HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Kombination asymmetrischer Organo- und Biokatalyse zur Synthese chiraler 1,3-Diole

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Dalia Bulut geb. Al-Sultani
aus Bagdad-Yarmouk

Mönchengladbach, Oktober 2016

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel
Korreferent: Prof. Dr. Vlada Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2012 bis März 2016 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Projektes „Biotechnologie 2020+: Basistechnologien für eine nächste Generation biotechnologischer Verfahren“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF, Projekt-Förderkennzeichen 031A184) finanziert und unterstützt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder werden demnächst zur Veröffentlichung eingereicht:

PUBLIKATIONEN

Toelzer C, Bulut D, Klimpel A, Chaib AO, Gröger H, Berkessel A, Hummel W, Niefind K. X-ray structure of NADPH-dependent alcohol dehydrogenase from *Pichia pastoris*. *Manuskript in Bearbeitung*.

Bulut D, Hammel M, Mahrwald R, Gröger H, Hummel W, Berkessel A. Chemoenzymatic one-pot synthesis of enantiopure tertiary/secondary 1,3-diols. *Manuskript in Bearbeitung*.

Bulut D, Duangdee N, Gröger H, Berkessel A, Hummel W (2016). Screening, molecular cloning, and biochemical characterization of an alcohol dehydrogenase from *Pichia pastoris* useful for the kinetic resolution of a racemic β-hydroxy-β-trifluoromethyl ketone. *ChemBioChem* 17:1349–1358.

Bulut D, Gröger H, Hummel W (2015). Development of a growth-dependent selection system for identification of L-threonine aldolases. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:5875–5883.

POSTERPRÄSENTATION

Bulut D, Gröger H, Hummel W. Selection system for identification of L-threonine aldolases. BIOTRANS Konferenz, 26.-30. Juli, 2015, Wien, Österreich.

PATENTANMELDUNG

Hummel W, Gröger H, Berkessel A, Bulut D. Alcohol dehydrogenase from *Pichia pastoris* and use thereof (2016). EP Application No./Patent No. 16000685.4 – 1402.

DANKSAGUNGEN

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Werner Hummel, der es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit im Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich zu absolvieren. Ebenso möchte ich mich für die Überlassung der interessanten und vielfältigen Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen konstruktiven Anregungen sowie die ausgezeichnete „Rundumbetreuung“ bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Vlada Urlacher möchte ich mich für die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jäger möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Institut unter hervorragenden Bedingungen diese Arbeit durchführen zu können.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Harald Gröger (Universität Bielefeld), Herrn Prof. Dr. Albrecht Berkessel (Universität Köln) und Herrn Prof. Dr. Karsten Niefind (Universität Köln) für die hervorragenden und erfolgreichen Kooperationen und stete Diskussionsbereitschaft. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Matthias Hammel (AK Berkessel) für die Analytik der Diole sowie bei Dipl. Biol. Dipl. Phys. Christine Tölzer (AK Niefind) für die Strukturaufklärung meiner Enzyme bedanken. Danke für euer Engagement und für die hilfreichen Gespräche!

Allen Mitarbeitern aus dem IMET, IBOC und OCI danke ich für die freundliche Hilfe und der guten Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorheben und danken möchte ich Dipl. Ing. Astrid Wirtz und Birgit Henßen für die Probenanalysen und die technischen Hilfestellungen bei HPLC und GC. Vera Svensson und Dipl. Ing. Esther Knieps-Grünhagen möchte ich für diverse praktische Hilfestellungen danken. Claudia Holec (M. Sc.), Andreas Klein (M. Sc.) und Marcus Brauns (M. Sc.) danke ich für die zahlreichen wertvollen chemischen Tipps und Tricks. Dr. Filip Kovacic danke ich für die netten Kaffeepausen zwischendurch.

Bei meinen Experimenten haben mir eine Vielzahl von Studenten geholfen, auch wenn es nicht alle thematisch in diese Arbeit geschafft haben. Dafür danke ich in alphabetischer Reihenfolge Stefanie Adler, Anissa Ouald Chaib und Linda Förster. Viel Erfolg für eure weitere Zukunft!

Danke an meine ehemaligen Laborkollegen Dipl.-Ing. Thorsten Rosenbaum, Dipl. Biol. Till Winkler, Dr. Carsten Lanzerath und M. Sc. Lukas Muschalik für die freundliche Hilfe, guten Ratschläge und den lustigen Momenten im Labor. Vor allem

möchte ich mich bei Dipl. Ing. Daniel Bakonyi bedanken, der mir auch als Freund sehr ans Herz gewachsen ist und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Meinen Eltern, meinem Bruder sowie meinen Freunden möchte ich für die großartige Unterstützung und Motivation in schweren und stressigen Zeiten danken.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann Ümit, der mich während des gesamten Studiums und der Promotion jederzeit liebevoll unterstützt und motiviert hat. DANKE, dass du mich ertragen hast!

„Wenn mein Kopf es sich ausdenken kann,
wenn mein Herz daran glauben kann -
dann kann ich es auch erreichen.“

MUHAMMAD ALI

Für meine Großeltern
Erika & Safa

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **VII**

1. EINLEITUNG **1**

1.1 Enzyme in der Biotechnologie 1

1.2 Enzyme als Biokatalysatoren für nachhaltige Chemie 2

1.3 Chirale Wirkstoffe und Bausteine 5

1.4 Synthesestrategien zur Darstellung von chiralen 1,3-Diolen 8

1.5 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit 15

1.5.1 Stand der Wissenschaft: Asymmetrische organokatalysierte Aldolreaktionen (Schritt 1) 17

1.5.2 Stand der Wissenschaft: Keton-Reduktionen mit Alkohol-Dehydrogenasen (Schritt 2) 22

1.5.3 Stand der Wissenschaft: Chemoenzymatische Eintopfsynthesen 29

2. MATERIAL UND METHODEN **33**

2.1 Chemikalien und Enzyme 33

2.2 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide 33

2.3 Oligonukleotide 37

2.4 Anzucht von Mikroorganismen 40

2.4.1 Medien und Lösungen 40

2.4.2 Kultivierung mikrobieller Stämme 41

2.4.3 Kultivierung von *Escherichia coli* 41

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren 43

2.5.1 Plasmid-DNA 43

2.5.2 Chromosomale DNA 43

2.6 Reinigung von Nukleinsäuren 44

2.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen 44

2.8 *In vitro* Modifikationen von DNA 44

2.8.1 Restriktion von DNA 44

2.8.2 Ligation von DNA-Molekülen mit T4-DNA-Ligase 44

2.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren 45

2.10 Sequenzierung von DNA 45

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 45

2.11.1 Standard-PCR 45

2.11.2 QuikChange® PCR 46

2.12 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen 47

2.13 Chemische Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA 47

2.14 Proteinchemische Methoden 48

2.14.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle 48

2.14.2 Zellaufschluss mittels *French Press* 48

2.14.3 Zellaufschluss mittels Ultraschall 48

2.14.4 Bestimmung der Proteinkonzentration 49

2.14.5 Umpuffern und Aufkonzentrierung von Proteinlösungen 49

2.14.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 49

2.14.7 Western Blot und Immunodetektion 50

2.14.8 Chromatographische Reinigung der PPADH aus dem *Pichia pastoris* GS115-Rohextrakt 51

2.14.9 Chromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen 52

2.14.10 Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) 53

2.14.11 Thermofluor-Screen 53

2.14.12 Präparation und Verwendung anderer Enzyme 54

2.15 Analytische Methoden 56

2.15.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten 56

2.15.2 Gaschromatographie (GC) 57

2.15.3 *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) 59

3. ERGEBNISSE 61

3.1 Herstellung des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) als *Screening*-Substrat für neue ADHs 61

3.2 *Screening* nach einer neuen ADH für die asymmetrische Reduktion des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols)..... 62

3.2.1 Identifikation des Zielproteins aus *Pichia pastoris* GS115 nach Strategie I (Sequenz-basiert).....65

3.2.2 Identifikation des Zielproteins aus *P. pastoris* GS115 nach Strategie II (Aktivitäts-basiert).....67

3.3 Klonierung und heterologe Expression des *ppadh* Gens aus *P. pastoris* GS115 in *E. coli* BL21(DE3) 74

3.3.1 Optimierung der heterologen Expression des *ppadh* Gens durch Veränderung der Kultivierungstemperatur 74

3.3.2 Reinigung der PPADH mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC).....76

3.4 Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse (Kapitel 3.1-3.3) 78

3.5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten PPADH aus *P. pastoris* . 79

3.5.1 Bestimmung der Lagerstabilität der PPADH 79

3.5.2 Untersuchung verschiedener Parameter mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Thermostabilitätsmessung (Thermofluor).....80

3.5.3 Aktivitätsbasierte Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums.....84

3.5.4 Untersuchung des Substratspektrums 85

3.5.5 Einfluss des His-Tags auf die PPADH.....90

3.5.6 Bestimmung der kinetischen Parameter.....95

3.5.7 Untersuchung der Enantioselektivität der PPADH.....97

3.6 Die anderen „putativen Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“ bzw. PPADHs in *P. pastoris* GS115 100

3.6.1 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH4 zur PPADH1 104

3.6.2 Heterologe Expression und Reinigung der PPADH4-Mutanten in *E. coli* BL21(DE3).....105

3.6.3 Optimierung der Genexpression der PPADH4 und Reinigung 107

3.6.4 Untersuchung der PPADH4-Mutanten bezüglich Enantio- und Diastereoselektivität 109

3.6.5 Einfluss von Fluor-substituierten Substraten auf die Stereospezifität der PPADH1 und PPADH4 116

3.6.6 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH1 zur PPADH4 118

3.6.7 Bestimmung der kinetischen Parameter von PPADH4 und der PPADH4-Mutanten 123

3.7 Kristallstrukturanalyse der PPADH1 aus *P. pastoris* GS115 128

3.7.1 Die Gesamtstruktur 129

3.7.2 Die Cofaktorbindestelle 131

3.7.3 Die Substratbindestelle 133

3.8 Entwicklung einer chemoenzymatischen Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole 136

3.8.1 Einsatz der PPADH1 für die kinetische Racematspaltung des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) 136

3.8.2 Erste Versuche zur Entwicklung chemoenzymatischer Synthesen von chiralen 1,3-Diolen 149

3.8.3 Optimierungen der chemoenzymatischen Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole 160

3.8.4 Erweiterung des Substratspektrums der Eintopfreaktion 180

3.9 Zugang zu allen vier Stereoisomeren des CF_3-1,3-Diols („*proof of concept*“). 187

3.10 Synthese geruchsaktiver 1,3-Dioxane (Floropal®) aus chiralen 1,3-Diolen 191

3.11 Bestimmung der absoluten Konfiguration der 1,3-Diole 195

4. DISKUSSION UND AUSBLICK 201

4.1 Identifizierung der PPADH1 als neue Alkohol-Dehydrogenase für die asymmetrische Reduktion des CF_3-Aldols 202

4.2 Biochemische Charakterisierung der PPADH und Vergleich mit Gre2, der Methylglyoxal-Reduktase aus *Saccharomyces cerevisiae* 207

4.3 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH1 und PPADH4 zur Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen 213

4.4 Vor- und Nachteile bei der Verwendung von Ganzzellkatalysatoren für die Reduktion des CF_3-Aldols und für die Synthese von chiralen 1,3-Diolen 217

4.5 Bewertung der zweistufigen Tandem-Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole 227

4.6 Die PPADH1 als Schlüsselelement für die Kombination von Organo- und Biokatalyse in einer Tandem-Eintopfreaktion 241

5. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT 245

6. ANHANG 253

6.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (PPADH1 & PPADH4) 253

6.2 Analytik 254

6.2.1 Synthese von racemischen 5,5,5-Trifluoro-4-hydroxy-4-phenylpentan-2-one (*rac*-CF_3-Aldol)[117] 254

6.2.2 Präparative kinetische Racematspaltungen von racemischen β-Hydroxyketonen mittels Ganzzellkatalysator (FGZK3) 255

6.2.3 Chemoenzymatische Eintopfreaktionen zur Herstellung von chiralen 1,3-Diolen ((2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(aryl)pentan-2,4-diolen) 259

6.2.4 Biokatalytische Synthese der Floropal®-Vorstufen (2*R*,4*S*)-2-Phenylpentan-2,4-diol und (2*S*,4*S*)-2-Phenylpentan-2,4-diol 270

6.2.5 Synthese von (2*S*,4*R*,6*S*)-2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan und (2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan (Floropal®)[301] 271

6.3 Wichtige NMR-Spektren 274

6.3.1 ^{1}H-NMR Spektrum (oben) und ^{13}C-NMR Spektrum (unten) von (*S*,*S*)-CH_3-Diol in $CDCl_3$ 274

6.3.2 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von (*S*,*S*)-CF_3-Diol **4a** in $CDCl_3$. 275

6.3.3 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Me-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4b** in $CDCl_3$. 276

6.3.4 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Cl-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4c** in $CDCl_3$. 277

6.3.5 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-F-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4d** in $CDCl_3$. 278

6.3.6 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-OMe-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4e** in $CDCl_3$. 279

6.3.7 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Br-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4h** in $CDCl_3$. 280

7. LITERATURVERZEICHNIS 281

LEBENSLAUF/VITA 309

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 311

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Folgend werden die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Aufgrund der Allgemeingültigkeit von (abgeleiten) SI-Einheiten und den Formeln von chemischen Elementen wird auf die Erklärung dieser Abkürzungen verzichtet. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein- und Drei-Buchstabencode abgekürzt.

Å	Angström
A. dest.	destilliertes Wasser
ADH(s)	Alkohol-Dehydrogenase(n)
Äq.	Äquivalente
Ar	Aryl
bp	Basenpaare
BSA	*N*,*O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid
CF_3-Aldol	5,5,5-Trifluoro-4-hydroxy-4-phenylpentan-2-on
CH_3-Aldol	4-Hydroxy-4-phenylpentan-2-on
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
de	Diastereomerenüberschuss (engl. *diastereomeric excess*)
DKR	Dynamisch-kinetische Racematspaltung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dr	Diastereomerenverhältnis (engl. *diastereomeric ratio*)
ε	Extinktionskoeffizient für NAD(P)H in [mM^{-1} cm^{-1}]
E. coli	*Escherichia coli*
ee	Enantiomerenüberschuss (engl. *enantiomeric excess*)
et al.	und andere (lat. *et alii*)
FGZK3	Ganzzellkatalysator 3 aus Hochzelldichte-Fermentation
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
fw	vorwärtsgerichtet (engl. *forward*)
g	Gravitationskonstante [9,81 m $(s^2)^{-1}$]
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
GZK(s)	Ganzzellkatalysator(en)
HPLC	*High Pressure Liquid Chromatography* (engl.)
HSDH	Hydroxysteroid-Dehydrogenase(n)
HZD	Hochzelldichte-Fermentation
IB	Einschlusskörper/Proteinaggregate (engl. *inclusion bodies*)
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KR	Kinetische Racematspaltung
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
Lsg.	Lösung
MALDI-TOF	*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight* (engl.)

m	*meta*
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NAD^+/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert/reduziert)
$NADP^+$/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert/reduzier)
NMR	Kernrmagnetische Resonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*)
NOX	NAD(P)H-Oxidase
NTA	Nitriloessigsäure
o	*ortho*
OD	optische Dichte
p	*para*
p. A.	*per analysis* (engl.)
P. pastoris	*Pichia pastoris*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
QPCR	QuikChange® PCR
rac	racemisch
rel.	relativ(e)
rev	rückwärtsgerichtet (engl. *reverse*)
RE	Rohextrakt
R_f	Retentionsfaktor
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RT	Raumtemperatur
SDR	*short-chain* dehydrogenase/reductase (engl.)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*engl*. *sodium dodecyl sulfate*)
spez.	spezifisch(e)
TB	Terrific Broth (Nährmedium)
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TCA	Trichloressigsäure
t_R	Retentionszeit
T_m	Schmelztermperatur in [° C]
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	*unit* (engl.) = Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
ÜK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
vol.	volumetrisch(e)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
ZFM	Zellfeuchtmasse
δ	Chemische Verschiebung in [ppm]

1. EINLEITUNG

1.1 Enzyme in der Biotechnologie

Der Begriff der Biotechnologie scheint eine neuartige und moderne Technik unserer Zeit zu beschreiben, jedoch ist die Anwendung der Biotechnologie schon sehr alt. Bereits 6000 v. Chr. wurde aus gekeimter Gerste ein alkoholhaltiges bierähnliches Getränk gebraut. Ebenso wurden unbewusst Mikroorganismen für die Herstellung von Lebensmitteln wie Wein, Sauerteigbrot oder Käse verwendet.[1] Einige wichtige klassische Methoden nutzen Hefen für die Herstellung alkoholhaltiger Getränke wie Wein und Bier durch Vergärung zuckerhaltiger Lebensmitteln, des weiteren kommen *Lactobacillus*-Stämmen für die Milchsäuregärung sowie spezielle *Acetobacter*-Spezies zur Essigherstellung zum Einsatz.[2]

In den damaligen Anfängen der Biotechnologie wurden unbewusst lebende Mikroorganismen verwendet, heutzutage basieren alle bekannten industriellen Prozesse auf den Einsatz von Enzymen- sei es mit Hilfe von ruhenden oder wachsenden Ganzzell-Systemen oder isolierten Enzymen. Für die industrielle Biotechnologie werden diese biologischen Systeme oder Enzyme allgemein für die Verbesserung industrieller, chemischer Synthesen, für die Herstellung von industriell relevanten Produkten sowie der Produktion alternativer Energien (Biokraftstoffe) und Biomaterialien eingesetzt. Allgemein steigt der Anteil an biotechnologisch hergestellten Produkten von Jahr zu Jahr an, wobei der weltweite Umsatz in der chemischen Industrie im Jahr 2004 bei fünf Prozent lag und Prognosen eine 2-4 fache Steigerung des Umsatzes für die weiteren Jahre vorhersagten.[3] Die Biotech-Branche ist deutschlandweit im Aufschwung, sodass der Umsatz der 593 deutschen dedizierten Biotech-Firmen im Jahr 2015 auf 3,28 Mrd. Euro gestiegen ist (entspricht einem Plus von 8,6 % zum Vorjahr). Dabei legen 10,1 % der deutschen, biotechnologischen Unternehmen ihren Fokus auf die industrielle Biotechnologie, die am stärksten zugelegt hat (+14,3 %, 244,4 Mio. Euro).[4]

Das Anwendungsgebiet ist dabei sehr umfassend und vielfältig. Mit Hilfe von Biokatalysatoren werden beispielsweise Vorstufen für enantiomerenreine Pharmazeutika, Waschmittel, Lebensmittelzusätze, Fein- und Bulkchemikalien, Textilien oder auch Kosmetika produziert.[1,2,5–13] Einen besonderen Stellenwert nehmen Enzyme bzw. Biokatalysatoren im Bereich der Pharmaindustrie ein, da hier die Produktion von reinen Enantiomeren mittels chiraler Enzyme immer mehr an Bedeutung gewinnt.[14]

1.2 Enzyme als Biokatalysatoren für nachhaltige Chemie

Der wachsende Bedarf an umweltfreundlichen Prozessen in der chemischen Industrie ist weitgehend bekannt. Dieser Trend, der auch als „Grüne Chemie“ bekannt geworden ist, erfordert dabei einen Paradigmenwechsel von den traditionellen Konzepten der Prozesseffizienz, welche hauptsächlich auf die chemische Ausbeute fokussiert ist, hin zu Verfahren mit ökologischen Werten zur Eliminierung von Abfällen und Vermeidung von toxischen oder gefährlichen Substanzen.[15]

Die „Grüne Chemie“ ist definiert als „Design von chemischen Produkten und Prozessen zur Verminderung oder Eliminierung der Verwendung und Erzeugung gefährlicher Substanzen“ und wurde 1991 von Paul ANASTAS, der zu dieser Zeit bei der amerikanischen Umweltschutzbehörde EPA (*United States Environmental Protection Agency*) tätig war, und später auch von John WARNER maßgeblich geprägt. Diese konzipierten die „12 Prinzipien der grünen Chemie“, welche als Leitlinien für Chemiker zur nachhaltigen Herstellung von Chemikalien und chemischen Produkten dienen (Abbildung 1).[16–20] Viele dieser vorgeschlagenen Leitlinien können durch den Einsatz von Biokatalysatoren eingehalten werden.

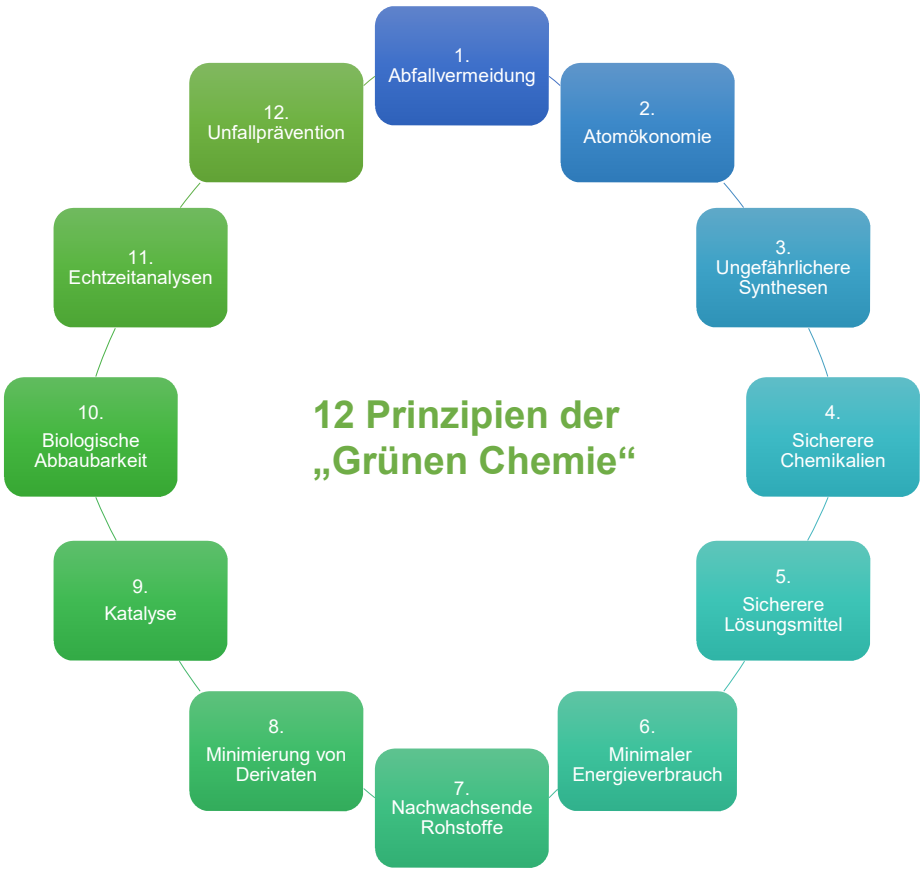


Abbildung 1: Die 12 Prinzipien der „Grünen Chemie“ nach ANASTAS & WARNER (1998).[16]

Die Biokatalyse wird hierbei gern als einer der Schlüsseltechnologien beschrieben und bietet demnach viele attraktive Eigenschaften im Zusammenhang mit der „Grünen Chemie“ wie z. B. milde Reaktionsbedingungen (physiologischer pH-Wert, Temperatur und Normaldruck), ein umweltverträglicher Katalysator (Zellen oder Enzyme) anstelle der Verwendung von Chemikalien, und die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel. Viele Enzyme zeigen hohe Aktivitäten auf, die sich mit chemischen Katalysatoren messen lassen können und sie weisen in aller Regel sehr hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivitäten in Molekülen mit mehreren, verschiedenen funktionellen Gruppen auf und übertreffen dabei sehr häufig chemische Katalysatoren. Durch den Einsatz von Enzymen kann auf Schritte wie Aktivierung funktioneller Gruppen oder die Einführung und Entfernung von Schutzgruppen, die in den klassischen, organischen Synthesen notwendig sind, verzichtet werden. Dadurch können Synthesen entwickelt werden, welche zum einen weniger Prozessschritte beinhalten und zum anderen weniger Abfall und höhere Ausbeuten produzieren, sodass deutliche Fortschritte in Hinblick auf ökonomische und ökologische Effizienz, Umweltfreundlichkeit, Qualität und Kostenreduzierung gegenüber klassisch-chemischen Syntheserouten erzielt werden können.[5,7,15]

Die Industrie hat längst das Potential von Mikroorganismen und deren Enzyme als Biokatalysatoren und ihre Vorteile gegenüber chemischen Katalysatoren erkannt, sodass enzymatische Syntheseschritte in bestehenden Produktionsprozesse implementiert oder bestehende chemische Prozesse durch biotechnologische Verfahren substituiert werden. Ein Beispiel für die Substitution einer klassisch-chemischen Synthese durch einen biotechnologischen, fermentativen Prozess für eine verbesserte Effizienz und Kostenreduzierung ist die Produktion von Vitamin B_2 (Riboflavin) zu nennen. Bis in die 90er Jahren wurde das Vitamin B_2 bei der BASF in einem achtstufigen überwiegend chemischen Syntheseprozess hergestellt. Wichtigster Ausgangsstoff war Glucose, welche zunächst biotechnologisch zu Ribose fermentiert wurde. Anschließend folgten chemisch-technische Prozessschritte unter Verwendung von umweltschädlichen Chemikalien und Säuren. Dieser Prozess wurde bei der BASF 1996 vollständig eingestellt und durch einen einstufigen Fermentierungsprozess mit dem Pilz *Ashbya gossypii* ersetzt. Dadurch konnten die entstehenden Abfälle um 95 % gesenkt und die Produktionskosten des Prozesses um bis zu 40 % reduziert werden.[2,21] Viele chemische Synthesen in der pharmazeutischen Industrie wurden durch biokatalytische Schritte ersetzt,[22] wodurch alte Synthesewege erneuert wurden.

Ein weiteres, besonders erfolgreiches Beispiel für die Substitution chemischer Syntheserouten durch Biokatalyse stellt die Optimierung der Sitagliptin-Synthese durch Merck und Codexis im Jahr 2010 dar, welche auch von der EPA mit dem

„*Green Chemistry Challenge Award*“ prämiert wurde. Bei Sitagliptin (Handelsname Januvia™) handelt es sich um einen wirksamen Arzneistoff zur Behandlung von *Diabetes mellitus* Typ 2 und gehört zu der Wirkstoffklasse der Inhibitoren der Serinprotease Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4). Die ursprüngliche chemische Synthese von Sitagliptin, ausgehend von Prositagliptin-Keton startet mit der Bildung eines Enamins, gefolgt von einer asymmetrischen Hydrierung bei Hochdruck (ca. 17 bar) mit Hilfe eines Rhodium-basierten chiralen Katalysators und einer Rekristallisation, um den *ee*-Wert zu steigern (Abbildung 2, links). Merck und Codexis planten eine Synthese-Variante, bei der dieser Prozess prinzipiell mit einer (*R*)-Transaminase durch direkte Aminierung des Prositagliptin-Ketons verbessert werden kann. Merck testete dazu primär kommerziell erhältliche Transaminasen auf Aktivität für das Prositagliptin-Keton, jedoch ohne Erfolg. Durch Koorperation mit Codexis wurde anschließend eine Transaminase, welche zuvor keine Aktivität gegenüber dem Prositagliptin-Keton zeigte, durch wiederholtes *Protein Engineering* und gerichtete Evolution zu einer Transaminase mit guter Aktivität verbessert. Die final-optimierte Transaminase-Variante konnte 200 g L^{-1} des Ketons zu Sitagliptin mit 99,95 % *ee* und 92 % Ausbeute umsetzen (Abbildung 2).[23] Mit diesem biokatalytischen Prozess konnte die Abfallmenge um 19 % reduziert und die Produktivität um 56 % gesteigert werden.[24]

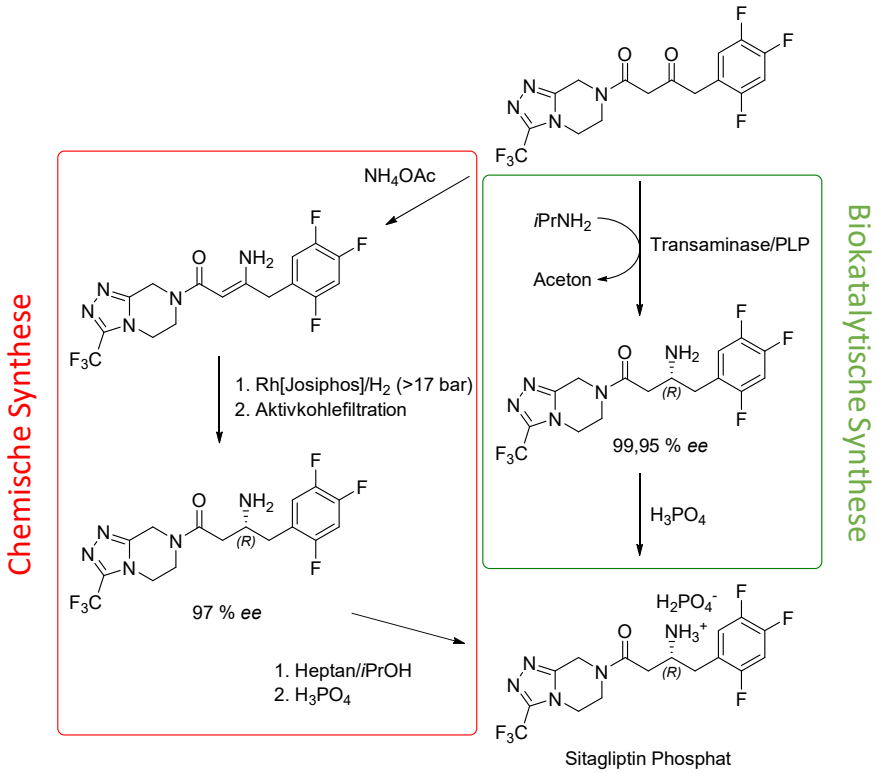


Abbildung 2: Chemische (links, rot) und biokatalytische Syntheserouten (rechts, grün) zu Sitagliptin nach SAVILE *et. al.*(2010).[23]

Im Jahr 2012 wurden Codexis und Prof. Yi TANG ebenfalls von der EPA für die Entwicklung eines effizienten biokatalytischen Prozesses für die Herstellung von Simvastatin ausgezeichnet. Simvastatin ist ein HMG-CoA-Reduktasehemmer und wird als Cholesterinsenker eingesetzt. Der Blockbuster-Wirkstoff wurde ursprünglich von Merck hergestellt und unter dem Handelsnamen Zocor® vertrieben. Simvastatin ist ein semi-synthetisches Derivat von Lovastatin und weist eine zusätzlichen Methyl-Gruppe an der C2'-Positon der Lovastatin-Seitenkette auf. Um eine Methyl-Gruppe in Lovastatin mit traditionellen Methoden einzuführen, werden viele chemische Teilschritte unter Verwendung toxischer Chemikalien wie *tert*-Butylchlordimethylsilan, Methyliodid und *n*-Butyllithium, benötigt. Die Gruppe um Prof. TANG identifizierte einen Biokatalysator, die Acyltransferase LovD, welche die regioselektive Acylierung der Simvastatin-Vorstufe unter Verwendung eines günstigen Acyl-Donors katalysiert. Codexis hat daraufhin den Biokatalysator hinsichtlich Aktivität, Stabilität und Produktinhibition durch gerichtete Evolution um ein 1000-faches verbessert.[25] Weitere Beispiele für biokatalytisch hergestellte Produkte sind z. B. Ephedrin (BASF), Nikotinamid (Lonza) und Cephalixin (DSM)[26]. Somit stellen Synthesen von enantiomerenreinen Substanzen durch unterschiedliche regio- und stereoselektive Transformationen, die von Enzymen katalysiert werden, eine attraktive Alternative zu unselektiven, chemischen Synthesen dar.[14] Die wichtigsten Schlüsselreaktionen in der organischen Synthese sind die enantioselektive Knüpfung von C-C-Bindungen,[27–29] die reduktive Aminierung von Keto-Verbindungen,[30] sowie die enantioselektiven Reduktion.[31,32]

1.3 Chirale Wirkstoffe und Bausteine

Einen besonderen Stellenwert nehmen Enzyme bzw. Biokatalysatoren im Bereich der Pharmaindustrie ein, da hier die Produktion von reinen Enantiomeren mittels chiraler Enzyme immer mehr an Bedeutung gewinnt.[6,14,33] Enantiomere sind Stereoisomere, deren räumliche Struktur sich wie Bild und Spiegelbild verhält. Sie unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer optischen Aktivität, während sie sich in ihren physikalischen Eigenschaften identisch verhalten. Dadurch, dass die geometrische Anordnung der Enantiomere spiegelbildlich ist, verhalten sie sich gegenüber anderen chiralen Molekülen lebender Systeme wie z. B. DNA, Hormone, Enzyme und Antikörper unterschiedlich. Ein ganz wesentlicher Unterschied ist allerdings, dass sie in vielen Fällen unterschiedliche biologische Wirkungen aufweisen, sodass ein Enantiomer einen pharmakologisch positiven Effekt ausübt, während das andere inaktiv oder im schlechtesten Fall eine toxische Wirkung aufweisen kann. Diese pharmakologischen

Unterschiede von Enantiomeren konnte erst durch das tragische Beispiel des Pharmazeutikums Thalidomid (auch bekannt unter dem Handelsnamen Contergan) identifiziert und verstanden werden. Thalidomid wurde Ende der 1950er-Jahre als racemisches Gemisch auf den Markt gebracht, sodass beide Enantiomere im gleichen Verhältnis vorlagen. Es zeigte sich, dass das (*R*)-Enantiomer die gewünschte, positive Wirkung als Schlaf- und Beruhigungsmittel hervorruft, jedoch das (*S*)-Enantiomer Fehlbildungen bei Ungeborenen verursachte (Abbildung 3A.).[34–36]

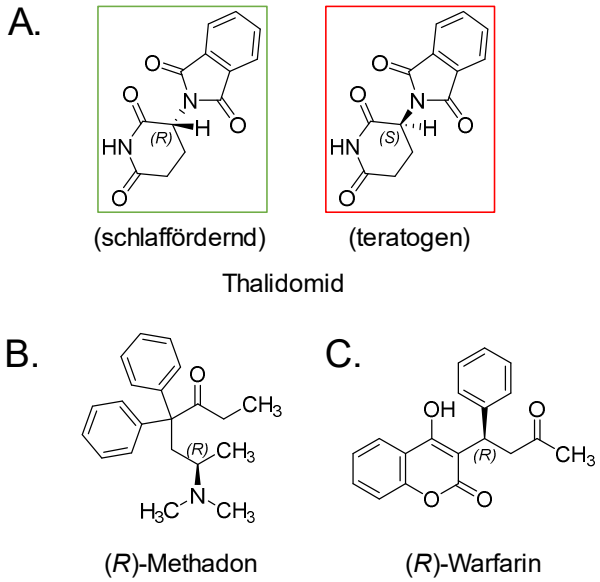


Abbildung 3: Die Enantiomere von Thalidomid mit unterschiedlichen biologischen Aktivitäten (A.) sowie (*R*)-Methadon (B.) und (*R*)-Warfarin (C.).

Weitere Beispiele für chirale Wirkstoffe, deren Enantiomere unterschiedlich wirken sind z. B.:

- Methadon: ein zentral-wirkendes Analgetikum mit hoher Affinität für μ-Opiodrezeptoren. Es wird als Substitutionsmittel für die Behandlung von Heroinabhängigkeit und zur Schmerzlinderung bei Krebs als racemisches Gemisch eingesetzt. Das (*R*)-Enantiomer ist dabei 25-50-fach wirksamer als das (*S*)-Enantiomer.[37–41]

- Warfarin: ist ein Antikoagulant, das zur Behandlung oder Vorbeugung von Gefäßverschlusskrankheiten wie z. B. Thrombosen ebenfalls als racemisches Gemisch eingesetzt wird. Die Enantiomere des Warfarins unterscheiden sich besonders hinsichtlich ihrer Halbwertszeiten aufgrund unterschiedlicher Abbauwege und ihrer antikoagulatorischen Wirksamkeit.[42–44]

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften wie z. B. der Wirksamkeit von Enantiomeren chiraler Verbindungen wurden im Jahre 1992 strenge Vorschriften zur Einführung neuer chiraler Wirkstoffe durch die amerikanischen Behörde *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA) der Pharmaindustrie auferlegt. Vor der Einführung eines neuen Pharmawirkstoffs muss die physiologische Wirkung jedes Enantiomers als auch der racemischen Mischung untersucht und charakterisiert werden. Seit 1997 empfiehlt die FDA die Umstellung racemischer Wirkstoffe auf enantiomerenreine Wirkstoffe („*Chiral Switch*“) und bietet im Gegenzug verkürzte Zulassungsverfahren an.[45] Als Konsequenz wurde die Herstellung von Racematen deutlich gesenkt, welche durch eine Analyse von Wissenschaftlern der Pharmakonzerne AstraZeneca, GlaxoSmithKline und Pfizer im Jahr 2006 bestätigt wurde: Von 128 analysierten Verbindungen wiesen 69 (54 %) mindestens ein Stereozentrum auf, 67 dieser chiralen Verbindungen wurden als einzelnes Enantiomer und nur zwei Verbindungen als Racematen hergestellt.[46]

Chirale Verbindungen werden nicht nur für die Herstellung pharmazeutisch-relevanter Wirkstoffe gebraucht, sondern auch als Vorstufen bzw. Bausteine, sogenannte „*Building Blocks*“ für die Synthese und den Aufbau komplexerer Moleküle verwendet. Chirale Alkohole spielen dabei für die Einführung von Chiralität in Zielverbindungen eine wichtige Rolle und werden als Intermediate für die Synthese von chemischen Katalysatoren, Flüssigkristallen, Agrochemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt.[47,48] Viele Chemieunternehmen weisen ein weites Produktportfolio auf und produzieren eine Vielzahl chiraler Alkohole wie z. B. SIGMA-ALDRICH, wo chirale Alkohole den größten Anteil bei den organischen, chiralen „*Building Blocks*“ einnehmen (Abbildung 4).[49] Es werden hauptsächlich drei Verfahren verwendet, um chirale Alkohole zu produzieren:

1) „*Chiral Pool*“: Chirale Verbindungen werden aus natürlichen Quellen verwendet und deren natürliche Enantiomerenreinheit ausgenutzt. Hierbei dienen z. B. Aminosäuren, Kohlenhydrate, Terpene oder Alkaloide als Ausgangsstoffe,

2) Racematspaltung: Unselektive Synthese mit anschließender Abtrennung des unerwünschten Enantiomeren durch Kristallisation oder chromatographischen Methoden,

3) Asymmetrische Synthese: Prochirale Verbindungen werden selektiv chemisch mit Hilfe von Übergangsmetall- oder chiralen Katalysatoren sowie biokatalytisch (Enzyme, Ganzzellkatalysatoren, Mikroorganismen) zu enantiomerenreinen Produkten umgesetzt.

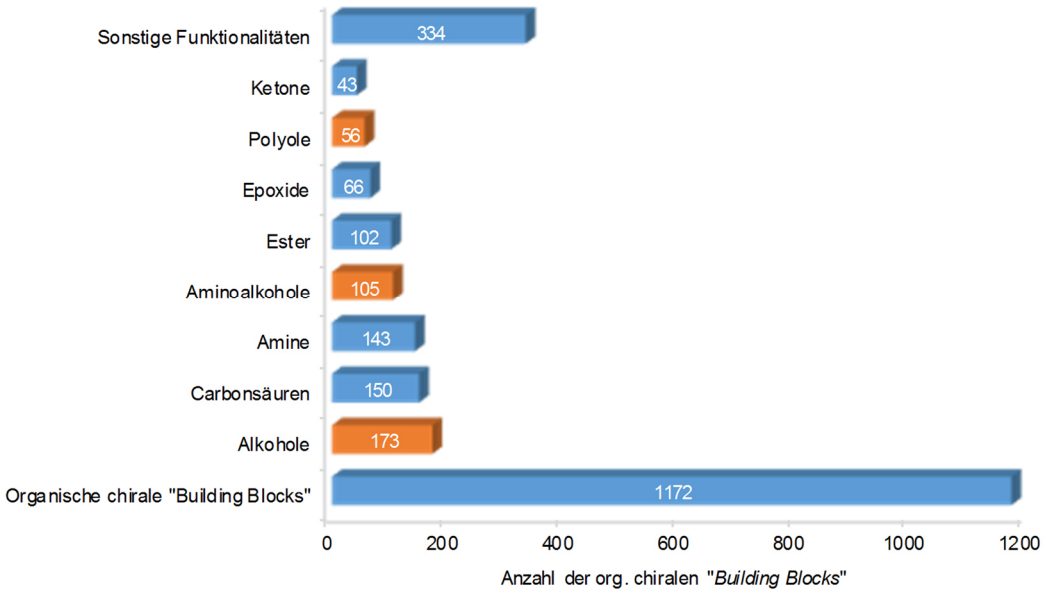


Abbildung 4: Chirale Alkohole machen in der Produktgruppe organische, chirale „*Building Blocks*“ den größten Anteil bei SIGMA-ALDRICH aus.[49]

Die stereoselektive Synthese von 1,3-Diolen ist derzeit von besonderem Interesse in der Organischen Chemie, da dieses Motiv häufig als *syn*- oder *anti*-Isomer in einer großen Vielzahl von natürlichen Produkten zu finden ist.[50]

1.4 Synthesestrategien zur Darstellung von chiralen 1,3-Diolen

Ein sehr häufig auftretendes Strukturmotiv sind chirale 1,3-Diole,[50] die charakteristische Teilstrukturen von diversen Makrolidantibiotika sind wie z. B. Amphotericin B,[51] Nystatin A1,[52,53] und Mycoticin A,[54–57] welche zur Behandlung von Pilzinfektionen eingesetzt werden (Abbildung 5, A.-C.). Weitere biologisch aktive Moleküle mit chiralen 1,3-Diolbausteinen lassen sich in vielen HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren wie z. B. Atorvastatin,[58,59] Rosuvastatin,[60–63] oder Compactin,[64,65] finden und werden zur Cholesterol-Senkung eingesetzt (Abbildung 5, D.-F.). Aufgrund der Wichtigkeit dieser 1,3-Diole als chiraler Bausteine wurden eine Vielzahl von chemischen und biokatalytischen Verfahren wie z. B. asymmetrische homogene und heterogene Hydrierung und diastereoselektive Reduktion mit Hilfe von Metallkatalysatoren, Desymmetrisierung über Kettenverlängerung, Prins-Reaktion, Iod-Carbonylierung und stereoselektive Aldol-Tishchenko-Reaktion zur stereoselektiven Synthese von 1,3-Diolen entwickelt. Eine ausführliche Übersicht der genannten Synthesestrategien von 1,3-Diolen wurde von BODE *et al.* zusammengestellt.[66]

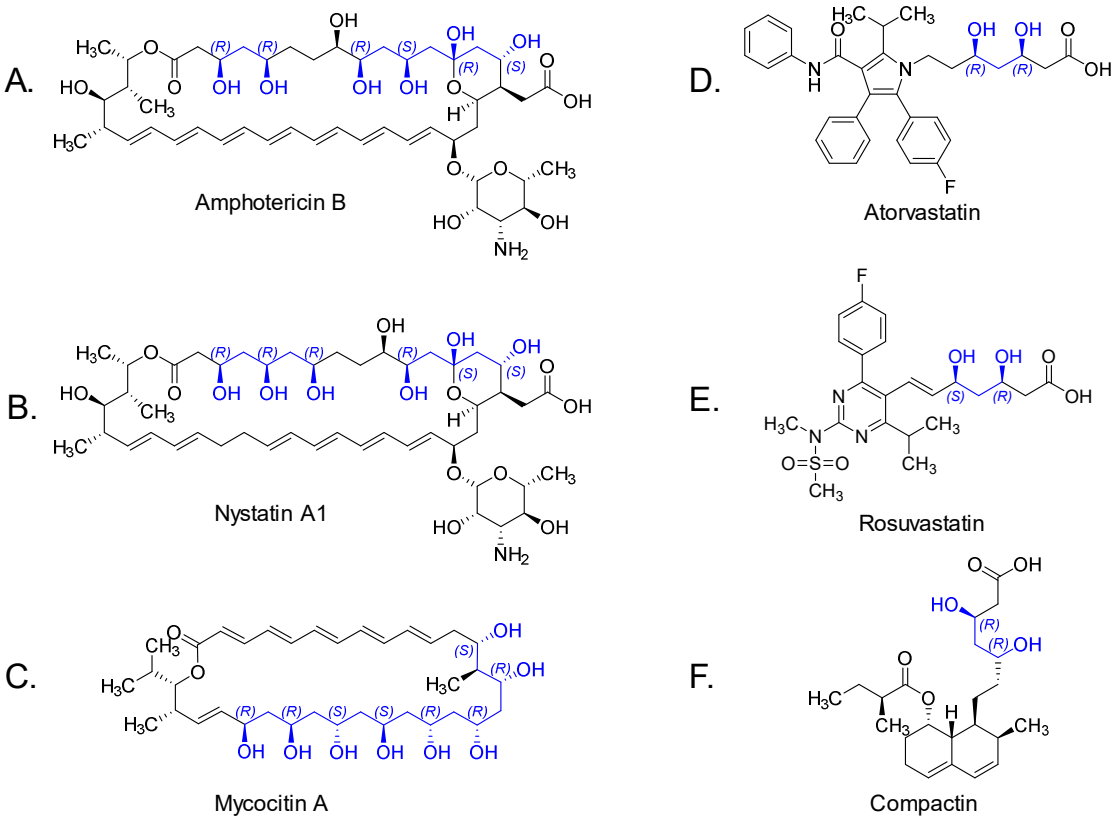
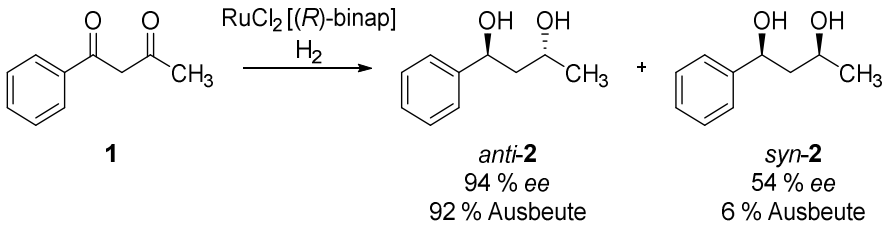


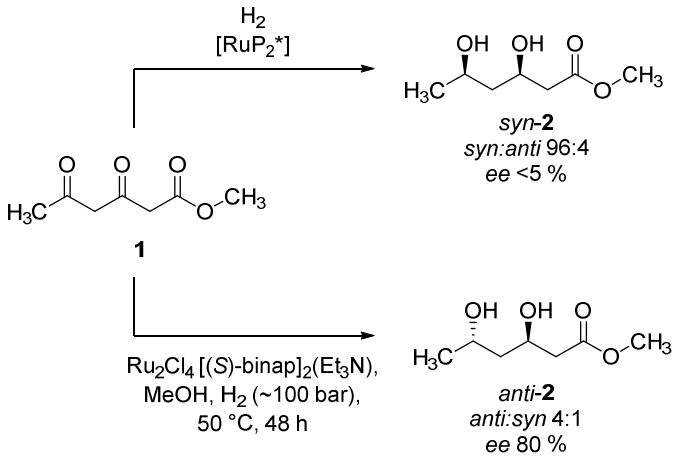
Abbildung 5: Biologisch aktive Moleküle mit chiralen 1,3-Diol-Motiven.

Eine klassisch-chemische Methode stellt dabei die stereoselektive Hydrierung von symmetrischen und unsymmetrischen 1,3-Diketonen dar, welche 1988 von NOYORI *et al.* und SABURI *et al.* publiziert wurde und die direkte Synthese beider Stereozentren in einem Schritt mit Hilfe des Ruthenium-Chlor-BINAP-Komplex katalysiert.[67,68] Die Hydrierung des 1,3-Diketons **1** führte hauptsächlich zum *anti*-Diol **2** mit 92 % Ausbeute und 94 % *ee* und geringen Mengen des *syn*-Diols (Schema 1).



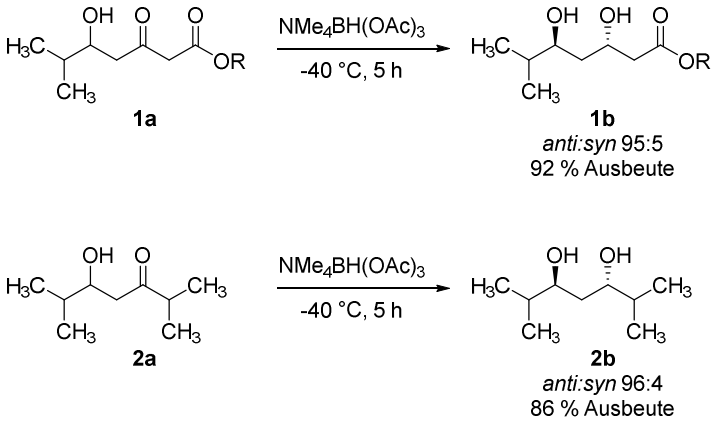
Schema 1: Asymmetrische Hydrierung von 1,3-Diketonen zu *anti*-Diolen mit einem Ruthenium-BINAP-Komplex nach NOYORI *et al.*[67]

Die Ruthenium-katalysierte Synthese von *syn*-1,3-Diolen stellte sich als schwierig heraus, konnte aber mit Hilfe geänderter Chelatliganden am Zentralmetall sowie harschen Reaktionsbedingungen (60 °C, 100-130 bar H_2, 18-235 h) realisiert werden, wobei die *syn*-Produkte nur mit geringen Enantiomerenüberschüssen erhalten wurden.[66,69] So konnte das Methyl-3,5-dioxohexanoat (**1**) zum *syn*-Diol **2** umgesetzt werden, jedoch mit einem geringen *ee*-Wert von <5 % (Schema 2).[70]



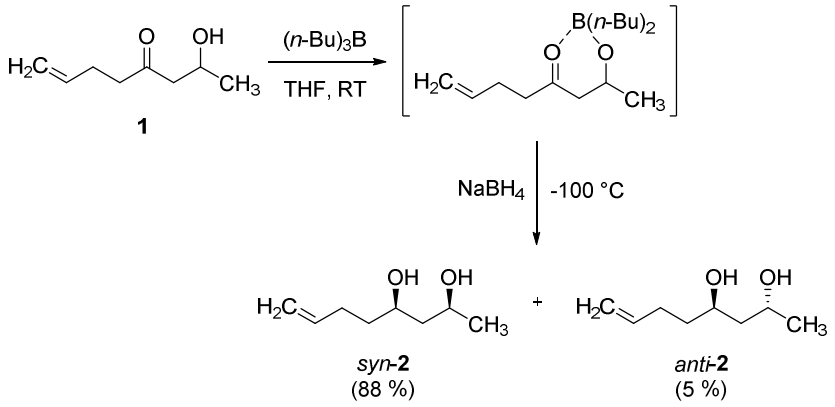
Schema 2: Asymmetrische Hydrierung von Methyl-3,5-dioxohexanoat **1** mittels Ruthenium-Katalysatoren.[69,70]

Eine weitere chemische Methode, um zu chiralen 1,3-Diolen zu gelangen, stellt die stereoselektive Reduktion von 1,3-Diketonen oder β-Hydroxyketonen dar, die je nach eingesetzten Reagenzien oder Reaktionsbedingungen selektiv *syn*- oder *anti*-Diole hervorbringt.[66] Mit Hilfe von Borhydriden als Reduktionsmittel, wie z. B. Tetramethylammoniumtriacetoxyborhydrid ($NMe_4BH(OAc)_3$), können selektiv *anti*-1,3-Diole wie **1b** und **2b** in guten bis exzellenten Ausbeuten erhalten werden (Schema 3).[71,72]



Schema 3: Diastereoselektive Reduktion von β-Hydroxyketonen mit $NMe_4BH(OAc)_3$.[71]

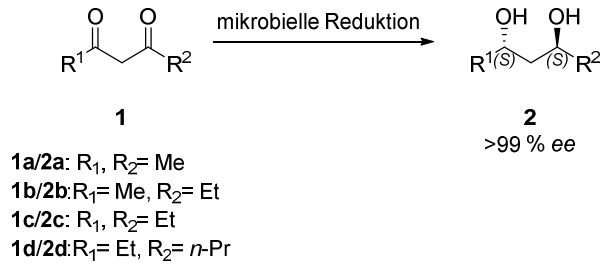
Die wohl am häufigsten angewandte Methode für eine *syn*-selektive Reduktion von β-Hydroxyketonen wurde von NARASAKA und PAI entwickelt und basiert auf einer Vororientierung des Substrats durch chelatisierende Additive, wie z. B. Tributylboran, sodass ein intermolekularer Hydridtransfer und die damit einhergehende Bildung des *syn*-Produkts begünstigt wird (Schema 4).[73,74] Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist der stöchiometrische Einsatz von Boranen als Additive sowie die Durchführung der Reaktion bei extrem niedrigen Temperaturen.



Schema 4: *Syn*-selektive Reduktion von 2-Hydroxy-7-octen-4-on (**1**) nach Umsetzung mit Tributylboran.[73]

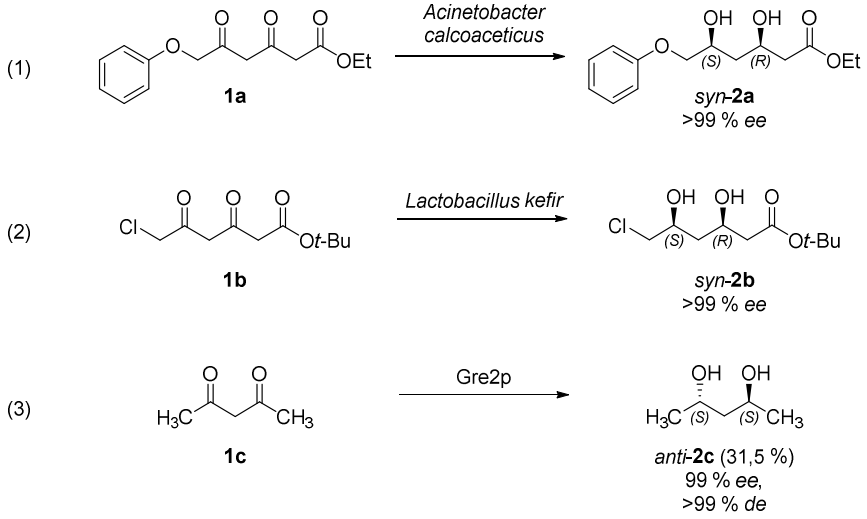
Neben diesen vorgestellten klassisch-chemischen Methoden, die unter harschen Reaktionsbedingungen und unter Einsatz von ökologisch bedenklichen Chemikalien durchgeführt werden, bieten Biotransformationen einen alternativen Zugang zu chiralen 1,3-Diolen.

