo, G.; Meli, M.; Zambianchi, F. und Ottolina, G. (2011).** "Effects of Water Miscible Organic Solvents on the Activity and Conformation of the Baeyer-Villiger Monooxygenases From *Thermobifida fusca* and *Acinetobacter calcoaceticus*: A Comparative Study." *Biotechnol Bioeng* 108(3) 491-499.
- Secundo, F.; Riva, S. und Carrea, G. (1992).** "Effects of Medium and of Reaction Conditions on the Enantioselectivity of Lipases in Organic-Solvents and Possible Rationales." *Tetrahedron-Asymmetr* 3(2) 267-280.
- Sehl, T.; Simon, R. C.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Schell, U.; Pohl, M. und Rother, D. (2012).** "TTC-based screening assay for omega-transaminases: A rapid method to detect reduction of 2-hydroxy ketones." *J Biotechnol* 159(3) 188-194.
- Sellek, G. A. und Chaudhuri, J. B. (1999).** "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." *Enzyme Microb Tech* 25(6) 471-482.
- Serdakowski, A. L. und Dordick, J. S. (2008).** "Enzyme activation for organic solvents made easy." *Trends Biotechnol* 26(1) 48-54.
- Shanmuganathan, S.; Natalia, D.; van den Wittenboer, A.; Kohlmann, C.; Greiner, L. und Dominguez de Maria, P. (2010).** "Enzyme-catalyzed C-C bond formation using 2-methyltetrahydrofuran (2-MTHF) as (co)solvent: efficient and bio-based alternative to DMSO and MTBE." *Green Chem* 12(12) 2240-2245.
- Shin, J. S.; Luque, S. und Klibanov, A. M. (2000).** "Improving lipase enantioselectivity in organic solvents by forming substrate salts with chiral agents." *Biotechnol Bioeng* 69(5) 577-583.
- Siegert, P.; McLeish, M. J.; Baumann, M.; Iding, H.; Kneen, M. M.; Kenyon, G. L. und Pohl, M. (2005).** "Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*." *Protein Eng Des Sel* 18(7) 345-357.

- Singh, M.; Singh, R. S. und Banerjee, U. C. (2010).** "Enantioselective transesterification of racemic phenyl ethanol and its derivatives in organic solvent and ionic liquid using *Pseudomonas aeruginosa* lipase." *Process Biochem* 45(1) 25-29.
- Smit, B. A.; Vlieg, J. E. T. V.; Engels, W. J. M.; Meijer, L.; Wouters, J. T. M. und Smit, G. (2005).** "Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain alpha-keto acid decarboxylase involved in flavor formation." *Appl Environ Microb* 71(1) 303-311.
- Smith, M. E.; Banerjee, S.; Shi, Y. L.; Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T. und Masterson, D. S. (2012).** "Investigation of the Cosolvent Effect on Six Isoenzymes of PLE in the Enantioselective Hydrolysis of Selected α,α -Disubstituted Malonate Esters." *ChemCatChem* 4(4) 472-475.
- Sopaci, S. B.; Simsek, I.; Tural, B.; Volkan, M. und Demir, A. S. (2009).** "Carboligation reactions with benzaldehyde lyase immobilized on superparamagnetic solid support." *Org Biomol Chem* 7(8) 1658-1664.
- Stillger, T. (2004).** "Enantioselective C-C Knüpfung mit Enzymen", Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Sulkowski, E. (1985).** "Purification of Proteins by Imac." *Trends Biotechnol* 3(1) 1-7.
- Sumner, J. B. (1926).** "The isolation and crystallization of the enzyme urease. Preliminary paper." *J Biol Chem* 69(2) 435-441.
- Sym, E. A. (1933).** "On the esterase-effect. III." *Biochem Z* 258 304-324.
- Tsou, A. Y.; Ransom, S. C.; Gerlt, J. A.; Buechter, D. D.; Babbitt, P. C. und Kenyon, G. L. (1990).** "Mandelate Pathway of *Pseudomonas-Putida* - Sequence Relationships Involving Mandelate Racemase, (S)-Mandelate Dehydrogenase, and Benzoylformate Decarboxylase and Expression of Benzoylformate Decarboxylase in *Escherichia coli*." *Biochemistry* 29(42) 9856-9862.
- Ueji, S.; Fujino, R.; Okubo, N.; Miyazawa, T.; Kurita, S.; Kitadani, M. und Muromatsu, A. (1992).** "Solvent-Induced Inversion of Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Esterification of 2-Phenoxypropionic Acids." *Biotechnol Lett* 14(3) 163-168.
- van de Wittenboer, A. (2009).** "Stabilitäten der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* und der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* in wässrig-organischen Zweiphasensystemen", Doktorarbeit, RWTH, Aachen.
- van Rantwijk, F.; Lau, R. M. und Sheldon, R. A. (2003).** "Biocatalytic transformations in ionic liquids." *Trends Biotechnol* 21(3) 131-138.
- van Rantwijk, F. und Sheldon, R. A. (2007).** "Biocatalysis in ionic liquids." *Chem Rev* 107(6) 2757-2785.
- van Vechten, J. A. (1969).** "Quantum Dielectric Theory of Electronegativity in Covalent Systems .I. Electronic Dielectric Constant." *Phys Rev* 182(3) 891-&.
- Vargas, R.; Garza, J.; Friesner, R. A.; Stern, H.; Hay, B. P. und Dixon, D. A. (2001).** "Strength of the N-H center dot center dot center dot O=C and C-H center dot center dot O=C bonds in formamide and N-methylacetamide dimers." *J Phys Chem A* 105(20) 4963-4968.