Die gängigsten biokatalytischen Methoden stellen die Reduktion von 1,3-Diketonen oder β-Hydroxyketonen dar. Die enzymatische Reduktion von 1,3-Diketonen führt dabei selten zu 1,3-Diolen, da in den meisten Fällen nur eine der beiden Keto-Gruppen reduziert und folglich das β-Hydroxyketon erhalten wird.[75–78] Die Reduktion der zweiten Keto-Gruppe erfolgt entweder sehr langsam oder gar nicht. Daraufhin führten FAUVE und VESCHEMBRE *Screening*-Studien durch, die zur Identifizierung der Hefe *Mortierella isabellina* sowie dem Bakterium *Clostridium tyrobutyricum* führten, welche die zweifache Reduktion von 2,4-Pentandion **1a** und weiteren 1,3-Diketonen (**1b**-**d**) zu ausschließlich (*S*,*S*)-1,3-Diolen **2a**-**d** katalysierten (Schema 5).[79] Später konnten IKEDA *et al.* zeigen, dass die Hefe *Pichia farinosa* 2,4-Pentandion zu (2*R*,4*R*)-Pentandiol mit 94 % Ausbeute und >99 % *ee* und 98 % *de* reduziert.[80] Die biokatalytische Darstellung von *syn*-Diolen konnte nur realisiert werden, wenn die 1,3-Diketo-Gruppe als Teilstruktur eines Ketoesters auftritt.



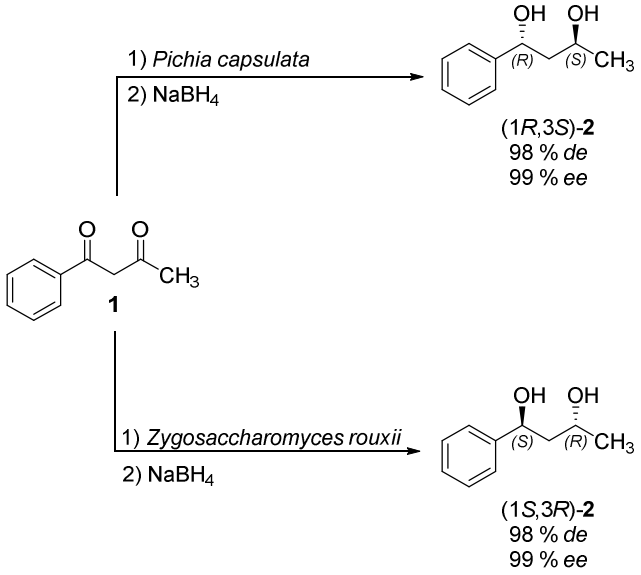
Schema 5: Mikrobielle Reduktion von azyklischen 1,3-Diketonen.[79]

So konnte in der Arbeitsgruppe von PATEL die Reduktion des Benzyloxy-substituierten β,δ-Diketoethylesters (**1a**) mit Hilfe des Rohextrakts von *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13876 zum Ethylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**2a** erreicht werden (1. Reaktionsgleichung, Schema 6). Daraufhin wurde eine NAD(H)-abhängige Reduktase aus dem Rohextrakt von *A. calcoaceticus* isoliert, welche die Doppelreduktion katalysiert und das enantiomerenreine *syn*-Produkt **2a** liefert.[81] Ein weiteres Beispiel für eine hochenantio- und diastereoselektive Doppelreduktion wurde von WOLBERG *et. al.* mit Hilfe von *Lactobacillus kefir*-Zellen erreicht, wobei der chlorinierte Diketoester **1b** zum Doppelreduktionsprodukt *syn*-(3*R*,5*S*)-**2b** mit >99 % *ee* und einem *dr* von 135:1 (*syn*:*anti*) reduziert wurde (2. Reaktionsgleichung, Schema 6).[82] Hierbei ist anzumerken, dass die Doppelreduktion von zwei verschiedenen Reduktasen in den *L. kefir*-Zellen katalysiert wird. Eine enzymatische Doppelreduktion des 1,3-Diketons 2,4-Pentandion (**1c**) unter Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase Gre2p liefert das *anti*-Diol (2*S*,4*S*)-**2c** mit 99 % *ee* und >99 % *de* zusammen mit dem Mono-reduzierten (4*S*)-Hydroxy-2-pentanon (3. Reaktionsgleichung, Schema 6).[83]



Schema 6: Reduktion von 1,3-Diketoestern zu *syn*- und *anti*-Produkten.[81–83]

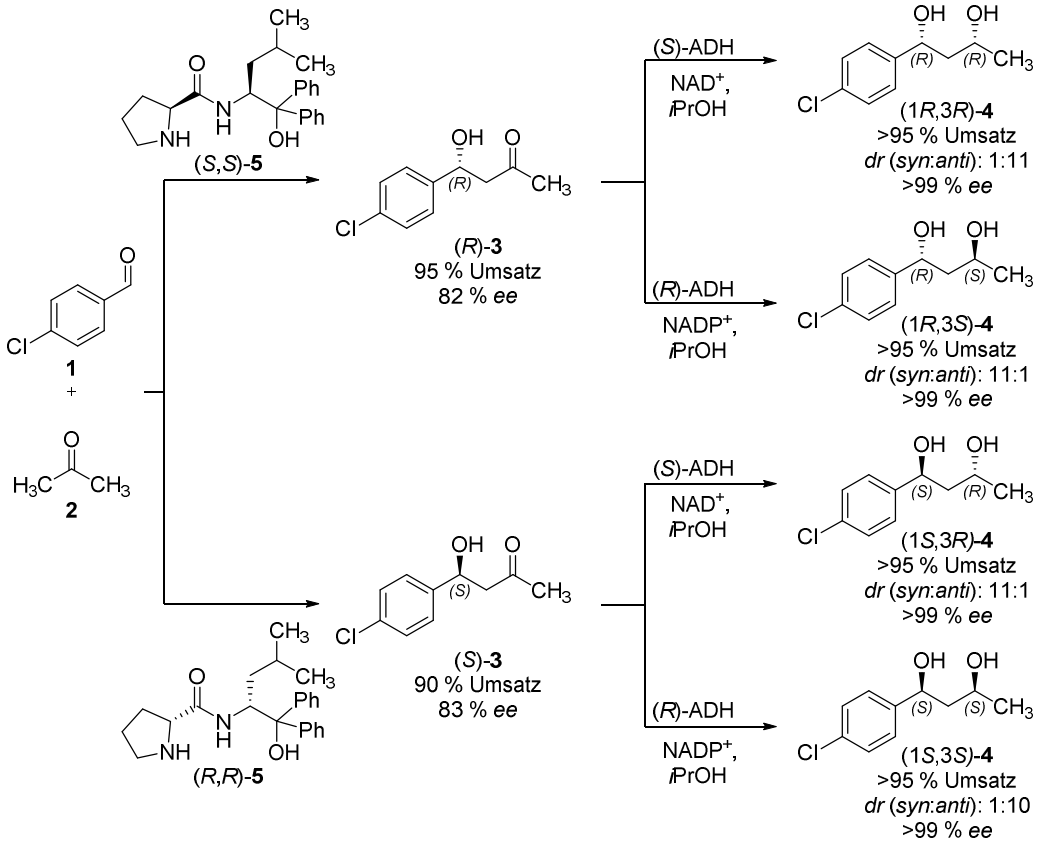
Wie zuvor erwähnt, werden 1,3-Diketone als Substrate enzymatisch überwiegend zu Hydroxyketonen reduziert. Um dennoch von prochiralen 1,3-Diketonen zu chiralen 1,3-Diolen zu gelangen, entwickelte die Gruppe um OAZI eine Eintopfreaktion, die im ersten Schritt eine enzymatische und im 2. Schritt eine chemische Reduktion beinhaltete. Mit Hilfe von Oxidoreduktasen unterschiedlicher Mikroorganismen mit komplementären Selektivitäten bezüglich der Keto-Funktion an Position C-3 wird das prochirale Diketon 1-Phenyl-1,3-butandion enantioselektiv zu (*R*)- oder (*S*)-3-Hydroxy-1-Phenyl-1-Butanon mit >99 % *ee* reduziert. Anschließend erfolgte die Reduktion der 2. Keto-Funktion an Position C-1 klassisch-chemisch mit Natriumborhydrid im gleichen Ansatz als Eintopfreaktion, wobei die *anti*-Produkte **2** in guten Ausbeuten (70-75 %) sowie exzellenten Stereoselektivitäten (99 % *ee*, 98 % *de*) erhalten werden (Schema 7).[84]



Schema 7: Enzymo-chemische Reduktion von 1-Phenyl-1,3-butandion **1**.[84]

Ein alternatives Beispiel einer chemoenzymatischen Reaktionsführung, welche den Zugang zu allen vier Stereoisomeren des 1,3-Diols **4** (Schema 8) bietet, wurde von BAER *et al.* (2009) beschrieben. Mit Hilfe eines modularen Konzepts, bestehend aus einer asymmetrischen Aldolreaktion (ausgehend von 4-Chlorobenzaldehyd **1** und Aceton **2**) und anschließender diastereoselektiven Biotransformation (Reduktion des β-Hydroxyketons **3**), werden die zwei Stereozentren nacheinander aufgebaut.[85] Dieses modulare System bietet den Vorteil, dass je nach eingesetztem Organokatalysator und Biokatalysator die gezielte Darstellung eines der vier möglichen Stereoisomere des 1,3-Diols ermöglicht wird (Schema 8). Nachdem gute Ergebnisse mit dem modularen System von BAER *et. al.* erreicht wurden, konnte die organokatalysierte Aldolreaktion

(in trockenem Aceton) mit einer nachgeschalteten biokatalytischen Reduktion als sequentielle Eintopfreaktion ohne Isolierung des Zwischenprodukts **3** realisiert und das Diol (1*R*,3*S*)-**4** mit >99 % *ee* und einem *dr* von 1:10 (*syn*:*anti*) isoliert werden.[85] In der gleichen Arbeitsgruppe konnten RULLI *et al.* diese Synthesestrategie auf 3-Chlorbenzaldehyd als Aldolakzeptor übertragen und weiter optimieren, sodass dies als erste chemoenzymatische, sequentielle Eintopfreaktion, in der beide Reaktionsschritte in wässrigem Medium durchgeführt wurden, angesehen werden kann. Die chiralen 1,3-Diole konnten mit bis zu 89 % produkt-bezogenem Umsatz, Diastereomerenverhältnisse von >25:1 und exzellenten Enantioselektivitäten mit >99 % in der sequentiellen Eintopfsynthese erhalten werden.[86]



Schema 8: Chemoenzymatische Synthese zur Darstellung der vier möglichen Stereoisomere des 1,3-Diols **4** nach BAER *et al.*.[85]

Weitere enzymatische Synthesestrategien zur Darstellung von 1,3-Diolen basieren auf den Einsatz von C-C-knüpfenden Enzymen wie z. B. der 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase (DERA), die die asymmetrische Tandem-Aldolreaktion ausgehend von günstigem Acetaldehyd und einem Aldehyd-Akzeptor zu einer Statin-Vorstufe (Trideoxypyranose) mit >99,5 % *ee* und 96,6 % *de* katalysiert.[87] Alternativ können

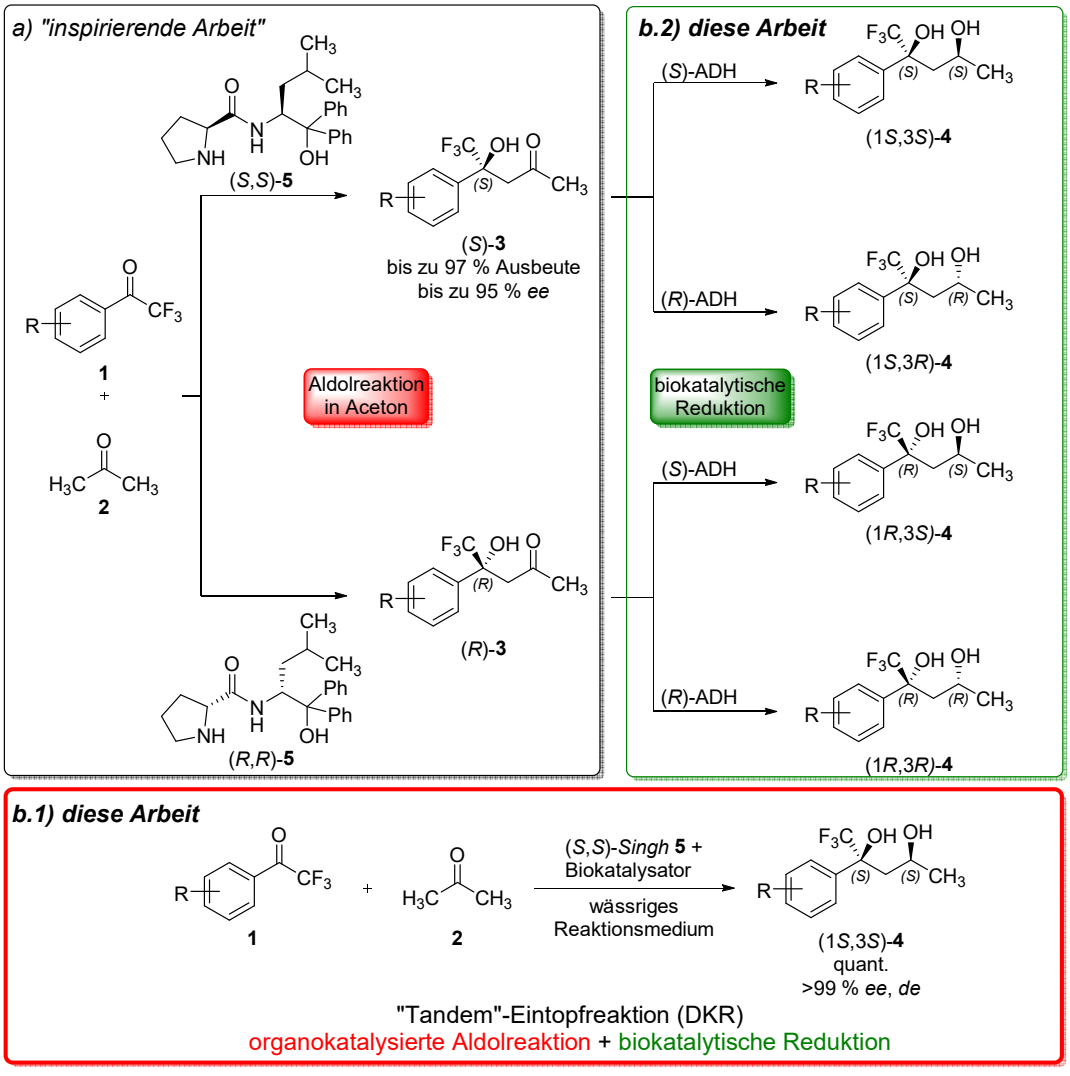
hydrolytische Enzyme wie z. B. Lipasen verwendet werden, um racemische 1,3-Diole im Zuge einer selektiven Acetylierung eines Enantiomeren in nicht-racemische 1,3-Diole mit einer maximalen Ausbeute von 50 % zu überführen (kinetische Racematspaltung). Wird die enantioselektive Acetylierung mit einer *in situ* Racemisierung des nicht-umgesetzten Enantiomers gekoppelt, können theoretische Ausbeuten von 100 % im Zuge einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR) erreicht werden.[66,88]

1.5 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits erwähnt publizierten die Gruppen um GRÖGER und BERKESSEL eine sequentielle „Ein-Topf-Zwei-Schritt"-Reaktion, welche die organokatalysierte Aldoladdition von Aceton an aromatische Aldehyde mit einer nachgeschalteten biokatalytischen Reduktion kombinierte. Ausgehend von prochiralen Ausgangsverbindungen konnten sekundäre, chirale 1,3-Diole enantiomerenrein erhalten werden.[85,86] Im Jahr 2012 publizierten die gleichen Gruppen eine hocheffiziente Aldoladdition von Aceton **2** an aromatischen Trifluormethylketonen **1** mit Hilfe des *Singh*-Katalysators **5**, wobei β-Hydroxyketone **3** in exzellenten Ausbeuten und Selektivitäten erhalten wurden (Schema 9, a)).[89]

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst einen geeigneten Biokatalysator (Alkohol-Dehydrogenase) zu finden, der in der Lage ist das chirale trifluormethylierte β-Hydroxyketon **3** effizient zum korrespondierenden 1,3-Diol zu reduzieren. Ein wichtiges Kriterium hierbei ist, dass der Biokatalysator das erste Stereozentrum, welches im Zuge der Aldolreaktion gebildet wird, selektiv erkennt und nur ein Enantiomer im Zuge einer kinetischen Racematspaltung (KR) zum 1,3-Diol reduziert. Die Reduktion der Keto-Gruppe zum Alkohol durch den Biokatalysator sollte dabei ebenfalls hochspezifisch verlaufen, sodass als Resultat eines der vier möglichen 1,3-Diole enantiomeren- als auch diastereomerenrein erhalten werden soll. Bei erfolgreicher Identifizierung eines neuen Biokatalysators, soll dieser umfassend biochemisch charakterisiert werden. Kann der Biokatalysator die zuvor genannten Anforderungen erfüllen, sollte im nächsten Schritt die Aldolreaktion von Trifluoracetophenon und Aceton mit der biokatalytischen Reduktion als „Tandem"-Eintopfsynthese kombiniert werden (Schema 9, b.1). Durch diese Weiterentwicklung soll der Isolierungsschritt nach der Aldolreaktion eingespart und der Verbrauch an Chemikalien reduziert werden. In Hinblick auf Nachhaltigkeit und Kompatibilität sollen beide Schritte in wässrigen Milieu durchgeführt werden. Aus Arbeiten von SINGH *et al*. ist bekannt, dass die Aldolreaktion mit dem *Singh*-Katalysator auch vollständig in Wasser ablaufen kann.[90] Da die Aldolreaktion reversibel ist und

mechanistische Studien von RULLI *et al.* eine Racemisierung des Aldolprodukts vermutlich durch eine Retro-Aldolreaktion zeigten,[91] soll die Kombination mit dem selektiven Biokatalysator im Gesamtprozess als dynamisch-kinetische Racematspaltung durchgeführt und damit versucht werden, das gewünschte Diol in hohen Ausbeuten (theoretisch bis zu 100 %) zu erhalten (Schema 9, b.1). Dieses Ziel soll durch Veränderung und Optimierung der Reaktionsparameter der Einzelreaktionen beispielsweise Katalysatormenge, Reaktionszeit und Acetonmenge erreicht werden. Weiterhin soll das Konzept auf weitere Aldolakzeptoren übertragen und das Substratspektrum erweitert werden. Zusätzlich soll der Zugang zu allen vier Stereoisomeren des 1,3-Diols **4** als „*proof of concept*“ durch sequentielle Variation des Organokatalysators **5** sowie des Biokatalysators ((*R*)- oder (*S*)-spezifische ADH) gezeigt werden (Schema 9, b.2).



Schema 9: Geplante „Tandem“-Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole durch Kombination von Organo- und Biokatalyse.

1.5.1 Stand der Wissenschaft: Asymmetrische organokatalysierte Aldolreaktionen (Schritt 1)

Eine der wichtigsten Schlüsselreaktionen in der organischen Synthese ist die enantioselektive Knüpfung von C-C-Bindungen.[27–29] Nach der „Wiederentdeckung“ von Prolin als Organokatalysator für die asymmetrische Aldolreaktion im Jahr 2000 durch LIST, LERNERS und BARBAS III fand eine rasante Entwicklung auf dem Gebiet der Organokatalyse statt.[92] Dies ist nicht verwunderlich, da Organokatalysatoren viele Vorteile bieten: sie sind meist sehr robust, relativ leicht zugänglich, kostengünstig herzustellen und nicht toxisch.[93,94] So basieren die meisten Organokatalysatoren auf natürlich-vorkommenden chiralen Molekülen wie z. B. Aminosäuren (Prolin,[95–97] Phenylalanin,[98]), Sacchariden (D-Fructose,[99]) oder Naturstoffen wie Cinchona-Alkaloide,[100] oder Weinsäure (Abbildung 6).[101]

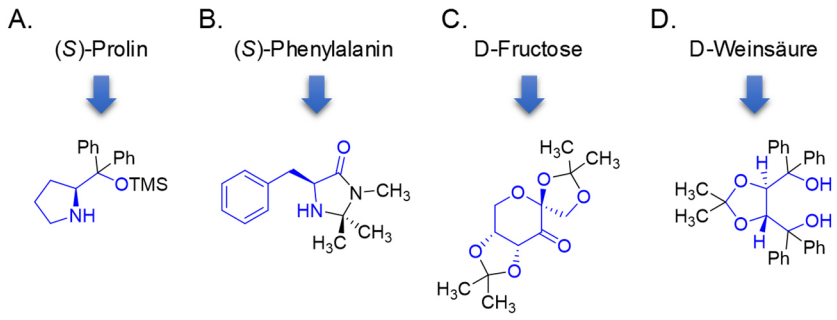
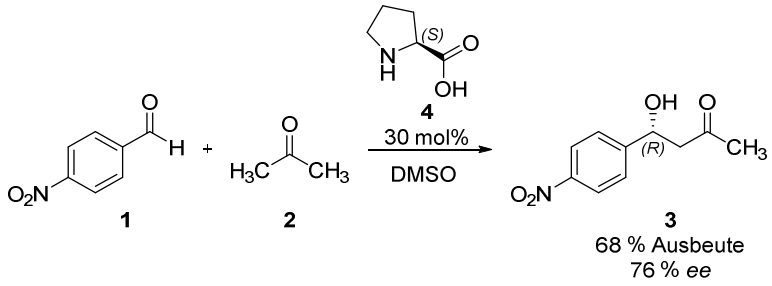


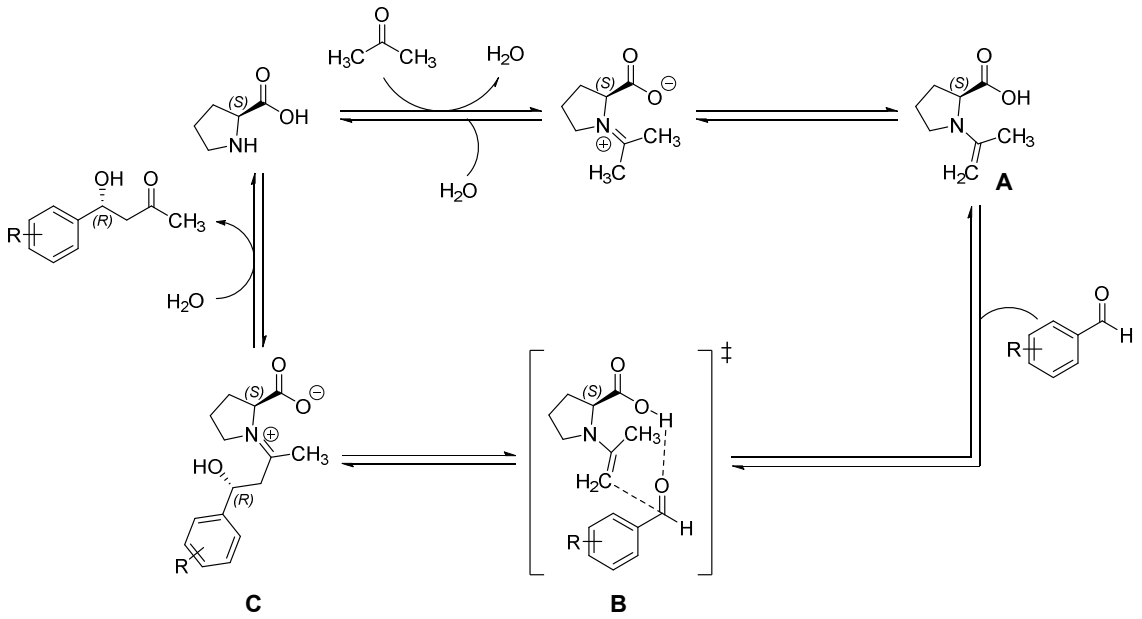
Abbildung 6: Organokatalysatoren, welche auf natürlich-vorkommenden chiralen Molekülen basieren. A. Diphenylprolinolsilylether,[97] B. Imidazolidinon,[98] C. Hydropyranon,[99] D. TADDOL.[101]

Das mit am häufigsten zu findende Strukturmotiv in Organokatalysatoren ist Prolin, welches erstmals 1971 als katalytisch wirksame Aminosäure für die enantioselektive intramolekulare Aldolreaktion eingesetzt wurde.[102] Erst durch Pionierarbeiten im Jahr 2000 konnten LIST, LERNER und BARBARS III zeigen, dass Prolin auch als Katalysator für die asymmetrische intermolekulare Aldoladdition von Aceton (**2**) zu Aldehyden wie 4-Nitrobenzaldehyd (**1**) eingesetzt werden kann (Schema 10). Das Aldolprodukt (*R*)-**3** (Schema 10) konnte mit 68 % Ausbeute und einem *ee*-Wert von 76 % erhalten werden. Ein Nachteil dieser Aldolreaktion bezüglich der Prozesseffizienz war die große Menge (30 mol%) des eingesetzten Prolins als Organokatalysator sowie DMSO als Lösungsmittel.[92] Nach Modifizierung der Prolin-Katalysatorstruktur durch Amidierung sowie der Einführung von zwei chiralen Ester-Gruppen als Substituenten konnte die in Schema 10 gezeigte Aldolreaktion optimiert werden, wobei Enantioselektivitäten bis zu 99 % *ee* (bei -25 °C) bei einer Katalysatorbeladung von 2 mol% erreicht wurden.[103]



Schema 10: (*S*)-Prolin-katalysierte asymmetrische Aldoladdition von Aceton (**2**) zu 4-Nitrobenzaldehyd (**1**).[92]

Mechanistisch gesehen ähnelt der Reaktionsmechanismus der Prolin-katalysierten Aldolreaktion dem Enamin-Mechanismus der Typ-I-Aldolasen.[93,104–108] Der postulierte Mechanismus der intermolekularen Aldolreaktion beginnt mit der Enamin-Bildung (**A**), gefolgt von der Carbonyl-Addition, welche durch die Carbonsäure-Gruppe des Prolins aktiviert wird (**B**) und endet mit der Hydrolyse des Iminium-Ions **C** unter Freisetzung des Aldolprodukts (Schema 11).[92,108] Es wird jedoch angenommen, dass die Enamin-Bildung und der Additionsschritt ähnliche Energiebarrieren aufweisen und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aldolreaktion von unterschiedlichen Bedingungen und Substraten abhängt. Die Annahme, dass die Addition des Aldehyds zum Enamin geschwindigkeitsbestimmend ist, wird jedoch favorisiert.[109]



Schema 11: Mechanismus der Prolin-katalysierten Aldoladdition von Aceton zu Benzaldehyden.[92,108]

Neben der Modifizierung der Katalysatorstruktur des ursprünglichen (*S*)-Prolins zur Verbesserung der Enantioselektivität und der benötigten Katalysatormenge, wurde viel Aufwand betrieben, um Prolin-basierte Organokatalysatoren zu entwickeln, die in rein wässrigen Milieu katalytisch aktiv sind und sich wie sogenannte „Mikro-Aldolasen" verhalten.[92] In den Jahren 2006 und 2007 publizierten verschiedene Forschergruppen unabhängig voneinander Aldolreaktionen mit Prolin-basierten Organokatalysatoren in wässrigen Medien wie Wasser oder Natriumchlorid-Lösung. BARBAS *et al*. entwickelten verschiedene alkylsubstituierte Prolinamide wie z. B. Katalysator **1**,[110] HAYASHI *et al.* verwendeten *tert*-Butyldiphenylsilylprolin (**2**),[111,112] und SINGH *et al.* konstruierten Prolinamid-basierte Organokatalysatoren wie z. B. Verbindung **3** mit einer tertiären Hydroxy- sowie zwei sterisch anspruchsvollen geminalen Phenyl-Gruppen (Abbildung 7).[90,96]

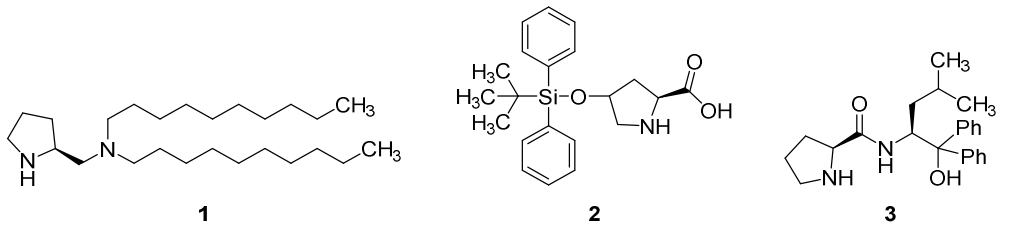
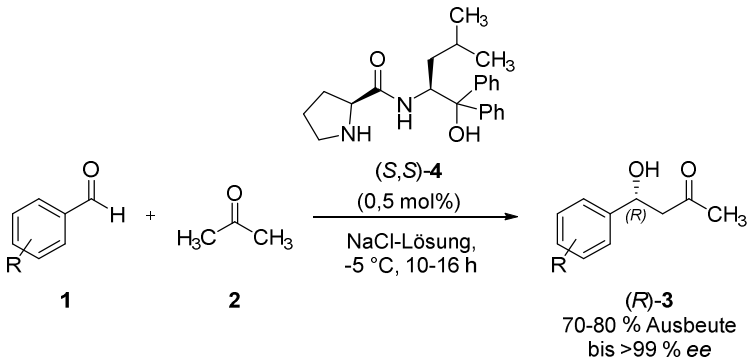


Abbildung 7: Prolin-basierte Organokatalysatoren für Aldolreaktionen in wässrigen Medien.[90,96,110–112]

Der zuletzt genannte „*Singh*-Katalysator" ((*S*,*S*)-**4**) wurde für die Aldoladdition von Aceton (**2**) an verschiedene aromatische Aldehyde (**1**) in NaCl-Lösung bei -5 °C verwendet, wobei β-Hydroxyketone (*R*)-**3** in guten Ausbeuten (70-80 %) sowie sehr guten Enantioselektivitäten bis zu 99 % *ee* erhalten werden konnten (Schema 12).

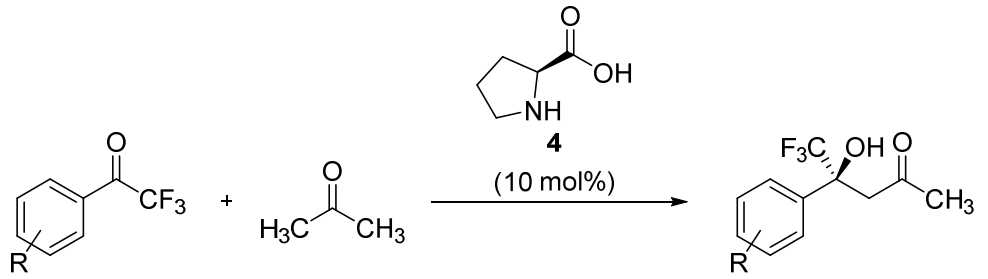


Schema 12: Asymmetrische Aldolreaktion von aromatischen Aldehyden und Aceton in NaCl-Lösung nach SINGH *et. al*.[90]

Die bisher beschriebenen Beispiele erfolgreicher asymmetrischer Synthesen basieren auf der Verwendung von Aldehyden als Adolakzeptoren oder als Elektrophile, da Aldehyde meist reaktiver sind als Ketone. Die intermolekulare Aldolreaktionen zweier unaktivierter Ketone ist themodynamisch ungünstig, sodass bis *dato* keine Beispiele für diese Reaktion beschrieben sind.[113] Es gibt jedoch zwei Möglichkeiten, um eine Keton-Keton-Aldoladdition zu realisieren: 1.) Verwendung von sehr elektrophilen Ketonen als Aldolakzeptoren (z. B. CF_3-substituierte Acetophenone) oder 2.) Verwendung von reaktiven Donoren (z. B. als Silylenolether).[114–116]

Im Jahr 2005 gelang ZHANG *et al*. die erste asymmetrische intermolekulare Aldolreaktion zwischen zwei Ketonen mit (*S*)-Prolin als Katalysator. Die Addition von Aceton (**2**) an aromatische Trifluormethylketone (**1**) unter Einsatz von 10 mol% (*S*)-Prolin (**4**) ergab diverse β-Trifluormethyl-β-hydroxyketone (**3**) in exzellenten Ausbeuten, jedoch mit nur mäßigen Enantioselektivitäten bis 64 % *ee* (Tabelle 1) .Es zeigte sich, dass die Erniedrigung der Reaktionstemperatur von 20 °C auf -20 °C zu einer Erhöhung des *ee*-Werts um ca. 20 % führt, allerdings einhergehend mit einer längeren Reaktionszeit (Tabelle 1, Einträge 1a und 1b). Bei der Verwendung von Aldolakzeptoren mit elektronenschiebenden Substituenten in *para*-Position des Phenylrings wie z. B. 4-Methoxytrifluoracetophenon fand die Aldolreaktion nicht statt (Tabelle 1, Eintrag 4).[117]

Tabelle 1: Prolin-katalysierte Aldoladdition von Aceton an Trifluormethylketone nach ZHANG *et. al*.[117] Die absolute Konfiguration der β-Trifluormethyl-β-hydroxyketone wurde nicht bestimmt. Reaktionen wurden in Aceton durchgeführt.



1 **2** **3**
bis zu 99 % Ausbeute
bis 64 % *ee*

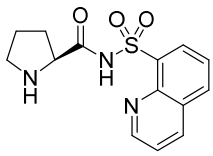
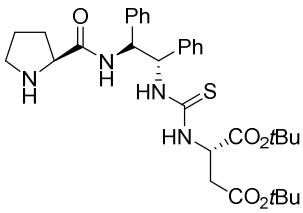
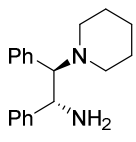
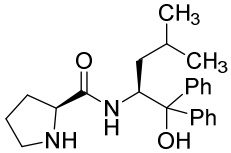
Eintrag	R	t /T [°C]	Ausbeute [%]	*ee* [%]
1a	*para*-H	3 h/20	99	48
1b	*para*-H	6 h/-20	98	64
2a	*para*-F	0,5 h/20	99	34
2a	*para*-F	2 h/-20	99	56
3a	*para*-Cl	2 h/20	99	18
3b	*para*-Cl	4 h/-20	99	42
4	*para*-OMe	24 h/20	0	-

Einige Arbeitsgruppen beschäftigten sich weiterhin mit der Aldoladdition von Aceton zu 2,2,2-Trifluoracetophenon und entwickelten weitere Katalysatoren zur Optimierung der Enantioselektivität sowie der Prozessführung. Einige ausgewählte Beispiele für diese Aldolreaktion sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Gruppe um NAKAMURA *et al.* (2011) verwendeten einen Prolinsulfonamid-Katalysator (**I**, 10 mol%), welcher effizient mit 8 mol% Trifluoressigsäure eingesetzt und das β-Hydroxyketon (*S*)-**3** in 92 % Ausbeute und 89 % *ee* bei einer Reaktionsdauer von 48 h und einer Temperatur von -20 °C erhalten wurde.[118] Ein Jahr später verwendete KOKOTOS einen Prolinamid-Thioharnstoff (**II**) als Organokatalysator für diese Reaktion, wobei die Katalysatorbeladung bei 2 mol% lag und dennoch das β-Hydroxyketon (*S*)-**3** in exzellenter Ausbeute (99 %) aber mit einer schlechteren Enantioselektivität (80 % *ee*) nach 44 h Reaktionszeit und bei 0 °C in Toluol erhalten wurde.[119] SONG *et al*. verzichteten auf einen Prolinamid-basierten Katalysator und einer sekundären Amin-Funktionalität im Molekül und verwendeten stattdessen ein Diamin mit zwei sterisch-anspruchsvollen Phenylgruppen (**III**) als Organokatalysator. Dieser stellte sich als sehr selektiv heraus, sodass mit einer Katalysatorbeladung von 5 mol% in Kombination mit 10 mol% *p*-Toluolsulfonsäure nach 24 h das Aldolprodukt (*S*)-**3** in 98 % Ausbeute und einem *ee* von 92 % erhalten wurde.[120]

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Organokatalysatoren für die Aldoladdition von Aceton an 2,2,2-Trifluoracetophenon. Kat.= Katalysator; TFA= Trifluoressigsäure, TsOH= *p*-Toluolsulfonsäure.



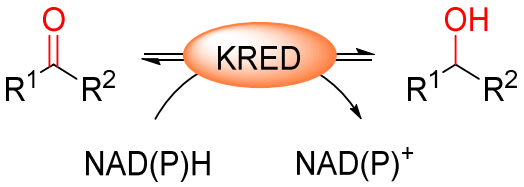
1 **2** **3**

Katalysator	 **I**	 **II**	 **III**	 **IV**
Reaktions-bedingung	10 mol% Kat., 8 mol% TFA, 48 h, -20 °C	2 mol% Kat., Toluol, 44 h, 0 °C	5 mol% Kat., 10 mol% TsOH, Toluol, 24 h, 0 °C	2 mol% Kat., 20 h, RT
Ergebnis (*S*)-**3**	92 % Ausbeute 89 % *ee*	99 % Ausbeute 80 % *ee*	98 % Ausbeute 92 % *ee*	91 % Ausbeute 92 % *ee*
	[118]	[119]	[120]	[89]

Der bereits vorgestellte *Singh*-Katalysator, welcher für die Aldoladdition von Aceton an diversen Benzaldehyden verwendet wurde,[96] konnte ebenfalls für die asymmetrische Aldoladdition von Aceton und 2,2,2-Trifluoracetophenon eingesetzt werden (Katalysator **IV**, Tabelle 2). BERKESSEL *et al.* konnten diese Aldolreaktion in Aceton mit nur 2 mol% *Singh*-Katalysator bei Raumtemperatur durchführen, wobei das β-Hydroxyketon (*S*)-**3** nach einer Reaktionszeit von nur 20 h in sehr guter Ausbeute (91 %) und exzellentem *ee*-Wert von 92 % isoliert wurde (Tabelle 2). Auch wenn die beschriebene Aldolreaktion mit dem *Singh*-Katalysator in Aceton als Lösungsmittel durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Reaktion mit 10 mol% Wasser als Additiv schneller abläuft und sich der *ee*-Wert dabei nur geringfügig ändert.[89] Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte zudem eine sehr effiziente, skalierbare Eintopfreaktion zur Synthese des *Singh*-Katalysators ausgehend von einfachen und günstigen Ausgangsverbindungen wie Prolin und Leucin, sodass große Mengen des Katalysators im Labor hergestellt werden können.[121]

1.5.2 Stand der Wissenschaft: Keton-Reduktionen mit Alkohol-Dehydrogenasen (Schritt 2)

Die enzymatische Synthese enantiomerenreiner Bausteine bietet vor allem Vorteile aufgrund der hohen Regio-, Chemo- und Enantioselektivität und stellt eine attraktive Alternative gegenüber chemischen Synthesen dar. Neben Hydrolasen, die am häufigsten im industriellen Maßstab für Racematspaltung racemischer Verbindung eingesetzt werden, können mit Hilfe von Oxidoreduktasen asymmetrische Synthesen katalysiert werden. Insbesondere Keto-Reduktasen (KREDs, EC 1.1.1.X) wie Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) oder Carbonyl-Reduktasen (CRs) werden als Katalysatoren für die asymmetrische Reduktion von Carbonyl-Verbindungen (z. B. Ketone und Aldehyde) bevorzugt eingesetzt (Schema 13),[122] da chirale Alkohole meist in pharmazeutisch-relevanten Verbindungen enthalten sind.[33]



Schema 13: Allgemeines Reaktionsschema zur enzymatischen Reduktion von Carbonylverbindungen mit Keto-Reduktasen (KREDs).

Die Reduktion der NAD(P)H-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen erfolgt durch die Übertragung eines Hydrids (H^-) vom Cofaktor auf das Substrat. Bei dieser Reaktion werden folgende Schritte durchlaufen: (1) der Komplex aus Enzym mit gebundenen Cofaktor (reduzierte Form) bindet das Substrat; (2) ein Hydrid wird vom reduzierten Cofaktor auf das Substrat transferiert; (3) der (chirale) Alkohol wird gebildet und vom Enzym freigesetzt, wobei der Cofaktor in oxidierter Form vorliegt; (4) der oxidierte Cofaktor wird vom Enzym freigesetzt.[123] Der zweite Schritt, also der Hydridtransfer, kann dabei stereochemisch auf vier verschiedenen Wegen (E_1-E_4) erfolgen und hängt zum einen davon ob der nucleophile Angriff von der *si*- oder *re*-facialen Seite des sp^2-hybridisierten Carbonyl-Kohlenstoff-Atoms erfolgt und zum anderen welches Hydrid, pro-*R* (H_R) oder pro-*S* (H_S), vom Nicotinamid-Cofaktor übertragen wird (siehe Abbildung 8).[124,125]

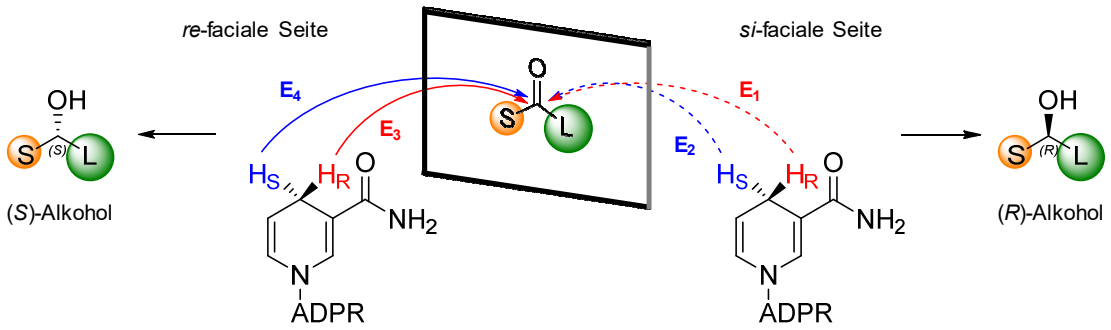


Abbildung 8: Stereochemischer Mechanismus des Hydridtransfers von NAD(P)H auf den Carbonyl-Kohlenstoff eines Substrats mit einem kleinen Rest (S) und einem großen Rest (L).[124,125] ADPR= Adenosindiphosphatribosyl.

Die Stereochemie der enzymatischen Ketonreduktion kann in den meisten Fällen mit Hilfe der PRELOG-Regel beschrieben werden, die besagt, dass der nucleophile Angriff vom sterischen Anspruch der Substituenten am Carbonyl-Kohlenstoff abhängt (Abbildung 8, kleiner Rest= S; großer Rest= L).[126] Die meisten Enzyme folgen der PRELOG-Regel und katalysieren den Hydrid-Transfer von der *re*-facialen Seite (E_3, pro-*R* und E_4, pro-*S*) des prochiralen Ketons, was in der Bildung des (*S*)-Alkohols resultiert. Enzyme, welche den Hydrid-Transfer von der *si*-facialen Seite (E_1, pro-*R* und E_2, pro-*S*) durchführen, werden als "Anti-PRELOG"-Enzyme bezeichnet. Als Resultat erhält man den (*R*)-Alkohol als Reduktionsprodukt (Abbildung 8).

Die Bezeichnung als (*R*)- oder (*S*)-Alkohol kann sich durch die Einführung von Substituenten mit höherer Priorität aufgrund der CAHN-INGOLD-PRELOG-Nomenklatur ändern. Einige Beispiele für Enzyme, die den Hydrid-Transfer nach E_1-E_3 folgen sind:

- E_1 (pro-*R,* *si*-faciale Seite): ADHs aus *Pseudomonas* sp.,[125] und aus *Lactobacillus kefir*.[127]
- E_2 (pro-*S*, *si*-faciale Seite): Dihydroxyaceton-Reduktase von *Mucor javanicus,*[128] Glycerol-Dehydrogenase von *Geotrichum candidum.*[129–131]
- E_3 (pro-*R,* *re*-faciale Seite): ADHs aus Hefe,[126] Pferdeleber,[132–135] und *Moraxella* sp..[136]

Enzyme, die den Hydrid-Transfer nach dem E_4-Mechanismus (pro-*S*, *si*-faciale Seite) durchführen, sind bisher nicht bekannt.[123]

Alkohol-Dehydrogenasen sind Cofaktor-abhängig und benötigen für die Reduktion bzw. Oxidation von einem Mol Substrat stöchiometrisch ein Mol NAD(P)H bzw. NAD(P)$^+$ (Abbildung 9).

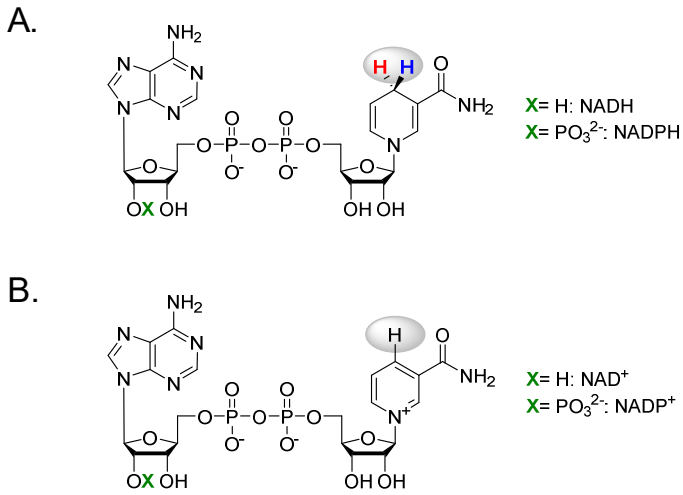


Abbildung 9: Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)-Cofaktor in reduzierter Form (A.) und oxidierter Form (B.).

Da Cofaktoren (insbesondere in reduzierter Form) sehr teuer sind (siehe Abbildung 10), können diese aus ökonomischen Gründen nicht in äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Zudem handelt es sich um Gleichgewichts-Reaktionen, so dass bei stöchiometrischer Verwendung des Cofaktors grundsätzlich kein vollständiger Umsatz erreicht werden kann. Aus diesem Grund wurden verschiedenste Methoden (enzymatisch, chemisch, photochemisch, elektrochemisch) für die *in situ* Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren entwickelt, um die Mengen an benötigten Cofaktoren zu reduzieren; gleichzeitig kann durch eine irreversible Regenerierungsmethode ein nahezu vollständiger Umsatz erzielt werden.

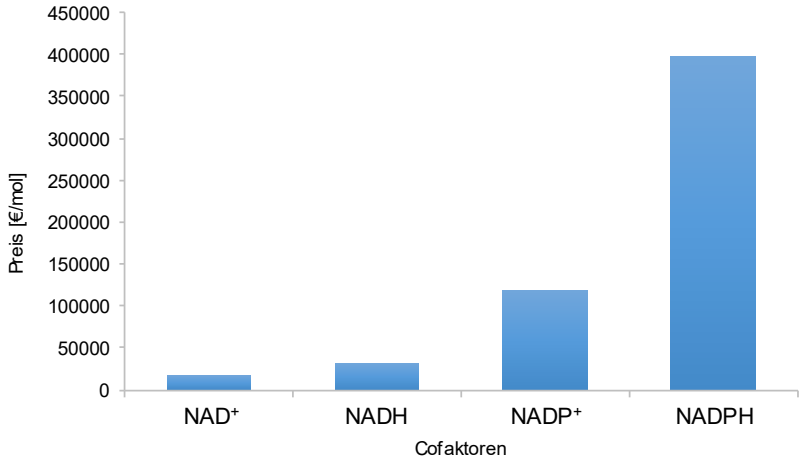
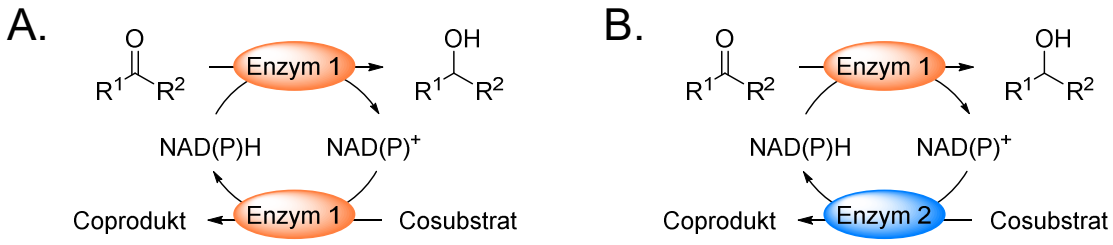


Abbildung 10: Kosten der Nicotinamidadenindinukleotid-Cofaktoren (Biomol GmbH, Hamburg, Stand: Juli 2016)

Die Strategie der enzymatischen Cofaktorregenerierung wird hierbei am häufigsten in industriellen Anwendungen verwendet, wobei hauptsächlich zwischen zwei Konzepten, der Enzym-gekoppelten und der Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung, unterschieden wird (Schema 14).[137–140]

Bei der Substrat-gekoppelten Methode wird ein zweites Cosubstrat dem Reaktionssystem hinzugeben, welches vom selben Enzym, das die Hauptreaktion katalysiert, umgesetzt wird (siehe Schema 14, A.). Für die Regenerierung des reduzierten Cofaktors werden häufig kostengünstige Alkohole wie Ethanol oder Isopropanol als Cosubstrate verwendet, die zu den korrespondierenden Produkten Acetaldehyd oder Aceton oxidiert werden. Häufig müssen die Alkohole aufgrund der Reversibilität der beiden Schritte im Überschuss hinzugegeben werden, um das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Produktseite zu verschieben.[123,141] Diese hohen Konzentrationen an Cosubstrat und folglich an Coprodukt können jedoch einen nachteiligen Effekt auf die Aktivität oder Stabilität des Biokatalysators haben.[142] Um dies zu umgehen sind Methoden z. B. durch Destillation des Ketons (Aceton) für die Entfernung des Coprodukts notwendig, um zum einen den Biokatalysator zu schützen und zum anderen das Gleichgewicht der Reaktion in die gewünschte Richtung zu verschieben. Der Einsatz hoher Konzentrationen an Alkoholen wie z. B. Isopropanol als Cosubstrat kann sich anderseits auch als vorteilhaft erweisen, da die Löslichkeit von Wasser-unlöslichen Substraten verbessert wird.[139] Eine weitere Einschränkung der Substrat-gekoppelten Regenerierung ist, dass das einsetzbare Cosubstrat stark von der Substratspezifität des Biokatalysators abhängt. Für die

Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung können die ADHs aus *Thermoanerobacter brockii* (TBADH),[143,144] sowie die chemotolerante ADH aus *Rhodococcus ruber* (RRADH bzw. ADH-'A'), die hohe Konzentrationen (bis zu 50 % (v/v)) an Aceton toleriert,[145–147] als Beispiele genannt werden.



Schema 14: Substrat-gekoppelte (A.) und Enzym-gekoppelte (B.) Cofaktorregenerierung.

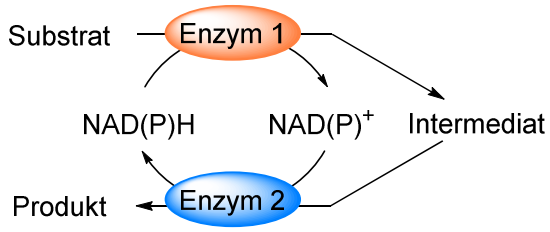
Die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung erfordert im Vergleich zur Substrat-gekoppelten Methode ein zweites Enzym, welches ein Cosubstrat unter Regenerierung des Cofaktors umsetzt (siehe Schema 14, B.). Der bienzymatische Ansatz koppelt z. B. eine ADH-katalysierte Reduktion eines Ketons unter Verbrauch des reduzierten Cofaktors (NAD(P)H) mit einer entgegengesetzten Redoxreaktion z. B. der Oxidation eines Cosubstrats unter Rückbildung des Cofaktors. Die bekanntesten Regenerierungssysteme (Enzym/Substrat) sind hierbei:

- Glucose-Dehydrogenase (GDH)/D-Glucose: Die GDH katalysiert die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconolacton, das wiederum irreversibel zur korrespondierenden Säure hydrolysiert wird. Durch die entstehende Säure muss der pH-Wert der Reaktion kontrolliert und stabilisiert werden. Vorteile dieses Regenierungssystems sind neben dem günstigen Substrat die hohe Aktivität und Stabilität der GDH sowie der Regenerierung beider Cofaktoren (NADH und NADPH). Zudem erreicht man durch die Irreversibilität der Lacton-Hydrolyse hohe, praktisch vollständige Umsätze ohne einen wesentlichen Überschuss an dem Regenerierungssubstrat Glucose. Die meist verwendeten GDHs wurden aus *Bacillus*-Stämmen wie z. B. *Bacillus megaterium* oder *Bacillus subtilis* kloniert.[138,139,142,148–150]

- Formiat-Dehydrogenase (FDH)/Formiat: Die FDH katalysiert die Oxidation von kostengünstigem Formiat zu Kohlenstoffdioxid bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH. Das entstehende Coprodukt Kohlenstoffdioxid kann durch einfaches Ausgasen aus der Reaktion entfernt werden, wodurch die FDH-katalysierte Reaktion irreversibel ist und sich dadurch das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung

NADH-Bildung verschiebt. Alle bislang bekannten, natürlicherweise vorkommenden FDHs sind NADH-abhängig, jedoch wurden viele Mutagenesestudien durchgeführt, um die FDH auch für die Regenerierung von NADPH zu verwenden. Ein wesentlicher Nachteil in der Verwendung von FDH liegt in der geringen spezifischen Aktivität (4-6 U mg^{-1}). Bekannte FDHs sind aus *Candida boidinii* und aus *Pseudomonas* sp. isoliert und rekombinant verfügbar gemacht worden.[138,139,151–156]

Eine weitere, bisher eher selten, verwendete Methode, um den Nicotinamid-Cofaktor zu regenerieren, kann durch eine Reaktion-interne Sequenz erreicht werden und wird als „*self sufficient*" bezeichnet. Hierbei dient das Zwischenprodukt bzw. Intermediat, welches im Zuge der ersten Redox-Reaktion gebildet wurde, als Substrat für die zweite entgegengesetzte Redox-Reaktion, sodass eine interne Cofaktorregenerierung stattfindet (Schema 15). Einer der beiden Redox-Reaktionen muss jedoch irreversibel verlaufen, um einen vollständigen Umsatz zu erhalten. Solche irreversiblen Reaktionen sind beispielsweise mit Enoat-Reduktasen oder Monooxygenasen realisiert worden.[139]

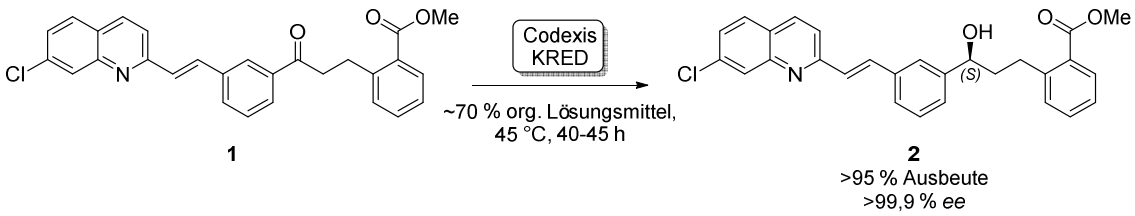


Schema 15: Reaktions-interne Cofaktorregenerierung. Das Intermediat, welches in der ersten Redoxreaktion gebildet wurde, fungiert als Substrat für die zweite Reaktion in entgegengesetzter Redoxrichtung.[139]

Nicht nur durch die Entwicklung von effizienten *in situ* Cofaktorregnerierungssystemen sondern auch durch Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie entwickelte sich die enzymatische Carbonyl-Reduktion als Methode der Wahl.[123] Einige Anwendungen mit Alkohol-Dehydrogenasen oder Carbonyl-Reduktasen (sowohl als Ganzzell-katalysatoren oder als isolierte Enzyme) konnten bereits erfolgreich im industriellen Maßstab realisiert werden.[6,32,33] Dazu zählt beispielsweise die Synthese chiraler Seitenketten von Cholesterol-senkenden Statinen wie Rosuvastatin oder Atorvastatin mit Hilfe einer Carbonyl-Reduktase aus *Candida magnoliae* (208 g L^{-1}, >99 % *ee* (*S*)-Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrat)[148] oder der *Lactobacillus brevis* ADH.[157] Ein weiteres Beispiel stellt die Synthese von (*S*)-3,5-Bistrifluormethylphenylethanol, einer Vorstufe eines NK-1 Rezeptor-Antagonisten, mit der ADH aus *Rhodococcus erythropolis* (READH) dar, bei der Raum-Zeit Ausbeuten bis zu 260 g L^{-1} d^{-1} erreicht wurden.[158] Eine

alternative enzymatische Reduktion eines sterisch sehr anspruchsvollen Ketons (**1**) zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol **2**, welches ein Schlüsselintermediat für die Synthese von Montelukast darstellt, konnte mit Hilfe einer optimierten $NADP^+$-abhängigen Ketoreduktase (CDX-026) von Codexis im 230 kg-Maßstab bei einer Substratkonzentration von 100 g L^{-1} erreicht werden (Schema 16).[159] Eine Vielzahl unterschiedlichster Ketoreduktasen sind bekannt und kommerziell verfügbar. Die bekanntesten Vertreter sind:

- die (*S*)-spezifischen NADH-abhängigen ADHs aus *Rhodococcus erythropolis* (READH)/ *Rhodococcus ruber* (RRADH, ADH-'A'),[145,160]
- die (*R*)-spezifischen NADPH-abhängigen ADHs aus *Lactobacillus brevis* (LBADH)/ *Lactobacillus kefir* (LKADH),[127,161–163]
- die NADPH-abhängige ADH aus *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), welche bei kleineren Substraten (*R*)-Alkohole und bei größeren Substraten (*S*)-Alkohole bildet,[164]
- diverse ADHs aus Hefen wie *Candida* und *Saccharomyces*.[148,165,166]



Schema 16: Enzymatische Herstellung einer Montelukast-Vorstufe (**2**) durch Ketonreduktion.[159]

Das Substratspektrum aller bisher in der Literatur beschriebenen Ketoreduktasen ist so vielfältig, dass mittlerweile ein sehr breites Spektrum an Ketonen, Ketoestern oder Aldehyden zum korrespondieren Alkohol reduziert werden können. Jedoch gibt es insbesondere für Substrate, deren Carbonylfunktion von beiden Seiten mit sterisch anspruchsvollen Resten flankiert wird, noch keine gut geeigneten ADHs.[123]

Es gibt bisher nur wenige bekannte ADHs, die sogenannte „*bulky-bulky*"-Ketone effizient umsetzen können. Beispiele hierfür sind die Alkohol-Dehydrogenase aus *Ralstonia* sp. (RASADH),[167] sowie die Carbonyl-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* (SSCR).[168] Um diese enzymatische Substrat-Lücke für sterisch anspruchsvolle Ketone zu füllen und weiterhin konkurrenzfähig gegenüber chemischen Reduktionsmethoden zu

bleiben, ist es notwendig, neue Ketoreduktasen für die enantioselektive Ketonreduktion zu finden oder bekannte Biokatalysatoren hinsichtlich Limitierungen wie enges Substratspektrum, unzureichende Stabilität oder geringe Regioselektivität zu optimieren.[169]

1.5.3 Stand der Wissenschaft: Chemoenzymatische Eintopfsynthesen

Mehrstufige Reaktionen können zu Eintopfreaktionen kombiniert und Zwischenschritte wie Aufarbeitungen und Reinigungen minimiert werden, um Gesamtprozesse in Hinblick auf Nachhaltigkeit und Effizienz zu steigern. Bei der klassischen Mehrstufensynthese muss jedes Zwischenprodukt (B, C) nach einer abgeschlossenen Reaktion aufgearbeitet werden, wodurch ein hoher Verbrauch an Lösungsmittel entsteht und sich folglich die Menge an umweltschädlichen Abfallprodukten erhöht (Abbildung 11, oben). Die Zwischenprodukte werden meist aufwändig über Säulenchromatographie gereinigt, welche in der Regel auch mit Verlusten hinsichtlich Produktausbeute einhergeht. Eine Alternative stellt hierbei die mehrstufige Eintopfsynthese dar, bei der lediglich zum Schluss das Endprodukt isoliert werden muss (Abbildung 11, unten).

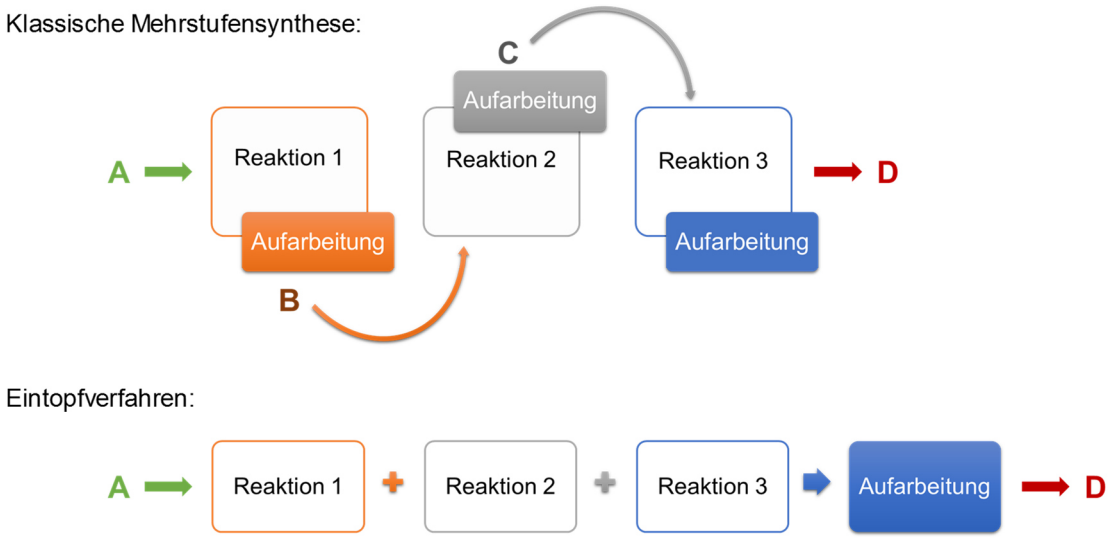
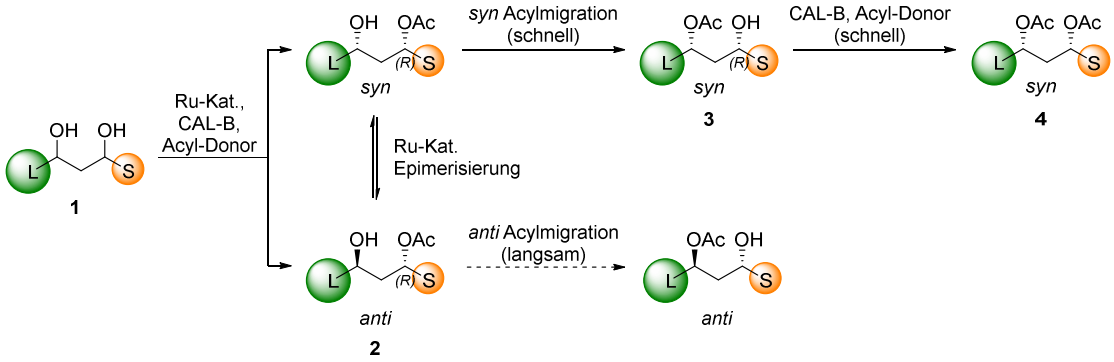


Abbildung 11: Vergleich der klassischen Mehrstufensynthese mit dem Eintopfverfahren.

Die Herausforderung eine klassische Mehrstufenreaktion als Eintopfreaktion zu realisieren, liegt in der Kompatibilität der Einzelreaktionen insbesondere bei der Kombination von Chemo- und Biokatalyse. Enzymatische Reaktionen verlaufen überwiegend in wässrigen Milieu, zudem werden die meisten Biokatalysatoren durch hohe Konzentrationen an Lösungsmitteln inaktiviert. Lipasen stellen die Ausnahme bei

der Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln dar und werden vor allem mit Metallkatalysatoren in dynamisch-kinetischen Racematspaltungen (DKR) eingesetzt. So entwickelten BÄCKVALL *et al.* eine sehr gelungene Eintopfreaktion, die eine enzymatische Veresterung mittels CAL-B Lipase mit einer *in situ* Racemisierung mit Hilfe eines Ruthenium-Katalysators in Toluol als Lösungsmittel kombiniert (Schema 17).



Schema 17: Dynamisch-kinetische Racematspaltung von unsymmetrischen 1,3-Diolen durch Kombination von Ruthenium- und Enzymkatalyse als „Tandem"-Eintopfreaktion.[170] L= großer Rest; S= kleiner Rest; Ru-Kat.= Ruthenium-Katalysator; CAL-B= *Candida antarctica* Lipase B.

Ausgehend von racemischem 1,3-Diol **1** mit einem großen (L) und einem kleinen Rest (S) wird selektiv nur die Alkohol-Gruppe neben dem kleinen Rest durch die Lipase CAL-B verestert und führt zur Bildung der *syn* und *anti* monoacetylierten Verbindung **2** (Schema 17). Die Verbindung *syn*-**2** unterliegt einer schnellen Acylmigration, während die Acyl-Wanderung des *anti*-Monoacetat **2** nur sehr langsam verläuft. Durch die Epimerisierung des *anti*-Monoacetat **2** zum *syn*-Monoacetat **2** durch den Ruthenium-Katalysator und dem schnellen Acyl-Transfer von *syn*-**2**, wird hauptsächlich die Verbindung *syn*-**3** mit der Alkohol-Gruppe neben dem kleinen Rest gebildet. Die Verbindung *syn*-**3** wird wiederum selektiv von der Lipase CAL-B zum Diacetat *syn*-**4** umgesetzt (Schema 17).[170] Bemerkenswert bei dieser Reaktion ist, dass alle benötigten Komponenten der Einzelreaktionen von Anfang an in der Eintopfreaktion vorliegen und die Reaktionen parallel ablaufen können („Tandem"-Reaktion).

Es wird hauptsächlich zwischen zwei Reaktionstypen bei der Durchführung einer Eintopfreaktion unterschieden. Bei der sequenziellen oder auch modularen Eintopfreaktion werden die Einzelreaktionen nacheinander, ohne Isolierung des Zwischenprodukts (B), durchgeführt (Abbildung 12, oben). Die benötigten Komponenten des zweiten Reaktionsschritts werden zeitlich gesehen meist nach Beendigung des ersten Reaktionsschritts hinzugegeben. In der Literatur wird hauptsächlich diese

Reaktionsführung durchgeführt. Der zweite Reaktionstyp wird hier und im Folgenden als „Tandem“-Reaktion bezeichnet und unterscheidet sich vom ersten Reaktionstypen dadurch, dass alle Komponenten der Gesamtreaktion von Anfang an hinzugegeben werden und die Reaktionen parallel stattfinden (Abbildung 12, unten). Im Gegensatz zur Literatur wird in dieser Arbeit der Begriff der Tandem-Eintopfreaktion ausschließlich für die in Abbildung 12 dargestellte Reaktionssequenz verwendet.[a] Diese Reaktionsführung ist meist nur schwer realisierbar, da ein hoher Grad an Kompatibilität der Einzelreaktionen notwendig ist, vor allem bei chemoenzymatischen Eintopfreaktion in wässrigem Medium.

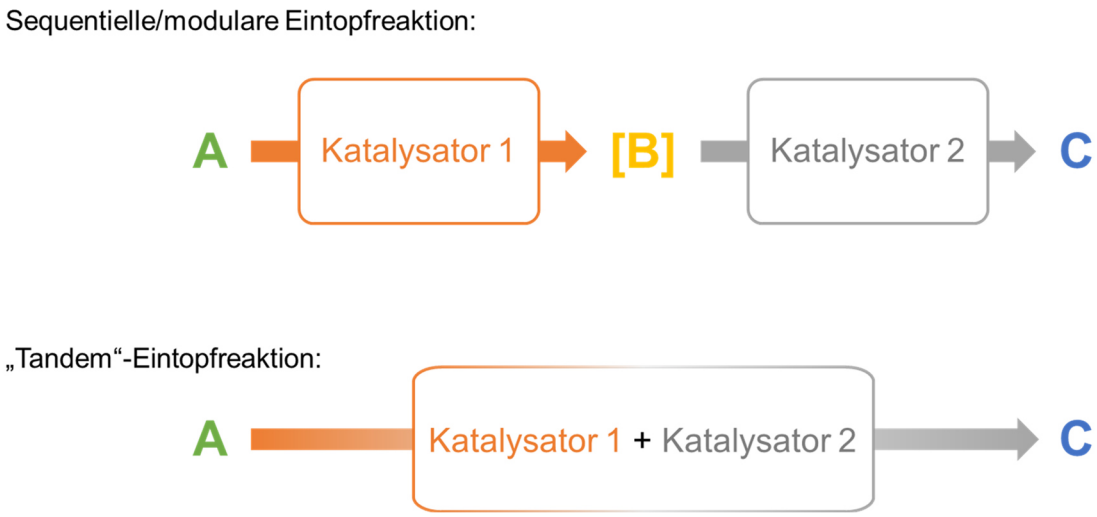
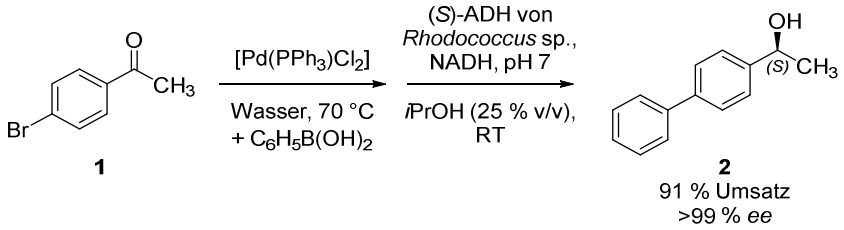


Abbildung 12: Vergleich der verschiedenen Reaktionstypen eines Eintopfverfahrens.

Erfolgreiche Beispiele bezüglich der Kombination von Chemo- und Biokatalyse in wässrigen Reaktionsmedien wurden in einem Review-Artikel von GRÖGER und HUMMEL zusammengefasst.[171] Neben den in Kapitel 1.4 vorgestellten Eintopfverfahren (Kombination von Organokatalyse und Biokatalyse) konnte die Darstellung eines Biphenylalkohols (**2**) mit 91 % Umsatz und >99 % *ee* mittels Kombination einer Palladium-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung und einer ADH-katalysierten Reduktion als modulare Eintopfreaktion erreicht werden (Schema 18).[172]

---

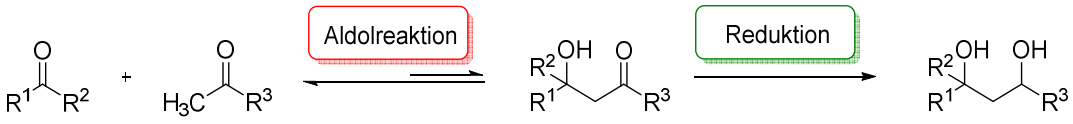
[a] Nach der klassischen Definition von TIETZE handelt es sich hierbei um eine „Domino“-Reaktion, wenn „*zwei oder mehr nacheinander ablaufende Transformationen, in denen unter Bindungsknüpfung oder Fragmentierung die jeweils nachfolgende Reaktion an den im vorhergehenden Schritt gebildeten Funktionalitäten erfolgt*“, alternativ wird dieser Reaktionstyp auch als Tandem- oder Kaskaden-Reaktion bezeichnet.
Quelle: **Tietze LF, Beifuss U.** (1993). Sequentielle Transformationen in der Organischen Chemie - eine Synthesestrategie mit Zukunft. *Angew Chem*, **105**, 137–170.



Schema 18: Kombination einer Suzuki-Kreuzkupplung mit einer biokatalytischen Reduktion in einer modularen Eintopfreaktion.[172]

Weitere wichtige Palladium-katalysierte Reaktionen wie die Heckreaktion und die Wacker-Oxidation konnten erfolgreich mit enzymatischen Ketonreduktionen in wässrigen Reaktionsmedien als Eintopfreaktionen kombiniert werden.[173,174] All diese Beispiele verbindet jedoch die Durchführung der Eintopfreaktion als modulare Reaktionssequenz.

Bis *dato* gibt es kaum Beispiele chemoenzymatischer „Tandem“-Eintopfreaktionen mit Wasser oder Puffer als Reaktionsmedium. Diese Reaktionsführung könnte neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, da so thermodynamisch instabile Intermediate, welche beispielsweise im Zuge einer organokatalysierten Aldolreaktionen zweier Ketone gebildet werden, im zweiten Schritt durch eine enzymatische Umsetzung zu stabilen Produkten umgewandelt werden könnten (Schema 19). Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit eine chemoenzymatische Tandem-Eintopfreaktion im wässrigem Reaktions-medium angestrebt bestehend aus einer einleitenden organokatalysierte Aldolreaktion mit zwei Ketonen, gefolgt von einer enzymatischen Reduktion des *in situ* gebildeten β-Hydroxyketons unter Ausbildung von diastereo- und enantiomerenreinen 1,3-Diolen.



Schema 19: Herstellung tertiärer Aldolprodukte und anschließender Reduktion zu chiralen 1,3-Diolen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und sonstigen Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Fluorochem (Hadfield) und abcr (Karlsruhe). Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und *Phusion*-Polymerase wurden von der Firma Thermo Scientific (ehemals Fermentas, Sankt Leon-Rot) bezogen. Weitere Enzyme wie Lysozym und RNase wurden bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen) gekauft.

2.2 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Eine Übersicht über die Mikroorganismen, Vektoren und rekombinanten Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt. Weiterhin wurden verschiedene Mikroorganismen aus der institutsinternen Stammsammlung verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
Escherichia coli DH5α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(rK- mK+) λ–	[175]/Novagen
Escherichia coli BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	[176]/Novagen
Pichia pastoris GS115	*his4*	[177]/Prof. J. Ernst

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektoren	Referenz	Wirt
pET28a(+)	Novagen	*E. coli*
pET21a(+)	Novagen	*E. coli*
pETDuet-1	Novagen	*E. coli*
pACYCDuet-1	Novagen	*E. coli*
Chaperone-Kit	TAKARA	*E. coli*

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

Bezeichnung	Merkmale	Referenz	Wirt
pET28a-ADH1	Km^R, 1074 bp Fragment *adh1* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY67733.1/C4QWW0, *Nco*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-mtADH	Km^R, 1053 bp Fragment *mtadh* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY69102.1/C4R0S8, *Nco*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-ADH4	Km^R, 1065 bp Fragment *adh4* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY69937.1/C4R3A2, *Nco*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-ADH5	Km^R, 1077 bp Fragment *adh5* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY71835.1/C4R8B0, *Nco*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PPADH1/NHis	Km^R, 1065 bp Fragment *ppadh1* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY70496.1/C4R4L0, *Nde*I/*Xho*I kloniert, N-term. His-Tag (NHis)	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-NCHis	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1/NHis, Stopp-Codon deletiert, N- und C-term. His-Tag (NCHis)	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-CHis	Ausgangsvektor pET28a-NCHis, Start-Codon in *Nco*I-Schnittstelle deletiert, C-term. His-Tag (CHis)	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-(-)His	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1/NHis, Start-Codon in *Nco*I-Schnittstelle deletiert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET21a-(-)His	Amp^R, 1065 bp Fragment *ppadh1* (*P. pastoris* GS115), Uniprot ID: C4R4L0, *Nde*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PPADH2	Km^R, 1065 bp Fragment *ppadh2* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY70495.1/C4R4K9, *Nde*I/*Xho*I kloniert, NHis	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PPADH3	Km^R, 1065 bp Fragment *ppadh3* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY70494.1/C4R4K8, *Nde*I/*Xho*I kloniert, NHis	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PPADH4	Km^R, 1065 bp Fragment *ppadh4* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY70493.1/C4R4K7, *Nde*I/*Not*I kloniert, NHis	diese Arbeit	*E. coli*

(Fortsetzung der Tabelle 5)

Bezeichnung	Merkmale	Referenz	Wirt
pET28a-PPADH5	Km^R, 1068 bp Fragment *ppadh5* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY71578.1/C4R7K3, *Nde*I/*Xho*I kloniert, NHis	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PPADH6	Km^R, 1062 bp Fragment *ppadh5* (*P. pastoris* GS115), Genbank/Uniprot ID: CAY69944.1/C4R3A9, *Nde*I/*Xho*I kloniert, NHis	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 3x (94-96)	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutationen F94V, I95A, F96L	Anissa Ouald Chaib	*E. coli*
pET28a-PP4 4x (136-142)	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutationen A136S, L138F, C140A, M142L	Anissa Ouald Chaib	*E. coli*
pET28a-PP4 7x (94-96 & 136-142)	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutationen F94V, I95A, F96L+ A136S, L138F, C140A, M142L	Anissa Ouald Chaib	*E. coli*
pET28a-PP4 F94V	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation F94V	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 I95A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation I95A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 F96L	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation F96L	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 A136S	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation A136S	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 L138F	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation L138F	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 C140A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation C140A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP4 M142L	Ausgangsvektor pET28a-PPADH4, Eingeführte Mutation M142L	diese Arbeit	*E. coli*

(Fortsetzung der Tabelle 5)

Bezeichnung	Merkmale	Referenz	Wirt
pET28a-PP1 F94V	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation F94V	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 F96L	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation F96L	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 F96W	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation F96W	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 F138L	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation F138L	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 L142A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation L142A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 L142M	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation L142M	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 S137A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation S137A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 Y176A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation Y176A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 Y176F	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation Y176F	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 K180L	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation K180L	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 Y207A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation Y207A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 N250A	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutation N250A	diese Arbeit	*E. coli*

(Fortsetzung der Tabelle 5)

Bezeichnung	Merkmale	Referenz	Wirt
pET28a-PP1 DM1,	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutationen: R287A, R313A, E321A	diese Arbeit	*E. coli*
pET28a-PP1 DM2,	Ausgangsvektor pET28a-PPADH1, Eingeführte Mutationen: R35A, D99A	diese Arbeit	*E. coli*
pDB5b(-)	pETDuet-GDH-7β-HSDH, *gdh* (aus *B. subtilis*) in MCSI, Uniprot ID: P12310 →Template für Klonierung (pGZK2)	Daniel Bakonyi	*E. coli*
pDB7b(-)	pETDuet-7β-HSDH-GDH, *gdh* (aus *B. subtilis*) in MCSII, Uniprot ID: P12310 →Template für Klonierung (pGZK1)	Daniel Bakonyi	*E. coli*
pETDuet-PPADH1-GDH (pGZK1)	Amp^R, Ausgangsvektor pDB7b(-), *ppadh1* aus pET28a-PPADH1 über *Nco*I/*Not*I umkloniert in MCSI, *gdh* (aus *B. subtilis*) in MCSII	diese Arbeit	*E. coli*
pETDuet-GDH-PPADH1 (pGZK2)	Amp^R, Ausgangsvektor pDB5b(-), *ppadh1* aus pET28a-PPADH1 über *Nde*I/*Xho*I umkloniert in MCSII *gdh* (aus *B. subtilis*) in MCSI	diese Arbeit	*E. coli*
pACYC-GDH	Cm^R, *gdh* (aus *B. subtilis*), *Bsa*I/*Xho*I kloniert, ohne His-Tag	diese Arbeit	*E. coli*

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden entsalzt und in lyophilisierter Form geliefert. Diese wurden vor Verwendung in sterilem *A. dest*. als 100 pmol/µL-Lösungen gelöst. Die Oligonukleotid-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmale
PP115-ADH1-fw	CATGCCATGGCTTACCCAGACAC	*Nco*I
PP115-ADH1-rev	CGGCTCGAGACTATTCAAACTGTTTTCCG	*Xho*I
PP115-mtADH-fw	CATGCCATGGGTATGTCTCCAACTATCCC	*Nco*I
PP115-mtADH1-rev	CGGCTCGAGATTATTTGGAAGTGTCC	*Xho*I
PP115-ADH4-fw	CATGCCATGGGTATGACCACAGTTTTCGC	*Nco*I
PP115-ADH4-rev	CGGCTCGAGACTACCCCCTGACTTTACTTAGAC	*Xho*I

(Fortsetzung der Tabelle 6)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmale
PP115-ADH5-fw	CATGCCATGGCGTACCCAGACACC	*Nco*I
PP115-ADH5-rev	CGGCTCGAGACTATTTGAATGCCTTATCGTAACCG	*Xho*I
PPADH1-fw	GCGCTTCCATATGGTTTCTAAGG	*Nde*I
PPADH1-rev	CGGCTCGAGATTATTTATTAGCACGC	*Xho*I
PPADH1-CHis-fw	AAACAGATATTGCGTGCTAATAAACTCGAGCACCACC	Deletion Stopp-Codon
PPADH1-CHis-rev	GGTGGTGCTCGAGTTTATTAGCACGCAATATCTGTTT	
PPADH1-(-)His-fw	TTAAGAAGGAGATATACCGGCAGCAGCCATCATCA	Deletion ATG im pET28a
PPADH1-(-)His-rev	TGATGATGGCTGCTGCCGGTATATCTCCTTCTTAA	
PPADH2-fw	GCGCTTCCATATGGCTTCAAAGGTTTTATTGACAGG	*Nde*I
PPADH2-rev	CGGCTCGAGATTATTTCCTAGCTCGC	*Xho*I
PPADH3-fw	GCGCTTCCATATGGTTTCTAACGTTTTATTGACAGG	*Nde*I
PPADH3-rev	CGGCTCGAGATTATTTATTGGCCCGC	*Xho*I
PPADH4-fw	GCGCTTCCATATGGTTTCAAAGGTTTTATTGACAGG	*Nde*I
PPADH4-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTTGTTTGCTCGC	*Not*I
PPADH5-fw	GCGCTTCCATATGCCAGGAGAAAGAGTTTTACTTACC	*Nde*I
PPADH5-rev	CGGCTCGAGATTATTTTGCAGACTCAAGG	*Xho*I
PPADH6-fw	GCGCTTCCATATGCTCCCTAAAGTATTAGTTACG	*Nde*I
PPADH6-rev	CGGCTCGAGATTACTGGATAGTGTTTACC	*Xho*I
PP4-3x-(94-96) fw	TACCTATGTTCTTCATACTGCTTCTCCATTTTATTTTCAATG ATGATAGAGCTCTCGAGG	V94F, A95I, L96F
PP4-3x-(94-96) rev	CCTCGAGAGCTCTATCATCATTGAAAATAAATGGAGAAG CAGTATGAAGAACATAGGTA	
PP4-4x-(136-142)-fw	GTGTCAAGAACGTCGTAGTGACCAGTTCTTTTGCTGCTA TCTTGAACCTTGATAAGGCTGAAGAC	A136S, L138F, C140A, M142L
PP4-4x-(136-142)-rev	GTCTTCAGCCTTATCAAGGTTCAAGATAGCAGCAAAAGA ACTGGTCACTACGACGTTCTTGACAC	
PP4-V94F-fw	GTTCTTCATACTGCTTCTCCATTTGCTCTCAATGATGATA GA	V94F
PP4-V94F-rev	CTCTATCATCATTGAGAGCAAATGGAGAAGCAGTATGAA GAAC	
PP4-A95I-fw	GTTCTTCATACTGCTTCTCCAGTTATTCTCAATGATGATA GAGCTCTC	A95I
PP4-A95I-rev	GAGAGCTCTATCATCATTGAGAATAACTGGAGAAGCAGT ATGAAGAAC	
PP4-L96F-fw	CATACTGCTTCTCCAGTTGCTTTCAATGATGATAGAGCT	L96F
PP4-L96F-rev	AGCTCTATCATCATTGAAAGCAACTGGAGAAGCAGTATG	
PP4-A136S-fw	CAAGAACGTCGTAGTGACCAGTTCTCTTGCTTGTATCAT G	A136S
PP4-A136S-rev	CATGATACAAGCAAGAGAACTGGTCACTACGACGTTCTT G	
PP4-L138F-fw	GTCGTAGTGACCGCTTCTTTTGCTTGTATCATGAACC	L138F
PP4-L138F-rev	GGTTCATGATACAAGCAAAAGAAGCGGTCACTACGAC	
PP4-C140A-fw	TAGTGACCGCTTCTCTTGCTGCTATCATGAACCTTGATA AGG	C140A
PP4-C140A-rev	CCTTATCAAGGTTCATGATAGCAGCAAGAGAAGCGGTCA CTA	
PP4-M142L-fw	GCTTCTCTTGCTTGTATCTTGAACCTTGATAAGGCTG	M142L
PP4-M142L-rev	CAGCCTTATCAAGGTTCAAGATACAAGCAAGAGAAGC	

(Fortsetzung der Tabelle 6)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmale
PP1-F94V-fw	CCTTCACACAGCTTCCCCAGTTATTTTCAATGACGACAG	F94V
PP1-F94V-rev	CTGTCGTCATTGAAAATAACTGGGGAAGCTGTGTGAAGG	
PP1-F96L-fw	TTCACACAGCTTCCCCATTTATTTTAAATGACGACAGAGC	F96L
PP1-F96L-rev	GCTCTGTCGTCATTTAAAATAAATGGGGAAGCTGTGTGAA	
PP1-F96W-fw	CTTCACACAGCTTCCCCATTTATTTGGAATGACGACAGAGC	F96W
PP1-F96W-rev	GCTCTGTCGTCATTCCAAATAAATGGGGAAGCTGTGTGAAG	
PP1-F138L-fw	CGTCGTGGTAACTTCCTCCTTAGCAGCAATTTTG	F138F
PP1-F138L-rev	CAAAATTGCTGCTAAGGAGGAAGTTACCACGACG	
PP1-L142A-fw	GGTAACTTCCTCCTTTGCAGCAATTGCGAACGCTGACAAGT	L142A
PP1-L142A-rev	ACTTGTCAGCGTTCGCAATTGCTGCAAAGGAGGAAGTTACC	
PP1-L142M-fw	GGTAACTTCCTCCTTTGCAGCAATTATGAACGCTGACAA	L142M
PP1-L142M-rev	TTGTCAGCGTTCATAATTGCTGCAAAGGAGGAAGTTACC	
PP1-S137A-fw	ACGTCGTGGTAACTTCCGCCTTTGCAGCAATTTTG	S137A
PP1-S137A-rev	CAAAATTGCTGCAAAGGCGGAAGTTACCACGACGT	
PP1-Y176A-fw	TGGAGACAGAGGTGTTGCTGCCATCGTTTCCAAGAAGGAG	Y176A
PP1-Y176A-rev	CTCCTTCTTGGAAACGATGGCAGCAACACCTCTGTCTCCA	
PP1-Y176F-fw	AGACAGAGGTGTTGCTTTCATCGTTTCCAAGAAGG	Y176F
PP1-Y176F-rev	CCTTCTTGGAAACGATGAAAGCAACACCTCTGTCT	
PP1-K180L-fw	GGTGTTGCTTACATCGTTTCCTTAAAGGAGGCTGAGAAAGCTGCC	K180L
PP1-K180L-rev	GGCAGCTTTCTCAGCCTCCTTTAAGGAAACGATGTAAGCAACACC	
PP1-Y207A-fw	CTTTAAATTGACAACAGTAAACCCTCCTGCTGTTTTTGGTCCTCAGAAATTC	Y207A
PP1-Y207A-rev	GAATTTCTGAGGACCAAAAACAGCAGGAGGGTTTACTGTTGTCAATTTAAAG	
PP1-N250A-fw	CAAGTTGTTTGATGATCCCCTCGCTTTATCCGTTGATGTTAGAGAC	N250A
PP1-N250A-rev	GTCTCTAACATCAACGGATAAAGCGAGGGGATCATCAAACAACTTG	
PP1-R287A-fw	AATCCAAGTTCAGCGCTCAGGCAATCCTGAACATTATCAACG	R287A
PP1-R287A-rev	CGTTGATAATGTTCAGGATTGCCTGAGCGCTGAACTTGGATT	
PP1-R313A-fw	AAAGCCCGAGGAAACGGCAGCAGTGGAAGCTATTAAGG	R313A
PP1-R313A-rev	CCTTAATAGCTTCCACTGCTGCCGTTTCCTCGGGCTTT	
PP1-E321A-fw	AGCTATTAAGGGCCCGGCGTATAACAACAGTGTTAC	E321A
PP1-E321A-rev	GTAACACTGTTGTTATACGCCGGGCCCTTAATAGCT	
PP1-R35A-fw	CTTTAAGGTCATTGGAACTGTAAGAGCACAGGAGCAGGCA	R35A
PP1-R35A-rev	TGCCTGCTCCTGTGCTCTTACAGTTCCAATGACCTTAAAG	
PP1-D99A-fw	CCCATTTATTTTCAATGACGCCAGAGCTCTTGAGGACGTT	D99A
PP1-D99A-rev	AACGTCCTCAAGAGCTCTGGCGTCATTGAAAATAAATGGG	

(Fortsetzung der Tabelle 6)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmale
PP1-Duet1-fw	CATGCCATGGTTTCTAAGGTTTTATTGACAGG	*Nco*I
PP1-Duet1-rev	ATTTAAGAATGCGGCCGCTTATTTATTAGCACGC	*Not*I
GDH-pACYC-fw	ACCAACCAGGTCTCACATGTATCCGGATTTAAA	*Bsa*I
GDH-pACYC-rev	ATAATAACTCGAGTTAACCGCGGCCTGC	*Xho*I

2.4 Anzucht von Mikroorganismen

2.4.1 Medien und Lösungen

Die flüssigen Nährmedien wurden bei 121 °C autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für Festmedien wurde den Lösungen 15 g L^{-1} Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden diese auf ca. 50 °C abgekühlt und nach Zugabe weiterer Medienzusätze (z. B. Antibiotika, siehe Tabelle 7) in Petrischalen gegossen. Die festen Nährböden wurden bis zur Verwendung für maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Antibiotika-Stammlösungen wurden zuvor mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) filtriert und bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antibiotika und die dazugehörigen Endkonzentrationen in den Medien.

Antibiotikum	Konzentration für *E. coli* [µg mL^{-1}]
Ampicillin (Amp)	100
Carbenicillin (Carb)	100
Chloramphenicol (Cm)	34
Kanamycin (Km)	50

LB-Medium: 10 g L^{-1} Pepton; 5 g L^{-1} Hefeextrakt; 10 g L^{-1} NaCl

TB-Medium: 12 g L^{-1} Casein (enzym. verdaut); 24 g L^{-1} Hefeextrakt; 9,4 g L^{-1} K_2HPO_4; 2,2 g L^{-1} KH_2PO_4; 4 mL L^{-1} Glycerin

YPD-Medium:

Lösung A 10 g L^{-1} Hefeextrakt; 20 g L^{-1} Pepton 5 g L^{-1}
auf 900 mL dH_2O

Lösung B 20 g D-Glucose
auf 100 mL dH_2O

Nach dem Autoklavieren wird die Lösung B (100 mL) der Lösung A (900 mL) zugegeben.

Autoinduktionsmedium:

Lösung A 12 g L^{-1} Caseinhydrolysat; 24 g L^{-1} Hefeextrakt; 5 g L^{-1} Glycerin
auf 900 mL KPi-Puffer (100 mM, pH 7)

Lösung B 0,5 g D-Glucose; 2 g Lactose
auf 100 mL KPi-Puffer (100 mM, pH 7)

Nach dem Autoklavieren wird die Lösung B (100 mL) der Lösung A (900 mL) zugegeben.

2.4.2 Kultivierung mikrobieller Stämme

Mikroorganismen aus der institutsinternen Stammsammlung wurden in den von der DSMZ empfohlenen Flüssigmedium und empfohlenen Temperaturen angezogen. Die Hefe *Pichia pastoris* GS115 wurde in YPD-Medium bei 120 UpM und 25 °C kultiviert.

2.4.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

2.4.3.1 Kultivierung im Standardmaßstab (bis zu 1 L Volumen)

Die Kulturen von *E. coli* wurden bei 37 °C in LB- oder TB-Medium kultiviert. Stämme mit plasmidkodierten Resistenzmarkern wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Flüssigkulturen wurden über Nacht in 5-20 mL LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und in einem Inkubationsschüttler bebrütet, größere Volumina wurden im Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler bei 120 UpM und 37 °C kultiviert. Hauptkulturen wurden aus einer Übernachtkultur auf eine OD_{600nm}= 0,05 in TB-Medium beimpft. Für die Überexpression der Gene wurde bei Erreichen einer OD_{600nm}= 0,5-0,8 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentrationen 0,1-0,5 mM) induziert. Die Kultivierung auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C bis Einzelkolonien erkennbar waren. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C gelagert.

Bei der Verwendung des Autoinduktionsmediums wurde kein IPTG hinzugegeben, da nach Verbrauch der D-Glucose, die im Medium enthaltene Lactose anschließend zur Induktion der Genexpression von den entsprechenden *E. coli*-Stämme verwendet wird.

2.4.3.2 Hochzelldichte-Fermentation (HZD)

Zur Produktion des Ganzzellkatalysators mit PPADH1 aus *P. pastoris* und GDH aus *B. subtilis* wurde eine Hochzelldichte-Fermentation in einem 40 L Fermenter (Infors AG) von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen durchgeführt, die die rekombinanten Plasmide pET28a-PPADH1 und pACYC-GDH tragen. Das Fermentationsvolumen betrug 15 L und das Fermentationsmedium setzte sich aus einem HZD-Batchmedium und einem HZD-Fedmedium zusammen.

Die Komponenten des HZD-Batchmediums setzen sich wie folgt zusammen:

0,2 g L^{-1} NH_4Cl; 2 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$; 13 g L^{-1} KH_2PO_4; 10 g L^{-1} K_2HPO_4; 6 g L^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 3 g L^{-1} Hefeextrakt; 2 g L^{-1} D-Glucose; 1 g L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,25 % Vitaminlösung (0,1 g L^{-1} Riboflavin; 10 g L^{-1} Thiamin; 0,5 g L^{-1} Nicotinsäure; 0,5 g L^{-1} Pyridoxin; 0,5 g L^{-1} Phanthotenat; 0,001 g L^{-1} Biotin; 0,002 g L^{-1} Folsäure; 0,01 g L^{-1} Cyanocabalamin); 0,16 % Spurenelementlösung (10 g L^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,5 g L^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,25 g L^{-1} $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 2,5 g L^{-1} $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1,75 g L^{-1} $CoCl_2 \cdot 6H2O$; 0,125 g L^{-1} H_3BO_3; 2,5 g L^{-1} $AlCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,5 g L^{-1} $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 10 g L^{-1} $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) und 0,1 g L^{-1} Thiamin in destilliertem Wasser.

Zusätzlich wurde ein HZD-Fedmedium verwendet, welches die gleichen Inhaltsstoffe wie das Batch-Medium enthielt, davon abweichend 18 g L^{-1} Hefeextrakt; 600 g L^{-1} D-Glucose, 10 g L^{-1} $MgSO_4$ $7H_2O$ und 1 g L^{-1} Thiamin.

Nach Sterilisation des Fermenters mit dem HZD-Batchmedium wurden die Antibiotika (40 mg L^{-1} Kanamycin und 20 mg L^{-1} Chloramphenicol) hinzugefügt und die Fermentation wurde durch Inokulation mit 1 % (v/v) der Vorkultur gestartet. Für optimales Wachstum wurden die Zellen unter Glucose-limitierenden Bedingungen kultiviert. Die Zudosierung des Fed-Mediums erfolgte nach einem optimierten Protokoll für *E. coli*-Zellen bei 30 °C. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,0 durch den Einsatz von H_3PO_4 konstant gehalten. Die Belüftung erfolgte mittels Pressluft, wobei die Regulierung des Sauerstoffpartialdruckes (auf 30 % eingestellt) über die Belüftungsrate erfolgte. Die Genexpression erfolgte nach 27 Stunden durch Zugabe von IPTG (2 mM). Nach Induktion wurde die Temperatur von 30 °C auf 25 °C gesenkt. Die Temperatur, der pH-Wert und die Belüftungsrate wurden automatisch kontrolliert mit Hilfe eines Computers. Nach einer Inkubationszeit von 41 Stunden wurden die Zellen anschließend mittels Zentrifugation abgetrennt und bei -20 °C eingefroren.

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Übernachtkultur von *E. coli* erfolgte durch die Verwendung von „Mini Kit innuPREP Plasmid“ der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA wurde mit Millipore-Wasser durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Chromosomale DNA

Die Isolierung von genomischer DNA von gram-positiven und gram-negativen Bakterien erfolgte aus einer Übernachtkultur unter Verwendung des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA wurde mit Millipore-Wasser durchgeführt. Die genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Isolierung genomischer DNA aus der Hefe *Pichia pastoris* GS115 wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierbei wurden Übernachtkulturen (5-10 mL) zentrifugiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µL Lysis-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 500 µL Phenol/Chloroform hinzugegeben und mittels Vortexer gut vermischt und anschließend bei max. Geschwindigkeit für 15 min bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 mL unvergälltes Ethanol (96 %) hinzugefügt und das Eppendorfgefäß dreimal langsam invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das sichtbare DNA-Pellet mit 400 µL 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand nach einer weiteren Zentrifugation entfernt und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 50 µL Millipore-Wasser gelöst und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

Hefe-Lysis-Puffer:
2°% (v/v) Triton X-100
1°% (w/v) SDS
1 mM EDTA
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 8

2.6 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von DNA aus PCR- bzw. Restriktionsansätzen wurde unter Verwendung des „innuPREP DOUBLE pure Kit“ der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA wurde mit Millipore-Wasser durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm über das Programm „nucleic acid“ mit dem „NanoDrop 2000c“ von Thermo Scientific nach Herstellerprotokoll bestimmt.

2.8 *In vitro* Modifikationen von DNA

2.8.1 Restriktion von DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA erfolgte durch Restriktionsenzyme nach Herstellerprotokoll unter Verwendung der empfohlenen Puffer bei empfohlener Temperatur, wobei der Anteil an Enzymlösung in einer Reaktion nicht mehr als 5 % (v/v) vom Gesamtvolumen betrug. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze bei jeweils vom Hersteller empfohlener Temperatur für 20 min erhitzt.

2.8.2 Ligation von DNA-Molekülen mit T4-DNA-Ligase

Zur effektiven *in vitro*-Ligation von DNA-Molekülen mit überhängenden Enden (*sticky ends*) wurden 50-100 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit Insert-DNA, Puffer (1 x) und 2,5-5 U T4-DNA-Ligase für 1 h bei RT inkubiert. Für Ligationsreaktionen mit glatte Enden (*blunt ends*) wurden Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 mit Insert-DNA nach Vorgabe von Thermo Scientific in Puffer (1 x) mit 5 U T4-DNA-Ligase für 2 h bei RT, 16 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Inaktivierung der T4-DNA-Ligase erfolgte für 10 min bei 65 °C.

2.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,5-1 % (w/v) nach SAMBROOK *et al*. (1989) elektrophoretisch getrennt.[178] Die Gele wurden in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na_2-EDTA) angesetzt und 10 µL Ethidiumbromid-Lösung (0,5 % (v/v)) hinzugefügt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Als Längenstandard wurden die „GeneRuler™ 1kb DNA ladder“ von Thermo Scientific eingesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente diente das eingesetzte Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese-Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammmen mit der Software „Gel Jet Imager Plus“ der Firma Intas (Göttingen) genutzt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Gel Extraction“-Kits der Firma Qiagen bzw. des „innuPREP DOUBLEpure“-Kits der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA wurde mit Millipore-Wasser durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Standard-PCR

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch, welche nach der Methode von SAIKI *et al.* (1988) durchgeführt wurde.[179] Die *annealing* Temperatur (T_a) lag bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m), bei Verwendung der *Phusion*-Polymerase 3 °C über der T_m der verwendeten Oligonukleotide. Die Elongationszeit (t_E) richtete sich nach der Größe der zu amplifizierenden Produkte und der Wahl der DNA-Polymerase, die *Pfu*-DNA-Polymerase benötigt für 1 kb ca. 2 min und die *Phusion*™ *High-Fidelity* DNA-Polymerase ca. 30 s für 1 kb. Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes ist in Tabelle 8 dargestellt. Die PCR wurde im PCR-Automaten

„*Mastercycler Gradient*“ der Firma Eppendorf mit dem in Tabelle 9 aufgeführten Standard-Temperaturprogramm durchgeführt. Bei hohen T_m der verwendeten Oligonukleotide wurde statt des Standard-PCR Programms eine 2-*step* PCR ohne Annealing-Schritt durchgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung einer Standard-PCR.

Komponente	Menge	Endkonzentration
Template-DNA	1-3 µL	-
Oligonukleotide (10 pmol/µL)	je 1-3 µL (fw & rev)	je 0,2-0,6 pmol/µL (fw & rev)
DMSO (100 %)	1,5-2,5 µL	3-5 %
Puffer (5x/10x)	10 µL/5 µL	1x
DNA-Polymerase	0,5 µL	-
dNTP’s (10 mM)	0,5-1,5 µL	100-300 µM
Millipore-H_2O	auf 50 µL	-

Tabelle 9: Temperaturprogramm einer Standard-PCR (3-*step* PCR).

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C[a]/98 °C[b]	2 min	1
Denaturierung	95 °C[a]/98 °C[b]	30 s	
Primer Annealing[c]	T_m -5 °C[a]/T_m +3 °C[b]	30 s	30-35
Elongation	68 °C[a]/72 °C[b]	2 min/kb[a]/30 s/kb[b]	
Abschließende Elongation	68 °C[a]/72 °C[b]	10 min	1

[a]*Pfu*-Polymerase.
[b]*Phusion*-Polymerase.
[c]Bei 2-*step* PCR wurde der Schritt Primer Annealing weggelassen.

2.11.2 QuikChange® PCR

Bei der QuikChange® PCR werden Primer verwendet, die zueinander komplementär sind und einige veränderte Nukleotide (Mutationen) in der Sequenz aufweisen. Diese Primer werden zur Amplifikation des gesamten Plasmids verwendet, wobei das amplifizierte Produkt an der betreffenden Stelle die Mutationen bei erfolgreichem Austausch tragen sollten. Die QuikChange® PCR wurde im PCR-Automaten „*Mastercycler Gradient*“ der Firma Eppendorf durchgeführt. Das verwendete

Temperaturprogramm folgt dem Standard-Programm (Tabelle 9) jedoch mit einer geringeren Zyklenanzahl von 23 statt 30-35. Nach Durchführung der QuikChange® PCR wurde mittels Agarosegel überprüft, ob das Plasmid vervielfältigt wurde. Anschließend wurde das PCR-Produkt gereinigt und einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I unterzogen, um das alte, methylierte DNA-Template (ohne Mutationen) abzubauen.

2.12 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Eine Vorkultur (10 mL) wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und üN bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 200 mL LB-Medium mit der entsprechenden Menge an *E. coli* Übernacht-Kultur auf eine Zelldichte von OD_{600nm}= 0,05 beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wuchsphase (OD_{600nm}= 0,5-0,8) auf einem Schüttler (120 UpM) bebrütet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 1750 g, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 14 mL eiskaltem FB-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 1750 g, 4 °C) wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in 3,4 mL eiskaltem FB-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 100 µL auf Eppendorfgefäße verteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze auf Eis oder bei -80 °C gelagert.

FB-Puffer: 1,48 g KCl; 1,50 g $CaCl_2$ x $2H_2O$; 20,0 g Glycerin;
2 mL KCH_3COOH (1 M, pH 7,5)
auf 200 mL A. dest. (pH 6,4 einstellen)

Der FB-Puffer wurde vor Verwendung bei 121 °C autoklaviert.

2.13 Chemische Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach HANAHAN (1983) wie folgt durchgeführt.[175] Zu 100 µL kompetenten Zellen wurden 7,5 µL eines Ligationsansatzes oder 1-2 µL Plasmid-DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C, gefolgt von einer kurzen Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 500 µL LB-Medium folgte die phänische Expression bei 37 °C und leichtem Schütteln (120 UpM) je nach Antibiotika-Resistenz für 0,5-2,5 Stunden. Die Zellen wurden anschließend mittels

Zentrifugation (14000 UpM, 1 min) sedimentiert, in 100 µL LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen (bei Transformationen von Ligationen) oder direkt 100 µL des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

2.14 Proteinchemische Methoden

2.14.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle

Für die Isolierung von Rohextrakten aus mikrobiellen Stämmen der institutsinternen Stammsammlung wurden Zellen in KPi-Puffer (50 mM, pH 7) resuspendiert, um eine 25%ige Zellsuspension zu erhalten. 600 µL dieser Suspension wurden mit 1,2 g Glasperlen (ø 0,25-0,50 mm) vermischt (1,5 mL Eppendorfgefäß), anschließend in den auf Eis vorgekühlten Probenhalterungen in der Schwingmühle (Firma Retsch) befestigt und unter Kühlung aufgeschlossen (15 min, 30 Hz). Zelltrümmer sowie Glasperlen wurden durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt, der zellfreie Rohextrakt abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.14.2 Zellaufschluss mittels *French Press*

Zum Aufschluss größerer Zellmengen oder zum Aufschluss von Hefe-Zellen der *P. pastoris* wurde die *French Press* (Glen Mills) eingesetzt. Die Zellpellets wurden als 25%ige Zellsuspension in KPi-Puffer (50 mM, pH 7) resuspendiert. Nach drei Durchläufen an der *French Press* bei einem Druck von 900 psi wurde der zellfreie Rohextrakt nach Zentrifugation für 45 Minuten bei 20000 g und 4 °C erhalten. Der isolierte Rohextrakt wurde entweder verwendet oder einer Proteinreinigung unterzogen.

2.14.3 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zellen wurden in den entsprechenden Aufschlusspuffer (Lysis-Puffer; KPi-Puffer oder Tris-HCl-Puffer) als 25%ige Zellsuspension auf Eis mittels Ultraschall (Branson-Sonifier W250) aufgeschlossen. Hierbei wurden je nach Volumen die Spitzen MS 72 oder MS 73 (Bandelin) verwendet mit folgenden Einstellungen: Leistungszyklus 50 %, Power 25-30 %; 3 x 2 min; jeweils 1 min Kühlung zwischen den Ultraschallbehandlungen auf Eis. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden anschließend durch Zentrifugation (18000 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt und der Rohextrakt erhalten.

2.14.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zum einen nach der Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt.[180] Hierfür wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzsubstanz verwendet, um eine Eichreihe von 0,01-1 mg mL^{-1} zu erstellen. Hierfür wurden 100 µL Proteinprobe mit 900 µL Bradford-Reagenz in einer Küvette vermischt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch bei 595 nm (UV-1602 Photometer, Shimadzu) vermessen. Die Nullwertbestimmung erfolgte mit Millipore-Wasser.

Herstellung Bradford-Reagenz: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden mit 50 mL Methanol versetzt und anschließend 100 mL Phosphorsäure (85 %) hinzugefügt. Die saure Lösung wurde langsam in 850 mL Millipore-Wasser hinzugegeben und lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigten Proteinproben wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) unter Einstellung des spezifischen Molekulargewichts und Extinktionskoeffizienten durchgeführt.

2.14.5 Umpuffern und Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zum Umpuffern oder Entsalzen von Proteinlösungen wurden PD-10 Säulen (GE Healthcare) verwendet. Nach Äquilibrierung der Säulen mit 20 mL Puffer, wurden 2,5 mL der Probe aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend mit 3,5 mL des gewünschten Puffers von den PD-10 Säulen eluiert. Zum Aufkonzentrieren und Umpuffern von Proteinproben wurde eine Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20, Sartorius) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet, welche maximal mit 5000 UpM bei 4 °C zentrifugiert wurde.

2.14.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte nach LAEMMLI (1979) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem, welches sich aus einem 5%igen Sammelgel und aus einem 12%igen Trenngel zusammensetzte.[181] Vor der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinproben mit 1x-SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurde 5-10 µL Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden zunächst bei einer

Spannung von 100 V ins Sammelgel einlaufen lassen, anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Die Entwicklung des Gels erfolgte in Coomassie-Färbelösung auf Ethanolbasis für 1–2 h oder in „Simply Blue Safe Stain“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Die Entfärbung der SDS-Gele erfolgte mit Essigsäure/Ethanol-Entfärber oder dH_2O.

SDS-Probenpuffer (5x): 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin;
5 % (v/v) ß-Mercaptoethanol;
0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250,
Tris-HCl-Puffer (60 mM, pH 6,8)

Coomassie-Färbelösung: 50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure;
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250

Coomassie-Entfärberlösung: 40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2.14.7 Western Blot und Immunodetektion

Der Western Blot und die Immunodetektion auf PVDF-Membranen erfolgte nach der Methode VON TOWBIN *et*. *al*. (1979) und wurde wie folgt durchgeführt.[182] Für die Durchführung des Western Blots wurde eine PVDF-Membran zunächst für 5 min in Methanol aktiviert und anschließend in dH_2O und Dunn-Carbonat-Puffer inkubiert. Der Transfer von durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte für 15 min bei 150 mA und für weitere 45 min bei 300 mA in Dunn-Carbonat--Puffer.

Für die anschließende Immunodetektion von His-getaggten Proteinen wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer für 1 h bei 37 °C in Blockierlösung (TBS-T-Puffer mit 1 % (w/v) Milchpulver) inkubiert. Es folgte die Zugabe des Anti-His-HRP-Antikörpers (Carl Roth, 1:10000) über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min in TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion der HRP (Meerrettisch-Peroxidase)-Aktivität erfolgte durch Visualisierung der Chemo-limuneszenz durch Zugabe der ECL-Lösung. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Gerät „Imaging System Stella 3200“ (Raytest, Wetzikon).