- Vermue, M. H. und Tramper, J. (1995).** "Interrelations of Chemistry and Biotechnology-V-Biocatalysis in Nonconventional Media - Medium Engineering Aspects." *Pure Appl Chem* 67(2) 345-373.
- Versees, W.; Spaepen, S.; Vanderleyden, J. und Steyaert, J. (2007).** "The crystal structure of phenylpyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasilense* at 1.5 angstrom resolution - Implications for its catalytic and regulatory mechanism." *FEBS J* 274(9) 2363-2375.
- Villela, M.; Stillger, T.; Müller, M.; Liese, A. und Wandrey, C. (2003).** "Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?" *Angew Chem Int Edit* 42(26) 2993-2996.
- Walden, P. (1914).** "Über die Molekulargröße und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzener Salze." *Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg)* 450-422.
- Wallert, S.; Drauz, K.; Grayson, I.; Groger, H.; Dominguez de Maria, P. und Bolm, C. (2005).** "Ionic liquids as additives in the pig liver esterase (PLE) catalysed synthesis of chiral disubstituted malonates." *Green Chem* 7(8) 602-605.
- Watson, J. D. und Crick, F. H. C. (1953).** "Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171(4356) 737-738.
- Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A. und Kragl, U. (2011).** "Industrial biotechnology-the future of green chemistry?" *Green Chem* 13(11) 3007-3047.
- Wendorff, M. (2006).** "Neue Benzoylformiatdecarboxylasen für die Biokatalyse", Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Wescott, C. R.; Noritomi, H. und Klibanov, A. M. (1996).** "Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics." *J Am Chem Soc* 118(43) 10365-10370.
- Widmann, M.; Radloff, R. und Pleiss, J. (2010).** "The Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database: A tool for the systematic analysis of sequence and structure relations." *BMC Biochem* 11.
- Wilcocks, R.; Ward, O. P.; Collins, S.; Dewdney, N. J.; Hong, Y. P. und Prosen, E. (1992).** "Acyloin Formation by Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida*." *Appl Environ Microb* 58(5) 1699-1704.
- Wilkes, J. S. (2002).** "A short history of ionic liquids - from molten salts to neoteric solvents." *Green Chem* 4(2) 73-80.
- Williams, R. R.; Waterman, R. E.; Keresztesy, J. C. und Buchman, E. R. (1935).** "Studies of crystalline vitamin B-1. III. Cleavage of vitamin with sulfite." *J Am Chem Soc* 57(1) 536-537.
- Yang, H.; Jonsson, A.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1997).** "The enantiomeric purity of alcohols formed by enzymatic reduction ketones can be improved by optimisation of the temperature and by using a high co-substrate concentration." *Bba-Gen Subjects* 1336(1) 51-58.
- Yep, A.; Kenyon, G. L. und McLeish, M. J. (2006).** "Determinants of substrate specificity in KdcA, a thiamin diphosphate-dependent decarboxylase." *Bioorg Chem* 34(6) 325-336.
- Zaks, A. und Klibanov, A. M. (1986).** "Substrate-Specificity of Enzymes in Organic-Solvents vs Water Is Reversed." *J Am Chem Soc* 108(10) 2767-2768.
- Zhao, H. (2005).** "Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids." *J Mol Catal B-Enzym* 37(1-6) 16-25.
- Zhao, H.; Jackson, L.; Song, Z. Y. und Olubajo, O. (2006).** "Enhancing protease enantioselectivity by ionic liquids based on chiral- or α -amino acids." *Tetrahedron-Asymmetr* 17(10) 1549-1553.