Dunn-Carbonat-Puffer: 10 mM $NaHCO_3$; 3 mM Na_2CO_3; 20 % (v/v) Methanol

TBS-T-Puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 3 mM KCl;
0,2 % (v/v) Tween 20

ECL-Lösung: 1 mL Lösung A; 100 µL Lösung B; 0,3 µL Lösung C

Lösung A: 50 mg Luminol auf 200 mL Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8,6)
Lösung B: 11 mg *para*-Hydroxycoumarinsäure auf 10 mL DMSO
Lösung C: 30 % Wasserstoffperoxid-Lösung

2.14.8 Chromatographische Reinigung der PPADH aus dem *Pichia pastoris* GS115-Rohextrakt

Nach Aufschluss der *Pichia*-Zellen und anschließender Zentrifugation, wurde der Rohextrakt einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Hierfür wurde dem Rohextrakt Ammoniumsulfat hinzugeben, sodass die Endkonzentration 2,47 M betrug. Die Lösung wurde für 1 h auf Eis langsam gerührt, sodass nach Zentrifugation ein Protein-Teil des *Pichia* Rohextrakts entfernt wurde. Der erhaltene Überstand wurde einer zweiten Ammoniumsulfatfällung unterzogen, wobei eine Ammoniumsulfat-Konzentration 4,25 M erreicht wurde. Nach einstündigem Rühren der Lösung auf Eis und anschließender Zentrifugation wurde diesmal der Überstand entfernt und das Pellet im ursprünglichen Volumen mit Start-Puffer (100 mM KPi-Puffer + 1,7 M Ammoniumsulfat, pH 7,2) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend über eine Phenylsepharose-Säule (GE Healthcare, 6 Fast Flow) mit einer Flussrate von 2,5 mL min^{-1} aufgereinigt, welche mit mindesten 5 Säulenvolumen Start-Puffer voräquilibriert wurde. Die Elution der Proteine erfolgte mit 50 mM KPi-Puffer pH 7 und einem Gradienten von 1,7 M auf 0 M Ammoniumsulfat. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, umgepuffert und einer Q-Sepharose Reinigung (Q-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) unterzogen. Die Reinigung erfolgte mit einer Flussrate von 2,5 mL min^{-1} und 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 9,0 äquilibriert. Die Elution der Proteine wurde mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 9,0 und 1 M NaCl durchgeführt, wobei ein linearer Gradient von 0 M auf 1 M NaCl verwendet wurde. Aktive Fraktionen wurden gesammelt und in 50 mM KPi-Puffer mit 300 mM NaCl umgepuffert für eine anschließende Gelfiltration (Superdex 75, GE Healthcare). Aktive Fraktionen wurden wiederum vereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Protein-Proben von Dr. Jens Sproß (Universität Bielefeld) für die MALDI-TOF Analyse weiterbearbeitet.

2.14.9 Chromatographische Reinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen

Die Reinigung der Proteine mit His-Tag erfolgte nach der Expression der korrespondierenden Gene in pET-Vektoren im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3) als N- oder/und C-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) nach PORATH *et al.* (1975).[183] Nach der Expression im 50 mL- bis 1 L-Maßstab wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in KPi-/Tris-HCl/Lysis-Puffer resuspendiert, so dass eine 25%ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation abgetrennt. Für die Reinigung wurden ca. 4-6 mL Ni-NTA-Material (MCLAB, San Francisco) in eine Tropfsäule gegeben und- nachdem sich das Material abgesetzt hatte- mit mindestens fünf Säulenvolumen Lysispuffer äquilibriert. Der als Überstand erhaltene zellfreie Rohextrakt wurde anschließend auf das Säulenmaterial gegeben, vermischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit mindestens zwei Säulenvolumen Lysispuffer gespült, um nicht-bindende Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumen Waschpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteinen abzutrennen. Die Elution der His-getaggten Fusionsproteine erfolgte im 10-fachen Säulenvolumen mit hohen Imidazolkonzentration unter Verwendung des Elutionspuffers. Anschließend wurde die Enzymlösung mittels Ultrafiltrationseinheit eingeengt und umgepuffert oder mit einer PD-10-Säule entsalzt.

Für die Reinigung größerer Rohextraktvolumina wurde das ÄKTA-System der Firma Pharmacia verwendet. Rohextrakte wurden mit einer Flussrate von 2 mL min^{-1} auf die voräquilibrierte Ni-NTA-Säule (befüllt mit Ni-NTA Material von MCLAB) aufgetragen. Nach der Beladung wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen Lysispuffer gespült bis die Extinktion bei UV_{280nm} konstant bei nahezu 0 blieb. Die Säule wurde mit mindestens 5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Die Elution des His-Tag Fusionsproteins erfolgte mit dem Elutionspuffer bei einer Flussrate von 3 mL min^{-1}. Die einzelnen Fraktionen des Elutions-Peaks wurden anschließend über ein SDS-Gel analysiert. Saubere Fraktionen wurden vereinigt über eine Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussvolumen: 10 kDa) umgepuffert und einkonzentriert. Die konzentrierte Proteinprobe wurde auf Eis oder bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Lysispuffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Waschpuffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

2.14.10 Präzipitation von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)

Die TCA-Fällung von Proteinen erfolgte mit der modifizierten Methode nach PETERSON (1977) und diente hauptsächlich zum Einkonzentrieren gereinigter Proteinproben mit geringen Proteinkonzentrationen für die SDS-PAGE.[184] Die zur Präzipitation von Proteinen verwendeten Proben wurden mit 0,1 Volumeneinheiten einer 70%igen (w/v) Trichloressigsäure-Lösung versetzt und der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 UpM und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die präzipitierten Proteine zweimal mit 80%igen (v/v) Aceton gewaschen. Hierfür wurden 100 µL Aceton vorsichtig in das Eppendorfgefäß gegeben und der Überstand direkt wieder abgenommen und verworfen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 14000 UpM) wurde der restliche Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Waschschritt mit Aceton dient der Entfernung der Trichloressigsäure aus der Proteinprobe Das Präzipitat wurde für 5 min bei RT getrocknet und in SDS-Probenpuffer, dH_2O sowie 4 µL konzentrierte Tris-HCl-Lösung gelöst.

2.14.11 Thermofluor-Screen

Zur Untersuchung von verschiedener Einflüssen wie z. B. Puffertypen, Pufferkapazität, Salzkonzentrationen und pH auf die PPADH1 und dessen Stabilität wurde ein Thermostabilitäts-*Screening* mit der Thermofluor-Methode nach BOIVIN *et al.* (2013) von Christine Tölzer (Universität Köln, AK Niefind) durchgeführt.[185] Hierfür wurde folgender Ansatz in der 96-well-Platte verwendet: 5 µL Puffer (5x konzentriert), 16 µL H_2O, 2 µL gereinigtes Protein (6,2 mg mL^{-1}), 2 µL SYPRO Orange-Lösung (Invitrogen, Stammlösung: 62 x konzentriert) auf ein Gesamtvolumen von 25 µL. Die 96-well-Platte wurde nach dem Pipettieren der einzelnen Komponenten in den Real-Time-PCR-Cycler gestellt und folgendes Programm gestartet: 1 °C min^{-1} von 4 °C bis 95 °C, wobei die Fluoreszenz im Bereich von 485/20 nm (Extinktion) und 530/30 nm (Emission) vermessen wurde. Die Analyse der Thermofluor-Daten basiert auf der 1. Ableitung der Rohdaten nach folgender Gleichung:

$f(T) = -(dRFU)/dT$

d/d*T*= 1. Ableitung nach der Temperatur

RFU= relative Fluoreszenzeinheit

T= Temperatur

2.14.12 Präparation und Verwendung anderer Enzyme

2.14.12.1 Verwendung der rekombinanten GDH aus *Bacillus subtilis*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der NAD(P)H-abhängigen Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (GDH) waren im Institut aus früheren Arbeiten vorhanden (Hochzelldichte-Fermentation von pET21a-*gdh* (Gen aus *B. subtilis* DSM 4424) in *E. coli* BL21(DE3). Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (50 mM, pH 8) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.14.12.2 Verwendung der rekombinanten NOX aus *Lactobacillus sanfranciscensis*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der NAD(P)H-abhängigen Oxidase aus *Lactobacillus sanfranciscensis* (LSNOX) waren im Institut aus früheren Arbeiten vorhanden (pET28a-*lsnox* (Gen aus *L. sanfranciscensis* DSM 20451) in *E. coli* BL21(DE3). Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (50 mM, pH 8) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.14.12.3 Verwendung der rekombinanten ADH aus *Lactobacillus kefir*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der (*R*)-spezifischen NADP(H)-abhängigen ADH aus *L. kefir* (LKADH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (Hochzelldichte-Fermentation von pET21a-*lkadh* (Gen aus *L. kefir* DSM 20587) in *E. coli* BL21(DE3)). Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (100 mM, pH 7 +1 mM $MgCl_2$) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.14.12.4 Verwendung der rekombinanten ADH aus *Rhodococcus ruber*

Gefrierkulturen von rekombinanten *E. coli* Zellen mit der (*S*)-spezifischen NAD(H)-abhängigen ADH aus *R. ruber* (RRADH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (pKA1-*rradh* (Gen aus *R. ruber* DSM 44541) + pGro7 (Chaperone Vektor, Takara) in *E. coli* BL21(DE3)). Die Hauptkultur wurde 1 %ig mit einer Übernachtkultur in 1 L TB-Medium mit 1 mg mL^{-1} L-Arabinose, 50 µg mL^{-1} Ampicillin und 34 µg mL^{-1} Chloramphenicol beimpft und bei 120 UpM und 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD_{600nm}= 0,3 wurde 1 mM $ZnCl_2$ hinzugefügt und die Hauptkultur für 30 min bei 25 °C kultiviert. Anschließend wurde die Überexpression der Gene durch Zugabe von IPTG (Endkonzentrationen 50 µM) induziert, wobei die Kultur für weitere 22 Stunden bei 25 °C inkubiert wurde. Nach der Zellernte wurde ein Teil der Zellen auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (100 mM, pH 7) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.14.12.5 Verwendung der rekombinanten 3α-HSDH aus *Comamonas testosteroni*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der NAD(H)-abhängigen HSDH aus *Comamonas testosteroni* (3α-HSDH) waren im Institut aus anderen Arbeiten vorhanden (pET21a-3α-*hsdh* (Gen aus *C. testosteroni* DSM 50244) in *E. coli* BL21(DE3)). Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (50 mM, pH 8) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.14.12.6 Verwendung der rekombinanten ADH aus *Parracoccus pantotrophus*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der NAD(H)-abhängigen ADH aus *P. pantotrophus* (PAPADH) waren im Institut aus anderen Arbeiten vorhanden (pET28a-*papadh* (Gen aus *P. pantotrophus* DSM 11072) in *E. coli* BL21(DE3)). Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit KPi-Puffer (50 mM, pH 8) als 25%ige Zellsuspension resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 18000 g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der zellfreie Rohextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.15 Analytische Methoden

2.15.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.15.1.1 Bestimmung der ADH-Aktivitäten

Bei der Reduktion von Aldehyden oder Ketonen durch die NAD(P)-abhängigen ADHs wird NAD(P)H oxidiert. Die Aktivitätsbestimmung der ADHs beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme der NAD(P)H-Konzentration bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messungen erfolgten in Küvetten (Schichtdicke: 1 cm) bei 25 °C mit Hilfe eines Photometers (UV-1602, Shimadzu). Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt 6,22 mM^{-1} cm^{-1}. Bei der Oxidation von Alkoholen durch die ADHs wird $NAD(P)^+$ reduziert, sodass photometrisch die Zunahme der NAD(P)H-Konzentration bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wird. Aus der Steigung der aufgenommenen Reaktionskinetik kann die Enzymaktivität mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$U\ mL^{-1} = \frac{\Delta E_{340nm}}{t} * \frac{V_g * f}{\varepsilon * V_P * d}$$

$\Delta E_{340nm}/t$ = Steigung der Extinktionskurve

V_g = Gesamtvolumen (1 mL)

V_P = Probenvolumen (10 µL)

f = Verdünnungsfaktor (der Enzymlösung)

ε = molarer Extinktionskoeffizient von NADP(H)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Jede Aktivitätsbestimmung wird in einer Dreifach-Bestimmung durchgeführt, wobei der erhaltene Mittelwert als Aktivität bezeichnet wird.

Der reduktive Standard-Assay für die PPADH setzt sich wie folgt zusammen:

980 µL Substratlösung (20 mM Benzaldehyd* in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7))
10 µL NADPH* (20 mM)
10 µL Protein
1 mL Gesamtvolumen

*Teilweise wurden andere Substrate in einer Konzentration von 10-20 mM und andere Cofaktoren (NADH) eingesetzt z. B. bei der Verwendung anderer ADHs.

Der oxidative Aktivitäts-Assay setzt sich wie folgt zusammen:

980 µL Substratlösung (10-20 mM Alkohol in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7/pH 9))
10 µL $NAD(P)^+$ (20 mM)
10 µL Protein
1 mL Gesamtvolumen

Die Aktivitätstests wurden durch Zugabe der Enzymlösung (10 µL) gestartet und die Änderung der Extinktion über 60 s verfolgt. Hierbei entspricht 1 U derjenigen Enzymmenge, welche die Umsetzung von einem µmol NAD(P)H/$NAD(P)^+$ pro Minute bei 25 °C katalysiert.

2.15.1.2 Bestimmung der GDH-Aktivität

Die Bestimmung der GDH-Aktivität erfolgte photometrisch durch Zunahme der NAD(P)H-Konzentration bei 340 nm. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 980 µL Substratlösung (100 mM D-Glucose in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7) und 10 µL $NAD(P)^+$ (20 mM). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms (10 µL) gestartet und erfolgte in einer Küvette bei 25 °C für 1 min.

2.15.1.3 Bestimmung der NOX-Aktivität

Die Aktivität der NOX wurde photometrisch durch die Abnahme der NAD(P)H-Konzentration bei 340 nm bestimmt. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 980 µL Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7) und 10 µL NADPH (20 mM). Die Messung wurde durch Zugabe des Enzyms (10 µL) gestartet und erfolgte in einer Küvette bei 25 °C für 1 min.

2.15.2 Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographischen Analysen wurden mit dem Gaschromatographen GC-17A mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) der Firma Shimadzu vorgenommen. Als Trennsäule wurde die chirale Säule CP Chirasil DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm) und als Trägergas Helium (1,3 mL min^{-1}) verwendet. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 1 µL. Zu analysierende Proben wurden mit der doppelten Menge an Ethylacetat oder Diethylether versetzt und 1 min mit dem Vortexer vermischt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (14000 UpM, 3 min) wurden 100 µL der organischen Phase in ein GC-Vail überführt und anschließend analysiert. Teilweise wurden die Proben im kleinen Maßstab säulenchromatographisch über kleine Silicagel-Säulchen aufgearbeitet und mit

n-Hexan/*i*PrOH (99:1) eluiert. In Tabelle 10 sind die verwendeten GC-Programme mit Angabe der Retentionszeiten (t_R) für Edukte und Produkte angegeben.

Tabelle 10: Verwendete GC-Programme. TF= Trifluor; DF= Difluor, MF= Monofluor.

Verwendung	Temperaturprogramm	Retentionszeiten
Reduktion CF_3-Aldols	60 °C (5 min)/ 30 °C min^{-1} auf 135°C/ 5 °C min^{-1} auf 185°C/ 30 °C min^{-1} auf 195°C	Trifluoracetophenon: 6,84 min; (*S*)-CF_3-Aldol: 11,74 min; (*R*)-CF_3-Aldol: 11,94 min; (*S*,*S*)-CF_3-Diol: 15,90 min
Eintopfreaktion	100 °C (5 min)/ 10 °C min^{-1} auf 130 °C (9 min)/ 15 °C min^{-1} auf 175 °C/ 5 °C min^{-1} auf 195 °C (1 min)	Trifluoracetophenon: 3,08 min; (*S*)-CF_3-Aldol: 13,97 min; (*R*)-CF_3-Aldol: 15,04 min; TF-Alkohole: 15,40 min, 15,94 min (*S*,*S*)-CF_3-Diol: 21,70 min
Reduktion Acetophenon	100 °C (2 min)/ 5 °C min^{-1} auf 140 °C/ 20 °C min^{-1} auf 195 °C (1 min)	Acetophenon: 6,65 min (*R*)-Phenylethanol: 9,66 min (*S*)-Phenylethanol: 9,94 min
Reduktion Trifluoracetophenon	100 °C (2 min)/ 5 °C min^{-1} auf 140 °C/ 20 °C min^{-1} auf 195 °C (1 min)	TF-Acetophenon: 3,02 min (*S*)-Alkohol: 11,38 min (*R*)-Alkohol: 11,50 min
Reduktion Difluoracetophenon	100 °C (5 min)/ 20 °C min^{-1} auf 135 °C/ 5 °C min^{-1} auf 195 °C (5 min)	DF-Acetophenon: 6,47 min (*S*)-Alkohol: 11,57 min (*R*)-Alkohol: 11,82 min
Reduktion Monofluoracetophenon	100 °C (5 min)/ 20 °C min^{-1} auf 135 °C/ 5 °C min^{-1} auf 195 °C (5 min)	MF-Acetophenon: 8,86 min (*S*)-Alkohol: 11,12 min (*R*)-Alkohol: 11,31 min
Reduktion 4-Phenyl-2-butanon	100 °C (5 min)/ 15 °C min^{-1} auf 140 °C (8 min)/ 15 °C min^{-1} auf 160 °C (1 min)	Edukt: 10,26 min (*S*)-Alkohol: 12,93 min (*R*)-Alkohol: 13,13 min
Reduktion/Oxidation 2 Hexanon/2-Hexanol	70 °C (15 min)	2-Hexanon: 4,58 min (*R*)-2-Hexanol: 10,38 min (*S*)-2-Hexanol: 10,70 min
Reduktion/Oxidation 2-Heptanon/2-Heptanol	60 °C (5 min)/ 5 °C min^{-1} auf 140 °C	(*S*)-Heptan-2-yl-trifluoracetat: 7,97 min (*R*)-Heptan-2-yl-trifluoracetat: 8,10 min 2-Heptanon: 9,68 min
Reduktion/Oxidation 2-Octanol/2-Octanol	60 °C (5 min)/ 5 °C min^{-1} auf 140 °C	(*S*)-Octan-2-yl-trifluoracetat: 11,18 min (*R*)-Octan-2-yl-trifluoracetat: 11,31 min 2-Octanon: 12,81 min
Reduktion Benzaldehyd	100 °C (2 min)/ 5 °C min^{-1} auf 140 °C/ 20 °C min^{-1} auf 195 °C (1 min)	Benzaldehyd: 4,95 min Benzylalkohol: 9,40 min

Die Umsatzbestimmungen für die Reduktionen von Acetophenon, Trifluoracetophenon und 4-Phenyl-2-butanon erfolgten mit Hilfe von Kalibriergeraden. Für die restlichen Reaktionen insbesondere der Eintopfreaktionen erfolgte die Umsatzbestimmung relativ definiert als Verhältnis der Menge des Produkts zu der Summe der Mengen an (Rest)-Substrat und (gebildetem) Produkt. Für die Reduktion bzw. der kinetischen Racematspaltung des racemischen CF_3-Aldols mit der PPADH1 erfolgte die Umsatzbestimmung mit Hilfe des Programms „*Enantioselectivity"* der Universität Graz (http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/cgi-bin/enantio.pl) unter Angabe des *ee*-Werts vom Edukt und dem *de*-Wert des Produkts.[186,187]

2.15.3 *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC)

Analytische HPLC-Messungen wurden mit dem HPLC-Gerät der Firma Dionex/Thermo Fisher im Institut für Bioorganische Chemie (Universität Düsseldorf) von Birgit Henßen durchgeführt, wobei eine chirale Säule Daicel Chiralcel® OD-H verwendet wurde. Die Trennung der vier Stereoisomere der CF_3-Diole und die Bestimmung der absoluten CF_3-Diolkonfiguration wurde von DUANGDEE erfolgreich etabliert und beschrieben.[188] Die beschriebene Methode wurde minimal verändert, wobei als Laufmittel ein Gemisch aus n-Heptan/*i*PrOH (98:2) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min^{-1} verwendet wurde. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 203 nm. Zu analysierende Proben wurden zweimal mit der gleichen Menge an Diethylether extrahiert und die organische Phase mittels SpeedVac evaporiert. Anschließend wurde das Rohprodukt in n-Heptan/*i*PrOH (98:2) gelöst und 20 µL für die HPLC-Messung injiziert. Für die eindeutige Zuordnung der Peak-Signale des CF_3-Aldols wurde das racemische Gemisch sowie eine Probe nach einer Racematspaltung mit der PPADH1 analysiert. Für die Trennung der CF_3-Diole wurde racemisches CF_3-Aldol mittels Borhydrid reduziert. Die Zuordnung der Peaksignale erfolgte durch Vergleich mit dem HPLC-Chromatogramm von DUANGDEE.[188]

Retentionszeiten des CF_3-Aldols: (*R*)-CF_3-Aldol 23 min; (*S*)-CF_3-Aldol 44 min.

Retentionszeiten des CF_3-Diols: (*R*,*S*) 31 min; (*R*,*R*) 34 min; (*S*,*R*) 89 min; (*S*,*S*) 167 min.

3. ERGEBNISSE

3.1 Herstellung des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) als *Screening*-Substrat für neue ADHs

Die Bereitstellung von Substraten und Katalysatoren, welche chemisch synthetisiert wurden, sowie die Herstellung des CF_3-Aldols und die Analytik der hergestellten Diole erfolgten in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Berkessel (Universität Köln) durch Dr. Nongnaphat Duangdee und M. Sc. Matthias Hammel. Das racemische CF_3-Aldol wurde, ausgehend von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton als Aldoldonor, mit DL-Prolin als Organokatalysator erfolgreich hergestellt (Abbildung 13) um es anschließend als Referenzsubstanz für die GC-Analytik als auch als *Screening* Substrat zu verwenden. Die Herstellung des CF_3-Aldols konnte in einer guten Ausbeute innerhalb einer Reaktionszeit von nur drei Stunden erhalten werden. Da DL-Prolin als Katalysator verwendet wurde, verlief die Aldolreaktion nicht enantioselektiv, sodass ein Racemat (*ee*= 0 %) vorlag. Mit Hilfe des selbsthergestellten Substrats wurden Referenzmessungen am Gaschromatographen durchgeführt, um eine GC Analytik etablieren zu können, die es ermöglichte, die beiden Enantiomere des CF_3 Aldols mit Hilfe einer chiralen GC-Säule zu trennen. Um jeweils einen Signalpeak einem Enantiomer des racemischen CF_3-Aldols zuordnen zu können, wurde das CF_3-Aldol in enantiomerenangereicherter Form vom Kooperationspartner (AK Berkessel) zur Verfügung gestellt, sodass die genaue Zuordnung der Enantiomere ((*S*)- und (*R*)-CF_3-Aldol) problemlos erfolgen konnte. Die enantiomerenangereicherten Verbindungen wurden mittels organokatalysierten Aldolreaktionen von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mit (*R*,*R*)- oder (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator hergestellt.[188]

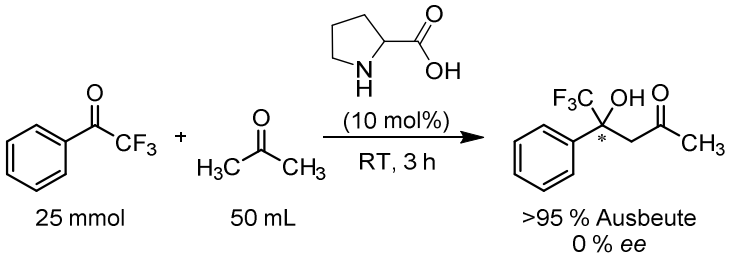


Abbildung 13: Synthese des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons ausgehend von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mit DL-Prolin als Organokatalysator. Die Reaktion wird in reinem Aceton durchgeführt.

3.2 *Screening* nach einer neuen ADH für die asymmetrische Reduktion des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols)

In institutsinternen Vorarbeiten wurden über 200 mikrobielle Stämme der institutsinternen Stammsammlung auf Aktivität bezüglich der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols getestet. Diese *Screening*-Methode unter Verwendung von Stammsammlungsstämmen bietet den Vorteil, dass bei einem positiven Treffer der jeweilige Stamm bekannt ist und eine gezielte Datenbanksuche nach Genomsequenzen erleichtert und so der Zugang zu einem rekombinanten Enzym ermöglicht wird. Es wurden Rohextrakte von Stämmen unterschiedlicher Gattungen wie z. B. *Streptomyceten*, *Lactobacillen*, *Rhodococcen*, *Saccharomyceten* hinsichtlich der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols photometrisch untersucht, jedoch zeigten nur die beiden Hefe-Stämme *Candida boidinii* (DSM 70034) und *Candida methanolica* (*boidinii*) (ATCC 26175) die gewünschte Reduktionsaktivität. Die Rohextrakte dieser beiden methylotrophen Hefe-Stämme wurden anschließend erneut CF_3-Aldolumsetzungen unterzogen und diese Umsetzungen dann mittels GC genauer analysiert. Offensichtlich verliefen die Reduktionen des CF_3-Aldols enantiospezifisch, wobei nur das (*S*)-Enantiomer aus dem racemischen Gemisch zum korrespondierenden 1,3-Diol reduziert wurde. Da für beide identifizierten Stämme keine brauchbaren Genomdaten verfügbar waren, ist der Zugang zu einem rekombinanten Enzym nur sehr schwer möglich. Aus diesem Grund wurde ein erneutes eingegrenztes *Screening* unter Hefestämmen durchgeführt. Hierbei wurden vor allem methylotrophe Hefen in Betracht gezogen, da die beiden positiv identifizierten Stämme *C. boidinii* (DSM 70034) und *C. methanolica* (*boidinii*) (ATCC 26175) methylotroph, also in der Lage sind Methanol als C1-Quelle zu nutzen. Es wurden Hefe-Stämme aus verschiedenen Gattungen und Arten ausgewählt, kultiviert und deren Rohextrakte isoliert. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse aller getesteten Hefe-Stämme, welche in der institutsinternen Stammsammlung verfügbar waren und kultiviert werden konnten, aufgeführt. Die angenommene These, dass methylotrophe Hefestämme die gewünschte Umsetzung bzw. Reduktion zeigen, kann teilweise bestätigt werden. Hierbei scheint es aber auch Ausnahmen zu geben wie die methylotrophe Hefe *Ogataea methanolica*, welche nicht die gewünschte Reduktion des CF_3-Aldols zeigte. Es konnten jedoch fünf weitere Hefe-Stämme identifiziert werden, welche die gewünschte Reduktion mit einhergehender Enantiospezifität für das (*S*)-Enantiomer zeigten.

Tabelle 11: Getestete Hefestämme auf Reduktion des racemischen CF_3-Aldols. Rohextrakte dieser Stämme wurden Übernacht-Umsetzungen unterzogen. Folgender Ansatz wurde gewählt: 10 mM *rac*-CF_3-Aldol, 1 mM NAD^+/1 mM $NAD(P)^+$, 1 mM $MgCl_2$, 5 U GDH (Rohextrakt), 100 mM D-Glucose, 200 µL (20 % (v/v)) Rohextrakt, auf 1 mL KPi-Puffer (50 mM, pH 7,5), 30 °C, t= 20 h.

Stamm	DSM-Nr.	Reduktion des CF_3-Aldols	Enantiospezifität für (*S*)-Enantiomer	Cofaktor-präferenz
Candida famata	70590	✗	-	-
Cyberlindnera jadinii	2361	✗	-	-
Komagataella pastoris	70877	✓	✓	NADP(H)
Komagataella pastoris	70382	✓	✓	n.b.
Ogataea methanolica	2147	✗	-	-
Ogataea polymorpha	70277	✓	✓	NADP(H)
Ogataea wickerhamii	70280	✓	✓	n.b.
Wickerhamomyces anomalus	70260	✓	✓	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

Weiterhin wurde die Präferenz der Cofaktoren NAD(H)/NADP(H) bei den Rohextrakten der Stämme *Komagataella pastoris* und *Ogataea polymorpha* überprüft und es konnte eine eindeutige Steigerung des Umsatzes bei $NADP^+$-Zusatz gegenüber NAD^+ beobachtet werden, sodass angenommen werden kann, dass es sich bei dem gesuchten Enzym mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine NADPH-abhängige Ketoreduktase handelt. Eine Verbesserung der CF_3-Aldolumsetzungen mit Rohextrakten, welche zuvor unter „mikro“-anaeroben Kulturbedingungen mit 1 % (v/v) Methanol im Medium der Stämme *Candida boidinii/ methanolica*, *Ogataea methanolica*, *Komagataella pastoris* und *Ogataea polymorpha* angezogen wurden, konnte nicht erreicht werden. Die Umsetzungen mit Rohextrakten, welche aus „mikro“-anaerob kultivierten Stämmen isoliert wurden, waren im Vergleich zu den isolierten Rohextrakten der Stämme unter aeroben Kulturbedingungen sogar schlechter. Außerdem konnten nur geringe Zellausbeuten (< 0,5 g) nach fünftägiger Kultivierung erreicht werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach einem umfassenden Vorscreening fünf weitere Stämme identifiziert werden konnten, welche das CF_3-Aldol enantiospezifisch reduzieren.

Für präparative Anwendungen, insbesondere für technische Anwendungen, ist es allerdings erforderlich, mit rekombinantem Enzym zu arbeiten, da nur dann die Möglichkeit besteht, dass das gewünschte Enzym in großen Mengen reproduzierbar zur Verfügung steht und seine Eigenschaften gegebenenfalls durch Mutationen verbessert

werden können. Aus diesem Grund sollten Stämme identifiziert werden, deren Genome sequenziert sind. Unter den positiv getesteten wurden zwei *Komagataella pastoris*-Stämme identifiziert und es liegen Sequenzinformationen zu einem ähnlichen Stamm, *Pichia pastoris* GS115, vor. Dieser Stamm wird industriell für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt und ist auch kommerziell verfügbar. Freundlicherweise wurde uns dieser von der Arbeitsgruppe Prof. Ernst (Universität Düsseldorf) auf Nachfrage zur Verfügung stellt. Dieser Stamm wurde anschließend kultiviert, dessen Rohextrakt isoliert und auf Reduktionsaktivität des racemischen CF_3-Aldols getestet. Auch hier konnte die gewünschte Aktivität mittels GC nachgewiesen und bestätigt werden. Daraufhin wurden zwei Strategien zur Identifizierung des Zielproteins entwickelt (siehe Abbildung 14), welche sich stark in der Vorhergehensweise unterscheiden. Strategie I basiert auf *in silico* annotierten Sequenzdaten von putativen ADHs. Diese ADH-Gene können dann mittels Gensynthese oder PCR verfügbar gemacht werden, in den pET28a-Vektor kloniert und anschließend in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden.

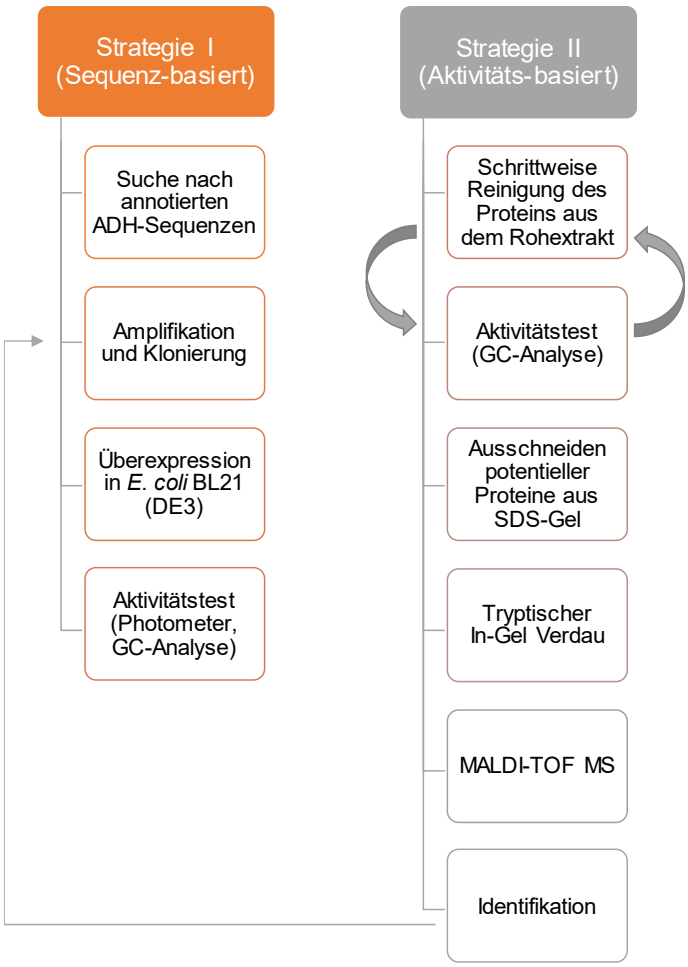


Abbildung 14: Strategien zur Identifizierung des Zielproteins.

Nach der Überexpression der verschiedenen ADH-Gene werden die Rohextrakte für die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols sowohl photometrisch als auch mittels GC analysiert. Da das Genom von einigen Hefen wie z. B. *Saccharomyces* sp. mehr als 20 Dehydrogenase-Gene aufweist, kann diese Strategie mitunter zeitraubend und relativ kostspielig sein.

Strategie II beschränkt sich hierbei hauptsächlich auf die chromatographische Reinigung des Zielproteins aus dem wildtypischen Rohextrakt des Stammes *P. pastoris* GS115. Hierbei werden ausgewählte Fraktionen nach jeder Reinigung auf die gewünschte Reduktions-Aktivität mittels Umsetzung und GC-Analytik überprüft. Dieser Prozess wird mit verschiedenen Chromatographie-Materialien mehrmalig wiederholt, bis das gewünschte Zielprotein nahezu homogen vorliegt. In der Folge hat man dann die Möglichkeit, das Protein aus dem SDS-Gel zu isolieren und mit Methoden der Proteom-Analytik mittels MALDI-TOF zu analysieren.

3.2.1 Identifikation des Zielproteins aus *Pichia pastoris* GS115 nach Strategie I (Sequenz-basiert)

Zunächst wurden nach annotierten Genen, welche für ADHs kodieren, im Genom von *P. pastoris* GS115 mit Hilfe der Datenbank „Uniprot“ gesucht. Die Suche mit dem Begriff „alcohol dehydrogenase“ ergab dabei 9 Treffer. Hiervon konnten im Vorfeld diejenigen ausgeschlossen werden, die hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu anderen bekannten und bereits biochemisch charakterisierten Proteinen aufwiesen und als NADH-spezifisch bezeichnet wurden. Schlussendlich wurden zunächst vier Gene ausgesucht, welche in der Datenbank als ADHs annotiert sind (siehe Tabelle 12). Diese wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert und anschließend in den pET28a-Vektor über die *Nco*I- und *Xho*I-Restriktionsschnittstellen erfolgreich kloniert. Anschließend wurden die konstruierten Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die heterologen Gene unter verschiedenen Bedingungen exprimiert:

- Bedingung 1: 200 mL LB-Medium, Induktion mit 0,1 mM IPTG, 4 h Expression bei 37 °C.
- Bedingung 2: 200 mL Autoinduktionsmedium mit 0,5 g L^{-1} D-Glucose und 2 g L^{-1} Lactose, 2 h Expression bei 37 °C ⇨ 3 Tage bei 15 °C.
- Bedingung 3: Koexpression mit pG-KJE8 (Chaperon-codierende Gene), 200 mL LB-Medium, Induktion der Chaperone mit 0,5 mg mL^{-1} L-Arabinose + 0,5 ng mL^{-1} Tetracyclin, Induktion ADHs mit 0,5 mM IPTG, 20 h Expression bei 37 °C.

- Bedingung 4: Koexpression mit pGro7 (Chaperon-Gene), 200 mL LB-Medium, Induktion der Chaperone mit 2 mg mL^{-1} L-Arabinose, Induktion ADHs mit 0,5 mM IPTG, 20 h Expression bei 37 °C.

Diese verschiedenen Expressionsbedingungen wurden durchgeführt, da die Expression der ADH-Gene unter Bedingung 1 zur Expression von unlöslichen Proteinen führte. Nur die ADH5 scheint in geringem Ausmaß auch als lösliches Protein im Rohextrakt vorzuliegen (siehe Abbildung 15).

Tabelle 12: Ausgewählte putative ADHs in *P. pastoris* GS115.

Uniprot ID	Annotierung	Eigene Bezeichnung
C4QWW0	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity	ADH1
C4R0S8	Mitochondrial alcohol dehydrogenase isozyme III	mtADH
C4R3A2	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase	ADH4
C4R8B0	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity	ADH5

Die erhaltenen Rohextrakte wurden dennoch photometrisch sowohl mit dem *rac*-CF_3-Aldol als auch mit anderen Substraten wie Acetophenon, 3-Pentanon und *trans*-2-Hexenal auf Aktivität getestet. Jedoch konnte nur für die ADH5 mit *trans*-2-Hexenal und NADPH als Cofaktor eine Aktivität von ca. 5-6 U mL^{-1} gemessen werden. Zusätzlich wurden die Rohextrakte für die Umsetzung vom *rac*-CF_3-Aldol eingesetzt, jedoch konnte in keinem der Ansätze die Reduktion zum 1,3-Diol mittels GC nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ließ zwei mögliche Erklärungen:

1) Keines der vier klonierten ADHs ist das gewünschte Zielprotein mit Reduktionsaktivität für das CF_3-Aldol oder

2) die putativen ADHs werden nicht als lösliche Proteine exprimiert, sodass keine Aktivität nachgewiesen werden kann.

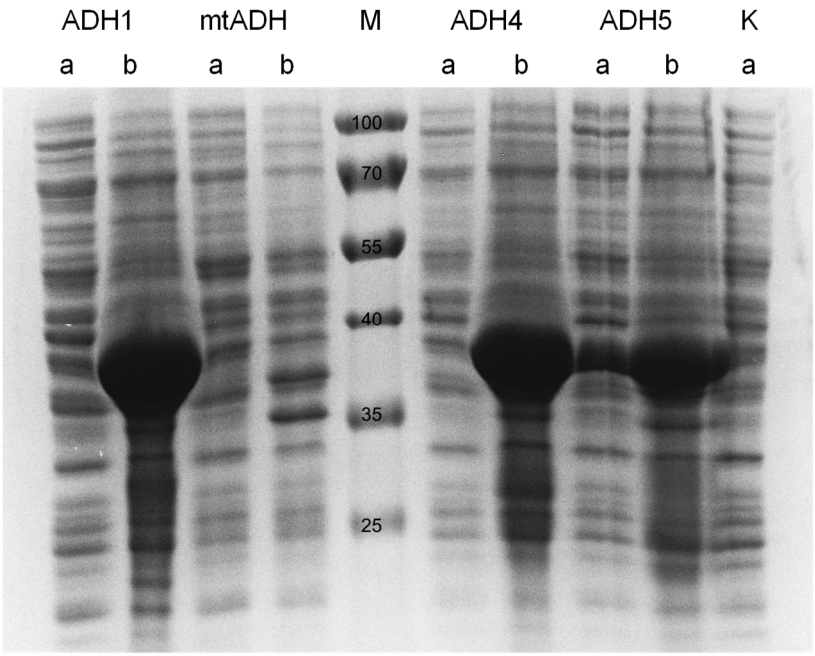


Abbildung 15: SDS-Polyacrylamidgel der exprimierten ADH-Gene in *E. coli* BL21(DE3). Die ADH-Gene wurden nach Bedingungen 1 (LB-Medium, Induktion mit 0,1 mM IPTG, 4 h bei 37 °C) exprimiert. Es wurden je 10 µg Protein pro Spur aufgetragen. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), a= lösliche Fraktion, b= unlösliche Fraktion, K= Kontrolle (Expression pET28a-Vektor ohne Gen). Vorhergesagte Molekulargewichte der ADHs liegen bei ca. 37 kDa.

Um die 2. Annahme auszuschließen, wurden Versuche unternommen die ADH-Gene und deren Proteine in löslicher Form zu exprimieren, wobei die Expressionsbedingungen 2-4 durchgeführt wurden. Weder die schonendere Expression (durch Autoinduktion mit D-Glucose und L-Arabinose und niedriger Temperatur) noch die Koexpression mit Chaperonen führte zu einer höheren photometrischen Aktivität in der löslichen Fraktion oder zum Nachweis der gewünschten Reduktion des *rac*-CF_3-Aldols mittels GC. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Strategie I nicht zur Identifikation des Zielproteins geführt hat.

3.2.2 Identifikation des Zielproteins aus *P. pastoris* GS115 nach Strategie II (Aktivitäts-basiert)

Eine Alternative gegenüber dem Klonieren und der Expression der annotierten ADHs (Strategie I) stellt die schrittweise Reinigung des Zielproteins aus dem Rohextrakt von *P. pastoris* GS115 dar. Hierfür wird ein großes Volumen an Rohextrakt benötigt, da der Rohextrakt mehreren Reinigungsschritten unterzogen werden muss. Ziel ist es, das Zielprotein aus dem Rohextrakt soweit zu reinigen, dass eine Zuordnung von

Proteinbanden im SDS-Gel möglich ist. Diese Banden können dann aus dem Gel herausgeschnitten und nach einem tryptischen In-Gel-Verdau mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden. Hierbei können die unterschiedlichen Peptidmassen zur Identifizierung des gesuchten Enzyms in der Datenbank führen.

Die Reinigung des Zielproteins sollte erstmal mit einer Ammoniumsulfatfällung beginnen. Hierfür wurde ein Vortest im kleinen Maßstab durchführt, wobei Aliquots des Rohextrakts mit steigenden Ammoniumsulfatkonzentrationen behandelt wurden, sodass Sättigungen von 0 bis 90 % erreicht wurden. Anschließend wurden nach der Fällung die Überstände mittels Zentrifugation isoliert und für die Reduktion des *rac*-CF_3-Aldols eingesetzt, um die restliche Enzymaktivität zu verfolgen. Dieser Vortest soll Auskunft darüber geben, bei welcher Ammoniumsulfatsättigung das Zielprotein ausfällt und im Pellet verbleibt. Die Ergebnisse des Vortestes mit Ammoniumsulfat sind in Tabelle 13 dargestellt. Es ist erkennbar, dass mit steigender Ammoniumsulfatsättigung der rel. Diolanteil stetig sinkt.

Tabelle 13: Vortest der Ammoniumsulfat-fällung des *P. pastoris* GS115 Rohextrakts. Es wurde je 200 µL Rohextrakt für die Fällung verwendet. Anschließend wurde je 150 µL des Überstands nach der Fällung für die Reduktion von 10 mM *rac*-CF_3-Aldols mit 1 mM $NADP^+$, 1 mM $MgCl_2$, 5 U GDH, 100 mM D-Glucose auf 1 mL KPi-Puffer (50 mM, pH 8), 30 °C, 3 h. Der rel. Diolanteil wurde mittels GC bestimmt.

Ammoniumsulfat-Sättigung [%]	rel. Diolanteil [%][a]
0	100
10	91
20	90
25	83
30	79
35	77
40	73
45	67
50	63
60	62
65	42
75	32
80	25
90	7
100	0

[a]100 % entsprechen einem rel. Diolanteil von 4,9 %.

Bei einer Sättigung ab 65 % sinkt die Aktivität (äquivalent betrachtet zum rel. Diolanteil) der gesuchten ADH drastischer ab als zwischen 0 und 60 %, sodass angenommen werden kann, dass aber dieser Grenze das Zielprotein stark ausfällt. Auffällig war hierbei, dass selbst bei einer 90%-igen Ammoniumsulfatfällung eine minimale Restaktivität der ADH beobachtet werden konnte. Ziel der Ammoniumsulfatfällung ist es, möglichst viele Fremdproteine aus dem Rohextrakt vor den nachfolgenden chromatographischen Reinigungen zu entfernen. Da die gesuchte ADH anscheinend stabil bzw. tolerant gegenüber hohen Ammonium-sulfatkonzentrationen ist, wurde der Rohextrakt einer zunächst 55%-igen Ammoniumsulfatsättigung unterzogen. Das erhaltene Pellet, welches ausgefallene Fremdproteine und ca. 40 % des Zielproteins enthielt, wurde verworfen und der Überstand einer weiteren Fällung (90%-ige Sättigung) unterzogen. Der Überstand wurde diesmal verworfen und das Pellet im Start-Puffer für die anschließende Reinigung mittels „hydrophober Interaktionschromatographie“ (HIC) resuspendiert. Vor und nach jedem Fällungsschritt wurden Proben entnommen und auf Reduktionsaktivität mit *rac*-CF_3-Aldol getestet und mittels GC überprüft. Die resuspendierte Probe wurde einer HIC-Reinigung mit einer Phenylsepharose-Säule unterzogen, wobei jede 2. bis 3. Fraktionen und der Durchfluss einer Umsetzung auf Reduktion des CF_3-Aldols getestet wurde. Hierbei zeigte sich, dass die besten Umsetzungen in Fraktionen des letzten Peaks im Chromatogramms der HIC-Aufreinigung, also bei sehr niedrigen Ammoniumsulfat-Konzentrationen gemessen wurden (Abbildung 16). Die positiv getesteten Fraktionen wurden anschließend gepoolt und zunächst in KPi-Puffer (50 mM, pH 7) umgepuffert für die nächste Reinigung über einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose). Bei diesem Chromatographieschritt zeigte sich allerdings, dass Aktivität nur im Durchfluss gemessen werden und das gewünschte Protein nicht an der Q-Sepharosesäule unter den gewählten Bedingungen binden konnte. Man kann also davon ausgehen, dass das Zielprotein bei pH 7 neutral oder gar positiv geladen vorliegt. Aus diesem Grund wurden die Puffer für die Q-Sepharose-Reinigung und des Proteins auf pH 9 erhöht, um dem Zielprotein eine negative Ladung zu geben. Unter diesen Bedingungen konnte das Zielprotein mit der Q-Sepharosesäule interagieren und Fraktionen isoliert werden, welche positiv für die Reduktion des CF_3-Aldols getestet wurden (siehe Abbildung 17). Der Fortschritt des Reinigungsprozesses wurde ebenfalls anhand eines SDS-Polyacrylamidgels analysiert (Abbildung 18A).

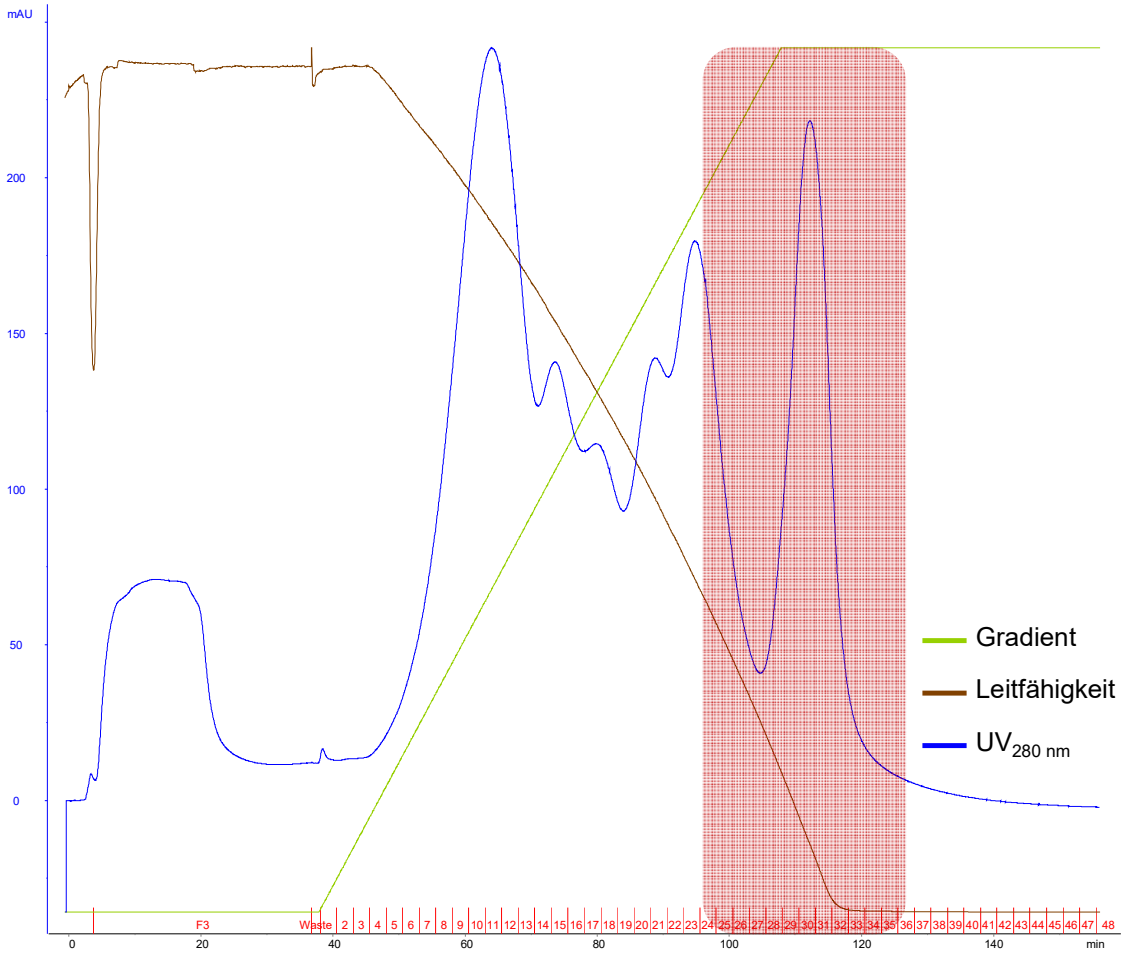


Abbildung 16: Chromatogramm der HIC-Reinigung. Folgende Puffer wurden verwendet: KPi-Puffer (100 mM) + 1,7 M Ammoniumsulfat, pH 7,2 (Startpuffer) und KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) (Elutionspuffer). Gradient von 0 auf 100 % Elutionspuffer in 56 min bei einer Flussrate von 2,5 mL min^{-1}. Jede 2. bis 3. Fraktion wurde auf Reduktion des CF_3-Aldols getestet, wobei Fraktionen 24-35 (rote Zahlen auf der X-Achse) positiv bezüglich der Reduktion mittels GC-Analyse identifiziert wurden (rote Box).

Hierbei ist erkennbar, dass nach jedem Reinigungsschritt weniger Proteinbanden in den Proben vorhanden waren und das sich zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa (Probe A) und von 39 kDa (Probe B) im Vergleich zu den anderen Proteinbanden deutlich anreicherten (Abbildung 18A). Da die Auswahl der Fraktionen für die nächsten Reinigungsschritte aktivitätsbasiert durchgeführt wurde, sollte eine Anreicherung des Zielproteins erreicht worden sein. Aus diesem Grund wurden die beiden Proteinbanden (Probe A und B) aus dem SDS-Polyacrylamidgel für einen anschließenden tryptischen In-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS-Analyse ausgeschnitten.

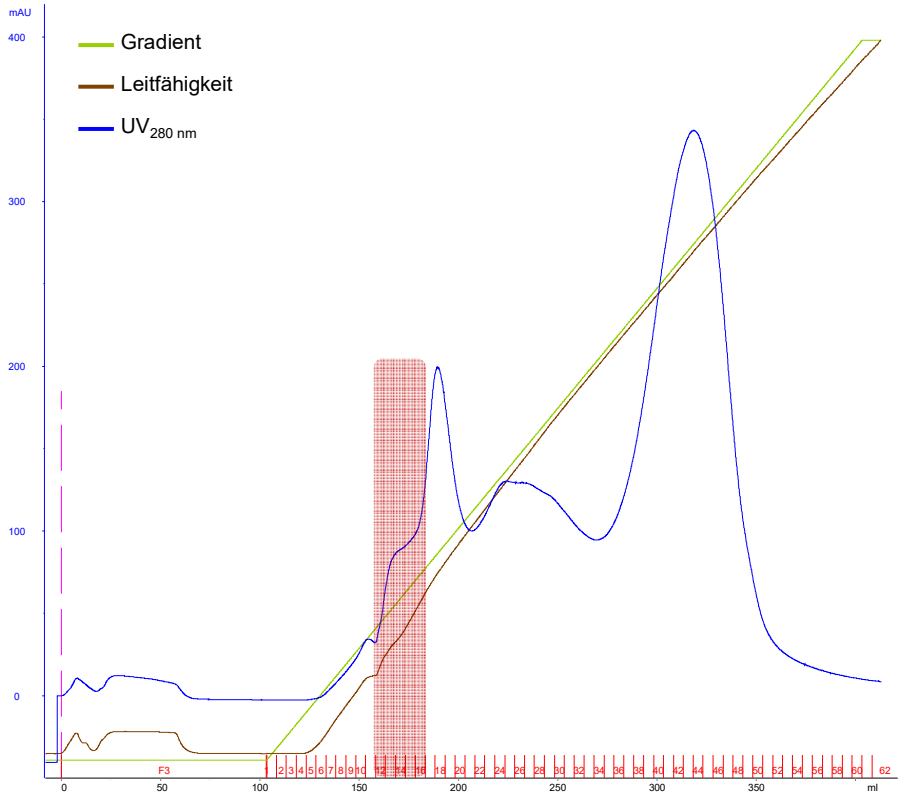


Abbildung 17: Chromatogramm der Q-Sepharose-Reinigung. Folgende Puffer wurden verwendet: Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 9) als Startpuffer und Tris-HCl Puffer (50 mM) + 1 M NaCl, pH 9 als Elutionspuffer. Gradient von 0 auf 100 % Elutionspuffer in 120 min bei einer Flussrate von 2,5 mL min^{-1}. Jede 2. bis 3. Fraktion wurde auf Reduktion des CF_3-Aldols getestet, wobei Fraktionen 12-15 (rote Zahlen auf der X-Achse) positiv bezüglich der Reduktion mittels GC-Analyse identifiziert wurden (rote Box).

Zusätzlich wurde die Probe nach der Anionenaustauscherchromatographie einer Gelfiltration unterzogen, um die beiden angereicherten Proteine zu trennen und eine eindeutige Identifizierung des Zielproteins zu erreichen. Auch bei der Größenausschlusschromatographie wurde jede 2. bis 3. gesammelte Fraktion auf Aktivität bezüglich der Reduktion des CF_3-Aldols getestet und die positiv getesteten Fraktionen gesammelt. Einer dieser Fraktionen ist in Abbildung 18B im SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Es ist erkennbar, dass nur noch eine deutliche Proteinbande in dieser Fraktion vorhanden ist mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 39 kDa, welches dem Molekulargewicht der isolierten Probe B (nach Q-Sepharose-Reinigung) gleicht. Diese Proteinbande, welche als Probe C bezeichnet wird, wurde ebenfalls aus dem SDS-Polyacrylamidgel herausgeschnitten für einen tryptischen In-Gel-Verdau und anschließender MALDI-TOF MS-Analyse. Die Proben A-C wurden an Dr. Jens Sproß (Universität Bielefeld, Organische Chemie I, Abteilung Massenspektrometrie) weitergeben und anschließend behandelt.