DANKE!

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, in ihrer Gruppe diese Arbeit anfertigen zu können, für die vielen konstruktiven Diskussionen, ihre tollen Ideen, ihre ruhige Art uns zu motivieren und ihr immer offenes Ohr.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Dörte Rother danke ich sehr für ihre stets freundschaftliche Art der Betreuung, ihre unzähligen Ideen und für die Zeit die sie sich immer genommen hat, um mich in wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Belangen zu unterstützen.

Für die tollen Ideen zur Veranschaulichung meiner Ergebnisse danke ich Herrn Dr. Eric von Lieres. Ohne ihn würden wir wohl vor lauter Balken immer noch den Trend nicht sehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marco Bocola. Aus jedem Treffen sind immer wieder neue und interessante Ideen hervorgegangen. Außerdem hat er tolle Arbeit geleistet die experimentell erlangten Ergebnisse modellgestützt zu untermauern. Dadurch hat das Projekt, vor allem in Bezug auf die Interpretation der Ergebnisse, erheblich an Tiefe gewonnen.

Bei Caroline E. Paul, Dr. Iván Lavandera García und Dr. Vicente Gotor Fernández von der Universität Oviedo bedanke ich mich für die Bereitstellung der kleinen und chiralen ionischen Flüssigkeiten im Rahmen einer konstruktiven Kooperation.

Der Zentralabteilung für Chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich und Dr. Björn Thiele danke ich für die Analyse der ionischen Flüssigkeit Ammoeng 102 und den sehr netten Kontakt.

Dem Graduiertenkolleg BioNoCo danke ich für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes. Den Stipendiaten, Kollegiaten sowie Betreuern danke ich für ihren Einsatz, die netten Treffen sowie die vielen Anregungen und Ideen, die wir auf den Workshops entwickelt haben.

Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Biokatalyse und Biosensoren danke ich für das angenehme Arbeitsklima, für die lustigen und ernsten Gespräche sowie die wertvollen Ideen und Hilfestellungen bei jeder Art von Problemen. Besonders aber danke ich ihnen für die wirklich schöne Zeit in Jülich.

Herrn Andreas Klein danke ich für sein Engagement und seine tolle Leistung während seines Bachelorprojektes im Rahmen dieser Arbeit.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Frau Ursula Mackfeld. Ihre unbändige Motivation und Hilfe bei der Durchführung von Experimenten haben diese Arbeit sehr bereichert.

Meinen Freunden, meiner Familie und besonders meinen Eltern danke ich neben Vielem dafür, dass sie nicht einen Moment daran gezweifelt haben, dass das hier möglich ist.