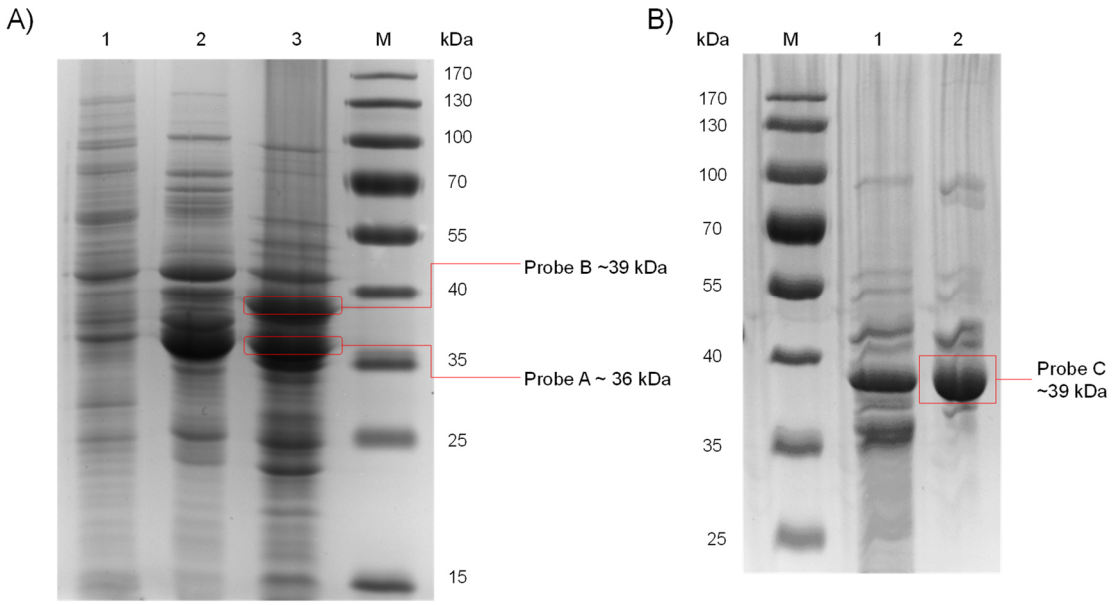


Abbildung 18: SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Reinigungsfortschritte nach HIC und Anionenaustauscher (A) und nach der Gelfiltration (B). Zu A) Spur 1= Rohextrakt *P. pastoris* GS115, Spur 2= Probe nach HIC-Reinigung (TCA gefällt), Spur 3= Probe nach Q-Sepharose-Reinigung (TCA gefällt). Es wurden je 10 µg Protein/Spur aufgetragen. Zu B) Spur 1= Probe nach Q-Sepharose-Reinigung, Spur 2= Probe nach Gelfiltration. Es wurden je 10 µg Protein/Spur aufgetragen. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Ausgeschnittene Proteinbanden (A-C) für MALDT-TOF MS wurden mit roter Umrandung gekennzeichnet.

Die Proteinproben wurden zuerst entfärbt und anschließend enzymatisch mit Hilfe einer Serinprotease Trypsin in kürzere Fragmente (Peptide) gespalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen am Carboxyende nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, wodurch eine definierte Anzahl von Fragmenten und somit ein Peptidmassen-Fingerabdruck entsteht. Diese Peptidstücke wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert und die Massen bestimmt. Die gemessenen Peptidmassen wurden mit Hilfe einer Proteinsequenz-Datenbank (Mascot Server von Matrix Science) mit virtuell bzw. theoretisch berechneten Peptidmassen der Proteine aus *P. pastoris* GS115 verglichen (5072 Sequenzen). Die Ergebnisse des Vergleichs der gemessenen Peptidmassen mit den Massen aus der Sequenzdatenbank von *P. pastoris* GS115 sind in Tabelle 14 aufgelistet. Für alle drei Proben A-C konnte ein hoher Mascot-Score und eine gute Sequenzabdeckung erreicht werden, sodass zu jeder Probe eine spezifische Proteinsequenz zugeordnet werden konnte. Die Probe A wurde als „*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*“ identifiziert.

Tabelle 14: Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie und Datenbankabgleich der Proben A-C. Die Proteinproben wurden mittels tryptischem In-Gel-Verdau in definierte Peptide gespalten und anschließend deren Massen mittels MALDI-TOF MS bestimmt. Diese gemessenen Massen wurden anschließend mit Massen aus der Sequenzdatenbank abgeglichen. Aufgeführt sind nur die Ergebnisse, welche signifikant sind ($p<0,05$; Score > 50). Für die Analyse wurde die Mascot-Software von Matrix Science verwendet.

Probe	Protein Score	Sequenz-abdeckung [%]	Identifiziertes Protein/ Uniprot ID	Molekulargewicht [kDa]
A	133	52	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ C4R0P1	35,58
B	186	61	Putative dihydrokaempferol 4-reductase/ C4R4L0	39,22
C	226	63	Putative dihydrokaempferol 4-reductase/ C4R4L0	39,22

Die ausgeschnittene Proteinbande der Probe A wies ein geschätztes Molekulargewicht von ca. 36 kDa im SDS-Polyacrylamidgel auf. Das nun dazugehörige, identifizierte Protein weist ein berechnetes Molekulargewicht von 35,58 kDa auf und entspricht somit dem beobachteten Molekulargewicht der ausgeschnittenen Proteinbande der Probe A. Das identifizierte Protein „Glyceraldehyd-3-phospat Dehydrogenase“ ist eine Oxidoreduktase, welche die reversible Oxidation und Phosphorylierung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter Verbrauch des Cofaktors NAD^+ katalysiert. Dieses Enzym ist essentiell für die Glykolyse und damit auch ubiquitär in jedem Lebewesen zu finden. Wie erwartet, ergab die BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins viele ähnliche Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit bei unterschiedlichen Hefe-Stämmen. Aufgrund dieser Ergebnislage wurde dieses Enzym nicht weiter für die Identifizierung des gesuchten Zielproteins für die selektive Reduktion des CF_3-Aldols in Betracht gezogen. Die beiden Proben B und C wurden als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktase“ identifiziert und sind somit, wie erwartet, auch identisch.

Normalerweise handelt es sich hierbei um pflanzliche Enzyme, welche in der Biosynthese von Anthocyanidinen in Pflanzen involviert sind. Auch eine BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins führte diesmal nur zu wenigen Übereinstimmungen, wobei die höchste Sequenzähnlichkeit (52,0–90,4 %) zu fünf weiteren als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“ bezeichnete Proteine im gleichen Wirtsorganismus (*P. pastoris* GS115) vorlag. Aus diesen Erkenntnissen konnte

angenommen werden, dass das neu identifizierte Protein tatsächlich auch das gesuchte Zielprotein darstellt. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte nun das Gen, das für die „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktase“ kodiert, verfügbar gemacht und anschließend heterolog im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Das Gen und das Protein der annotierten putativen Dihydrokaempferol 4-Reduktase werden in der Folge als *ppadh* und PPADH (*Pichia pastoris* Alkohol-Dehydrogenase) bezeichnet.

3.3 Klonierung und heterologe Expression des *ppadh* Gens aus *P. pastoris* GS115 in *E. coli* BL21(DE3)

Um die Annahme zu bestätigen, dass das neu identifizierte Enzym PPADH auch wirklich der gewünschte Biokatalysator für die asymmetrische Reduktion des racemischen CF_3-Aldols zum korrespondierenden 1,3-Diols ist, sollte das Gen zunächst verfügbar gemacht und anschließend überexprimiert werden. Hierfür wurde die genomische DNA aus *P. pastoris* GS115 isoliert und das Gen mittels PCR und genspezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt nach Restriktion in den pET28a-Vektor (über *Nde*I-, *Xho*I-Restriktionsschnittstellen) kloniert, in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3), welcher keinerlei ADH-Aktivität bezüglich der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols aufweist, transformiert und anschließend im kleinen Maßstab (50mL) exprimiert. Nach der Überexpression und der Zellernte wurde das erhaltene Zellpellet als 25%-ige Zellsuspension resuspendiert und die Zellen aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde anschließend für die Reduktion des *rac*-CF_3-Aldols mittels GC als auch photometrisch getestet und in beiden Fällen konnte die gewünschte Aktivität im Rohextrakt nachgewiesen werden.

3.3.1 Optimierung der heterologen Expression des *ppadh* Gens durch Veränderung der Kultivierungstemperatur

Im Allgemeinen ist bekannt, dass die Expressionstemperatur einen starken Einfluss auf die Proteinsynthese in *E. coli* ausübt. Eine Veränderung der Expressionstemperatur kann folglich das Wachstum und somit auch die Proteinausbeute verändern und zusätzlich die Proteinfaltung beeinflussen. Da die PPADH aus einem eukaryotischen Organismus stammt, besteht die Möglichkeit, dass es z. B. durch alternativen Codongebrauch in *E. coli*, zur Bildung von unlöslichen Zelleinschlüssen (*inclusion bodies*) kommt. Um die Bildung dieser *inclusion bodies* zu minimieren, wird häufig die Expressionstemperatur reduziert, um damit die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese

etwas zu reduzieren. Damit sollen Fehlfaltungen der rekombinanten Proteine herabgesetzt und der Anteil an löslichem Protein erhöht werden. Um die optimale Expressionstemperatur für die Expression des rekombinanten *ppadh* Gens zu untersuchen, wurde eine 200 mL Hauptkultur (TB-Medium + 50 µg mL^{-1} Kanamycin) mit einer Start-$OD_{600\,nm}$ von 0,05 beimpft und bei 37 °C kultiviert wurde. Bei Erreichen einer $OD_{600\,nm}$ von ca. 0,6 wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und die Kultur auf vier Schüttelkolben à 50 mL aufgeteilt und bei verschiedenen Temperaturen (15 °C, 20 °C, 24 °C und 37 °C) kultiviert. Nach ca. 20-stündiger Expression wurden die Zellen geerntet. Die Zellpellets wurden anschließend aufgeschlossen und die isolierten Rohextrakte einer Aktivitätsmessung unterzogen. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessung dargestellt. Es ist erkennbar, dass es sowohl bei niedriger als auch bei höherer Expressionstemperatur zur Bildung der rekombinanten PPADH kommt, da in allen Rohextrakten Aktivitäten messbar sind. Jedoch wird deutlich, dass eine höhere Expressionstemperatur bei 37 °C zu einer 5- bis 7-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität im Rohextrakt führt (Abbildung 19). Das dazugehörige SDS-Polyacrylamidgel der löslichen und unlöslichen Fraktionen (siehe Abbildung 20) zeigt eine leichte Überexpressionsbande der PPADH bei ca. 41 kDa in jeder löslichen Fraktion bei variierender Expressionstemperatur, aber auch hier ist erkennbar, dass bei 37 °C die stärkste Überexpressionsbande zu sehen ist. Eine Bildung von *inclusion bodies* der PPADH in den unlöslichen Fraktionen konnte unter keiner Bedingung der getesteten Expressionstemperaturen beobachtet werden.

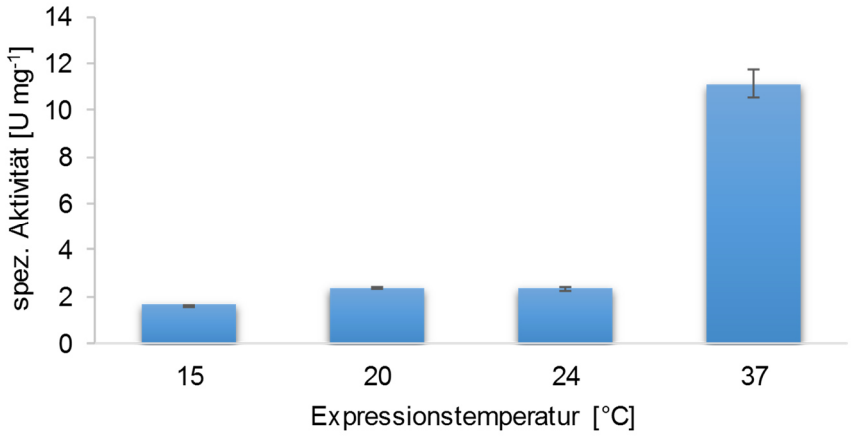


Abbildung 19: Einfluss der Expressionstemperatur auf die Aktivität der PPADH im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3). Die Aktivität für die Reduktion wurde mit 10 mM *rac*-CF_3-Aldol in Tris-HCl Puffer (100 mM, pH 7) und NADPH (0,25 mM) bei 25 °C in Triplikaten gemessen. Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

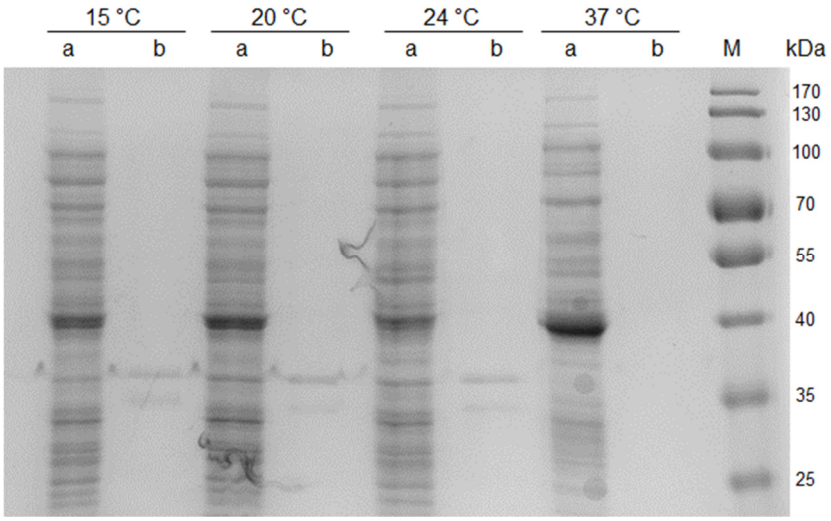


Abbildung 20: SDS-Polyacrylamidgel der löslichen und unlöslichen Fraktionen aus *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-PPADH. Fraktionen stammen aus unterschiedlichen Expressionstemperaturen; a= lösliche Fraktionen und b= unlösliche Fraktionen der Rohextrakte; M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

3.3.2 Reinigung der PPADH mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC)

Nachdem festgestellt wurde, dass bei einer Expressionstemperatur von 37 °C das *ppadh* Gen gut exprimiert wird bzw. es zu einer höheren Aktivität im Rohextrakt kommt, wurde die PPADH anschließend im größeren Maßstab (1 L TB-Medium + 50 µg mL^{-1} Kanamycin, Induktion mit 0,5 mM IPTG, 37 °C) hergestellt und die Zellen bei -20 °C eingefroren. Nach Bedarf wurden Zellen für den Aufschluss abgewogen und für eine anschließende Reinigung über IMAC mit Ni-NTA verwendet. Das *ppadh* Gen wurde über spezifische Restriktionsschnittstellen so in den pET28a-Vektor hineinkloniert, dass nach erfolgreicher Expression die PPADH mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert vorliegt. Der His-Tag ermöglicht eine einfache und schnelle Reinigung der PPADH aus dem Rohextrakt mittels Ni-NTA-Chromatographiematerial in einem Schritt. Die Ergebnisse einer solchen Reinigung sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die PPADH konnte erfolgreich von Fremdproteinen abgetrennt und somit die spezifische Aktivität von 3,6 U mg^{-1} im Rohextrakt auf 37,3 U mg^{-1} in der Ni-NTA gereinigten Probe erhöht werden, was einem Reinigungsfaktor von 10 entspricht. Die PPADH konnte, bezogen auf die Gesamtaktivität im Rohextrakt, mit einer Ausbeute von 67 % wiedergewonnen werden. Eine SDS-PAGE der Proben vor und nach der Ni-NTA-Reinigung wurde ebenfalls zur Überprüfung der Reinigung durchgeführt und ist in Abbildung 21 dargestellt.

Tabelle 15: Reinigung der rekombinanten PPADH aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mittels via IMAC mit Ni-NTA. Aktivitätsassay: 20 mM Benzaldehyd in Tris-HCl Puffer (100 mM, pH 7), 0,2 mM NADPH, 25 °C.

Reinigungsschritt	Gesamt-Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Reinigungsfaktor [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	117	3,6	1	100
Ni-NTA gereinigte PPADH	78	37,3	10	67

Das SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 21) zeigt im Rohextrakt eine deutliche Überexpressionsbande mit einem Molekulargewicht von ca. 41 kDa. Nach der Reinigung ist nur noch eine deutliche Proteinbande erkennbar, sodass eine nahezu vollständige Homogenität (>95 %) der PPADH durch die Ni-NTA-Aufreinigung erreicht wurde.

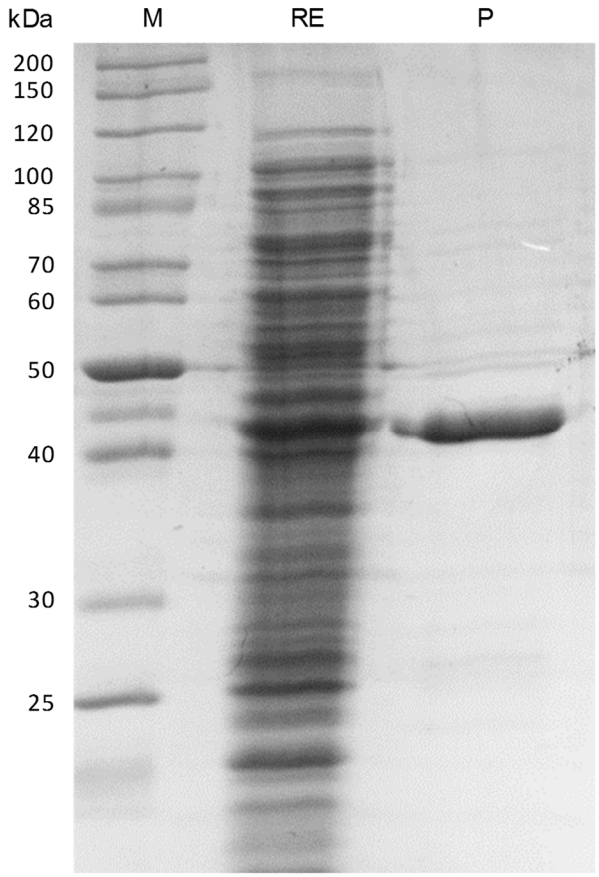


Abbildung 21: SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung der PPADH aus *E. coli* BL21(DE3). RE= Rohextrakt; P= Ni-NTA gereinigte PPADH, TCA-gefällt; M= Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). Es wurden je 10 µg Protein pro Spur aufgetragen.

3.4 Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse (Kapitel 3.1-3.3)

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass

1) das racemische *Screening*-Substrat (CF_3-Aldol) erfolgreich in einer Prolin-katalysierten Aldolreaktion synthetisiert werden konnte (Kapitel 3.1);

2) die partielle Reinigung/Anreicherung des gesuchten Zielproteins aus dem wildtypischen *Pichia* Rohextrakt mittels verschiedener chromatographischer Reinigungen erfolgreich durchgeführt wurde;

3) dieses partiell angereicherte putative Zielprotein (PPADH) erfolgreich mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden konnte (Kapitel 3.2.2);

4) das *ppadh* Gen, welches für das identifizierte, putative Zielprotein kodiert, heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die Aktivität für die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols sowohl photometrisch als auch mittels GC-Analyse im zellfreien Rohextrakt nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.3);

5) die rekombinante PPADH über Ni-NTA in nahezu vollständiger Homogenität gereinigt wurde (Kapitel 3.3.2).

3.5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten PPADH aus *P. pastoris*

Da die rekombinante PPADH mittels Ni-NTA-Reinigung in hoher Reinheit aus dem *E. coli* Rohextrakt isoliert werden konnte, sollte nun diese neu identifizierte ADH bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften näher charakterisiert werden.

3.5.1 Bestimmung der Lagerstabilität der PPADH

Um die Lagerstabilität der PPADH bei unterschiedlichen Temperaturen zu untersuchen und eine mögliche Inaktivierung auszuschließen, wurde die gereinigte PPADH aliquotiert und bei unterschiedlichen Temperaturen (-20 °C, 4 °C, RT (~25 °C)) inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Restaktivität bestimmt und in Relation zur ersten Messung der spezifischen Aktivität gesetzt. Die Ergebnisse der Lagerstabilität sind graphisch in Abbildung 22 dargestellt. Es ist erkennbar, dass durch die Lagerung der PPADH bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) zu einer schnellen Inaktivierung innerhalb von nur wenigen Tagen führt. Die berechnete Halbwertszeit $t_{1/2}$ der PPADH beträgt ca. 2,5 Tage bei Raumtemperatur. Für die Bestimmung der Lagerstabilität bei -20 °C wurde nur ein Enzympräparat verwendet, das mehrfach zur Probenentnahme für die Aktivitätsbestimmung aufgetaut und dann wieder eingefroren wurde. Bei -20 °C scheint das Enzym über einen längeren Zeitraum (>18 Tage) recht stabil zu sein. Es kann aber angenommen werden, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen zur Schädigung des Enzyms durch Bildung von Eiskristallen führen könnte. Bei der Betrachtung der Lagerstabilität bei 4 °C wird deutlich, dass die PPADH unter dieser Bedingung am stabilsten über einen Zeitraum von mehr als 100 Tagen ist. Die berechnete Halbwertszeit $t_{1/2}$ der PPADH beträgt ca. 114 Tage bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C. Aus diesem Grund wurde die PPADH bei 4 °C für eine langfristige Lagerung aufbewahrt. Zusätzlich wurde eine kurze Thermostabilitätsmessung bei 50 °C für wenige Minuten (< 5 min) durchgeführt mit dem Resultat, dass die PPADH vollständig inaktiviert und somit keinerlei Restaktivität gemessen wurde.

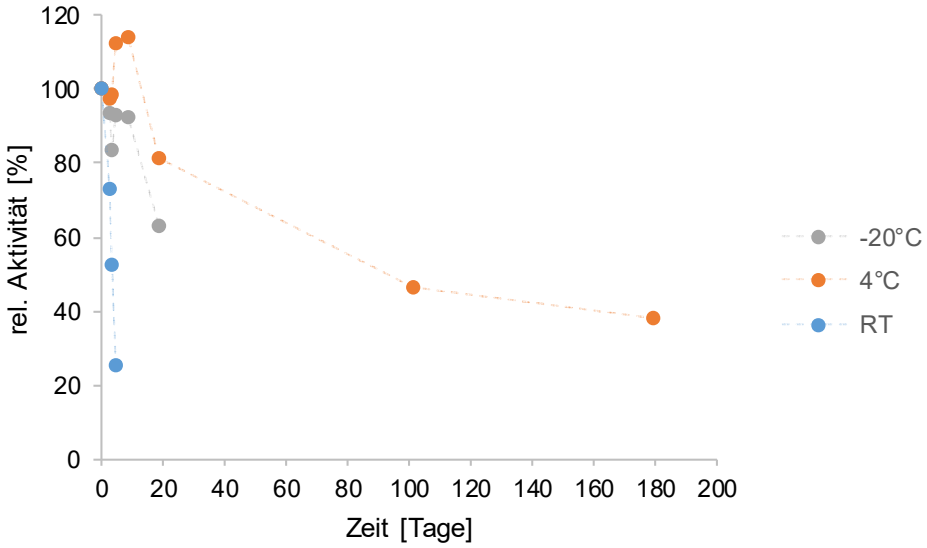


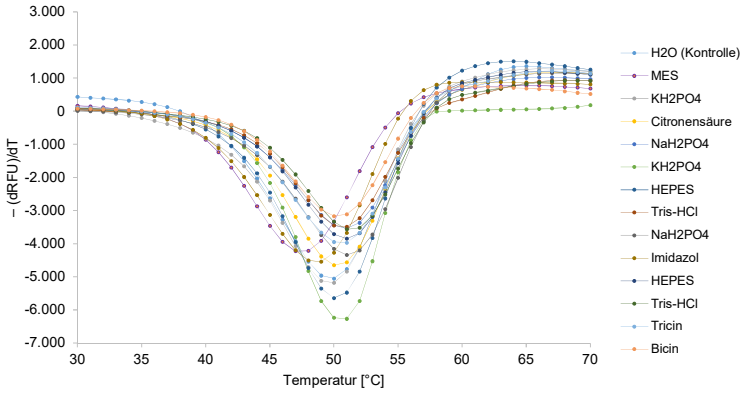
Abbildung 22: Untersuchung der Lagerstabilität der PPADH in Abhängigkeit der Temperatur. Es wurden je 50 µL PPADH (1 mg mL^{-1}) in Eppendorfgefäßen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Für die Bestimmung der Lagerstabilität bei -20°C wurde nur ein Präparat verwendet, das mehrfach zur Probenentnahme aufgetaut und dann wieder eingefroren wurde. 100 % rel. Aktivität entspricht einer spez. Aktivität von 56,5 U mg^{-1}, welche direkt nach der Reinigung des Enzyms mit 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl pH 7 und 0,2 mM NADPH photometrisch vermessen wurde.

3.5.2 Untersuchung verschiedener Parameter mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Thermostabilitätsmessung (Thermofluor)

Es ist allgemein bekannt, dass viele Faktoren wie z. B. der Puffertyp, die Pufferstärke, Salze und pH einen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen haben. Um diese Faktoren bezüglich der Stabilität der PPADH zu überprüfen wurde ein Thermofluor-*Screen* nach BOIVIN *et al.* (2013) in der Arbeitsgruppe von Prof. Niefind (Universität Köln) von Dipl. Biol. Christine Tölzer durchgeführt.[185] Diese Methode ist Temperatur-basiert und beruht auf der Interaktion bzw. Bindung eines Farbstoffes, welcher an hydrophobe Bereiche des Proteins bindet und dann fluoresziert. Bei beginnender Denaturierung des Proteins durch graduelle Erhöhung der Temperatur werden hydrophobe Strukturbereiche, die im nativen Zustand überwiegend im Inneren des Proteins verborgen liegen, offengelegt. Folglich kann der Farbstoff, der in wässriger Lösung durch Wassermoleküle gequencht wird, mit den offengelegten hydrophoben Bereichen des Proteins wechselwirken, wodurch die Fluoreszenz erhöht wird. Die Änderung in der Fluoreszenz kann dann als relative Fluoreszenzeinheit (RFU) gemessen werden. Aus diesen Daten ist es dann möglich, die Schmelztemperatur des Proteins zu bestimmen. Zunächst wurden verschiedene Puffertypen im pH-Bereich von 6,0-8,0 getestet, um

einen möglichen stabilisierenden Effekt zu untersuchen. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse sowohl graphisch (Abbildung 23A) als auch tabellarisch (Abbildung 23B) dargestellt. Die gemessene Schmelztemperatur T_m, bei der das Protein 50 % ungefaltet vorliegt bzw. zu 50 % denaturiert ist, betrug 50 °C mit Wasser als Kontrolle. Bei der Verwendung unterschiedlichster Puffertypen im Bereich von pH 6,0-8,0 konnten keine Besonderheiten in Bezug auf eine abweichende Schmelztemperatur (50 ± 1 °C) gemessen werden. Nur mit dem MES Puffer pH 6,0 wurde ein geringfügig niedrigerer T_m-Wert von 47 °C gemessen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Schmelztemperatur der PPADH ca. 50 ± 1 °C beträgt und keine stabilisierenden Effekte durch den Puffertyp festgestellt wurden.

A)



B)

Puffer[a]	pH	T_m [°C]
H_2O (Kontrolle)	/	50
MES	6,0	47
KH_2PO_4	6,0	50
Citronensäure	6,0	50
NaH_2PO_4	7,0	51
KH_2PO_4	7,0	51
HEPES	7,0	50
Tris-HCl	7,5	51
NaH_2PO_4	7,5	51
Imidazol	8,0	49
HEPES	8,0	51
Tris-HCl	8,0	51
Tricin	8,0	51
Bicin	8,0	50

[a]100 mM

Abbildung 23: Einfluss des Puffertyps und des pH-Wertes auf die Thermostabilität der PPADH. Ausgewählte Schmelzkurven (1. Ableitung) verschiedener Puffertypen im pH-Bereich von 6,0-9,0 (A) und die ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) tabellarisch zusammengefasst (B). Die Puffertypen/pH-Werte scheinen keinen Einfluss auf die Thermostabilität der PPADH zu haben, da unter nahezu jeder Bedingung eine Schmelztemperatur (T_m) von 50 ± 1 °C gemessen wurde. Mit dem MES-Puffer pH 6,0 wurde ein geringfügig niedrigerer T_m-Wert von 47 °C gemessen.

Als nächstes wurde die Thermostabilität der PPADH in Abhängigkeit des pH-Wertes im Bereich von 4,0-9,0 vermessen (Abbildung 24). Wie zuvor beobachtet, scheint die PPADH im Bereich von 6,0-8,0 sehr stabil zu sein, da sich die gemessene Thermostabilität in dem Bereich nicht ändert. Dieses Ergebnis kann ebenfalls auf den pH-Bereich zwischen 8,0-9,0 erweitert werden. Betrachtet man hingegen die Kurvenverläufe des Citronensäure-Puffers im Bereich von 4,0-6,0 so wird deutlich, dass die Schmelztemperatur und somit die einhergehende Thermostabilität der PPADH bei sinkendem pH stark abnimmt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die PPADH im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich (6,0-9,0) keine veränderte Thermostabilität zeigte. Bei sauren pH-Werten (4,0-6,0) sinkt jedoch die Thermostabilität kontinuierlich ab.

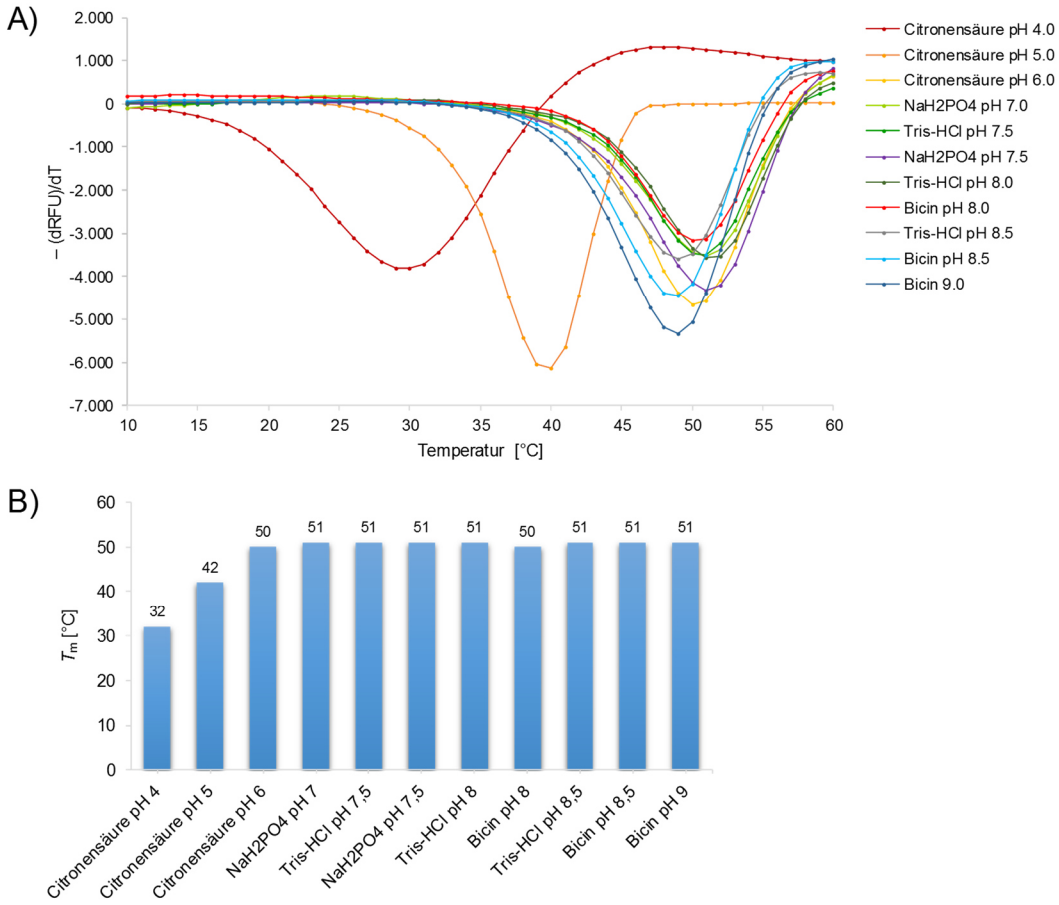


Abbildung 24: Einfluss des pH-Wertes auf die Thermostabilität der PPADH. Ausgewählte Schmelzkurven (1. Ableitung) verschiedener Puffer im pH-Bereich von 4,0-9,0 (A) und Auftragung der ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) in Abhängigkeit des pH-Werts (B). Verwendete Pufferstärke 100 mM. Niedrige pH-Werte (<6,0) scheinen einen negativen Einfluss auf die Thermostabilität der PPADH zu haben, da die PPADH eine Schmelztemperatur (T_m) von 50 ± 1 °C bei pH 6,0-9,0 aufweist und der T_m-Wert im sauren Bereich stark abnimmt und dieser bei pH 4,0 nur noch bei 32 °C liegt.

Nicht nur der Puffertyp oder der pH-Wert sind wichtige Parameter, die die Thermostabilität eines Proteins beeinflussen können, sondern auch die Stärke des Puffers und Salze. Um einen möglichen Effekt der Pufferkonzentration auf die Thermostabilität zu überprüfen, wurden Konzentrationen von 10 mM bis zu 250 mM mit drei verschiedenen Puffern (HEPES-, NaH_2PO_4- und Tris-Puffer) verwendet. Hierbei konnte kein deutlicher Einfluss der Pufferstärke auf die Thermostabilität beobachtet werden, da der T_m-Wert durchweg bei ca. 50 ± 1 °C lag (Tabelle 16A). Bei der Untersuchung der Thermostabilität in Abhängigkeit der Salzkonzentration konnte kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Es wurden zwei Puffer (HEPES, Tris-HCl) verwendet, die sich in ihren NaCl-Konzentrationen (0-1000 mM) unterschieden und die T_m-Werte bestimmt.

In Tabelle 16B sind die Ergebnisse bezüglich eines möglichen Effekts der Salzkonzentration auf die Thermostabilität der PPADH zusammengefasst. Bei der Verwendung von HEPES-Puffer scheint eine hohe Salzkonzentration ab 250 mM NaCl einen negativen Effekt auf die Thermostabilität auszuüben, sodass bei Anwesenheit von 1 M NaCl die Schmelztemperatur von 50 °C (ohne NaCl) auf 41 °C sinkt. Betrachtet man hingegen die Ergebnisse mit Tris-HCl-Puffer, kann kein eindeutiger Einfluss von NaCl auf die Thermostabilität beobachtet werden, da die T_m-Werte im Bereich von 45 °C und 51 °C leicht schwanken.

Tabelle 16: Untersuchung des Einflusses der Pufferstärke (A) und der Salzkonzentration (B) auf die Thermostabilität der PPADH. Zu A) Es wurden drei unterschiedliche Puffertypen (HEPES-, NaH_2PO_4- und Tris-Puffer) mit Konzentrationen von 10 mM bis 250 mM verwendet und der T_m-Wert bestimmt. Eine hohe Pufferstärke bis zu 250 mM scheint kaum einen Einfluss auf die Thermostabilität der PPADH zu haben. Zu B) Es wurden HEPES und Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 7,5-8,0) mit variierender Salzkonzentration (0 bis 1000 mM) verwendet und der T_m-Wert bestimmt. Hierbei konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Bei der Verwendung von HEPES-Puffer scheint eine hohe Salzkonzentration ab 250 mM NaCl einen negativen Effekt auf die Thermostabilität auszuüben, hingegen konnte bei Tris-HCl-Puffer kein eindeutiger Einfluss von NaCl auf die Thermostabilität beobachtet werden.

A)

Puffer	c [mM]	T_m [°C]
HEPES pH 7,5	10	50
	50	50
	100	50
	250	51
NaH_2PO_4 pH 7,5	10	49
	50	50
	100	51
	200	51
Tris-HCl pH 8,0	10	50
	50	51
	100	51
	250	51

B)

Puffer	NaCl [mM]	T_m [°C]
HEPES (50 mM, pH 7,5)	0	50
	50	48
	125	46
	250	50
	500	49
	750	48
	1000	41
Tris-HCl (50 mM, pH 8,0)	0	51
	50	47
	125	45
	250	51
	500	46
	750	48
	1000	49

3.5.3 Aktivitätsbasierte Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

Um die Abhängigkeit der PPADH-Aktivität vom pH und der Temperatur zu bestimmen, wurde die Reduktion mit dem kommerziell erhältlichen Substrat Ethyl-4-chloroacetoacetat durchgeführt. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden vier Puffer mit überlappenden pH-Bereichen verwendet (Citronensäure/Na_2HPO_4 Puffer (pH 4,0-6,5), KPi-Puffer (pH 6,0-7,5), Tris-HCl Puffer (pH 7,0-9,0) und Na_2CO_3/$NaHCO_3$-Puffer (pH 9,0-10,0). Es ist erkennbar, dass die PPADH über einen weiten pH-Bereich (pH 4,0-8,0) gute Aktivitäten zeigt (siehe Abbildung 25). Die höchste Aktivität wurde mit dem Citronensäure/Na_2HPO_4-Puffer bei einem pH-Wert von 5,5 erreicht. In Hinblick auf die Thermostabilitätsmessungen in Abhängigkeit des pH-Wertes wurde festgestellt, dass die PPADH bei sauren pH-Werten (<6) instabiler ist (Abbildung 24). Aus diesem Grund sollten längere Inkubationszeiten der PPADH oder Biotransformationen eher im pH-Bereich von 6-8 durchgeführt werden.

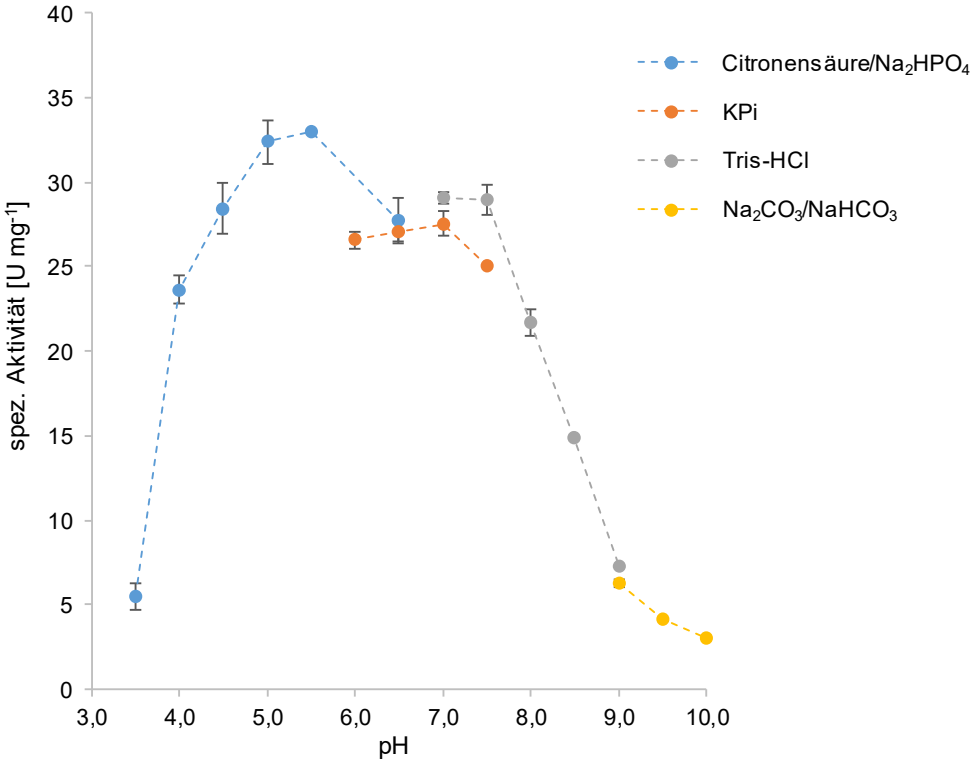


Abbildung 25: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der PPADH. Die Reduktion von 10 mM Ethyl-4-chloroacetoacetat in vier verschiedenen Puffern unterschiedlicher pH-Werte wurde photometrisch vermessen. Folgende Puffer wurden verwendet Citronensäue-Na_2HPO_4 Puffer pH 4,0-6,5 (blau), KPi-Puffer pH 6,0-7,5 (rot), Tris-HCl Puffer pH 7,0-9,0 (grün) und Na_2CO_3/$NaHCO_3$-Puffer pH 9,0-10,0 (lila).

Zusätzlich wurde die Aktivität der PPADH in Abhängigkeit von der Temperatur vermessen (Abbildung 26). Hierbei wird ersichtlich, dass mit steigender Temperatur auch die Aktivität kontinuierlich steigt bis 40 °C und anschließend rapide sinkt bei weiterer Erhöhung der Temperatur ab 50 °C. Das Temperaturoptimum der PPADH liegt zwischen 40 °C und 45 °C. Die starke Aktivitätsminderung der PPADH ab 50 °C hängt ebenfalls mit der Thermostabilität zusammen.

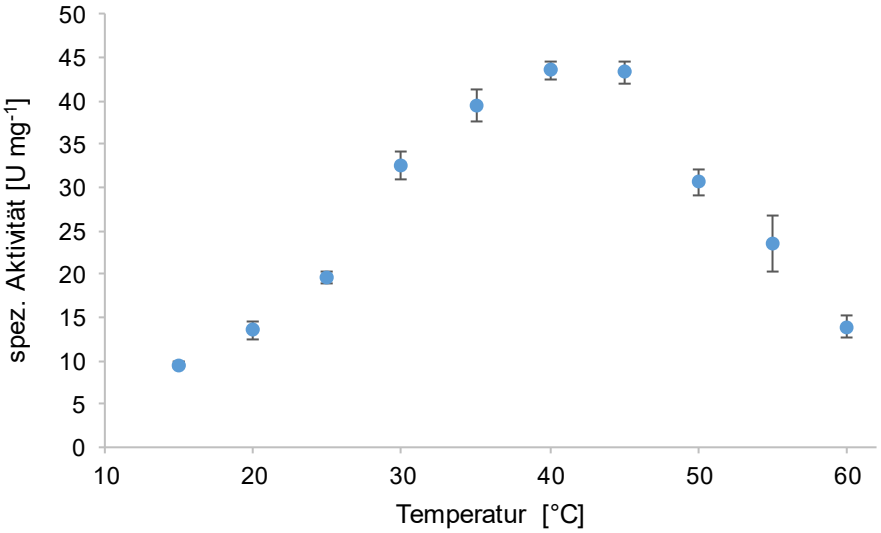


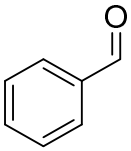
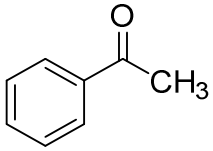
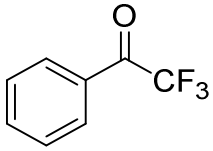
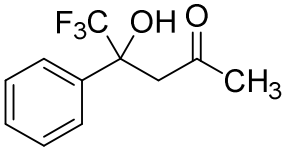
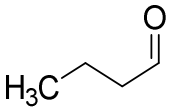
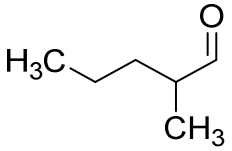
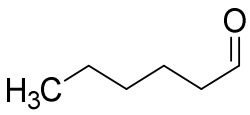
Abbildung 26: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der PPADH. Die Reduktion von 10 mM Ethyl-4-chloroacetoacetat in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7) wurde photometrisch vermessen.

3.5.4 Untersuchung des Substratspektrums

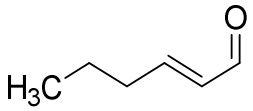
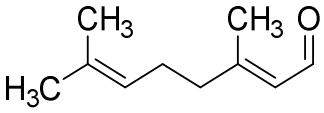
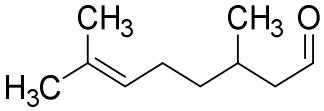
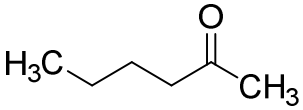
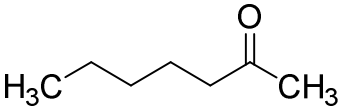
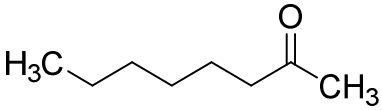
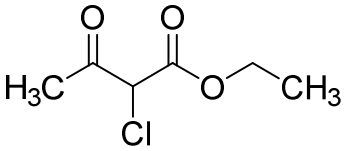
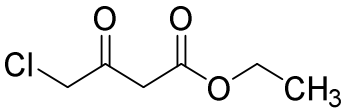
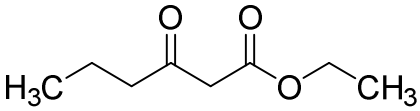
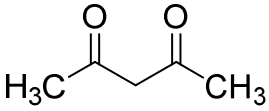
Um das Potential der PPADH zu ergründen, wurde die Substratspezifität der PPADH photometrisch sowohl für die Reduktion als auch für die Oxidation untersucht. Hierfür wurden die spezifischen Aktivitäten der gereinigten PPADH für die Reduktion von verschiedenen aliphatischen, verzweigten und aromatischen Aldehyden und Ketonen (Tabelle 17) und für die Oxidation einer Vielzahl von Alkoholen (Tabelle 8) bestimmt. Für die Reduktionsrichtung wurden die Aktivitäten in Relation zum Standardsubstrat Benzaldehyd gesetzt (Eintrag 1, spezifische Aktivität 38,6 U mg^{-1}). Es zeigte sich, dass die PPADH gute Aktivitäten in der Reduktion von verschiedenen aliphatischen und verzweigten Aldehyden aufwies. Die höchste Aktivität wurde mit 2-Methylvaleraldehyd als Substrat gemessen (Eintrag 6). Zusätzlich wurde eine Vielzahl von Ketonen getestet wie z. B. Acetophenon oder 2,2,2-Trifluoracetophenon (Eintrag 2-3), jedoch zeigte die PPADH kaum Aktivitäten (<0,5 U mg^{-1}) hinsichtlich dieser Substratgruppe verglichen zum racemischen CF_3-Aldol (Eintrag 4, Tabelle 17), welches sowohl eine tertiäre

Alkohol-Gruppe als auch eine Keto-Gruppe aufweist. Unter den vielen getesteten Ketonen konnten ebenfalls gute Aktivitäten mit einigen β-Ketoestern wie Ethyl-4-chloroacetoacetat (Eintrag 15) und Ethyl-2-chloroacetoacetat (Eintrag 14) gemessen werden. Hierbei ist auffällig, dass die Position des Chlor-Atoms die Aktivität stark beeinflusst. Die Änderung der Chlor-Position von C4 auf C2 führt zu einer 6-fachen Aktivitätsminderung (von 38,0 auf 5,7 U mg^{-1}). In Hinblick auf aliphatische Ketone, zeigte die PPADH kaum Aktivitäten gegenüber kurzkettigen Verbindungen wie 2-Butanon (<0,1 U mg^{-1}), jedoch wurden Ketone mit längerer Kettenlänge (C6-C8) vergleichsweise besser umgesetzt (Einträge 11-13: 0,5-1,6 U mg^{-1}).

Tabelle 17: Photometrische Aktivitäten für die Reduktion von verschiedenen Substraten der PPADH. Es wurde der Standardaktivitäts-Assay verwendet (10 mM Substrat in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7; 0,2 mM NADPH). 100 % entsprechen einer spez. Aktivität von 38,6 U mg^{-1}.

Eintrag	Substrat[b]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Relative Aktivität [%]
1		38,6	100,0
2		0,06	0,2
3		0,10	0,3
4[a]		37,5	97,2
5		68,0	176,2
6		96,1	248,9
7		28,5	73,9

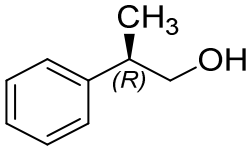
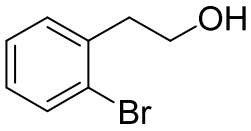
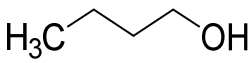
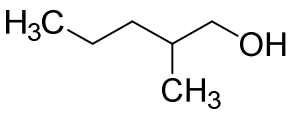
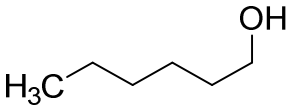
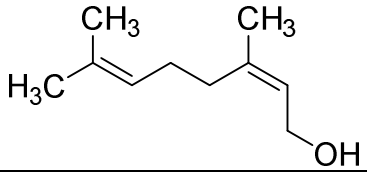
(Fortsetzung der Tabelle 17)

Eintrag	Substrat[b]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Relative Aktivität [%]
8		37,5	97,2
9		17,8	46,1
10		27,8	71,9
11		1,6	4,1
12		0,8	2,1
13		0,5	1,3
14		5,7	14,7
15		38,0	98,3
16		0,5	1,3
17		3,3	8,5

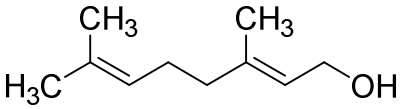
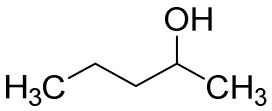
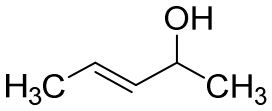
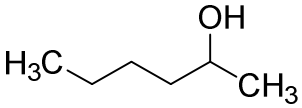
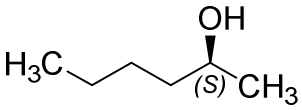
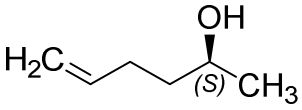
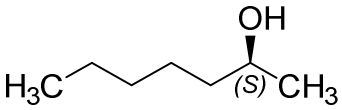
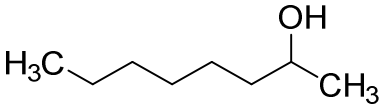
[a]20 mM des racemischen CF_3-Aldols wurden verwendet.
[b]Zusätzlich getestete Ketone Aktivitäten <0,5 U mg^{-1}: Benzylaceton, 2-Cyclohexen-1-on, 2-Butanon, (+)-Fenchon, 3,3,5-Trimethylcyclohexanon, Propiophenon, (*R*)-(-)-Carvon, 2-Nonanon, (*R*)-(+)-Pulegon, (2*S*,5*R*)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexanon, 4-Methyl-2-pentanon, 4-Methoxy-4-methyl-2-pentanon, Dihydro-4,4-dimethyl-2,3-furandion, 4-Hydroxy-3-hexanon, Aceton.

Für die Oxidation wurde (*S*)-2-Hexanol (Eintrag 26) als Referenzsubstrat verwendet. Unter allen getesteten Substraten konnte mit (*S*)-2-Hexanol die höchste Aktivität von 6,61 U mg^{-1} gemessen werden. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen für die Oxidation sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Im Allgemeinen wurden sowohl primäre als auch sekundäre Alkohole von der PPADH oxidiert (Einträge 18-24 und 25-31). Es ist ersichtlich, dass die PPADH Substrate mit einer bestimmten Kettenlänge bevorzugt: 2-Pentanol (C5) < 2-Hexanol (C6) > 2-Octanol (C8) (vergleiche Einträge 25, 27 und 31). Ebenfalls fällt auf, dass die PPADH ungesättigte Substrate im Vergleich zu gesättigten Analoga schlechter oxidiert (Tabelle 18, Einträge 25-26 und 28-29) Vergleicht man hierbei 2-Pentanol mit 3-Penten-2-ol (2,53 U mg^{-1} und 1,29 U mg^{-1}) sowie (*S*)-2-Hexanol mit (*S*)-5-Hexen-2-ol (6,61 U mg^{-1} und 3,79 U mg$^{-1)}$ so wird deutlich, dass die gesättigten Alkohole mit einer höheren Aktivität oxidiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Doppelbindungen meist das Molekül oder die Seitenkette starrer machen und eine gewisse Flexibilität im aktiven Zentrum notwendig ist.

Tabelle 18: Photometrische Aktivitäten für die Oxidation von verschiedenen Substraten der PPADH. Es wurde der Standardaktivitäts-Assay verwendet (10 mM Substrat in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 9; 0,2 mM NADPH). 100 % entsprechen einer spez. Aktivität von 6,61 U mg^{-1})

Eintrag	Substrat[a]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Relative Aktivität [%]
18		1,06	16,0
19		1,94	29,3
20		1,11	16,7
21		2,04	30,9
22		1,26	19,1
23		2,16	32,7

(Fortsetzung der Tabelle 18)

Eintrag	Substrat[a]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Relative Aktivität [%]
24		1,19	18,0
25		2,53	38,3
26		1,29	19,5
27		3,62	54,9
28		6,61	100,0
29		3,79	57,4
30		2,09	31,6
31		0,57	8,7

[a]Weitere getestete Alkohole mit Aktivitäten <0,5 U mg^{-1}: (*R*)-5-Hexen-2-ol, 2-Phenyl-1-propanol, Benzylalkohol, (*S*)-2-Amino-1-butanol, (*R*)-2-octanol, 1,2-Butandiol, 1,2-Propanediol, 1-Octen-3-ol, Cyclohexanol, 2,3-Butanediol, 1-(4-Chlorphenyl)ethanol, (*S*)-2-Butanol, 1-Penten-3-ol, 2-Cyclohexen-1-ol, (*R*)-1-Phenylethanol.

Vergleicht man die gemessenen Aktivitäten der Reduktion und Oxidation miteinander, so wird deutlich, dass die Reduktion von Aldehyden gegenüber der Oxidation von primären Alkoholen bevorzugt wird. Beispiele hierfür können aus Tabelle 17 und Tabelle 18 entnommen werden wie z. B. Reduktion von 1-Hexanal (28,5 U mg^{-1}) / Oxidation von 1-Hexanol (1,26 U mg^{-1}) sowie Reduktion von 1-Butanal (68,0 U mg^{-1}) / Oxidation von 1-Butanol (1,11 U mg^{-1}). Dieser Aktivitätsunterschied ist jedoch bei der Reduktion von Ketonen und der Oxidation von sekundären Alkoholen nicht so groß, sodass hier im Falle von z. B. der Reduktion von 2-Hexanon (10 mM, 1,6 U mg^{-1}) und

der Oxidation von racemischen 2-Hexanol (10 mM, 3,6 U mg^{-1}) und (*S*)-2-Hexanol (10 mM, 6,6 U mg^{-1}) die Oxidationsrichtung überwiegt. Hierbei muss natürlich beachtet werden, dass die Aktivitätsmessungen für die Reduktion bei pH 7 und für die Oxidation bei pH 9 durchgeführt worden sind.

In der Uniprot-Datenbank wurde die PPADH als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktase“ annotiert. Aufgrund dessen wurde die PPADH für die reduktive Biotransformation von kommerziell erhältlichem Dihydrokaempferol (20 mM) in Gegenwart von NADPH und einen Cofaktorregenerierungssystem (D-Glucose und einer Glucose-Dehydrogenase (GDH)) untersucht. Nach t= 20 h wurde eine Probe entnommen und mittels HPLC auf Produktbildung analysiert, jedoch konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Auch andere Flavonoide wie Naringenin, Dihydromyricetin und Taxifolin wurden getestet mit dem gleichen Ergebnis, dass keine Produktbildung beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Annotierung des Gens, welches für die PPADH kodiert, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht korrekt ist.

3.5.5 Einfluss des His-Tags auf die PPADH

Es wurde zusätzlich der Einfluss des His-Tags auf die PPADH untersucht. In der Literatur ist bekannt, dass solche zusätzlichen Modifikationen einen Einfluss auf die proteinchemischen Eigenschaften ausüben können.[185,189–194] Ebenfalls konnten in anderen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe ein Einfluss der Position des His-Tags auf die katalytische Aktivität der Enzyme beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden noch drei zusätzliche Varianten der PPADH erstellt (Tabelle 19). Die Varianten wurden molekularbiologisch mit Hilfe der QuikChange® PCR und dem zuvor erstellen Plasmid pET28a-PPADH(+NHis) als Template hergestellt, wobei entweder das ATG in der *Nco*I-Schnittstelle des pET28a-Vektors und/oder das Stopp-Codon des *ppadh*-Gens entfernt wurden. Die Konstrukte konnten alle erfolgreich hergestellt und mittels DNA-Sequenzierung verifiziert werden. Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und anschließend exprimiert. Nach der Expression wurden die Zellen geerntet und als 25%-ige Zellsuspensionen mittels Ultraschall aufgeschlossen, die zellfreien Rohextrakte isoliert und einer photometrischen Aktivitätsmessung mit Benzaldehyd unterzogen. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Die PPADH-Variante mit N-terminalem His-Tag (NHis) als auch die mit zwei His-Tags (NCHis) wiesen höhere Aktivitäten im Rohextrakt auf im Vergleich zu den Varianten nur mit C-terminalem His-Tag (CHis) und ohne His-Tag ((-)-His).

Tabelle 19: Übersicht der konstruierten PPADH-Varianten mit und ohne His-Tag. Die unterschiedlichen Varianten wurden im pET28a-Vektor konstruiert, wobei das *ppadh*-Gen über die *Nde*I/*Xho*I-Schnittstellen kloniert wurde und anschließend durch Deletion des ATG-Triplets bei der *Nco*I-Schnittstelle und/oder des Stoppcodons des Gens der Leserahmen verändert wurde. Bedingt durch die Verwendung des pET28a-Vektors wurden zu den His-Tags auch zusätzliche Linker-Sequenzen angefügt. AS= Aminosäuren.

Variante	Bezeichnung	Aufbau
1	NHis	
2	NCHis	
3	CHis	
4	(-)His	

Der C-terminale His-Tag scheint keinen Einfluss auf die Aktivität der PPADH im Rohextrakt auszuüben. Hinsichtlich des N-terminalen His-Tags konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet werden (Tabelle 20). Diese Aktivitätsunterschiede im Rohextrakt könnten unter anderem mit einer unterschiedlichen Expression des *ppadh*-Gens oder Löslichkeit des Proteins begründet werden. Um jedoch auszuschließend, dass die C-terminal getaggte Variante nicht exprimiert und somit nicht im Rohextrakt vorliegt, wurde mit Hilfe eines Western-Blots und einem Antikörper (Anti-His-HRP), welcher spezifisch His-Tag Epitope erkennt, das C-terminal getaggte Protein im Rohextrakt nachgewiesen.

Tabelle 20: Einfluss des His-Tags auf die Aktivität der PPADH im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3). Photometrischer Aktivitätsassay: 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7 und 0,2 mM NADPH. 100 % entsprechen der spez. Aktivität der Variante mit N-terminalem His-Tag (NHis).

Variante[a]	Vol. Aktivität [U mL^{-1}]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Protein-konzentration [mg mL^{-1}]	Rel. spez. Aktivität zu NHis [%]
NHis	54,5	3,8	14,3	100,0
NCHis	98,4	8,3	11,9	218,4
CHis	1,9	0,2	12,5	5,3
(-)His	1,9	0,2	12,0	5,3

[a]Expressionsbedingungen: 1 L TB-Medium + 50 µg mL^{-1} Kanamycin; Induktion mit 0,5 mM IPTG; 37 °C; 19 h. Zellen wurden als 25%-ige Zellsuspension mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Eine weitere Annahme, warum die Aktivitäten im Rohextrakt bei den Varianten mit C-terminalem His-Tag (CHis) und ohne His-Tag ((-)His) deutlich geringer sind, könnte mit einer unterschiedlichen Genexpression aufgrund des Abstandes zwischen der Ribosomenbindestelle (RBS) und dem ersten Startcodon (AUG) einhergehen. Die CHis- und (-)His-Varianten wurden mittels QuikChange® PCR erstellt, indem das Konstrukt pET28a-PPADH(+NHis) als Template verwendet wurde und das erste AUG bei der *Nco*I-Schnittstelle entfernt wurde. Dadurch ändert sich der Abstand zwischen der RBS und dem ersten AUG von 7 Nukleotide (nt) auf 64 nt. Eine Übersicht der Konstrukte und den Distanzen zwischen RBS und dem Start-Codon sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Übersicht der konstruierten His-Tag Varianten unter Angabe der Distanz zwischen Ribosomenbindestelle (RBS) und dem 1. Startcodon (AUG). nt= Nukleotide.

Variante	Konstrukt	Plasmid	Distanz zwischen RBS und 1. AUG [nt]
1	NHis	pET28a	7
2	NCHis	pET28a	7
3	CHis	pET28a	64
4	(-)His	pET28a	64

In der Literatur wird beschrieben, dass die Distanz zwischen RBS und dem AUG eine wichtige Rolle für die Überexpression von rekombinanten Proteinen spielt. Für eine effiziente Proteinherstellung wird eine optimale Distanz von 5-13 nt zwischen RBS und dem Start-Codon benötigt.[195–197] Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Aktivität im Rohextrakt nur auf diesen Effekt zurückzuführen ist, wurde eine (-)His-Variante im pET21a-Vektor erstellt, deren Abstand zwischen dem 1. AUG und der RBS nur 8 nt beträgt. Daraufhin wurden die Konstrukte pET28a-NHis (7 nt), pET28a-(-)His (64 nt) und pET21a-(-)His (8 nt) in Parallelversuchen unter Standardbedingungen wiederholt exprimiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und der erhaltene Rohextrakt einem Aktivitätstest unterzogen. In Tabelle 22 ist erkennbar, dass die NHis-Variante mit einer Distanz von 7 nt die höchste spezifische Aktivität im Rohextrakt aufweist. Vergleicht man nun die Varianten ohne His-Tag mit 64 nt mit derjenigen mit 8 nt Abstand zwischen Startcodon und RBS, so wird deutlich, dass die Variante mit einem kürzeren Abstand von 8 nt eine nahezu 10-fach höhere spezifische Aktivität im Rohextrakt aufweist als die Variante mit langem Abstand von 64 nt. Mit diesem Ergebnis wird deutlich, dass die Distanz zwischen RBS und 1. AUG (Startcodon) sehr wichtig für eine erfolgreiche Überexpression ist. Dennoch zeigt der Rohextrakt der NHis-Variante eine nahezu doppelt so hohe spezifische Aktivität als der Rohextrakt der pET21a-(-)His-Variante, obwohl die Abstände mit 7 nt und 8 nt nahezu gleich sind

(Tabelle 22). Offensichtlich übt also die Position des His-Tags (N- oder C-terminal) einen positiven Effekt auf die Aktivität der PPADH aus.

Tabelle 22: Einfluss der Distanz zwischen RBS und 1. AUG auf die Aktivität der PPADH im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3). Photometrischer Aktivitätsassay: 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl pH 7 und 0,2 mM NADPH. 100 % entsprechen der spez. Aktivität der Variante mit N-terminalem His-Tag (NHis).

Variante[a]	Abstand zw. RBS und AUG [nt]	Vol. Aktivität [U mL^{-1}]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Protein-konzentration [mg mL^{-1}]	Rel. spez. Aktivität zu NHis [%]
pET28a-NHis	7	109,0	3,8	29,4	100,0
pET28a-(-)His	64	3,1	0,2	20,7	5,3
pET21a-(-)His*	8	42,9	2,1	20,8	55,3

[a]Expressionsbedingungen: 200 mL TB-Medium + 50 µg mL^{-1} Kanamycin/*100 µg mL^{-1} Carbenicillin; Induktion mit 0,5 mM IPTG; 37 °C; 18 h. Zellen wurden als 25%-ige Zellsuspension mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden die Varianten fusioniert mit einem His-Tag (NHis, NCHis, CHis) über Ni-NTA gereinigt und die kinetischen Parameter bestimmt. Ein repräsentatives SDS-Polyacrylamidgel der Rohextrakte und der gereinigten Proben sind in Abbildung 27 dargestellt.

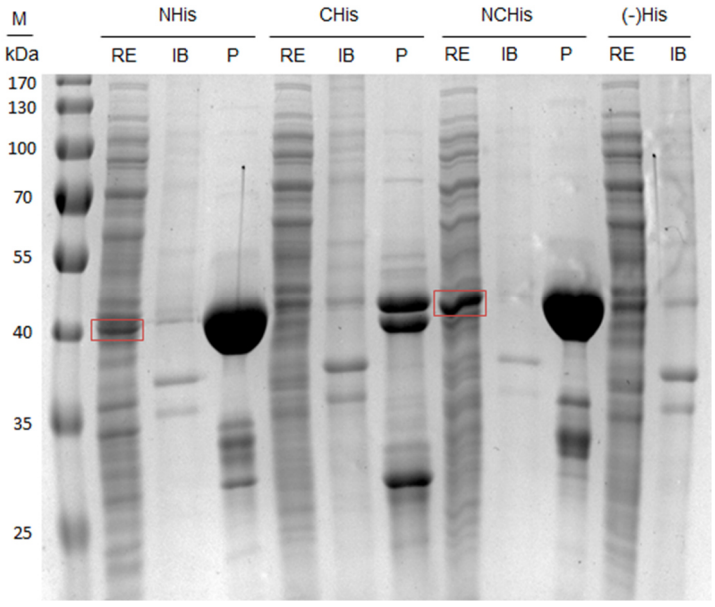


Abbildung 27: SDS-Polyacrylamidgel der verschiedenen Varianten der PPADH mit und ohne His-Tag aus *E. coli* BL21(DE3) und Reinigung. RE= Rohextrakt; IB= *inclusion bodies*; P= Ni-NTA gereinigte Probe. Die gereinigte Probe der Variante CHis wurde zuvor TCA-gefällt, da die Proteinkonzentration zu niedrig war. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Es wurden je 10 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Die gereinigten Proben der His-Tag Varianten wurden anschließend für die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Reduktion von Benzaldehyd verwendet. Hierbei wurden die Aktivitäten bei konstanter Enzymmenge und variierender Substratkonzentration bis zu 30 mM Benzaldehyd gemessen. Die Michaelis-Menten-Kurven sind in Abbildung 28 dargestellt und die dazugehörigen ermittelten kinetischen Parameter in Tabelle 23 zusammengefasst. Anhand der Kurvenverläufe und der kinetischen Parameter ist ersichtlich, dass die beiden Varianten NHis und NCHis sich nur minimal unterscheiden.

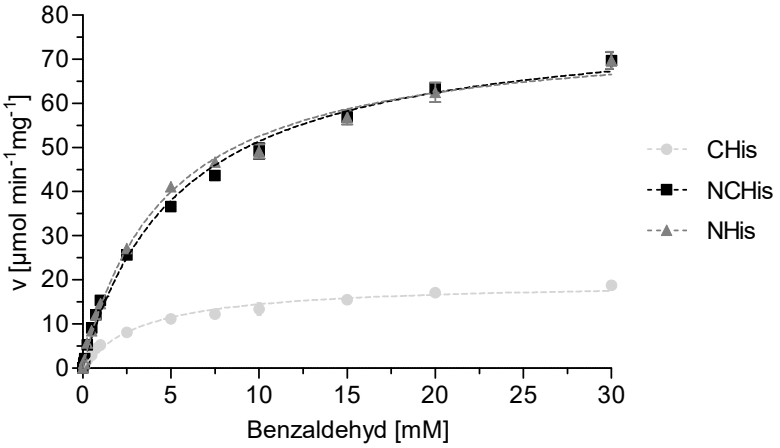


Abbildung 28: Michaelis-Menten Kinetiken für die Reduktion von Benzaldehyd der gereinigten His-Tag Varianten. Die Substratkonzentration wurde variiert, wobei der verwendete Puffer (0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7) und die Cofaktorkonzentration (0,2 mM NADPH) gleich gehalten wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Vergleicht man hierzu den Kurvenverlauf und die kinetischen Parameter der PPADH mit C-terminalem His-Tag, so wird deutlich, dass der V_{max} deutlich geringer ist als bei NHis und NCHis und somit auch k_{cat} um ein 4-faches kleiner ist (Tabelle 23). Die K_M-Werte der verschiedenen Varianten zeigen dagegen im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch keine Unterschiede. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) ist bei den Varianten NHis und NCHis annähernd gleich und bei der CHis-Variante um ein Drittel geringer. Jedoch zeigt die CHis-Variante einen geringfügig kleineren K_M-Wert. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Position des His-Tags einen Einfluss auf die Aktivität der PPADH hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion eines His-Tags am N- oder C-Terminus zu unterschiedlichen kinetischen Parametern führt. Hierbei wurden vor allem Unterschiede bezüglich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) sowie der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) festgestellt.

Tabelle 23: Übersicht der kinetischen Parameter der His-Tag Varianten für die Reduktion von Benzaldehyd. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Variante	K_M [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [s^{-1} mM^{-1}]
NHis	4,6	76,8	53,0	11,4
NCHis	5,5	79,5	56,3	10,3
CHis	3,5	19,6	13,2	3,7

3.5.6 Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die nähere Charakterisierung der PPADH bezüglich kinetischer Parameter wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration gegenüber ausgewählten Substraten Benzaldehyd, Acetophenon, 2,2,2-Trifluoracetophenon, *rac*-CF_3-Aldol sowie für den Cofaktor NADPH ermittelt. Die Aktivitäten für die Michaelis-Menten-Kinetiken wurden mit gereinigter PPADH (Ni-NTA und Gelfiltration) mit N-terminalem His-Tag in Dreifachbestimmung photometrisch vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5. Die Wechselzahl k_{cat} wurde auf Grundlage des theoretischen Molekulargewichtes der monomeren Form mit N-terminalem His-Tag und Linker (41,4 kDa) berechnet. Die Michaelis-Menten Kurvenverläufe sind in Abbildung 29 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass bei allen gemessenen Substraten keine Substartüberschussinhibierung vorlag. Bei den Substraten, die zuvor mit hohen Aktivitäten reduziert wurden, wurde ein typischer Kurvenverlauf einer Michaelis-Menten Kinetik beobachtet (Abbildung 29A, D und E). Die kinetischen Parameter der Michaelis-Menten Kinetiken aus Abbildung 29 sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass die Ketone Acetophenon und 2,2,2-Trifluoracetophenon schlechte Substrate für die PPADH sind, da die K_M-Werte mit ca. 140 mM und 37 mM sehr hoch sind (Tabelle 24, Eintrag B-C). Der Austausch des Restes -CH_3 im Acetophenon zu -CF_3 führt zu einer nahezu 4-fachen Erniedrigung des K_M-Wertes und somit zu einer höheren Substrataffinität. Die ermittelte katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für die Reduktion dieser beiden Substrate ist sehr niedrig (0,01-0,02 s^{-1} mM^{-1}). Vergleicht man hierzu die kinetischen Parameter des CF_3-Aldols, so wird deutlich, dass die PPADH dieses Substrat um ein Vielfaches besser umsetzen kann. Der K_M-Wert liegt bei 2,3 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei 64,5 U mg^{-1}. Die katalytische Effizienz ist im Vergleich zu den beiden Ketonen Acetophenon und 2,2,2-Trifluoracetophenon mit ca. 20 s^{-1} mM^{-1} hoch. Hierbei muss beachtet werden, dass das racemische Gemisch des CF_3-Aldols für die Kinetik-Messung verwendet wurde.

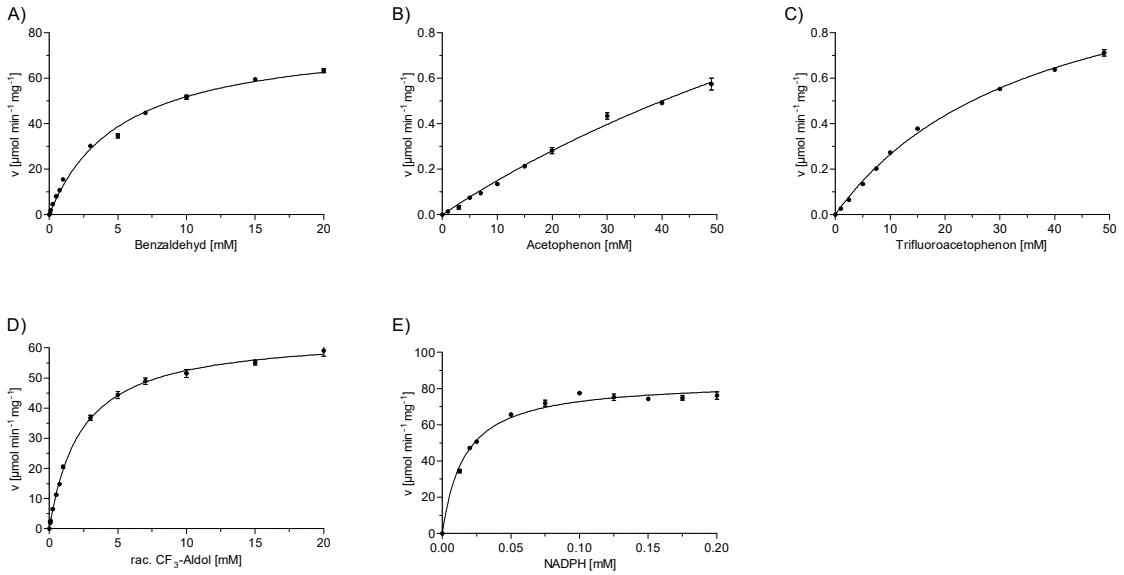


Abbildung 29: Michaelis-Menten Kinetiken der PPADH für die Reduktion von Benzaldehyd (A), Acetophenon (B), 2,2,2-Trifluoracetophenon (C), *rac*-CF_3-Aldol (D) sowie des Cofaktors NADPH (E). Die Substratkonzentrationen wurden jeweils variiert, wobei der verwendete Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7) und die Cofaktorkonzentration (0,2 mM NADPH) gleich gehalten wurden (A-D). Die Michaelis-Menten Kinetik des Cofaktors NADPH (E) wurde mit 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7 vermessen, wobei die Konzentration von NADPH variiert wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

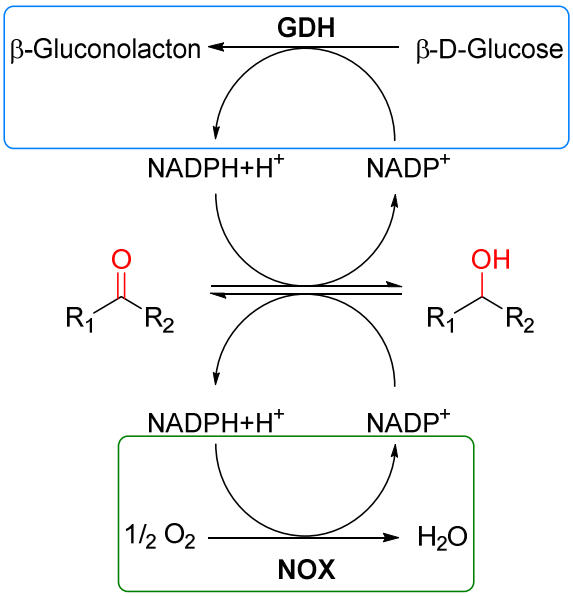
Da die PPADH hoch enantioselektiv gegenüber der Reduktion des (*S*)-Enantiomers des CF_3-Aldol ist (Kapitel 3.8.1), müsste der entsprechende K_M-Wert von 2,3 mM auf 1,15 mM halbiert werden und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) sich damit verdoppeln. Beim Standardsubstrat Benzaldehyd wurde ein K_M-Wert von 5,2 mM und V_{max}-Wert von 78,8 U mg^{-1} ermittelt. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) liegt bei 10,5 s^{-1} mM^{-1}.

Tabelle 24: Übersicht der kinetischen Parameter ermittelt aus den Kurvenverläufen der Abbildung 29 für die Reduktion von verschiedenen Substraten (A-D) sowie für den Cofaktor NADPH (E). Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 ausgewertet.

Eintrag	Substrat/Cofaktor	K_M [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [s^{-1} mM^{-1}]
A	Benzaldehyd	5,2	78,8	54,4	10,48
B	Acetophenon	140,4	2,3	1,6	0,01
C	2,2,2-Trifluoracetophenon	36,9	1,2	0,9	0,02
D	*rac*-CF_3-Aldol	2,3	64,5	44,5	19,44
E	NADPH	0,016	84,6	58,4	3636,25

3.5.7 Untersuchung der Enantioselektivität der PPADH

Um die Enantioselektivität der PPADH zu untersuchen, wurden in Biotransformationen einige prochirale Ketone zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert und ebenso die Oxidation von racemischen Alkoholen zu den prochiralen Ketonen betrachtet. Hierbei wurden Hilfsenzyme für die Regenerierung des Cofaktors verwendet (Schema 20). Für die Reduktion von Ketonen durch die PPADH wurde der Cofaktor NADPH mit Hilfe der Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *B. subtilis* und D-Glucose als Cosubstrat bereitgestellt. Für die Oxidation von Alkoholen durch die PPADH wurde die NAD(P)H-Oxidase (NOX) aus *L. sanfranciscensis* für die Regenerierung des Cofaktors $NADP^+$ verwendet.



Schema 20: Allgemeines Reaktionsschema der PPADH mit Cofaktorregenerierungssysteme. Gezeigt sind die Reduktion von prochiralen Ketonen zu chiralen Alkoholen, sowie die Rückreaktion (Oxidation). Für die Cofaktorregenerierung werden Hilfsenzyme (blau: GDH, grün: NOX) verwendet.

Die Ergebnisse der Biotransformationen hinsichtlich der Reduktion von Acetophenon, sowie 2-Hexanon, 2-Heptanon und 2-Octanon sind in Tabelle 25 aufgeführt. Für die Reduktionsrichtung konnte in den vier ausgewählten Biotransformationen ausschließlich die Bildung des (*S*)-Alkohols mit >99 % *ee* nachgewiesen werden. Zudem wurden gute bis quantitative Umsätze in den Biotransformationen erreicht. Diese Ergebnisse aus den reduktiven Biotransformationen, welche ausschließlich zu den (*S*)-Alkoholen als Produkte führten, kann man annehmen, dass die PPADH eine (*S*)-spezifische ADH ist.

Tabelle 25: Reduktive Biotransformationen ausgewählter Ketone zur Untersuchung der Enantiospezifität der PPADH1. Rel. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.

Eintrag	Substrat	Umsatz [%]	Selektivität [*ee*]
1[a]]	Acetophenon	93	(*S*) >99 %
2[b]	2-Hexanon	>99	(*S*) >99 %
3[b,c]	2-Heptanon	>99	(*S*) >99 %
4[b,c]	2-Octanon	>99	(*S*) >99 %

[a]Ansatz: 20 mM Acetophenon, 150 mM D-Glucose, 1 mM NADP+, 0,1 mg PPADH (gereinigt), 3 U GDH, auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M pH 7), 25 °C, t= 19 h.
[b]Ansatz: 9 mM Keton, 50 mM D-Glucose, 1 mM NADP+, 0,5 U PPADH (gereinigt), 3 U GDH, auf 1 mL Tris-HCl-Puffer (0,1 M pH 7), 25 °C, t= 22 h.
[c]Hydroxygruppen der Produkte wurden mit TFAA derivatisiert.

Diese Annahme sollte zusätzlich durch weitere oxidative Biotransformationen, in denen racemische Alkohole als Substrate eingesetzt werden, bestätigt werden. Bei einer hohen (*S*)-Enantioselektivität der PPADH sollte eine asymmetrische Oxidation den Zugang zum reinen (*R*)-Alkohol ermöglichen. Die Ergebnisse der oxidativen Biotransformationen sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Wie angenommen, verlief die Oxidation asymmetrisch ab, da bei allen drei getesteten racemischen Substraten nach einer Reaktionszeit von 22 h der (*R*)-Alkohol mit einem Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) von >97 % bis >99 % mittels GC-Analyse nachgewiesen werden konnte. Die GC-Chromatogramme der Standards sowie der Oxidation von *rac*-2-Hexanol sind Abbildung 30 dargestellt. Ob die PPADH nur exklusiv das (*S*)-Enantiomer oxidiert oder auch eventuell nach einer verlängerten Reaktionszeit auch das (*R*)-Enantiomer zum prochiralen Keton oxidiert wird, kann nicht gesagt werden, da die GC-Analyse nicht quantitativ durchgeführt wurde. Die bisherigen Ergebnisse bestätigen jedoch die Annahme, dass die PPADH eine (*S*)-spezifische ADH ist.

Tabelle 26: Ergebnisse der asymmetrischen Oxidation racemischer, sekundärer Alkohole mit PPADH als Biokatalysator und NOX aus *L. sanfranciscensis* als Cofaktor-regenerierendes Enzym. Reaktionsbedingungen: 17,88 mM racemisches Substrat, 1 mM NADP+, 5 U LsNOX, 0,5 U PPADH (bezogen auf die Oxidationsaktivität von 2-Hexanol) auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7, 25°C, t= 22 h. Enantiomerenüberschuss wurde mittels GC bestimmt.

Eintrag	Substrat	restlicher Alkohol [*ee*]
1	*rac*-2-Hexanol	(*R*) >99 %
2[a]	*rac*-2-Heptanol	(*R*) >99 %
3[a]	*rac*-2-Octanol	(*R*) >97 %

[a]Hydroxygruppen der Alkohole wurden mit TFAA derivatisiert.

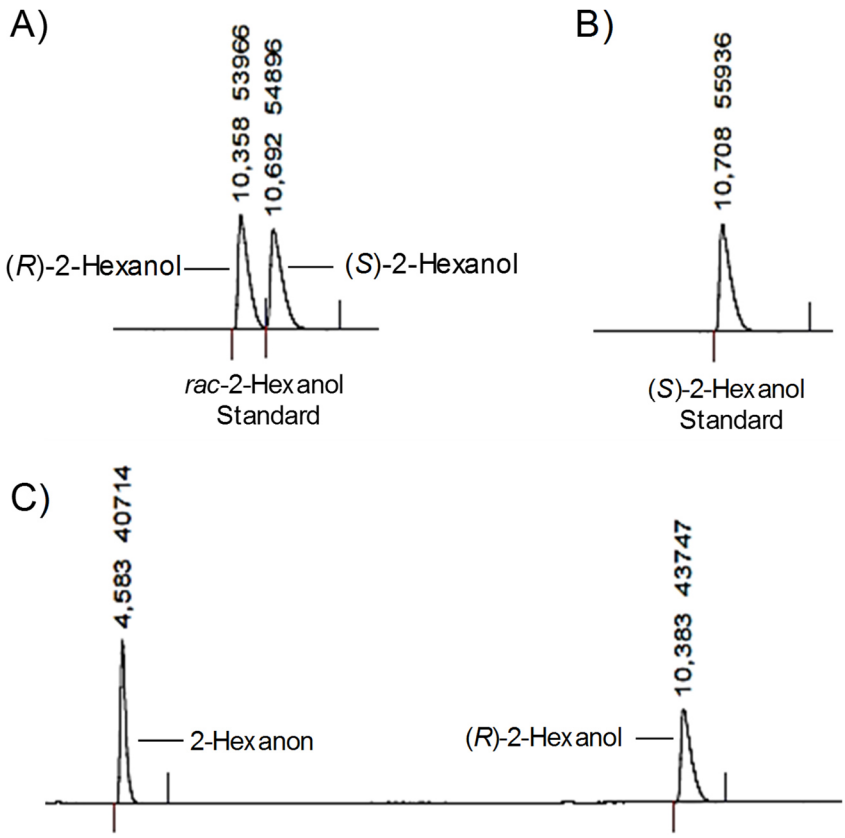


Abbildung 30: GC-Chromatogramme von A) Standard *rac*-2-Hexanol, B) Standard (*S*)-2-Hexanol und C) Oxidation von *rac*-2-Hexanol durch PPADH.

3.6 Die anderen „putativen Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“ bzw. PPADHs in *P. pastoris* GS115

Bei der Auffindung des Gens aus *P. pastoris* GS115, welches für die neu identifizierten ADH PPADH kodiert, ergab die BLAST-Suche ausgehend von der Aminosäuresequenz der PPADH einige Übereinstimmungen in der Datenbank. Die höchsten Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene mit 50,8 % bis 90,4 % wiesen hierbei andere Proteine auf, welche ebenfalls als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“ annotiert sind und zusätzlich im gleichen Stamm bzw. Genom vorliegen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Übersicht über weitere Proteine, welche als putative „Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“ in *P. pastoirs* GS115 annotiert sind und die höchste Sequenzähnlichkeiten zur PPADH aufweisen.

Uniprot-ID	Eigene Bezeichnung	Sequenzähnlichkeit zu PPADH1 [%][a]	Genlokalisation
C4R4L0	PPADH1	-	Chromosom 3, 0449
C4R4K9	PPADH2	83,9	Chromosom 3, 0448
C4R4K8	PPADH3	86,7	Chromosom 3, 0447
C4R4K7	PPADH4	90,4	Chromosom 3, 0446
C4R7K3	PPADH5	65,4	Chromosom 4, 0336
C4R3A9	PPADH6	50,8	Chromosom 3, 0014

[a]bezogen auf Aminosäureebene

Hierbei ist bei einer genaueren Analyse der Genlokalisation dieser Proteine aufgefallen, dass das neu identifizierte *ppadh*-Gen zusammen mit drei weiteren als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“-annotierten Gene (kodierend für PPADH2-PPADH4) nacheinander geschaltet im Genom vorliegt. Eine schematische Darstellung dieser Genanordnung der Proteine auf dem Chromosom 3 von *P. pastoris* GS115 ist in Abbildung 31 ersichtlich. Hierbei weist das als PPADH4-bezeichnete Protein die höchste Sequenzähnlichkeit von 90,4 % zur PPADH (PPADH1) auf.

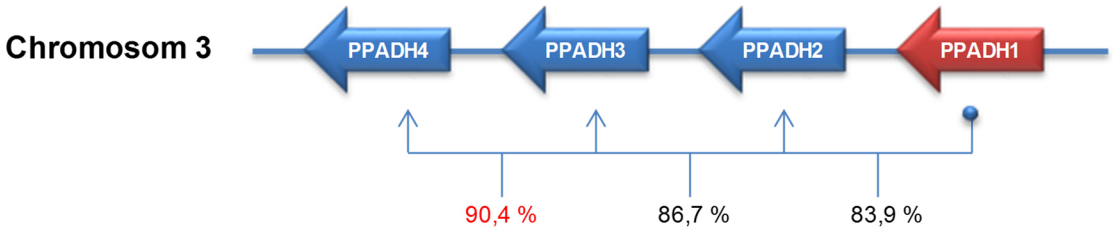


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Genanordnung auf dem Chromosom 3 von *Pichia pastoris* GS115 der PPADH1 bis PPADH4-Gene und deren Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene bezogen auf PPADH1.

Um zu untersuchen, ob diese putativen Proteine auch ähnliche katalytische Eigenschaften wie die PPADH1 aufweisen, wurden die entsprechenden Gene verfügbar gemacht, in den pET28a-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend wurden die Gene, welche für die PPADH1-PPADH6 kodieren, unter den T7-Promoter heterolog im kleinen Maßstab und unter gleichen Expressionsbedingungen (200 mL TB + 50 µg mL^{-1} Kanamycin, Induktion mit 0,5 mM IPTG, 37 °C, 19 h) überexprimiert. Die geernteten Zellen wurden als 25%-ige Zellsuspensionen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die zellfreien Rohextrakte isoliert. Die Rohextrakte wurden zunächst photometrisch für die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols getestet. Hierbei zeigte sich beim photometrischen Test, dass der Rohextrakt der PPADH1 eine hohe volumetrische Aktivität von 73,1 U mL^{-1} aufwies. Im Vergleich dazu, wurde in den Rohextrakten der PPADH2-PPADH6 eine volumetrische Aktivität <0,5 U mL^{-1} gemessen, selbst mit der PPADH4, die eine besonders hohe Sequenzähnlichkeit zur PPADH1 aufweist. Zur Überprüfung wurde sowohl eine SDS-PAGE als auch ein Western-Blot der Rohextrakt-Proben durchgeführt, um die Expression der Gene zu vergleichen. In Abbildung 32A ist das SDS-Polyacrylamidgel dargestellt, welches eine deutliche Überexpressionsbande mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa im Rohextrakt der PPADH1 zeigt. In Anbetracht der anderen Rohextrakte kann keine eindeutige Überexpressionsbande mit einem ähnlichen Molekulargewicht identifiziert werden. Zum eindeutigen Nachweis einer Expression wurde ein Western-Blot mit einem Anti-His-HRP-Antikörper durchgeführt, welche spezifisch His-Tag-Epitope erkennt und bindet. Da die Gene, welche für die PPADH1-PPADH6 kodieren, im Leserahmen der Sequenz für den N-terminalen His-Tags im pET28a-Vektor kloniert wurden, sollte bei erfolgreicher Expression die ADH-Proteine mit N-terminalem His-Tag fusioniert vorliegen und mit dem Antikörper nachweisbar sein. Der entsprechende Western-Blot ist in Abbildung 32B dargestellt und zeigt äquivalent zum Ergebnis der SDS-PAGE eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa im Rohextrakt der PPADH1,

welches nahezu dem berechneten Molekulargewicht des Monomers entspricht. In den Rohextrakten der PPADH2-6 ist in diesem Bereich bei ca. 40 kDa keine Proteinbande nachweisbar. Es ist jedoch erkennbar, dass in allen Rohextrakten Proteine mit geringeren Molekulargewichten (<35 kDa) nachgewiesen wurden. Diese Proteinbanden könnten unvollständig translatierte oder degradierte PPADH-Proteine sein, da diese mit dem Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Bei genauerer Betrachtung ist ebenfalls in allen Rohextrakt-Proben eine schwache Bande im Bereich zwischen 70 und 100 kDa erkennbar, welches eventuell dem Dimer entsprechen könnte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Genexpression der PPADH1 sich von denen der PPADH2-PPADH6 unterscheidet und zu unterschiedlicher Proteinausbeute im Rohextrakt führt.

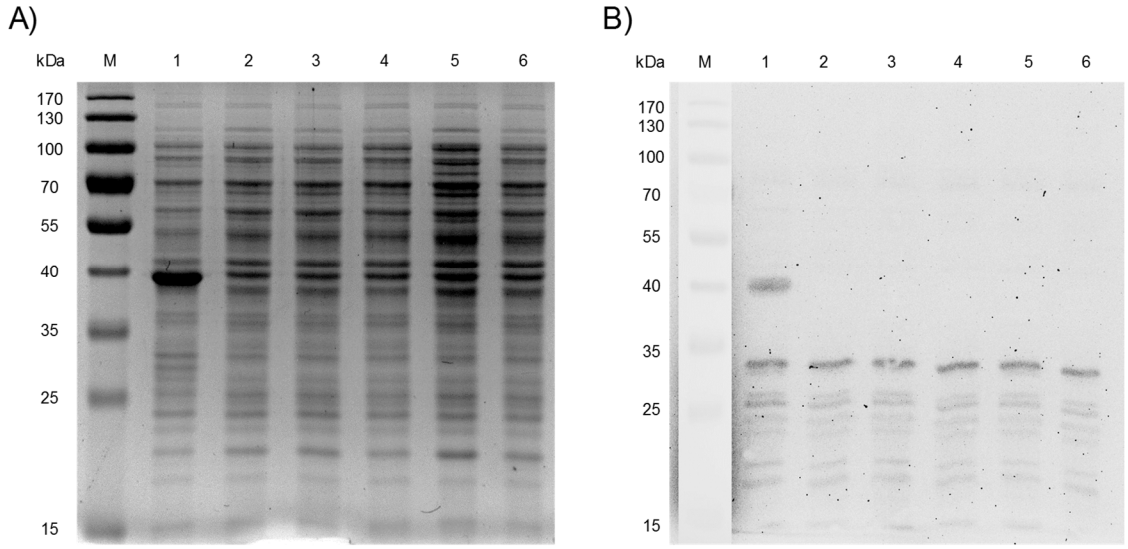


Abbildung 32: SDS-Polyacrylamidgel (A) und dazugehöriger Western-Blot (B) der Rohextrakte von PPADH1-PPADH6. Die Spuren 1-6 entsprechen den Rohextrakten PPADH1-PPADH6. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Es wurden je 10 µg Protein/ Spur aufgetragen. Für den Western-Blot wurde ein Anti-His-HRP-Antikörper (Carl Roth) verwendet.

Da anscheinend die Gene, welche für die PPADH2-PPADH6 nicht gut in *E. coli* exprimiert wurden und die Proteinmengen in den isolierten Rohextrakten gering waren, wurden die Rohextrakte (10 % (v/v)) einer Biotransformation mit Cofaktorregenerierungssystem (GDH und D-Glucose) für die Reduktion von 20 mM racemischem CF_3-Aldol bei einer Gesamtreaktionszeit von 17 h eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Biotransformationen sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Wie erwartet, wurden sehr geringe Umsätze bis zu 5 % bei den Biotransformationen der Rohextrakte von PPADH2-PPADH6 beobachtet. In den Ansätzen der Rohextrakte PPADH2, PPADH3 und PPADH6 lagen die Umsätze unter 1 %, sodass die

HPLC-Analysen dieser Proben nicht ausgewertet wurden. Die Ansatz der PPADH1 zeigte hingegen eine nahezu vollständige Reduktion des (*S*)-Enantiomer zum korrespondieren (*S*,*S*)-1,3-Diol. Wie in Vorversuchen beobachtet, kann bei längerer Reaktionszeit und hoher Enzymmenge die PPADH1 unselektiv werden, sodass auch das (*R*)-Enantiomer zum (*R*,*S*)-Diol reduziert wird. In diesem Ansatz wurden 10 % (v/v) Rohextrakt eingesetzt, was einer Gesamtaktivität von 7,3 U entspricht und offensichtlich bei dieser hohen Enzymmenge zu einem schlechteren *dr*-Wert führen kann. Betrachtet man die Ergebnisse der PPADH4-Umsetzung, so wird deutlich, dass dieses Enzym enantioselektiv das (*S*)-Enantiomer reduziert, aber die Bildung des *anti*-Diols gegenüber dem *syn*-Diol bevorzugt.

Tabelle 28: Reduktion des racemischen CF_3-Aldols mit PPADH1-PPADH6 Rohextrakten. Reaktionsbedingungen: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 5 U GDH, 10 % (v/v) Rohextrakt, auf 1 mL 0,5 M KPi pH 7, 25°C, t= 17 h.

Rohextrakt	(*R*)-CF_3-Aldol [*ee*][a]	Umsatz [%][a]	Diolverteilung [%][b]				*dr* (*syn*:*anti*)
			(*S*,*S*)	(*S*,*R*)	(*R*,*R*)	(*R*,*S*)	
PPADH1	99	58	86	0	0	14	86:14
PPADH2	<1	<1	na	na	na	na	na
PPADH3	<1	<1	na	na	na	na	na
PPADH4	6	6	26	74	0	0	26:74
PPADH5	4	4	96	0	0	4	96:4
PPADH6	<1	<1	na	na	na	na	na

[a]Enantiomerenüberschuss und Umsatz wurden mit chiraler GC gemessen.
[b]Diastereomerenüberschuss und Diolverteilung wurden mit chiraler HPLC gemessen.
na= nicht auswertbar

Obwohl die PPADH4 eine Sequenzähnlichkeit von 90,4 % zur PPADH1 aufweist, wurde eine umgekehrte Diastereoselektivität bezüglich der Reduktion des CF_3-Aldols beobachtet. Um dies genauer zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Kristallstruktur der inaktiven PPADH1-Mutante (Y196F mit Substrat CF_3-Aldol und dem Cofaktor $NADP^+$) sowie des Aminosäuresequenz-Vergleichs (Abbildung 33) zwischen PPADH1 und PPADH4 zwei putativ wichtige Regionen 94-96 sowie 136-142 als *hot spots* ausgewählt, welche den Substrattunnel und die Position bzw. die Bindung des Substrates beeinflussen könnten und somit Ziele für eine semirationale Mutagenese darstellen.

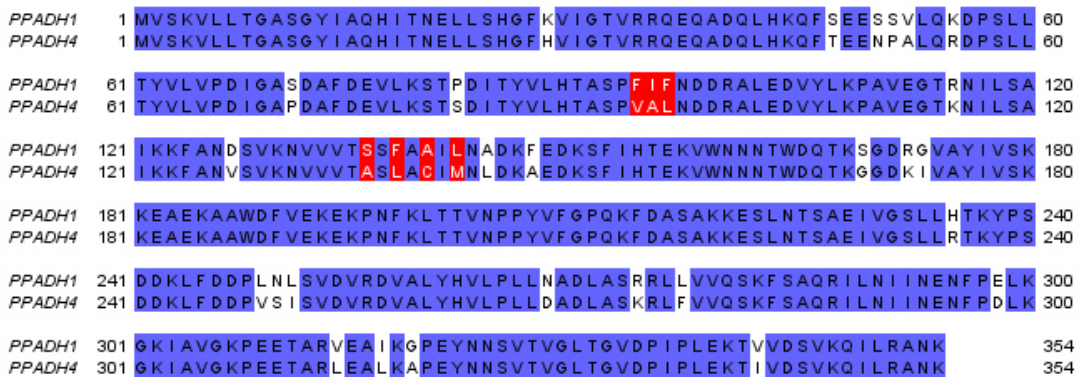


Abbildung 33: Alignment der Aminosäuresequenzen der PPADH1 und PPADH4 aus *P. pastoris* GS115. Potentiell wichtige Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums wurden rot markiert (Region 94-96 sowie 136-142).

3.6.1 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH4 zur PPADH1

Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese sollten die Aminosäuren der beiden Regionen der PPADH4 94-96 und 136-142 durch die in der PPADH1 vorkommenden schrittweise ersetzt werden und veränderte Eigenschaften hinsichtlich Stereoselektivität und Aktivität beobachtet werden. Im Rahmen einer Bachelorarbeit (Anissa Ouald Chaibs) wurden eine Dreifach- und eine Vierfach-Mutante, sowie die Kombination aus diesen beiden, also eine Siebenfach-Mutante konstruiert.[198] Eine Übersicht der konstruierten PPADH4-Mutanten mit Angabe der Aminosäureaustausche ist in Abbildung 34 dargestellt.

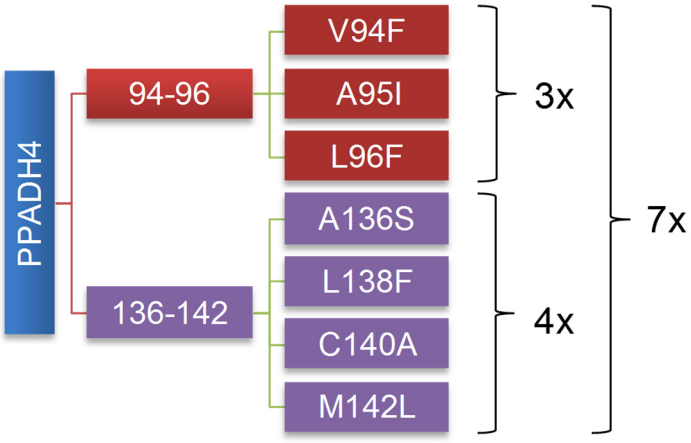


Abbildung 34: Übersicht der konstruierten PPADH4-Mutanten. Das Wildtyp-Gen der PPADH4 wurde als Template für die zielgerichtete Mutagenese verwendet. Die Aminosäuren der Positionen 94-96 (rot) sowie 136-142 (lila) wurden hierbei durch die entsprechenden Aminosäuren der PPADH1 ausgetauscht, sodass eine Dreifach-, Vierfach- und Siebenfach-Mutante der PPADH4 erzeugt wurden.

Zusätzlich wurden alle Einzelmutanten der Regionen 94-96 sowie 136-142 der PPADH4 konstruiert, um den potentiellen Einfluss einer einzelnen Aminosäureposition zu analysieren. Nach erfolgreicher Sequenzierung und Verifizierung der eingeführten Mutationen wurden die Vektoren für die heterologe Expression in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

3.6.2 Heterologe Expression und Reinigung der PPADH4-Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)

Die Wildtyp (wt)-Gene der PPADH1 und PPADH4, sowie die mutierten Gene der Dreifach-, Vierfach-, Siebenfachmutanten und aller Einzelmutanten der PPADH4 wurden zur besseren Vergleichbarkeit unter gleichen Bedingungen (1 L TB + 50 µg mL^{-1} Kanamycin, Induktion mit 0,5 mM IPTG, 37 °C, 18-20 h) überexprimiert. Die geernteten Zellen wurden als 25 %-ige Zellsuspensionen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die zellfreien Rohextrakte isoliert. Anschließend wurden die Proteine aus den zellfreien Rohextrakten über IMAC (Ni-NTA) gereinigt und weiter untersucht. Zur Überprüfung der Expression und Reinigung der PPADH4 und der Mehrfach-Mutanten wurden Proben von den Rohextrakten, der *inclusion bodies*-Fraktion sowie der gereinigten Proteine einer SDS-PAGE unterzogen. In Abbildung 35 wird deutlich, dass sich die Expression der PPADH4 (wt) stark von denen der Mehrfach-Mutanten unterscheidet. Wie zuvor festgestellt, scheint das wt-Gen der PPADH4 unter diesen Bedingungen kaum exprimiert zu werden, sodass keine Überexpressionsbande im Rohextrakt des Zielproteins sichtbar ist. Je ähnlicher jedoch das wt-Gen der PPADH4 zur PPADH1 in Folge der Mutationen wird, desto deutlicher ist eine Überexpressionsbande des Zielproteins im Bereich von ca. 41 kDa im Rohextrakt sichtbar. Dies wird besonders anhand der gereinigten Proben im SDS-Polyacrylamidgel deutlich (Abbildung 35). Die Ausbeute an Zielprotein verbesserte sich hierbei deutlich bei der Vierfach-Mutante im Vergleich zum wt-Enzym und der Dreifachmutante. Die SDS-Probe der Dreifach-Mutante zeigt eine leicht erhöhte Menge an Zielprotein im Vergleich zum wt-Enzym, sie ist jedoch im Vergleich zur Vierfach- und Siebenfach-Mutante deutlich geringer. Hinsichtlich der Einzelmutanten konnten ähnliche Expressionsunterschiede festgestellt werden. Die PPADH4-Einzelmutanten der Positionen 94-96 zeigten eine ähnlich schwache Expression wie der Wildtyp. Die Einzelmutanten der Positionen 136-142 wurden hierbei besser exprimiert bzw. es konnte mehr Zielprotein in den gereinigten Proben erhalten werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einzelne Aminosäureaustauche bzw. Änderungen einzelner Nukleotide im Gen zu einer veränderten Expression führen können.

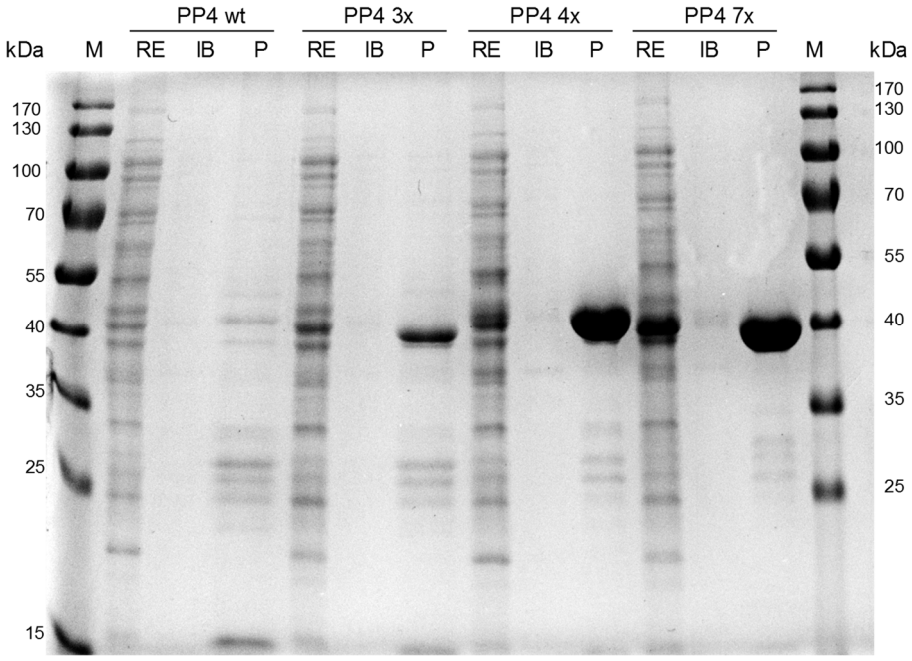


Abbildung 35: SDS-Polyacrylamidgel der wt-PPADH4 und der Mehrfach-Mutanten. Es wurden von den Rohextrakten und *inclusion bodies* jeweils 10 µg Protein aufgetragen und je 5 µg von den gereinigten Proben. Folgende Probenbezeichnungen für die PPADH4 (PP4)-Varianten wurden verwendet: wt= Wildtyp; 3x= V94F, A95I, L96F; 4x= A136S, L138F, C140A, M142L; 7x= V94F, A95I, L96F + A136S, L138F, C140A, M142L. RE= Rohextrakt; IB= *inclusion bodies*; P= gereinigtes Protein; M= Proteinmarker (Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

Um festzustellen, ob die Austausche der Aminosäuren in den Regionen 94-96 sowie 136-142 der PPADH4 zu einer vergleichbaren Aktivität wie bei der wildtypischen PPADH1 führen, wurden die gereinigten PPADH4-Varianten einem photometrischen Aktivitätstest mit Benzaldehyd als Substrat unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass die wt-PPADH4, die Dreifachmutante (3x, 94-96) sowie die Einzelmutanten der Positionen 94-96 sehr geringe spezifische Aktivitäten <1 U mg^{-1} (Tabelle 29). Dies könnte auf die geringen Proteinkonzentrationen und die damit einhergehenden schlechten Ausbeuten der Proteine zurückzuführen sein. Dies könnte mit den geringen Proteinkonzentrationen und der damit einhergehenden schlechten Ausbeuten der Proteine begründet werden. Die höchste spezifische Aktivität von knapp 7 U mg^{-1} wurde bei der Vierfach-Mutante (4x, 136-142) gemessen. Die Siebenfach-Mutante hingegen zeigte eine nur etwa halb so hohe Aktivität von 3,8 U mg^{-1}. Da die gereinigten Vierfach- und Siebenfach-Mutanten eine ähnliche Reinigungsgrade aufwiesen (Abbildung 35), sollten diese Werte verlässlich und vergleichbar sein. Die Erwartung war jedoch, dass mit höherer Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen auch die Aktivitäten der PPADH4-Mutanten steigen. Anscheinend führt die Kombination der Dreifach-Mutante mit der Vierfach-Mutante zu einer Aktivitätsminderung.

Tabelle 29: Übersicht der photometrischen Aktivitäten der gereinigten wildtypischen PPADH4 und der PPADH4-Mutanten. Aktivitäten wurden mit 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7, 0,2 mM NADPH bei 25 °C vermessen.

Varianten	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]
PP4 wt[a]	0,4
PP4 94-96[a]	0,8
PP4 136-142	7,0
PP4 94-96 & 136-142	3,8
PP4 V94F[a]	0,5
PP4 A95I[a]	0,8
PP4 L96F[a]	0,3
PP4 A136S	3,3
PP4 L138F	1,5
PP4 C140A[a]	0,7
PP4 M142L	2,0

[a]Ausbeute an Zielprotein sehr gering.

In Anbetracht der Einzelmutanten des Bereichs 136-142 wird deutlich, dass hier ebenfalls höhere Aktivitäten (bis auf Ausnahme der C140A-Mutante) gemessen werden konnten. Änderungen in diesen Bereich führen anscheinend zu einer höheren spezifischen Aktivität, sodass man beim Aufaddieren der Aktivitäten der Einzelmutanten A136S, L138F, C140A und M142L man auf nahezu die Gesamtaktivität der Vierfachmutante 136-142 kommt. Überraschenderweise konnte durch den Austausch von sieben Aminosäuren der PPADH4 keine vergleichbare Aktivität der PPADH1 mit ca. 70 U mg^{-1} hergestellt werden, sodass angenommen werden kann, dass Aminosäureunterschiede außerhalb der beiden Regionen 94-96 sowie 136-142 einen Einfluss auf die Aktivität haben. Dennoch sollten die hergestellten Mutanten bezüglich der Enantio- und Diastereoselektivität gegenüber verschiedenen Substraten getestet und verglichen werden.

3.6.3 Optimierung der Genexpression der PPADH4 und Reinigung

Aufgrund der schlechten Expression des wt-Gens der PPADH4, wurde ein codonoptimiertes Gen bei GeneArt™ (Thermo Scientific) bestellt. Das codonoptimerte Gen im pET28a-Vektor wurde anschließend in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und beim Koorperationspartner (AK Niefind, Universität Köln) im größeren Maßstab (5 L) überexprimiert. Hierbei wurde die Kultivierungstemperatur stetig herabgesenkt (1. 37 °C bis OD_{600nm} = 0,3; 2. 30 °C bis OD_{600nm} = 0,5; 3. 18 °C 12-16 h) und die Induktion bei einer OD_{600nm} zwischen 0,7-0,9 mit 0,2 mM IPTG eingeleitet. Nach der Zellernte und dem

Zellaufschluss, wurde die PPADH4 über Ni-NTA und anschließender Gelfiltration aus dem Rohextrakt gereinigt. Das gereinigte Protein wurde anschließend mit der PPADH1 sowohl bezüglich des Reinigungsgrads überprüft als auch hinsichtlich der Aktivitäten verglichen. Das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 36 zeigt einen ähnlich hohen Reinigungsgrad wie bei der PPADH1, sodass diesmal genügend Zielprotein gewonnen werden konnte. Wiederholt sind aber wieder einige Proteinbanden mit geringerem Molekulargewicht sichtbar, sodass entweder die Proteine mit der Zeit degradieren oder es sich hierbei um unvollständige Proteinaggregate der PPADH1 und PPADH4 handelt, welche nach der Ni-NTA-Reinigung und der Gelfiltration nicht vollständig entfernt werden konnten.

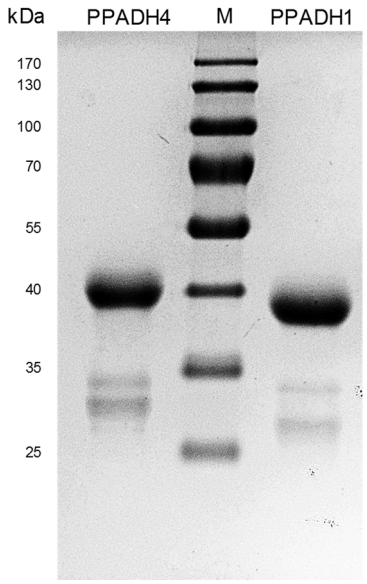


Abbildung 36: SDS-Polyacrylamidgel der gereinigten Proteinproben von PPADH4 (links) und PPADH1 (rechts) nach Gelfiltration. Es wurden je 5 µg Protein pro Spur aufgetragen. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Da nun die PPADH4 in vergleichbarer Proteinmenge und Homogenität vorlag, wurde anschließend ein photometrischer Aktivitätstest mit dem Standardsubstrat Benzaldehyd durchgeführt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung in Tabelle 30 zeigen hierbei, dass die PPADH4 weiterhin eine reduzierte Aktivität von 9,7 U mg^{-1} im Vergleich zur PPADH1 mit 65,3 U mg^{-1} aufweist. Jedoch konnte aufgrund der optimierten Expressionsbedingungen und anschließenden Reinigung die spezifische Aktivität der gereinigten PPADH4 von ursprünglich 0,4 mg^{-1} (Tabelle 29) auf 9,7 U mg^{-1}, also nahezu um das 25-fache verbessert werden. Für weitere Untersuchungen wurden diese beiden Enzympräparate verwendet.

Tabelle 30: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der PPADH1 und PPADH4 für die Reduktion von Benzaldehyd. Photometrische Aktivitäten wurden mit 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7, 0,2 mM NADPH bei 25 °C bestimmt. Beide Enzyme wurden mittels Ni-NTA und anschließender Gelfiltration gereinigt.

Enzym	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]
PPADH1	65,3
PPADH4	9,7

3.6.4 Untersuchung der PPADH4-Mutanten bezüglich Enantio- und Diastereoselektivität

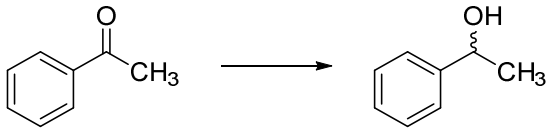
Wie bereits vorher erwähnt, konnte bei der PPADH1 und der PPADH4 trotz hoher Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene von 90,4 % Unterschiede in der Diastereoselektivität bei der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols festgestellt werden. Dieses Phänomen sollte durch Umsetzungen mit weiteren Substraten (Acetophenon, 2,2,2-Trifluoracetophenon, 4-Phenyl-2-butanon und dem CF_3-Aldol) verifiziert und untersucht werden. Zusätzlich sollten die konstruierten PPADH4-Mutanten ebenfalls hinsichtlich Änderungen der Stereoselektivität analysiert werden. Für die Umsetzungen wurden standardgemäß GDH und D-Glucose für die Regenerierung des Cofaktors NADPH verwendet. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden je 50 µg gereinigtes Protein verwendet (wenn nicht anders angemerkt).

A) Reduktion von Acetophenon zu 1-Phenylethanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM Acetophenon zu 1-Phenylethanol sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Wie bereits in einem vorherigen Kapitel beschrieben, zeigte die PPADH1 eine hohe Enantiospezifität, wobei die getesteten Ketone zu den korrespondierenden (*S*)-Alkoholen reduziert wurden. Bei der Reduktion von Acetophenon durch die PPADH1 ist dies ebenfalls der Fall und es wird (*S*)-1-Phenylethanol mit einem *ee* >99 % gebildet. Vergleicht man hierzu die Umsetzung mit der PPADH4, so wird deutlich, dass das (*S*)-Enantiomer mit einem *ee* von 70 % gebildet wurde (vergleiche Tabelle 31, Eintrag 1 und 2). Die PPADH4 weist somit im Gegensatz zur PPADH1 eine signifikante Änderung der Enantioselektivität auf. In Hinblick auf die Dreifach-Mutante 94-96 konnte wiederum eine Enantioselektivität von >99 % *ee* für den (*S*)-Alkohol beobachtet werden, ebenso wie bei der

Siebenfach-Mutante (Tabelle 31, Eintrag 3 und 5). Die Änderungen der Aminosäuren der Region 136-142 der PPADH4 führten dabei nicht zur Verbesserung des *ee*-Wertes auf >99 %. Hierbei kann also die Hypothese aufgestellt werden, dass Änderungen im Bereich 94-96 (also V94F, A95I und L96F) die Enantioselektivität beeinflussen und die Enantioselektivität der PPADH4 erhöhen. Bei den Einzelmutanten der PPADH4 zeigten sich ebenfalls Unterschiede. Hierbei konnte vor allem bei den Einzelmutanten A95I und L138F hohe *ee*-Werte von 90-91 % gemessen werden. Bei der Umsetzung mit der V94F-Mutante wurde ebenfalls ein *ee* >99 % erreicht, jedoch muss dieses Ergebnis hierbei kritisch betrachtet werden. Da der Umsatz nur bei 1 % lag und die Peakfläche des Produkts minimal war, könnte potentiell gebildetes (*R*)-Phenylethanol unter der GC-Nachweisgrenze liegen und somit nicht detektiert werden. Eine Wiederholung der Umsetzung mit 200 µg Protein statt 50 µg erzielte keine Verbesserung des Umsatzes.

Tabelle 31: Reduktion von Acetophenon mit PPADH1, PPADH4 und den PPADH4-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM Acetophenon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 16-19 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



Acetophenon (*R*)- / (*S*)-1-Phenylethanol

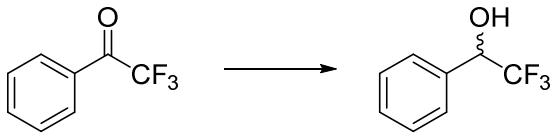
Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* von (*S*)-1-Phenylethanol [%]
1	PPADH1	93	>99
2	PPADH4	>99	70
3	PP4 3x (94-96)[a]	14	>99
4	PP4 4x (136-142)	32	79
5	PP4 7x (94-96 & 136-142)	27	>99
6	PP4 V94F[a]	1	na
7	PP4 A95I[a]	36	91
8	PP4 L96F[a]	12	64
9	PP4 A136S	32	67
10	PP4 L138F	39	90
11	PP4 C140A[a]	6	60
12	PP4 M142L	35	70

[a]Proteinmenge nicht verlässlich aufgrund niedriger Proteinkonzentration und Inhomogenität der Probe.
na= nicht auswertbar aufgrund des geringen Umsatzes.

B) Reduktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon zu 2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon zu 2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol sind in Tabelle 32 zusammengefasst. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der CF_3-Gruppe sich die CIP-Priorität bei den korrespondierenden Alkoholen ändert. Auffällig ist hierbei, dass anscheinend die Änderung des Restes am Acetophenon von -CH_3 auf -CF_3 bereits zu einer stark veränderten Stereoselektivität der PPADH1 und PPADH4 führt.

Tabelle 32: Reduktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit PPADH1, PPADH4 und den PPADH4-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 16-19 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



2,2,2-Trifluoracetophenon (*R*)- / (*S*)-2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol

Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* [%] von (*R*)	*ee* [%] von (*S*)
1	PPADH1	62	31	
2	PPADH4	>99		85
3	PP4 3x (94-96)[a]	24	20	
4	PP4 4x (136-142)	>99		78
5	PP4 7x (94-96 & 136-142)	23	41	
6	PP4 V94F[a]	21	19	
7	PP4 A95I[a]	94		78
8	PP4 L96F[a]	84		74
9	PP4 A136S	>99		88
10	PP4 L138F	>99		77
11	PP4 C140A[a]	60		71
12	PP4 M142L	>99		85

[a]Proteinmenge nicht verlässlich aufgrund niedriger Proteinkonzentration und Inhomogenität der Probe.

Die Anwesenheit der CF_3-Gruppe führte hierbei zu einer Erniedrigung des *ee*-Wertes von >99 % (-CH_3) auf nur noch 31 % für den (*R*)-Alkohol. Ein noch viel stärkerer Einfluss der CF_3-Gruppe wurde bei der PPADH4 beobachtet. Die PPADH4 zeigte eine moderate Enantioselektivität bezüglich der Bildung von (*S*)-1-Phenylethanol (70 % *ee*), die Reduktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon resultierte hingegen in der Bildung des korrespondierenden (*S*)-Alkohols mit einem *ee* von 85 %. Hier hätte man ebenfalls die

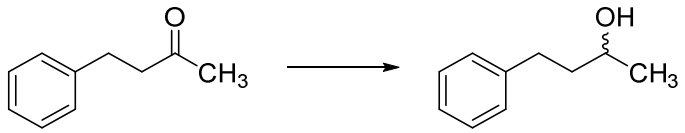
Bildung des korrespondierenden (*R*)-Alkohols als Hauptprodukt erwartet. Eine ähnlich hohe Enantioselektivität für die Bildung des (*S*)-Alkohols wurde ebenfalls bei der Vierfach-Mutante (136-142) sowie bei den Einzelmutanten A95I, L96F, A136S, L138F, C140A und M142L beobachtet (Tabelle 32, Einträge 4, 7-12). Nur die Dreifach-, Siebenfach- und V94F-Mutanten zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei der PPADH1 (Tabelle 32, Einträge 3, 5-6). Diese Ergebnisse sind nahezu äquivalent zu denen, die bei der Reduktion des Acetophenons beobachtet wurden und deuten darauf hin, dass der Bereich 94-96 einen wichtigen Einfluss auf die Enantioselektivität der PPADH4 zu haben scheint und hierbei insbesondere die Position 94 eine zentrale Rolle spielt. Die Vierfach-Mutante 136-142 der PPADH4 zeigt ähnliche Eigenschaften wie die wt-PPADH4. Die Dreifach-Mutante 94-96 hingegen zeigt ähnliche Eigenschaften wie die PPADH1. Führt man nun die Mutationen der Dreifach-Mutante 94-96 in die Vierfach-Mutante ein, so verändert sich ebenfalls die Enantioselektivität in Richtung PPADH1. Bei den Einzelmutanten zeigte die V94F als einziges die Bildung des (*R*)-Alkohols.

C) Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon zu 4-Phenyl-2-butanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM 4-Phenyl-2-butanon zu 4-Phenyl-2-butanol sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Hierbei konnte bei allen getesteten Varianten eine Enantiopräferenz für die Bildung des (*S*)-Alkohols beobachtet werden, wobei die Enantioselektivitäten meist im moderaten Bereich zwischen ca. 70-90 % *ee* lagen. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Substrates führte zu einer Verschlechterung des *ee*-Wertes auf 69 % bei der PPADH1 in Vergleich zum exzellenten *ee*-Wertes >99 % bei der Reduktion des Acetophenons zu (*S*)-1-Phenylethanol. Auffällig war hierbei erneut die V94F-Mutante, welche einen *ee* >99 % zeigte. Jedoch muss hierbei, wie zuvor erwähnt, der geringe Umsatz von nur 2 % beachtet werden, wodurch dieser *ee*-Wert nicht verlässlich und somit nicht auswertbar ist. In Hinblick auf die Umsätze fällt auf, dass es sehr große Variationsbreiten bezüglich der Aktivitäten der einzelnen Mutanten gibt. Hierbei fallen im positiven Sinn besonders die Vierfach- und die L138F-Mutanten auf, die einen vollständigen Umsatz erreichen konnten. Offensichtlich wird durch den Austausch L138F die Aktivität für dieses Substrat stark erhöht diese Änderung wirken sich ebenfalls positiv auf die Aktivität und die Umsatzstärke der Vierfach-Mutanten aus. Die Einzelmutanten V94F, A95I und L96F zeigen ebenfalls große Schwankungen in den erreichten Umsätzen, obwohl die Proteinkonzentrationen dieser Proben ähnlich sind. Diese Variationen in den erreichten Umsätzen könnten auf Unterschiede in den

spezifischen Aktivitäten der Mutanten hindeuten, da im SDS-Gel die Proteinbanden der Einzelmutanten V94F, A95I und L96F vergleichbare Intensitäten aufwiesen, sowie die Stärke der Proteinbanden der Einzelmutanten im Bereich 136-142 mit Ausnahme von C140A ebenso vergleichbar waren. Die Einzelmutanten V94F und L96F zeigen deutlich niedrigere Umsätze als die A95I-Mutante (Tabelle 33, Eintrag 6-8). Die Dreifach-Mutante zeigte ebenfalls einen niedrigen Umsatz, wahrscheinlich durch die Mutationen V94F und L96F verursacht. Kombiniert man die Dreifach-Mutante (Umsatz 19 %) mit der Vierfach-Mutante (Umsatz >99 %) zur Siebenfach-Mutante, so verringert sich der Umsatz auf 46 %. Die Bereiche 94-96 sowie 136-142 scheinen nicht nur die Stereoselektivität, sondern auch die Aktivität der Enzyme zu beeinflussen. Zusammenfassend kann aufgrund der geringen Unterschiede bezüglich der Stereoselektivität (*ee*-Werte) zwischen PPADH1 und PPADH4 sowie innerhalb der Mutanten kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Die verlängerte Kohlenstoff-Kette des Substrates 4-Phenyl-2-Butanon könnte eventuell dazu führen, dass das Substrat im aktiven Zentrum mehr räumliche Flexibilität erhält und dies zu den moderaten Enantioselektivitäten führt.

Tabelle 33: Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon mit PPADH1, PPADH4 und den PPADH4-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM 4-Phenyl-2-butanon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 18 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



4-Phenyl-2-butanon (*R*)- / (*S*)-4-Phenyl-2-butanol

Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* [%] von (*S*)
1	PPADH1	28	69
2	PPADH4	53	80
3	PP4 3x (94-96)[a]	19	76
4	PP4 4x (136-142)	>99	78
5	PP4 7x (94-96 & 136-142)	46	65
6	PP4 V94F[a]	2	na
7	PP4 A95I[a]	95	90
8	PP4 L96F[a]	30	81
9	PP4 A136S	73	83
10	PP4 L138F	>99	93
11	PP4 C140A[a]	16	79
12	PP4 M142L	68	48

[a]Proteinmenge nicht verlässlich aufgrund niedriger Proteinkonzentration und Inhomogenität der Probe.
na= nicht auswertbar aufgrund des geringen Umsatzes

D) Reduktion des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) zum 1,3-Diol

Am Anfang des Kapitels wurde die Auffindung weiterer ADH-Gene (PPADH2-PPADH6) beschrieben, die auf die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols getestet wurden. Hierbei zeigte sich, dass die PPADH4 die Bildung des *anti*-Diastereomeren bevorzugt, während die PPADH1 eine umgekehrte Diastereoselektivität mit Bildung des *syn*-Diastereomeren zeigt. Die erstellten PPADH4-Varianten wurden ebenfalls für die Reduktion dieses Substrates getestet.

Die Ergebnisse dieser Umsetzungsreihe sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Auch hier bestätigt sich, dass sich die PPADH1 und PPADH4 hinsichtlich ihrer Diastereoselektivitäten deutlich unterscheiden. Die PPADH1 bevorzugt die Bildung der *syn*-Diole, hingegen die PPADH4 die Bildung von *anti*-Diolen (siehe Tabelle 34, Eintrag 1-2). Hinsichtlich der Mehrfach-Mutanten der PPADH4 konnte diese *anti*-Diol-Präferenz hin zur Präferenz der PPADH1, also einer *syn*-Diol-Bildung, geändert werden. Hierbei zeigte die Dreifach-Mutante 94-96 die Bildung von nur einem Stereoisomeren (*S*,*S*) von vier möglichen CF_3-Diolen, sodass ein *dr* von >99:1 für die *syn*-Diastereomere erreicht werden konnte (siehe Tabelle 34, Eintrag 3). Die Vierfach-Mutante 136-142 zeigte ein umgekehrtes Diastereomerenverhältnis als die wt-PPADH4, jedoch wurde im Vergleich zur Dreifach-Mutante hier die Bildung des (*S*,*R*)-Diols beobachtet. Die Aminosäure-Austausche in dieser Regionen führten zwar zu einer Umkehrung der Diastereoselektivität jedoch wird die Bildung des (*S*,*R*)-Diols damit nicht unterbunden, sondern nur minimiert (Tabelle 34, Eintrag 4). In Anbetracht der Siebenfach-Mutante (94-96 und 136-142) konnte wiederum die Diastereoselektivität der wt-PPADH1 erreicht und die Bildung des (*S*,*R*)-Diols unterbunden werden (Tabelle 34, Eintrag 5). In Korrelation zu den bisher erreichten Ergebnissen kann wiederholt bestätigt werden, dass die Einführung der Mutationen der Region 94-96 in die Vierfach-Mutante die Eigenschaften der PPADH1 bezüglich der Diastereoselektivität wiederherstellen. Die Mutationen im Bereich 136-142 scheinen hierbei nicht ausreichend zu sein, um die Bildung des (*S*,*R*)-Diols zu verhindern. Unter den getesteten Einzelmutanten konnte bei L96F, A136S sowie C160A weiterhin die Präferenz für die Bildung der *anti*-Diastereomere beobachtet werden. Auffällig war hierbei die Mutante L96F, die ein noch höheres Diastereomerenverhältnis zeigte als die der wildtypischen PPADH4 (Tabelle 34, Eintrag 2 und 8). Die Mutanten A95I, L138F sowie M142L reduzierten das racemische CF_3-Aldol überwiegend zu den (*S*,*S*) und (*S*,*R*)-Diolen, wobei die Diole nahezu als racemisches Gemisch vorlagen (Tabelle 34, Eintrag 7, 10, 12).

Bei der V94F-Einzelmutante wurde erneut ein schlechter Umsatz von nur 1 % festgestellt. Eine Wiederholung der Umsetzung mit weniger Substrat (20 mM statt 40 mM) und doppelter Enzymmenge (100 µg statt 50 µg) führten hierbei nicht zur Steigerung des Umsatzes.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass anhand der konstruierten Mehrfach- und Einzelmutanten der PPADH4 und der Analyse der Enantio- und Diastereoselektivitäten bezüglich der Reduktion einiger Ketone zu den korrespondierenden Alkoholen, wertvolle Erkenntnisse bezüglich des Einflusses spezifischer Aminosäurereste der Region 94-96 auf die Stereospezifität der PPADH4 erhalten werden konnten.

Tabelle 34: Reduktion des racemischen CF_3-Aldols mit PPADH1, PPADH4 und den PPADH4-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 40 mM *rac*-CF_3-Aldol, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 16-19 h. Grau hinterlegt= *anti*-Diastereomere werden bevorzugt gebildet.

Eintrag	Variante	Umsatz [%][a]	Diolverteilung [%][b]				*dr* (*syn*:*anti*)
			(*S*,*S*)	(*S*,*R*)	(*R*,*R*)	(*R*,*S*)	
1	PPADH1[c]	52	96	0	0	4	96:4
2	PPADH4[c]	52	29	67	0	4	29:71
3	PP4 3x (94-96)[d]	40	>99	0	0	0	>99:1
4	PP4 4x (136-142)	51	76	22	0	2	76:24
5	PP4 7x (94-96 & 136-142)	51	98	0	0	2	98:2
6	PP4 V94F[d]	1	na	na	na	na	na
7	PP4 A95I[d]	28	55	44	0	1	55:45
8	PP4 L96F[d]	17	10	90	0	0	10:90
9	PP4 A136S	26	31	69	0	0	31:69
10	PP4 L138F	50	55	44	0	1	55:45
11	PP4 C140A[d]	5	34	66	0	0	34:66
12	PP4 M142L	50	51	49	0	0	51:49

[a]Umsätze wurden mit chiraler GC gemessen.

[b]Diolverteilung und *dr* wurden mit HPLC gemessen.

[c]100 µg Protein verwendet.

[d]Proteinmenge nicht verlässlich aufgrund niedriger Proteinkonzentration und Inhomogenität der Probe.

na= nicht auswertbar aufgrund des geringen Umsatzes.

3.6.5 Einfluss von Fluor-substituierten Substraten auf die Stereospezifität der PPADH1 und PPADH4

Im vorherigen Kapitel bei der Untersuchung der Enantioselektivität hinsichtlich der Reduktion von Acetophenon und 2,2,2-Trifluoracetophenon konnte ein Einfluss der Trifluor-Gruppe im Acetophenon auf die Enantioselektivität beobachtet werden Dabei zeigte sich, dass bei Abwesenheit der Fluor-Gruppe, also bei der Reduktion von Acetophenon die PPADH1 hoch stereospezifisch ist und (*S*)-1-Phenylethanol mit >99 % *ee* gebildet wurde. Bei der PPADH4 lief diese Reduktion nicht hoch stereospezifisch ab, sodass der *ee*-Wert von (*S*)-1-Phenylethanol nur bei 68 % lag. Beim Austausch der CH_3-Gruppe zur CF_3-Gruppe konnte bei der Reduktion mit der PPADH1 der trifluorierte (*R*)-Alkohol nur mit einem *ee* von 31 % erhalten werden. Dieser gravierende Effekt der Fluor-Gruppe sollte näher untersucht werden. Hierfür wurden zusätzlich die Reduktionen von 2-Fluoracetophenon, 2,2-Difluoracetophenon und 2,2,2-Trifluoracetophenon mit der PPADH1 und PPADH4 in Anwesenheit eines Cofaktorregenerierungssystems (GDH und D-Glucose) durchgeführt und die Produkte mittels chiraler GC analysiert. Die Ergebnisse dieser Umsetzungen sind in Abbildung 37 zusammen mit den vorherigen Ergebnissen der Reduktion von Acetophenon und 2,2,2-Trifluoracetophenon graphisch dargestellt. Hierbei ist zu anzumerken, dass die CIP-Priorität der fluorierten Produkte bei der Reduktion der Acetophenon-Derivate aufgrund der Anwesenheit von Fluor sich ändert (*S*/*R* wird zu *R*/*S*), daher würde man die bevorzugte Bildung der (*R*)-Alkohole bei PPADH1 und PPADH4 erwarten. Bei der PPADH1 ist dies auch der Fall, jedoch ist erkennbar, dass mit zunehmender Anzahl an Fluor-Atomen im Substrat die Stereospezifität und somit die Präferenz für die Bildung des (*R*)-Enantiomeren stetig sinkt und sich Richtung (*S*)-Präferenz verschiebt: >99 % (0 Fluor) >94 % (1 Fluor) >73 % (2 Fluor) >31 % (3 Fluor). Bei der PPADH4 scheint die Anwesenheit von Fluor im Substrat einen noch größeren Effekt auf die Stereoselektivität auszuüben. Da die PPADH4 ebenfalls die Bildung des (*S*)-Enantiomeren von 1-Phenylethanol bevorzugt (68 % *ee*), würde man die Bildung des (*R*)-Alkohols aufgrund der geänderten CIP-Priorität erwarten. Dies triift jedoch nicht zu, da bereits beim monofluorierten Acetophenon eine Umkehrung der Präferenz erfolgte und der (*S*)-Alkohol mit einem *ee* von 34 % gebildet wurde. Zusätzlich konnte bei der PPADH4 hinsichtlich des *ee*-Wertes der fluorierten Produkte ein ähnlicher Effekt wie bei der PPADH1 beobachtet werden. Mit zunehmender Anzahl an Fluor-Atomen im Substrat erhöht sich die Stereospezifität der PPADH4 für die Bildung des (*S*)-Alkohols: 34 % (1 Fluor) < 59 % (2 Fluor) < 83 % (3 Fluor).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Effekt von Fluor-Atomen im Substrat auf die Stereospezifität der PPADH1 und PPADH4 nachgewiesen werden konnte. Hierbei könnten elektrostatische Wechselwirkungen der Fluor-Atome mit Aminosäuren im aktiven Zentrum zu einer Umorientierung des Substrates und somit zu einer Änderung der Stereospezifität führen.

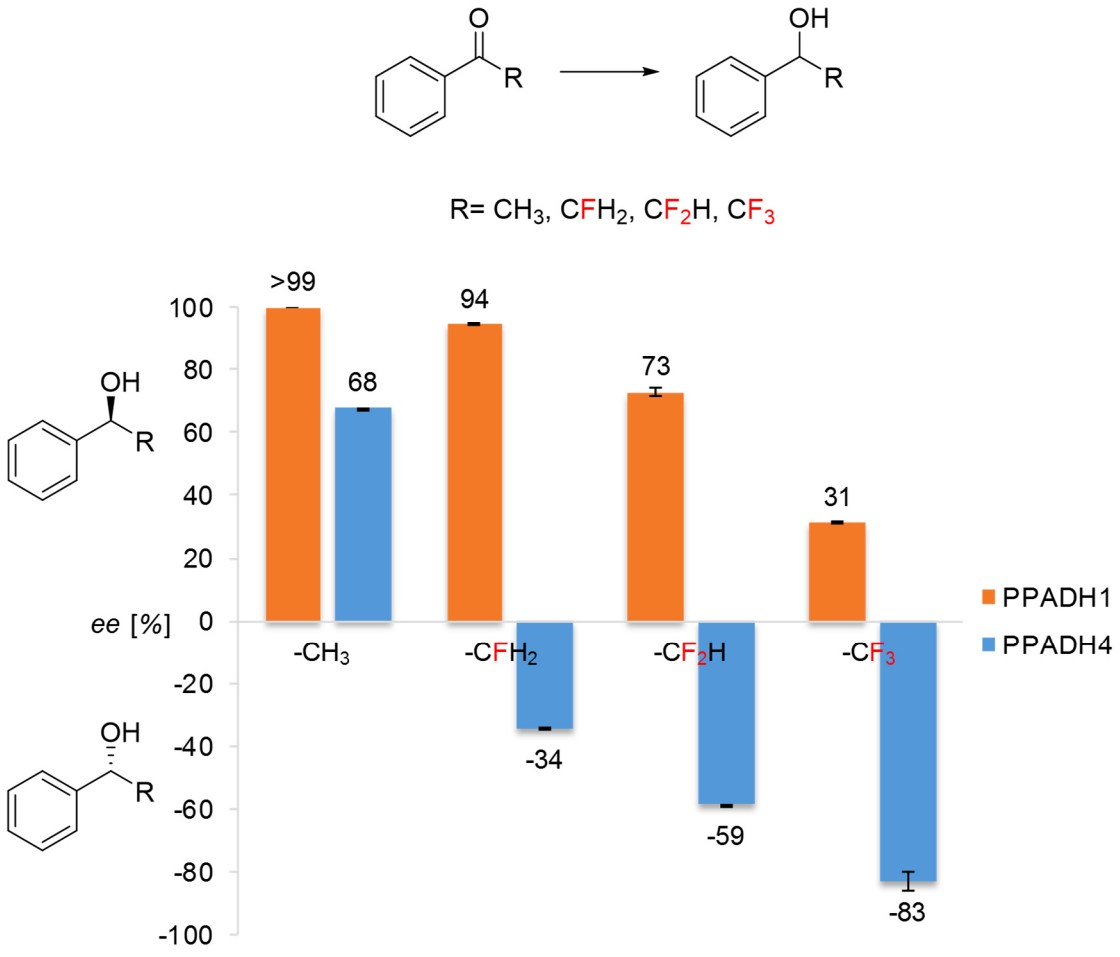


Abbildung 37: Einfluss von Fluor auf die Enantioselektivität der PPADH1 und PPADH4. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet: 20 mM Substrat (Acetophenon-Derivate), 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 5 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 21 h. Die *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt. Es wurden je zwei Umsetzungen pro Enzym und Substrat vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der *ee*-Werte von den Duplikaten mit Angabe der Standardabweichung.

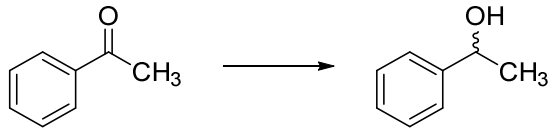
3.6.6 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH1 zur PPADH4

Anhand der zuvor erhaltenen Ergebnisse bezüglich der PPADH4-Mutanten, sollten nun im Umkehrschluss einige Aminosäurepositionen der PPADH1 (94, 96, 138 und 142) gegen Aminosäuren der PPADH4 und weitere ausgetauscht werden und damit die Diastereoselektivität der PPADH1 in Richtung PPADH4 verändert wird. Hierbei wurde wie zuvor mittels QuikChange® PCR und dem pET28a-*ppadh1*-Vektor als Template die verschiedenen Konstrukte erstellt und anschließend in *E. coli* BL21(DE3) für die anschließend Überexpression transformiert. Die Überexpression der Gene erfolgte hierbei unter äquivalenten Bedingungen wie bei den PPADH4-Varianten. Die anschließende Zellernte, Zellaufschluss und Reinigung der Mutanten erfolgte wie zuvor beschrieben. Die gereinigten Proteinvarianten wurden ebenfalls für die Reduktion von Acetophenon, 2,2,2-Trifluoracetophenon, 4-Phenyl-2-butanon und dem CF_3-Aldol untersucht und hinsichtlich Änderungen der Stereoselektivität analysiert. Für die Umsetzungen wurden standardgemäß GDH und D-Glucose für die Regenerierung des Cofaktors NADPH verwendet. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden je 50 µg gereinigtes Protein verwendet (wenn nicht anders angemerkt). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die zuvor beschriebenen Ergebnisse der wt-PPADH1 ebenfalls in den Tabellen der PPADH1-Mutanten aufgeführt (Eintrag 0).

A) Reduktion von Acetophenon zu 1-Phenylethanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM Acetophenon zu 1-Phenylethanol sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Wie bereits in einem vorherigen Kapitel beschrieben, zeigte die wildtypische PPADH1 eine hohe Enantiospezifität, wobei die getesteten Ketone zu den korrespondierenden (*S*)-Alkoholen reduziert wurden. Bei der Reduktion von Acetophenon durch die PPADH1 ist dies ebenfalls der Fall und es wird (*S*)-1-Phenylethanol mit einem *ee* >99 % gebildet. Die konstruierten PPADH1-Mutanten zeigten die gleiche exzellente Enantioselektivität mit >99 % *ee* für die Bildung von (*S*)-1-Phenylethanol mit Ausnahme der Mutante F94V. Diese zeigte einen reduzierten *ee*-Wert von 84 % für die Bildung von (*S*)-1-Phenylethanol (Tabelle 35, Eintrag 1). Auffällig hierbei war zudem der quantitative Umsatz, welcher bei der F94V-Mutante beobachtet wurde. Die anderen Mutanten hingegen wiesen Umsätze von 10 % - 53 % auf.

Tabelle 35: Reduktion von Acetophenon mit PPADH1-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM Acetophenon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 18 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



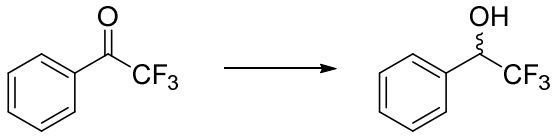
Acetophenon (*R*)- / (*S*)-1-Phenylethanol

Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* von (*S*)-1-Phenylethanol [%]
0	PPADH1	93	>99
1	PP1 F94V	>99	84
2	PP1 F96L	10	>99
3	PP1 F96W	42	>99
4	PP1 F138L	53	>99
5	PP1 L142A	10	>99
6	PP1 L142M	37	>99

B) Reduktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon zu 2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon zu 2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol sind in Tabelle 36 zusammengefasst. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der CF_3-Gruppe sich die CIP-Priorität bei den korrespondierenden Alkoholen ändert. Die Änderung des Restes am Acetophenon von $-CH_3$ auf $-CF_3$ führte zu einer starken Veränderung der Stereoselektivität bei der wildtypischen PPADH1. Bei den PPADH1-Mutanten konnten, mit Ausnahme der Mutanten F94V und L142A, nur moderate *ee*-Werte von 14 % bis 53 % für die Bildung des (*R*)-2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol erhalten werden (Tabelle 36, Eintrag 2-4, 6). Bei der wt-PPADH1 lag der erreichte *ee*-Wert bei 31 % (*R*). Bei der Position 96 scheint die Größe des Aminosäurerestes einen Einfluss auf den *ee*-Wert zu haben. Je größer die Aminosäure an dieser Position ist, desto höher ist der *ee*-Wert für die Bildung des (*R*)-Enantiomeren: F96L (14 %)< F96 (31 %)< F96W (56 %). Die einzigen Mutanten, welche das (*S*)-Enantiomer im Überschuss bildeten, waren die F94V- und die L142A-Mutanten mit 8 % und 19 % *ee* (*S*), sodass die (*R*)-Präferenz der wildtypischen PPADH1 umgekehrt wurde. Zusätzlich konnte bei der F94V-Mutante ein vollständiger Umsatz beobachtet werden (Tabelle 36, Eintrag 1).

Tabelle 36: Reduktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit PPADH1-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 18 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



2,2,2-Trifluoracetophenon (*R*)- / (*S*)-2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol

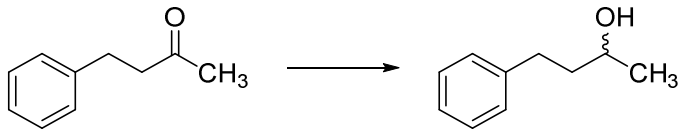
Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* [%] für (*R*)	*ee* [%] von (*S*)
0	PPADH1	62	31	
1	PP1 F94V	>99		8
2	PP1 F96L	40	14	
3	PP1 F96W	56	53	
4	PP1 F138L	29	45	
5	PP1 L142A	37		19
6	PP1 L142M	34	27	

C) Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon zu 4-Phenyl-2-butanol

Die Ergebnisse der Reduktion von 20 mM 4-Phenyl-2-butanon zu 4-Phenyl-2-butanol sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Hierbei konnte bei allen getesteten Varianten eine Enantiopräferenz für die Bildung des (*S*)-Alkohols beobachtet werden, wobei die Enantioselektivitäten meist im moderaten bis guten Bereich zwischen ca. 73-94 % *ee* lagen. Die wt-PPADH1 wies einen *ee*-Wert von 69 % (*S*) auf im Vergleich dazu konnte bei der F94V-Mutante nur ein *ee* von 6 % erreicht werden (Tabelle 37, Eintrag 1). Die F94V-Mutante weist somit nur eine geringfügige Präferenz für die Bildung des (*S*)-Alkohols auf. Bei der F138L-Mutanten scheint sich ebenfalls die (*S*)-Präferenz im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zu vermindern auf einen *ee* von 27 %, wobei ein geringer Umsatz beobachtet wurde (Tabelle 37, Eintrag 4). Einen guten Umsatz und einen guten *ee*-Wert von 94 % konnte bei der L142A-Mutanten festgestellt werden. Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Aminosäureaustausche der Positionen 94 und 142 von einer größeren Aminosäure (Phenylalanin und Leucin) zu kleineren Aminosäuren (Valin und Alanin) einmal zur Verminderung (F94V) und einmal zu Erhöhung (L142A) des *ee*-Wertes im Vergleich zur wildtypischen PPADH1 führen. In Hinblick auf die Umsätze fällt auf, dass es große Variationsbreiten bezüglich der Aktivitäten der einzelnen Mutanten gibt. Hierbei fallen im positiven Sinn besonders die F94V- und die L142A-Mutanten auf, die einen Umsatz

>90 % erreichen konnten (Tabelle 37, Eintrag 1 und 5). Offensichtlich werden durch diese Austausche die Aktivitäten für dieses Substrat stark erhöht. Die Einzelmutanten F96W und L142M zeigen ähnliche Umsätze wie die wt-PPADH1, hingegen die Mutanten F96L und F138L geringere Umsätze als die wt-PPADH1 erreichten. Diese Variationen in den erreichten Umsätzen könnten auf Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten der Mutanten hindeuten, da im SDS-Gel die Proteinbanden der Einzelmutanten vergleichbare Intensitäten aufwiesen. Die Bereiche 94-96 sowie 136-142 scheinen nicht nur die Stereoselektivität, sondern auch die Aktivität der Enzyme zu beeinflussen.

Tabelle 37: Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon mit PPADH1-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM 4-Phenyl-2-butanon, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 18 h. Umsätze und *ee*-Werte wurden mit chiraler GC bestimmt.



4-Phenyl-2-butanon (*R*)- / (*S*)-4-Phenyl-2-butanol

Eintrag	Variante	Umsatz [%]	*ee* [%] von (*S*)
0	PPADH1	28	69
1	PP1 F94V	93	6
2	PP1 F96L	9	77
3	PP1 F96W	27	80
4	PP1 F138L	9	27
5	PP1 L142A	94	94
6	PP1 L142M	35	63

D) Reduktion des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols)

Mit Hilfe der Erkenntnisse, welche mit den PPADH4-Mutanten gewonnen werden konnten, sollten diese nun auf die PPADH1 übertragen werden, um den Einfluss von Substituenten auf die Diastereoselektivität zu untersuchen. Die PPADH1 bevorzugt bei der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols die Bildung des (*S*,*S*)-Diols, wobei mit längerer Reaktionszeit auch in geringem Maße das (*R*,*S*)-Diol gebildet werden kann. Die Ergebnisse der Reduktion des CF_3-Aldols mit den PPADH1-Mutanten sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Bei nahezu allen Mutanten konnte ein Umsatz von 47 % bis 52 % erreicht werden, wobei das (*S*)-Enantiomer bevorzugt zum (*S*,*S*)-Diol reduziert wurde. Wie auch bei der wt-PPADH1 beobachtet, konnte zusätzlich auch eine Bildung des (*R*,*S*)-Diols nachgewiesen werden. Auffällige Ergebnisse konnten nur bei der

F94V-Variante beobachtet werden, welche als einzige die Bildung des (*S*,*R*)-Diols zeigte mit einem *dr*-Wert von 82:18 (*syn*:*anti*). Dieser Aminosäureaustausch an Position 94 von Phenylalanin zu Valin resultierte in einer vermehrten Bildung des *anti*-Diastereomeren (*S*,*R*)-Diols. Es kann angenommen werden, dass durch den Austausch der großen Aminosäure an Position 94 gegen eine kleinere Aminosäure die Orientierung des Substrates in der Substratbindestelle beeinflusst und dadurch die Stereoselektivität des Enzyms verändert wird.

Tabelle 38: Reduktion des racemischen CF_3-Aldols mit PPADH1-Mutanten. Folgender Ansatz wurde verwendet: 40 mM *rac*-CF_3-Aldol, 150 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 3 U GDH (Rohextrakt), 50 µg gereinigtes Protein auf 1 mL 0,5 M KPi-Puffer pH 7 bei 25 °C, t= 18 h.

Eintrag	Variante	Umsatz [%][a]	Diolverteilung [%][b]				*dr* (*syn*:*anti*)
			(*S*,*S*)	(*S*,*R*)	(*R*,*R*)	(*R*,*S*)	
0	PPADH1[c]	52	96	0	0	4	96:4
1	PP1 F94V	52	82	15	0	3	82:18
2	PP1 F96L	50	>99	0	0	0	>99:0
3	PP1 F96W	50	99	0	0	1	99:1
4	PP1 F138L	47	>99	0	0	0	>99:0
5	PP1 L142A	47	>99	0	0	0	>99:0
6	PP1 L142M	50	99	0	0	1	99:1

[a]Umsätze wurden mit chiraler GC gemessen.
[b]Diolverteilung und *dr* wurden mit HPLC gemessen.
[c]100 µg Protein verwendet

Zusammenfassend konnten durch den Sequenzvergleich der PPADH1 und PPADH4 zwei wichtige Regionen (94-96 und 136-142) nahe dem aktiven Zentrum identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Stereoselektivität der Enzyme ausüben. Daraufhin wurden Mehrfach- und Einzelmutanten der PPADH4 erstellt, wobei in beiden Fällen Aminosäure-Sequenzen aus der PPADH1 eingebracht wurden. Im Falle der Mehrfach-Mutanten konnte die Stereoselektivität der PPADH4 in die der PPADH1 verändert werden, wobei insbesondere die Position 94 eine wichtige Rolle zu haben scheint. Um die Ergebnisse der PPADH4-Mutanten auf die PPADH1 zu übertragen, wurde der Ansatz umgedreht und einige Aminosäuren der PPADH1 zu denen der PPADH4 geändert. Hierbei zeigte sich wieder, dass Änderungen der Aminosäure der Position 94 die Stereoselektivität verändert. Zusätzlich zeigte sich, dass diese Position ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität (Umsatz) zu haben scheint, da die PPADH4 V94F-Mutante geringe Umsätze mit den vier verschiedenen Substraten zeigte im Vergleich zur PPADH1 F94V-Mutante, welche quantitative Umsätze erreichte. Dies könnte auch eventuell an der geringen Proteinkonzentration der PPADH4-Mutanten liegen.

3.6.7 Bestimmung der kinetischen Parameter von PPADH4 und der PPADH4-Mutanten

In den vorherigen Kapiteln konnten Unterschiede hinsichtlich der Expression, der Aktivität und der Stereoselektivität zwischen PPADH1 und PPADH4 festgestellt werden, obwohl sie eine Sequenzähnlichkeit von 90,4 % auf Aminosäureebene aufweisen. Daraufhin sollte überprüft werden, ob die PPADH1, PPADH4 und die PPADH4-Mutanten (Dreifach- (94-96), Vierfach-(136-142) sowie Siebenfach-Mutante (94-96 und 136-142)) sich auch hinsichtlich kinetischer Parameter unterscheiden. Hierfür wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration gegenüber dem *rac*-CF_3-Aldol und dem Cofaktor NADPH (nur bei wt-PPADH4) sowie Benzaldehyd gemessen und mit den kinetischen Daten der PPADH1 (Kapitel 3.5.6) verglichen. In Abbildung 38 sind die Michaelis-Menten Kinetiken der wt-PPADH4 für das racemischen CF_3-Aldol und den Cofaktor NADPH gezeigt. Es ist erkennbar, dass im Falle des CF_3-Aldols eine Substratüberschussinhibierung vorliegt und ab einer Konzentration von ca. 3 mM die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit stetig sinkt (Abbildung 38A). Die Kinetik für den Cofaktor NADPH hingegen folgt dem typischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Auftragung (Abbildung 38B). Eine Übersicht der ermittelten kinetischen Daten der wildtypischen PPADH4 ist in Tabelle 39 dargestellt. Der K_M-Wert mit dem racemischen CF_3-Aldol liegt bei 0,66 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei 8,5 U mg^{-1}. Aufgrund der Substratüberschussinhibierung liegt der K_i-Wert bei 14,7 mM. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) beträgt 8,95 s^{-1} mM^{-1}. Hierbei muss zusätzlich beachtet werden, dass das racemische Gemisch des CF_3-Aldols für die Kinetik-Messung verwendet wurde. Da die PPADH4 wie die PPADH1 auch hoch enantioselektiv gegenüber der Reduktion des (*S*)-Enantiomers des CF_3-Aldol ist, müsste der entsprechende K_M-Wert von 0,66 mM auf 0,33 mM halbiert werden und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) sich damit verdoppeln. Zusätzlich wurden die apparenten Werte berechnet aufgrund der sehr ausgeprägten Substratüberschussinhibierung (Tabelle 39, Eintrag A1).

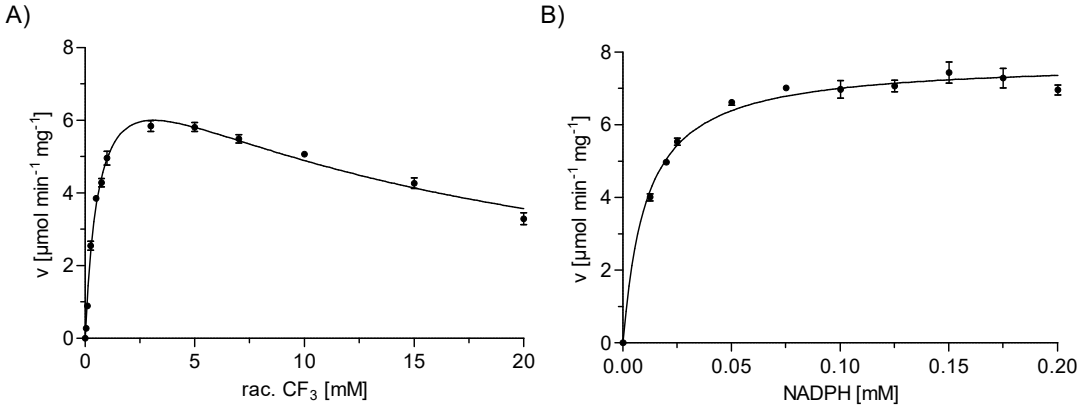


Abbildung 38: Michaelis-Menten Kinetiken der PPADH4 für die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols (A) und des Cofaktors NADPH (B). Die Substratkonzentrationen wurde jeweils variiert, wobei der verwendete Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7) und die Cofaktorkonzentration (0,2 mM NADPH) gleich gehalten wurde (A). Die Michaelis-Menten Kinetik des Cofaktors NADPH (B) wurde mit 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7 vermessen, wobei die Konzentration von NADPH variiert wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Für die Bestimmung der apparenten kinetischen Parameter wurden nur die Messdaten bis zur maximal erreichten Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (hier bis 3 mM) in Betracht gezogen. Der apparente K_M-Wert mit dem racemischen CF_3-Aldol liegt bei 0,46 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei 6,9 U mg^{-1}. Die apparente katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) steigt von 8,95 s^{-1} mM^{-1} auf 10,48 s^{-1} mM^{-1}. Beim Cofaktor NADPH wurde ein K_M-Wert von 0,011 mM und V_{max}-Wert von 7,8 U mg^{-1} ermittelt. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) liegt bei etwa 500 s^{-1} mM^{-1}.

Tabelle 39: Übersicht der kinetischen Parameter der wildtypischen PPADH4 für die Reduktion des racemischen CF_3-Aldols (A) und des Cofaktors NADPH (B). Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde Tris-HCl Puffer (0,1 M, pH 7) und 0,2 mM NADPH und für den Cofaktor (B) wurde 20 mM Benzaldehyd in 0,1 M Tris-HCl pH 7 verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Eintrag	Substrat/Cofaktor	K_M [mM]	K_i [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [s^{-1} mM^{-1}]
A	CF_3-Aldol[a]	0,66	14,7	8,5	5,9	8,95
A1	CF_3-Aldol-apparent	0,46	/	6,9	4,8	10,48
B	NADPH	0,01	/	7,8	5,3	500,74

[a]Racemat wurde verwendet.

Daraufhin wurden die kinetischen Parameter der wt-PPADH4 und der Mehrfach-Mutanten (3x, 4x, 7x) für die Reduktion des Substrates Benzaldehyd bestimmt und verglichen. Die Kurvenverläufe der gemessenen Kinetiken sind in Abbildung 39 dargestellt. Dabei zeigen die wildtypische PPADH4 und auch die Dreifach-Mutante (3x, 94-96) erneut einen Kurvenverlauf einer Substratüberschussinhibierung (Abbildung 39, A-B), während im Gegensatz dazu die Vierfach-Mutante (4x, 136-142) sowie Siebenfach-Mutante (7x, 94-96 & 136-142) dem Kurvenverlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Abbildung 39, C-D). Dadurch kann angenommen werden, dass die Aminosäureaustausche der Region 136-142 anscheinend zur Eliminierung der Substratüberschussinhibierung, welche sowohl bei der wildtypischen PPADH4 als auch bei der Dreifach-Mutante beobachtet wurde, beitragen.

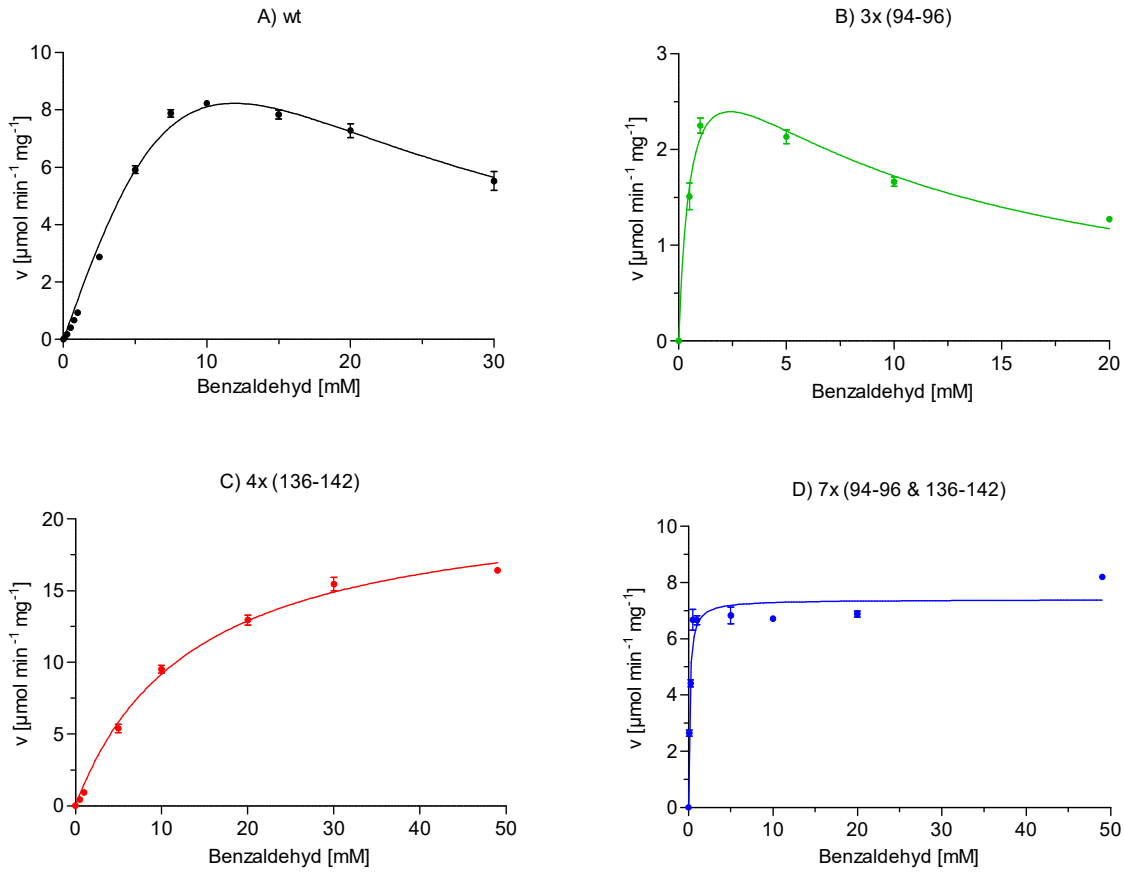


Abbildung 39: Kurvenverläufe der Kinetiken der wildtypischen PPADH4 (A) und der Mehrfach-Mutanten (B-D) für die Reduktion von Benzaldehyd. Die Substratkonzentration wurde variiert, wobei der verwendete Puffer (0,1 M Tris HCl pH 7) und die Cofaktorkonzentration (0,2 mM NADPH) gleich gehalten wurden. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Eine Übersicht der kinetischen Parameter ist in Tabelle 40 dargestellt. Im Fall der wt-PPADH4 konnte mit der verwendeten Software keine eindeutige Auswertung der Parameter erfolgen. Anhand des Kurvenverlaufs der wildtypischen PPADH4 ist ersichtlich, dass dieser bei niedriger Substratkonzentration bis ca. 10 mM einen leicht sigmoidalen Verlauf zeigt, anschließend zeigt er den typischen Verlauf einer Substratüberschussinhibierung (Abbildung 39A). Aus diesem Grund wurden die apparenten kinetischen Parameter für die wildtypische PPADH4 für Benzaldehyd bestimmt. Der apparente K_M-Wert liegt bei ca. 15 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei ca. 22 U mg^{-1}.

Tabelle 40: Übersicht der kinetischen Parameter der wildtypischen PPADH4 und der PPADH4-Mutanten für die Reduktion von Benzaldehyd. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde Tris-HCl Puffer (0,1 M, pH 7) und 0,2 mM NADPH verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Model: nicht-lineare Regression) ausgewertet.

Eintrag	Enzym/Variante	K_M [mM]	K_i [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [s^{-1} mM^{-1}]
A	PPADH4			na		
A1	PPADH4-apparent	14,99	/	21,9	15,0	1,00
B	3x (94-96)[a]	0,57	10,05	3,5	2,4	4,27
B1	3x (94-96)-apparent	0,96	/	4,4	3,0	3,17
C	4x (136-142)	13,53	/	21,6	14,9	1,10
D	7x (94-96 & 136-142)	0,14	/	7,4	5,1	35,64

na= mit Software nicht auswertbar.
[a]Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration und der Inhomogenität der Probe, könnten die Werte nicht verlässlich sein.

Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) beträgt nur 1 s^{-1} mM^{-1} (Tabelle 40, Eintrag A1). Wie zuvor beschrieben, zeigte die Dreifach-Mutante der PPADH4 (3x, 94-96) eine stark ausgeprägte Substratüberschussinhibierung, sodass ein K_i-Wert von 10,05 mM ermittelt wurde. Der K_M-Wert liegt bei 0,57 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei 3,5 U mg^{-1}. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) beträgt nur 4,27 s^{-1} mM^{-1} (Tabelle 40, Eintrag B). Bei der Ermittlung der apparenten kinetischen Parameter konnte ein K_M-Wert von 0,96 mM und V_{max} von 4,4 U mg^{-1} ermittelt werden. Die apparente katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) beträgt 3,17 1 s^{-1} mM^{-1} (Tabelle 40, Eintrag B1). Im Vergleich der apparenten Werte der wildtypischen PPADH4 und der Dreifach-Mutanten wird deutlich, dass zum einen durch die Aminosäureaustausche im Bereich 94-96 der PPADH4 der K_M-Wert um ein 15-faches und zum anderen V_{max} um ein 5-faches reduziert wurden. Aufgrund der zuvor beschriebenen schlechten Expression und Reinigung der

Dreifach-Mutante konnten die Proteinkonzentration und damit der V_{max}-Wert in Einzelfällen nicht zuverlässig bestimmt werden. Neben dem V_{max}-Wert werden auch die abgeleiteten Größen k_{cat} und k_{cat}/K_M davon beeinflusst. Durch die dreifachen Austausche an den Positionen 94-96 konnte die Substratüberschussinhibition nicht eliminiert werden, allerdings zeigte die Vierfach-Mutante (4x, 136-142) keine Substratüberschussinhibierung mehr und es wurde eine typische Michaelis-Menten Kinetik beobachtet. Auffällig hierbei war, dass die kinetischen Parameter der Vierfach-Mutanten denen der wt-PPADH4 (apparente Werte) in hohem Maße glichen (Tabelle 40, Eintrag A1 und C). Dieses Ergebnis unterstreicht die anfängliche Hypothese, dass die Aminosäureaustausche in der Region 136-142 zur Eliminierung der Substratüberschussinhibierung bei der wt-PPADH4 führt. Hinsichtlich der Siebenfach-Mutante (7x, 94-96 und 136-142) wurde der kleinste K_M-Wert von 0,14 mM und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) von 7,4 U mg^{-1} ermittelt. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) beträgt 35,64 s^{-1} mM^{-1} und ist im Vergleich zu allen anderen Varianten um ein Vielfaches höher (Tabelle 40, Eintrag D). Wie bei der Vierfach-Mutante, konnte bei der Siebenfach-Mutante keine Substratüberschussinhibierung beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die verschiedenen PPADH4-Varianten in den kinetischen Parametern deutlich unterscheiden. Während bei der wt-PPADH4 und der Dreifach-Mutante eine Substratüberschussinhibierung beobachtet wurde, folgten die Kurvenverläufe der Kinetiken von Vierfach- und Siebenfach-Mutanten einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik. Dabei scheint insbesondere die Region 136-142 der PPADH4 für die Substratüberschussinhibierung eine wichtige Rolle einzunehmen, da es mit dem Einbringen von Aminosäure-Motiven aus der PPADH1 an diesen Positionen zur Eliminierung der Substratüberschussinhibition kommt. Die Austausche in der Region 94-96 scheinen eher die Substrataffinität (K_M-Wert) zu beeinflussen.

3.7 Kristallstrukturanalyse der PPADH1 aus *P. pastoris* GS115

Die Kristallisation sowie die Strukturaufklärung und -interpretation der PPADH1 aus *P. pastoris* sowie der Mutanten erfolgten beim Kooperationspartner (AK Prof. K. Niefind, Institut für Biochemie, Universität zu Köln), wobei die Arbeiten von Dipl. Biol. Dipl. Phys. Christine Tölzer durchgeführt wurden. Die Betrachtung der Strukturen in dieser Arbeit ist vorläufig und eine ausführlichere Behandlung wird in Kürze in der Doktorarbeit von Dipl. Biol. Dipl. Phys. Christine Tölzer erfolgen.

Die PPADH1 aus *P. pastoris* wurde im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, welcher zuvor mit dem Gen kodierend für die PPADH1 im pET28a-Vektor transformiert wurde. Der zellfreie Rohextrakt wurde nach Aufschluss mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation erhalten. Nach einer anschließenden Ni-NTA-Reinigung konnte die gereinigte PPADH1 mit einer Proteinkonzentration von ca. 10 mg mL^{-1} nach Aufkonzentrieren auf ca. 5 mL erhalten werden. Ein Teil der Proteinlösung wurde anschließend über eine präparative Größenausschlusschromatographie (Säule: Superdex 75) in 100 mM Tris-HCl-Puffer mit 100 mM NaCl gelfiltriert. Anhand des Elutionsprofils der Größenausschlusschromatographie wurde angenommen, dass die PPADH1 als ein Homodimer in Lösung vorliegt. Für das *Screening* wurden unterschiedlichste Kristallisationsbedingungen ausgetestet, wobei hauptsächlich die 96-well Mikrotiterplatten (JCSG Core) von QIAGEN verwendet wurden. Hierbei wurde die *sitting-drop* Variante der Dampfdiffusionsmethode angewendet. Bereits nach kurzer Zeit konnte in einigen Kristallisationsbedingungen das Wachstum von Kristallen unter dem Mikroskop beobachtet werden, sodass im Anschluss der ersten *Screening*-Runde Optimierungsansätze im 24-well-Format angelegt wurden und die besten Kristalle mit HEPES-Puffer (100 mM, pH 7-7,5), PEG4000 (20-25 % w/v) und Isopropanol (5-10 % v/v) erhalten wurden. In Abbildung 40 sind Kristalle unter mikroskopischer Auflösung gezeigt, welche unter den JCSG-Bedingungen als auch unter optimierten Bedingungen gewachsen sind.

Hierbei konnten Kristalle mit einer Raumgruppe P 21 21 21 erhalten werden, welche bis zu einer Auflösung von 1,9 Å streuten. Die Struktur der PPADH1 wurde mit Hilfe des molekularen Ersatzes der Dimerstruktur von Gre2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4PVC, 41 % Sequenzähnlichkeit mit PPADH1) als Model gelöst und anschließend mit Hilfe der „Phenix Software Suite“ verfeinert und mit „COOT“ manuell modelliert (Christine, Tölzer, persönliche Mitteilung). Die Darstellung der Strukturen und die Generierung der nachfolgenden Bilder erfolgten mit Hilfe der Software „PyMOL“.[199]

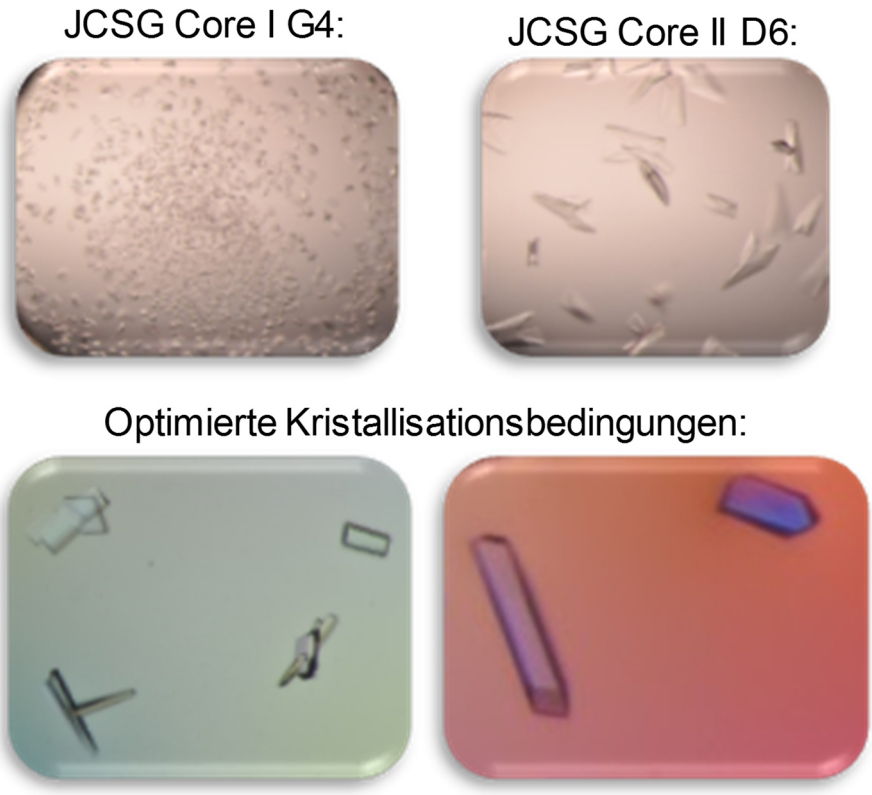


Abbildung 40: PPADH1-Kristalle des Apoenzyms in unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen (JCSG Core I-II) sowie in Anwesenheit von Substraten (CF_3-Aldol, NADP(H)) unter optimierten Kristallisationsbedingungen (Christine Tölzer, persönliche Mitteilung).

3.7.1 Die Gesamtstruktur

Die PPADH1 besteht aus zwei Monomeren A und B in der asymmetrischen Einheit (Abbildung 41). Das Monomer A der PPADH1 bildet eine Kontaktfläche von 1456 $Å^2$ mit der Untereinheit B, welches mit Hilfe der Software PISA berechnet wurde.[200] Jedes dieser Monomere besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen Cofaktor-Bindungsdomäne und einer C-terminalen Substrat-Bindungsdomäne (Abbildung 42). Die Cofaktor-Bindungsdomäne weist den klassischen „*Rossmann fold*“ auf, welcher aus einem zentralen β-Faltblatt besteht, das wiederum aus sieben β-Strängen (β1-β7) aufgebaut ist: β1 (Rest 4-8), β2 (28-33), β3 (60-85), β4 (86-89), β5 (131-135), β6 (199-204) und β7 (274-277). Dieses β-Faltblatt wird von sieben α-Helices umschlossen: α1 (13-25), α2 (36-49), α3 (73-80), α4 (102-124), α5 (172-194), α7 (255-267) und α10 (325-331). Die Substrat-Bindungsdomäne umfasst vier α-Helices (α6, α8-α9, α11) und einem verdrehten β-Faltblatt, bestehend aus den drei β-Strängen β1‘, β2‘ und β3‘ (Abbildung 42).

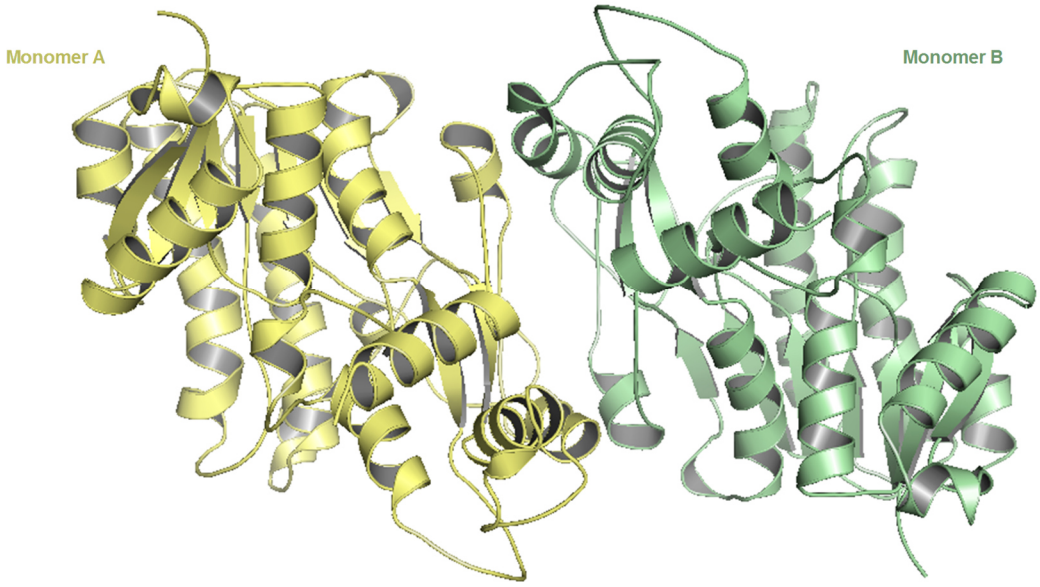


Abbildung 41: Dimerstruktur der PPADH. Das Dimer setzt sich aus zwei gleichen Monomeruntereinheiten A und B zusammen. Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

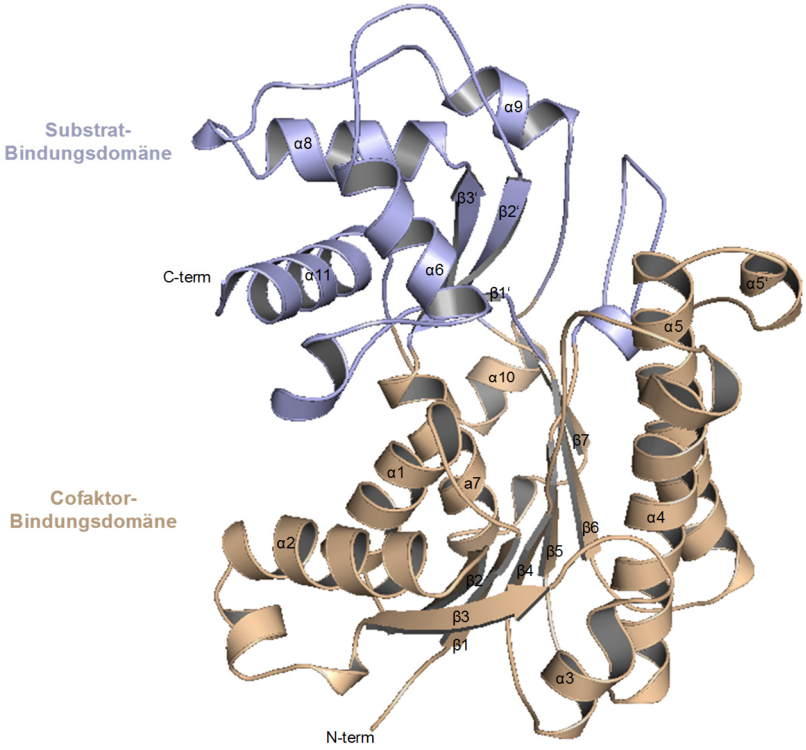


Abbildung 42: Ein Monomer der PPADH1 besteht aus zwei Domänen: einer Cofaktor-Bindungsdomäne mit „*Rossmann fold*“ (hellbraun) und einer Substrat-Bindungsdomäne (lila). Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

Um nähere Erkenntnisse bezüglich der Bindung des Cofaktors (NADP(H)) als auch des Substrats (CF_3-Aldol) zu erhalten, wurden unter anderem PPADH1-Mutanten konstruiert, welche katalytisch inaktiv waren (S137A; Y176F; Y176A; K180L; <0,2 U mg^{-1}). Die inaktiven Mutanten wurden wie die wt-PPADH1 im 1 L-Maßstab exprimiert und die Proteine mittels Ni-NTA und einer anschließenden Gelfiltration gereinigt. Zudem konnten Kristalle der PPADH4 erhalten werden, die jedoch verzwillingt waren. Eine Übersicht über die erhaltenen Datensätze ist in Tabelle 41 zusammengefasst.

Tabelle 41: Übersicht über die erhaltenen Datensätze aus den Proteinkristallisationen.

Varianten	Liganden	PDB-ID
PPADH1 wt	-	[a]
PPADH1 S136A	$NADP^+$	[a]
PPADH1 Y176F	$NADP^+$, CF_3-Aldol	5M3P
PPADH1 K200L	-	[a]
PPADH1 F94V+Y176F	$NADP^+$	[a]
PPADH4 wt	$NADP^+$	[a]

[a]Eintragung in die PDB-Datenbank erfolgt in Kürze [persönliche Mitteilung, Christine Tölzer].

3.7.2 Die Cofaktorbindestelle

Zu Beginn wurde versucht die wt-PPADH1 mit dem Cofaktor NADPH zu co-kristallisieren, jedoch wurde in den erhaltenen Datensätzen keine Dichte für einen gebundenen Cofaktor beobachtet. Daraufhin wurden die katalytisch-inaktiven Mutanten in Gegenwart von Cofaktor (hauptsächlich in oxidierter Form ($NADP^+$)) als auch Substrat (CF_3-Aldol) kristallisiert. Es wurden mehrere Datensätze von Kristallen erhalten, die eine eindeutige Elektronendichte für den gebundenen Cofaktor zeigten unter anderem die S137A-Mutante als auch die Y176F-Mutante. Des Weiteren konnten Strukturen eines ternären Komplexes der PPADH1-Y176F mit gebundenem Cofaktor $NADP^+$ als auch dem Substrat ((*S*)-CF_3-Aldol) bis zu einer Auflösung von 1,79 Å gelöst werden. Aufgrund der hochaufgelösten Datensätze war es möglich die Position einzelner Atome innerhalb der Elektronendichte gut zu bestimmen und zu definieren, sodass ein plausibles Strukturmodell erstellt werden konnte (Christine Tölzer, persönliche Mitteilung). Anhand dieser Struktur wird die Cofaktor- und die Substratbindung näher erläutert. Der Cofaktor liegt in einer Spalte zwischen der C- und der N-terminalen Bindungsdomäne und interagiert mit Aminosäureresten beider Domänen. Der Adenin-Ring des Nicotinamid-Cofaktors wird hierbei hauptsächlich von den Resten Arg34, Asp67, Ile68 sowie den beiden Resten Thr90 und Ser102 umschlossen (Abbildung 43).

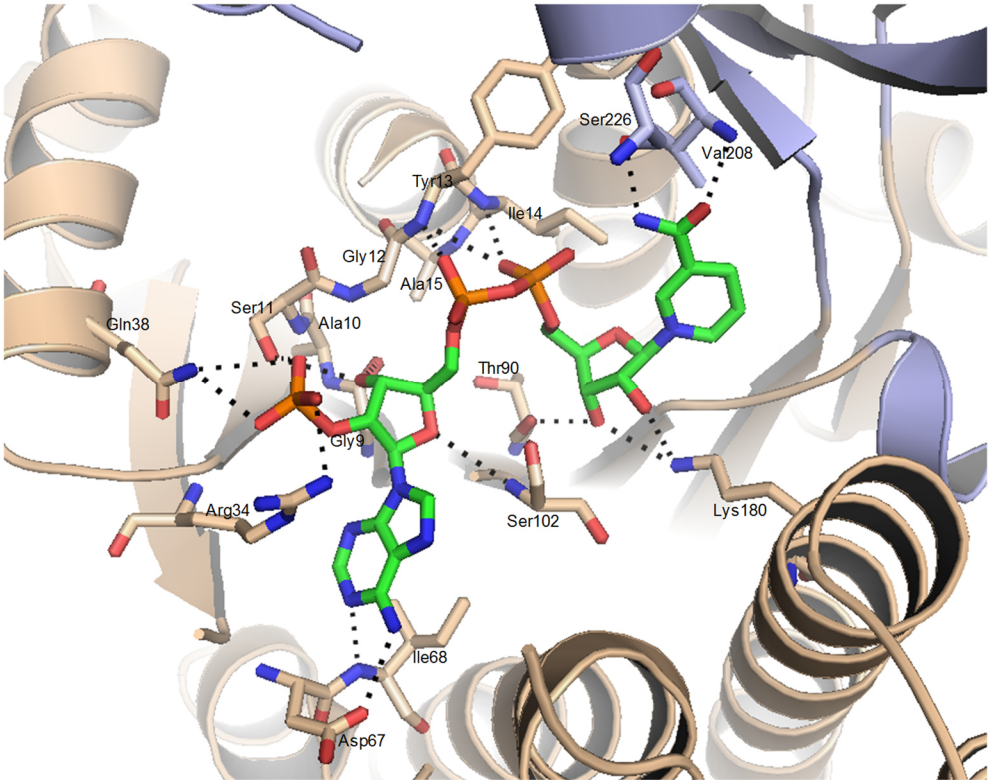


Abbildung 43: Y176F-Mutante mit polaren Kontakten (gestrichelte schwarze Linien) zum gebundenen Cofaktor $NADP^+$. Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

Die Aminogruppe des Adenin-Rings wird dabei von Asp67 durch eine H-Brücke gebunden. Die Aminosäurereste Gly9-Ala15 des Dinukleotid-Bindungsmotifs interagieren hauptsächlich mit dem Riboseteil des Adenosins sowie mit dem Diphosphat *via* fünf H-Brücken-Bindungen. Die Phosphat-Gruppe an Position C2‘ des Adeninribose-Rings wird durch die H-Brücken zu den Aminosäureresten Ser11, Arg34 und Gln38 gebunden und erklärt die starke Präferenz des phosphorylierten Cofaktors NADPH gegenüber NADH (Abbildung 44). Die Diphosphat-Gruppe des Nicotinamid-Cofaktors wird durch H-Brücken zu den Aminosäureresten Tyr13 sowie Ile14 stabilisiert (Abbildung 43). Die beiden Hydroxyl-Gruppen der Nicotinamid-Ribose werden durch H-Brückenbindungen zu den Aminosäuren Thr90 und Lys180 gebunden. Die Stabilisierung des Nicotinamids erfolgt ebenfalls durch zwei H-Brücken-Bindungen, wobei die Carboxyl-Funktion des Nicotinamids eine H-Brücke zu Ser226 und die sekundäre Amino-Gruppe eine H-Brücke zu Val208 bildet. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Anissa Ouald Chaib wurden Mutageneseexperimente zur Änderung der Cofaktorpräferenz von NADPH zu NADH durchgeführt. Hierbei wurden die PPADH1-Einzelmutanten S11D, E, N, H, K, L, V, W, R34D, E, F, Q38D, E, V33D, E und D99E konstruiert. Bei den Mutanten S11D und S11E konnte eine höhere Affinität zum

Cofaktor NADH als zum Cofaktor NADPH erreicht werden jedoch mit dramatischen Aktivitätseinbußen im Vergleich zur wildtypischen PPADH1. Zusätzlich konnte die Wichtigkeit der Position 34 für die Cofaktor-Bindung gezeigt werden, da die Mutanten R34D, R34E und R34F alle nahezu inaktiv waren.[198]

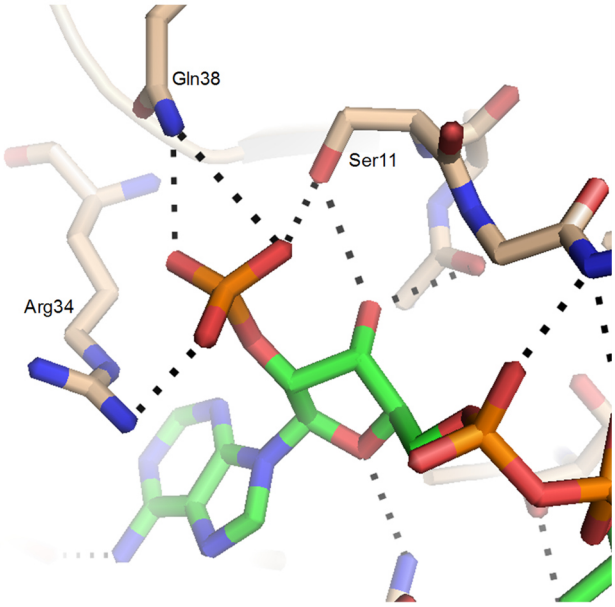


Abbildung 44: Bindung des 2'-Phosphats des $NADP^+$-Cofaktors in der PPADH1 Y176F-Mutante. Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

3.7.3 Die Substratbindestelle

Das aktive Zentrum der PPADH1 (Y176F) ist ein hydrophober Substrattunnel (Abbildung 45), welcher sich über das zentrale β-Faltblatt der *Rossmann*-Falte erstreckt.

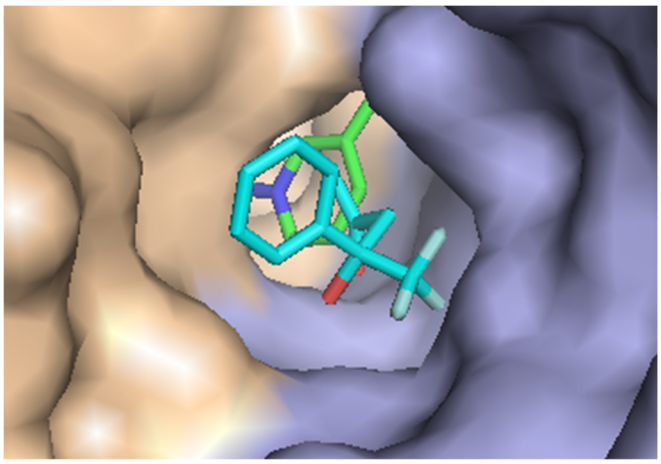


Abbildung 45: Substrattunnel der PPADH1-Y176F-Mutante mit Substrat ((*S*)-CF_3-Aldol; türkis) und Cofaktor $NADP^+$ (grün). Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

Überwiegend wird der Tunnel durch hydrophobe und aromatische Aminosäurereste (Phe94, Phe96, Phe138, Leu142, Tyr176Phe, Ile177, Tyr207 und Leu251) geformt (Abbildung 46). Die CF_3-Gruppe des Substrats ((*S*)-CF_3-Aldol) ist dabei räumlich von den Aminosäureresten Tyr207 sowie Asn250 umgeben. Die hydrophilen Seitenketten der Aminosäuren Lys180, Ser136 und Ser137 bilden dabei den Boden der Substratbindetasche. Es wird angenommen, dass die Aminosäuren Ser_{137}-Tyr_{176}-Lys_{180} die katalytische Triade in der PPADH1 darstellen, da diese Aminosäuren hochkonserviert in der Familie der Short-Chain-Dehydrogenasen/-Reduktasen sind.[201] Um diese Hypothese zu stützen, wurden mittels QuikChange® PCR verschiedene Mutanten konstruiert und hinsichtlich der Reduktionsaktivität getestet. Die Mutanten S137A, Y176A, Y176F sowie K180L zeigten keinerlei Aktivitäten bezüglich der Reduktion des Standardsubstrats Benzaldehyd sowie dem CF_3-Aldol, sodass die Positionen S137, Y176 und K180 eine wichtige Rolle im Katalysemechanismus einnehmen.

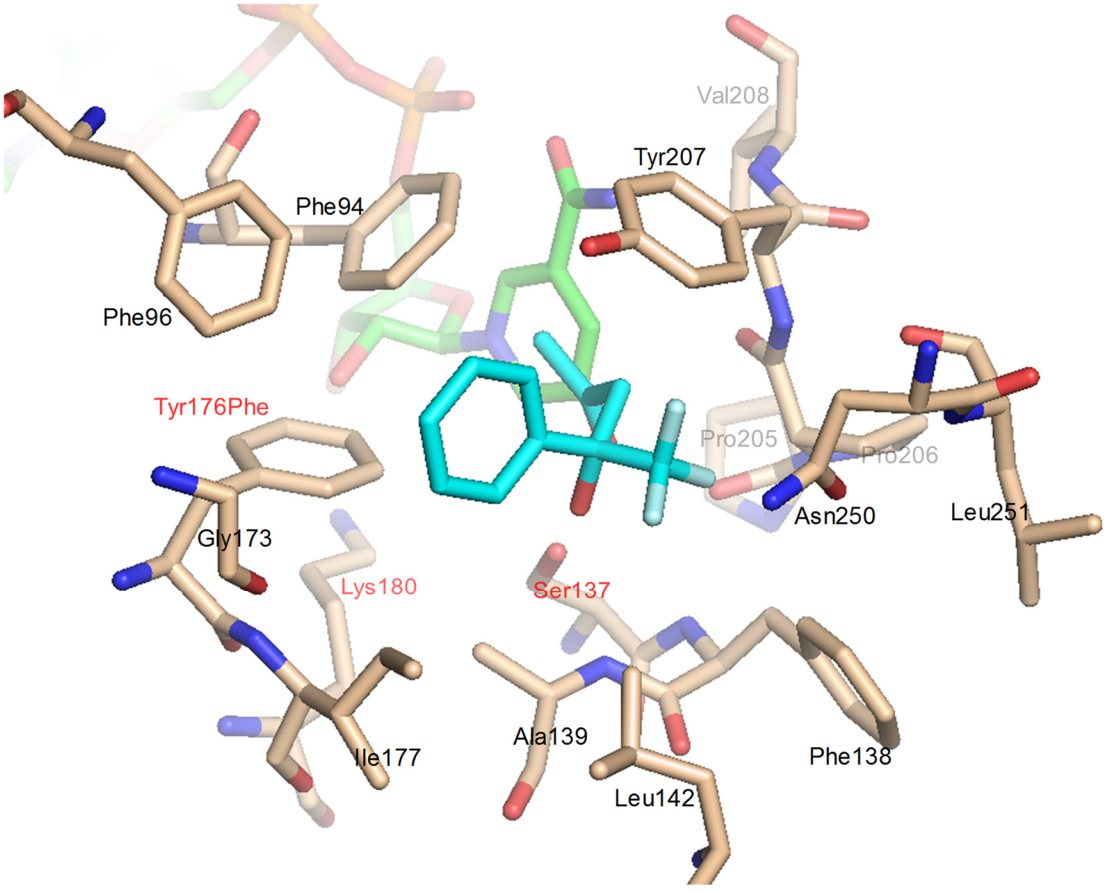


Abbildung 46: Aktives Zentrum mit überwiegend hydrophoben und aromatischen Aminosäuren, die den Substrattunnel in der PPADH1 Y176F-Mutante bilden. CF_3-Aldol (türkis); Cofaktor $NADP^+$ (grün). Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

Nach JÖRNVALL *et al*. stabilisiert das Serin das Substrat via H-Brücken; das Lysin formt H-Brücken zur Nicotinamid-Ribose des Cofaktors (um die richtige Orientierung zu erhalten) und erniedrigt den pKs-Wert der Hydroxy-Gruppe des Tyrosins durch elektrostatische Wechselwirkungen um den Protonentransfer zu unterstützen; das Tyrosin fungiert als katalytische Säure (bzw. Base bei der Oxidation von Alkoholen).[202] In Abbildung 47 ist die katalytische Triade des ternären Komplexes (Y176F+NADP$^+$+(*S*)-CF_3-Aldol) mit H-Brücken-Bindungen gezeigt. Der Abstand zwischen dem C4-Atom des Nicotinamids und dem Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats beträgt hierbei 3,2 Å.

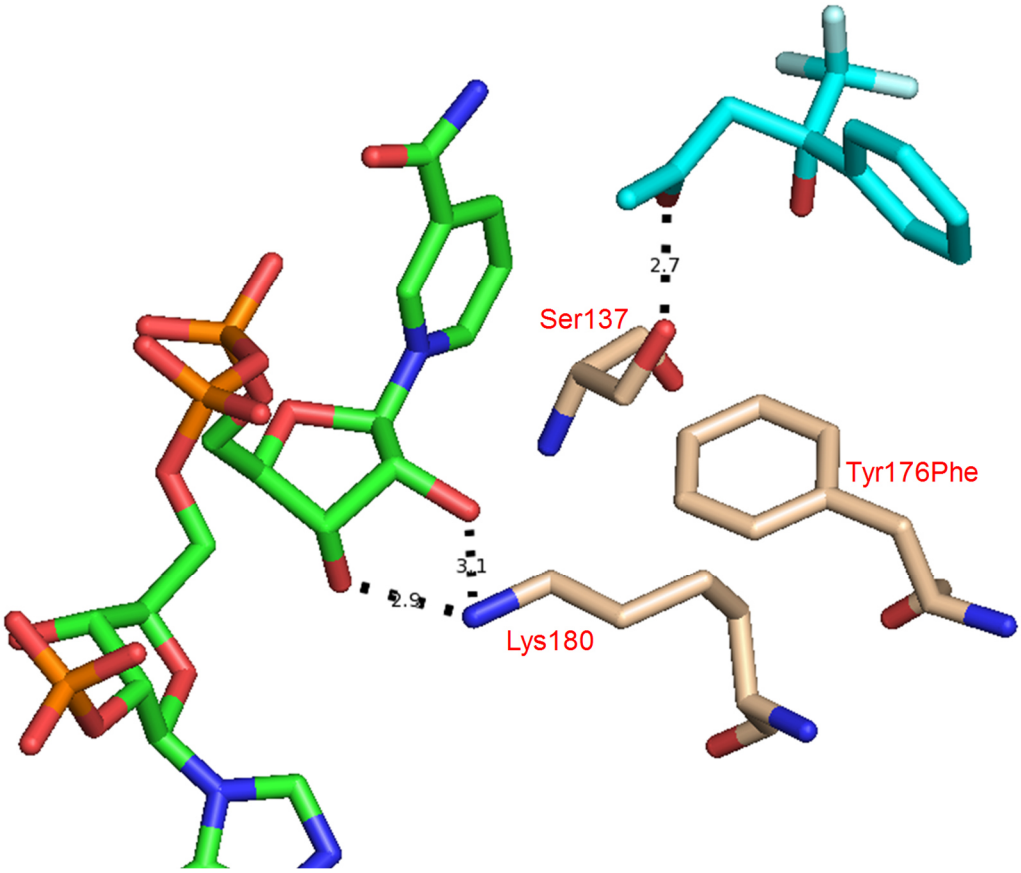
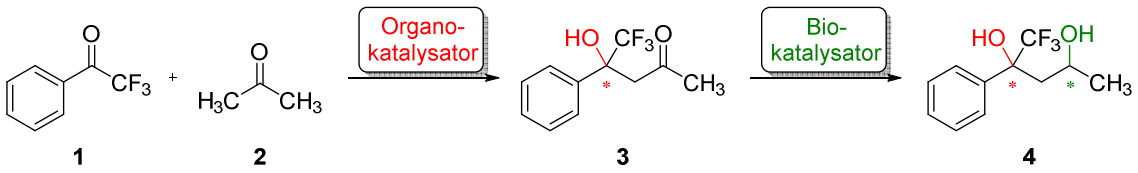


Abbildung 47: Katalytische Triade bestehend aus Ser137, Tyr176 (hier Phe) und Lys180. Der Cofaktor (grün) wird durch zwei H-Brückenbindungen zwischen Lysin und den OH-Gruppen der Nicotinamid-Ribose stabilisiert. Das Serin stabilisiert ebenfalls das (*S*)-CF_3-Aldol (türkis) durch Bildung einer H-Brücke zu der Carbonyl-Gruppe des Substrats. Bei den angegebenen Distanzen handelt es sich um vorläufige Angaben, die sich geringfügig ändern können (Christine Tölzer, persönliche Mitteilung). Für die Darstellung wurde die Software Pymol verwendet.[199]

3.8 Entwicklung einer chemoenzymatischen Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole

Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist das Hauptziel dieser Arbeit die Entwicklung einer effizienten chemoenzymatischen Eintopfreaktion zur Synthese von chiralen 1,3-Diolen **4** (siehe Schema 21). Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Synthese der 1,3-Diole mit hoher optischer Reinheit (*ee* und *de* >95 %). Ein wichtiger Schlüsselschritt für die Realisierung dieses Vorhabens ist der 2. Schritt, die biokatalytische Reduktion des intermediären Aldolproduktes **3**, welche sowohl hoch enantio- als auch diastereoselektiv erfolgen sollte. Das Auffinden eines effizienten Biokatalysators, der diese Kriterien erfüllt, war hierbei ein wichtiges Zwischenziel und konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der vielversprechende, neu identifizierte Biokatalysator, eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Pichia pastoris* (PPADH1) wurde in den vorherigen Kapiteln biochemisch umfassend charakterisiert und sollte nun hinsichtlich des Anwendungspotentials untersucht und für die Realisierung des in Schema 21 aufgeführten Konzepts eingesetzt werden.

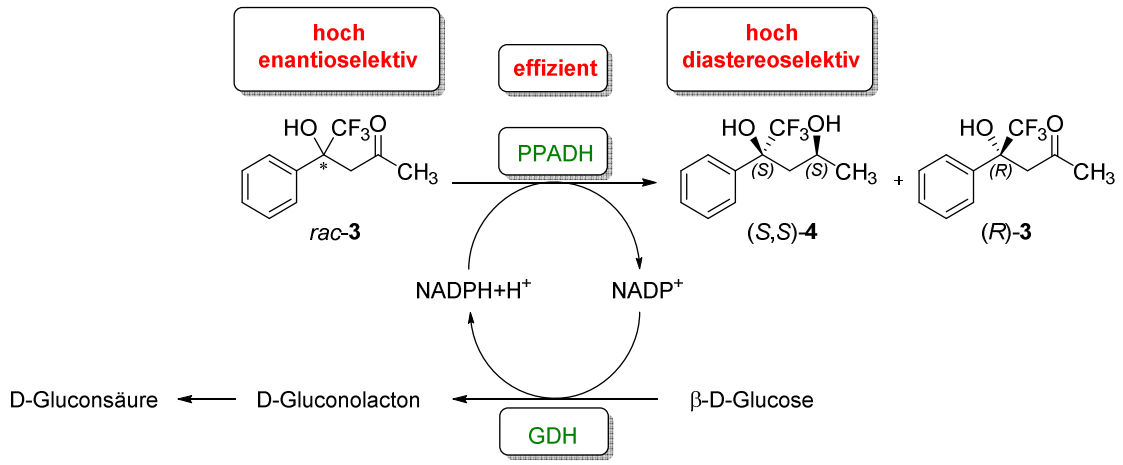


Schema 21: Kombination von Organo- und Biokatalysator für die Synthese chiraler tertiärer/sekundärer 1,3-Diole.

3.8.1 Einsatz der PPADH1 für die kinetische Racematspaltung des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols)

Um eine effiziente Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole zu realisieren, sollte zunächst die biokatalytische Reduktion des Aldolproduktes mit der PPADH1 untersucht und optimiert werden. Wie bereits zuvor erwähnt, zeigte die neu identifizierte PPADH1 eine deutliche Präferenz für die Reduktion des (*S*)-Enantiomeren aus dem Gemisch des β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols). Für eine erfolgreiche Reduktion im Sinne einer kinetischen Racematspaltung mit einer ADH müssen folgende Kriterien erfüllt werden: die Reduktion muss 1.) effizient sein, 2.) hochselektiv bezüglich des 1. Stereozentrums und 3.) diastereoselektiv bezüglich der Bildung des 2. Stereozentrums verlaufen, um die Synthese eines der vier möglichen Stereoisomere des 1,3-Diols zu erzielen und das verbleibende β-Hydroxyketon mit hoher optischer

Reinheit zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die PPADH1 für die asymmetrische Reduktion mit simultaner Regenerierung des Cofaktors NADPH mit Hilfe der GDH und D-Glucose als Cofaktorregenerierungssystem näher untersucht (siehe Schema 22).



Schema 22: Wichtige Kriterien für die Racematspaltung des racemischen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) für die Gewinnung des optisch reinen β-Hydroxyketons und 1,3-Diols mit Cofaktorregenerierungssystem.

3.8.1.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Um das optimale Enzymverhältnis der PPADH zum Cofaktor-regenerierenden Enzym GDH für die Racematspaltung zu bestimmen, wurden Umsetzungen mit dem racemischen CF_3-Aldol durchgeführt und die gereinigte PPADH1 sowie die GDH (angereichert durch Hitzefällung) in den Verhältnissen ADH:GDH = 1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 und 10:1 eingesetzt. Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 1 U PPADH und GDH im angepassten Verhältnis in KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Die Reaktionsansätze wurden bei 25 °C inkubiert und bei 900 UpM geschüttelt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurden Proben entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen gaschromatographisch analysiert. Die erhaltenen Peakflächen des Eduktes ((*S*)-CF_3-Aldol **3**) und des gebildeten Produktes ((*S,S*)-Diol **4**) wurden hierbei in Relation gesetzt und sind in Abbildung 48 graphisch dargestellt. Die Abbildung 48 zeigt, dass die besten Umsetzungen (>95 % relativer Anteil des gebildeten (*S,S*)-Diols) mit einem Überschuss an GDH erreicht wurden. Bei einem ADH:GDH-Verhältnis von 1:1 sowie 2:1 konnten ebenso gute Umsätze erreicht werden (>90 % rel. Diolkonzentration). Mit steigendem ADH-Anteil bezogen auf das Verhältnis zur GDH, sinken die relativen Diolkonzentrationen stetig ab und die Umsetzungen verlaufen daher langsamer.

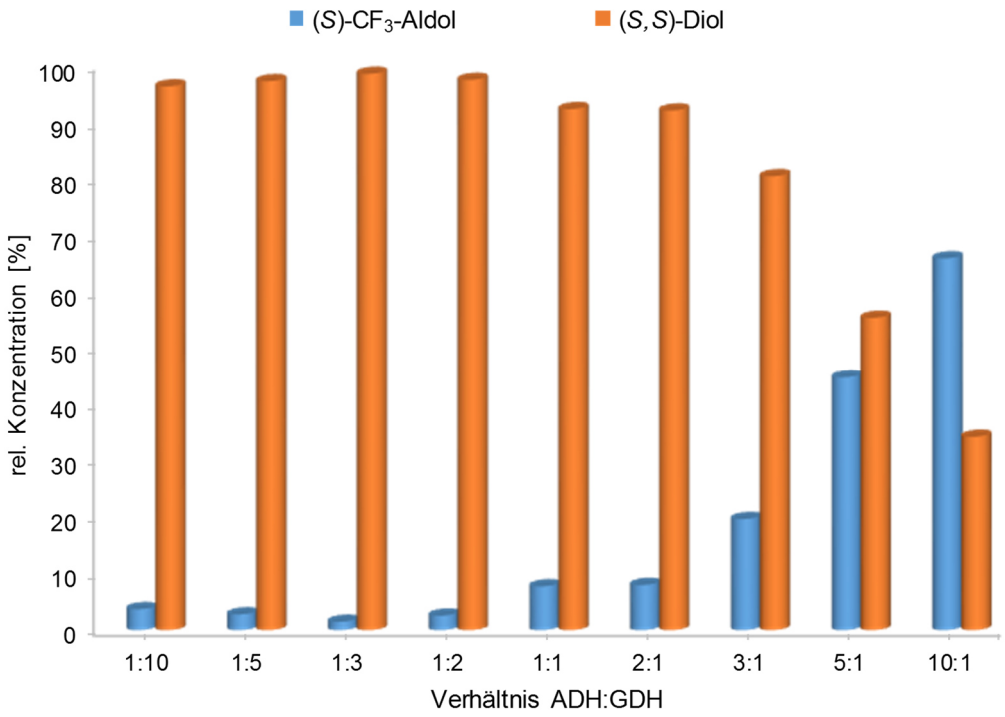


Abbildung 48: Bildung des (*S*,*S*)-Diols bei der Reduktion des racemischen CF_3-Aldols in Abhängigkeit des ADH:GDH-Verhältnisses nach einer Reaktionszeit von 15 min. Es wurden 1 U PPADH und GDH im angepassten Verhältnis eingesetzt. Graphisch aufgetragen sind die relativen Konzentrationen des (*S*)-CF_3-Aldols und des gebildeten (*S*,*S*)-Diols, welche mittels GC bestimmt wurden.

Am Beispiel des eingesetzten Verhältnisses von 1:3 (ADH:GDH) konnte das (*S*)-Enantiomer aus des racemischen CF_3-Aldols (20 mM) nahezu vollständig zum korrespondieren 1,3-Diol reduziert und das (*R*)-CF_3-Aldol mit einem *ee* von 97 %, nach bereits 15 Minuten in hohem Maße angereichert werden. Um hohe Umsätze zu erreichen und die kinetische Racematspaltung so effizient wie möglich durchzuführen, ist es daher ratsam, die GDH im leichten Überschuss zur ADH einzusetzen. Ein typischer Reaktionsverlauf der kinetischen Racematspaltung von 20 mM racemischem CF_3-Aldol mit einem ADH:GDH-Verhältnis von 1:10 ist in Abbildung 49 dargestellt. Beim Start der Reaktion liegen die beiden Enantiomerenanteile des CF_3 Aldols bei jeweils 50 % (*ee*= 0 %). Mit fortschreitender Reaktionszeit sinkt der Anteil des (*S*)-Enantiomeren durch die enantioselektive Reduktion der PPADH1 stetig ab verbunden mit einer simultan zunehmenden Diolkonzentration. Der Anteil des (*R*) Enantiomeren erscheint dabei nahezu unverändert zu bleiben.

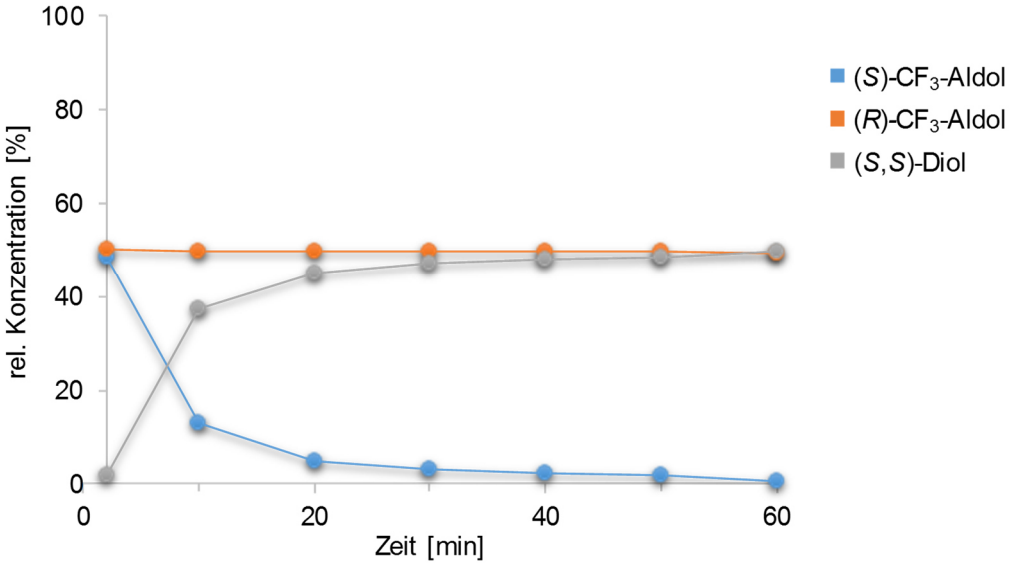


Abbildung 49: Typischer Reaktionsverlauf der kinetischen Racematspaltung mit PPADH1 und GDH als Cofaktorregenerierungssystem im Verhältnis 1:10. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 0,5 U PPADH1 (gereinigt), 5 U GDH (angereichert durch Hitzefällung) in KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) bei 25 °C, 900 UpM. Nach ausgesuchten Zeitabständen wurden Proben entnommen und gaschromatographisch analysiert.

3.8.1.2 Einfluss der Reaktionsdauer und der Enzymaktivität auf die kinetische Racematspaltung

Die kinetische Racematspaltung wurde nicht nur hinsichtlich des Reaktionsverlaufs analysiert, sondern auch die optische Reinheit des (*R*)-CF_3-Aldols (*ee*) sowie des (*S,S*)-Diols (*ee* und *de*) in Abhängigkeit der Zeit sowie der eingesetzten Enzymaktivität bestimmt. Hierbei erfolgte die Bestimmung des *ee*-Wertes des (*R*)-CF_3-Aldols mittels GC/HPLC und die Bestimmung von *ee* und *de* des (*S,S*)-Diols mittels HPLC. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 0,5 U PPADH und 5 U GDH in KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Die Reaktionsansätze wurden bei 25 °C inkubiert und bei 900 UpM geschüttelt. Nach gewissen Zeitabständen wurden Proben entnommen und analysiert. In Abbildung 50 ist erkennbar, dass mit steigendem Umsatz auch der *ee*-Wert des (*R*)-CF_3-Aldols stetig ansteigt und nach 1,5 Stunden bei >99 % liegt und dieser über den weiteren Reaktionsverlauf unverändert bleibt. Der *ee*-Wert des gebildeten (*S,S*)-Diols betrug zu jedem Zeitpunkt >99 % (nicht in Abbildung 50 dargestellt) und der *de*-Wert bei >99 % in den ersten zwei Stunden. Bei längerer Reaktionsdauer (nach 18 Stunden) wurde jedoch eine Veränderung des *de*-Wertes hinsichtlich des (*S,S*)-Diols beobachtet, wobei neben dem (*S,S*)-Diol als Hauptstereoisomer auch in geringem Umfang das (*R,S*)-Diol nachgewiesen werden konnte, sodass der *de*-Wert von >99 % auf 97 % *de* gesunken ist.

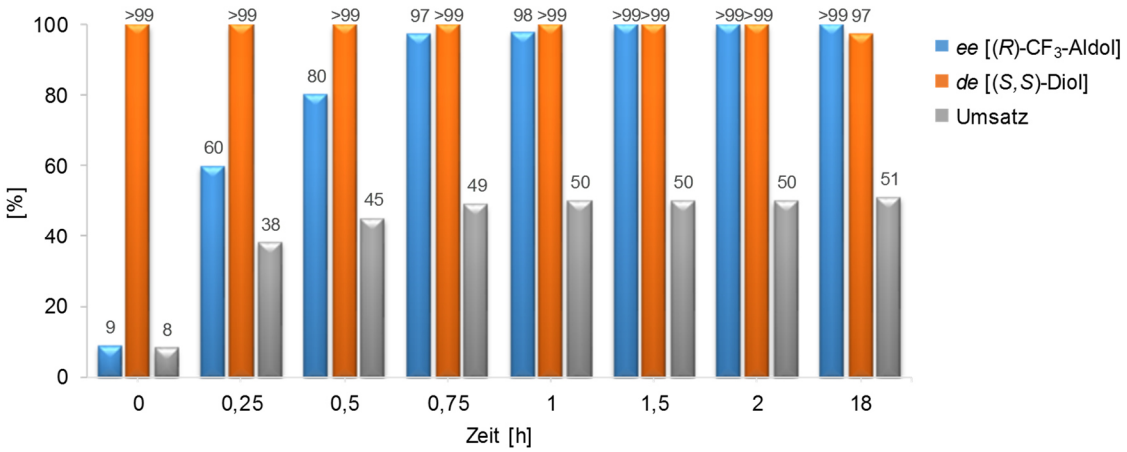


Abbildung 50: Abhängigkeit der optischen Reinheit des (*R*)-CF_3-Aldols und des (*S*,*S*)-Diols in Abhängigkeit der Reaktionsdauer. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 0,5 U PPADH1 (gereinigt), 5 U GDH (Rohextrakt) in KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) bei 25 °C, 900 UpM. Nach ausgesuchten Zeitabständen wurden Proben entnommen und *ee*-/*de*-Werte mittels HPLC-Analyse bestimmt. Der Umsatz wurde mit Hilfe der Software „*Enantioselectivity*“ bestimmt.[186]

Offensichtlich wird mit verlängerter Reaktionszeit und der Abwesenheit des (*S*)-CF_3-Aldols das nicht-favorisierte (*R*)-Enantiomer zum korrespondierenden (*R,S*)-Diol reduziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die kinetische Racematspaltung des racemischen CF_3-Aldols wie zuvor angegeben wiederholt, jedoch mit unterschiedlichen Rohextraktvolumina (10 % und 1 % (v/v)), welche den eingesetzten Enzymaktivitäten von 7,3 U und 0,73 U entsprechen. Der Einfluss der eingesetzten Enzymaktivität auf die kinetische Racematspaltung hinsichtlich der *ee*- und *de*-Werte ist in Abbildung 51 dargestellt. In Abbildung 51A ist die Umsetzung mit 7,3 U PPADH1 dargestellt. Es ist erkennbar, dass bereits nach t= 0,5 h das (*S*)-Enantiomer nahezu vollständig zum 1,3-Diol reduziert wurde und das (*R*)-CF_3-Aldol mit einem *ee* von >99 % vorlag. Der *de*-Wert des gebildeten (*S*,*S*)-Diols zum Zeitpunkt t=0,5 h betrug hierbei 98 %. Mit längerer Reaktionsdauer nimmt die Diastereoselektivität der PPADH1-katalysierten Reaktion ab, sodass nach t= 3 h der *de*-Wert des (*S*,*S*)-Diols bei 90 % und nach 69 Stunden nur noch 71 % beträgt. Hierbei konnte wiederholt nur das (*R*,*S*)-Diastereomer nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Umsetzung mit nur 0,73 U PPADH1 (Abbildung 51B) ist der Einfluss auf die Diastereoselektivität der PPADH1-katalysierten Reaktion nicht so stark ausgeprägt. Die kinetische Racematspaltung lieferte hierbei zum Zeitpunkt t= 0,5 h und 3 h exzellente *ee*-Werte von >99 % für das (*R*)-CF_3-Aldol sowie >99 % *de* für das (*S*,*S*)-Diol. Die Diastereoselektivität der PPADH1-katalysierten Reaktion veränderte sich hierbei nur minimal, sodass nach 69 Stunden für das (*S*,*S*)-Diol ein *de* von 97 % gemessen wurde.

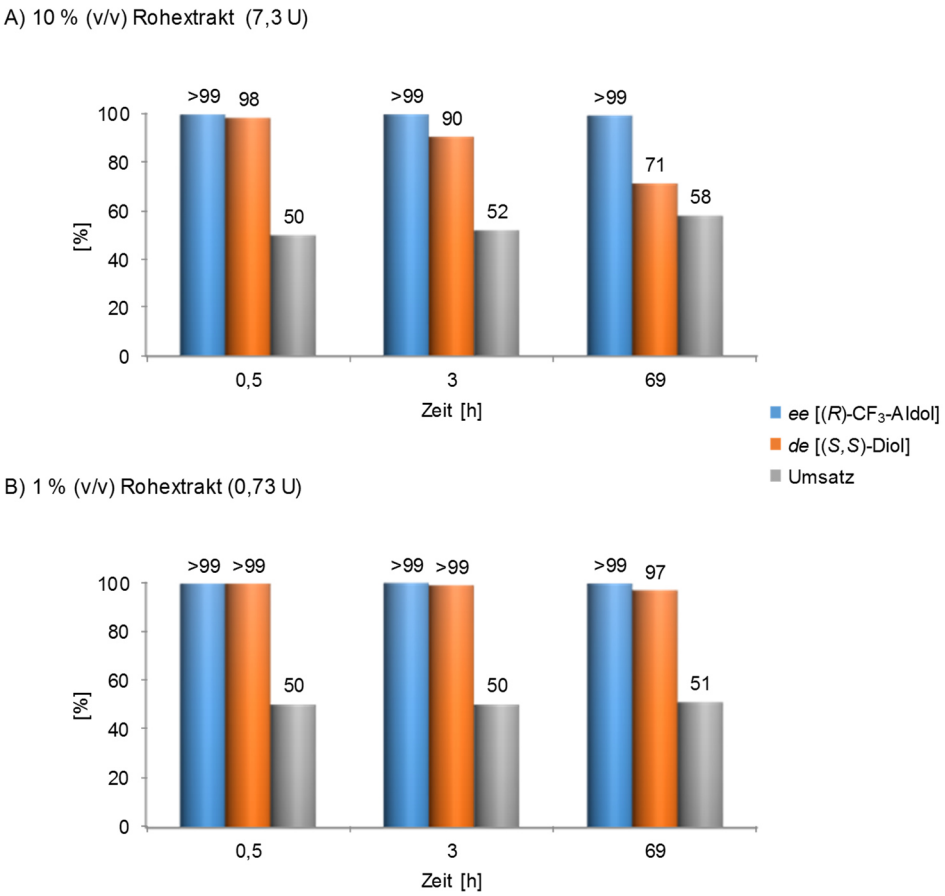


Abbildung 51: Einfluss der eingesetzten Enzymaktivität auf die kinetische Racematspaltung des CF_3-Aldols hinsichtlich der *ee*- und *de*-Werte. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, A) 10 % B)1 % (v/v) PPADH1 (Rohextrakt), 5 U GDH (Rohextrakt) in KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) bei 25 °C, 900 UpM. Nach ausgesuchten Zeitabständen wurden Proben entnommen und *ee*-/*de*-Werte mittels HPLC analysiert. Umsatz wurde mit Hilfe der Software „*Enantioselectivity*“ bestimmt.[186]

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Umsetzung mit 0,5 U PPADH1 bei t= 18 h (siehe Abbildung 50). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Diastereoselektivität der PPADH1 zum einen von der Reaktionsdauer und zum anderen von der eingesetzten Enzymaktivität abhängt. Beim Einsatz geringer Enzymmengen (äquivalent zur Aktivität) verläuft die Umsetzung langsamer, sobald aber das favorisierte (*S*)-Enantiomer vollständig reduziert wurde und das Enzym noch stabil/aktiv ist, wird mit fortschreitender Reaktionszeit auch das (*R*)-Enantiomer zum korrespondierenden (*R*,*S*)-Diol reduziert einhergehend mit der Verschlechterung des *de*-Wertes. Bei dem Einsatz hoher Enzymmengen wird dieser Effekt noch deutlicher, da das favorisierte (*S*)-Enantiomer viel schneller reduziert wird und die PPADH1 eine noch höhere Restaktivität aufweist, sodass mit längerer Reaktionszeit ebenfalls das nicht-favorisierte (*R*)-Enantiomer zum korrespondierenden 1,3-Diol umgesetzt wird. In beiden Fällen ist

es daher ratsam, den Reaktionsverlauf der kinetischen Racematspaltung zeitnah zu verfolgen und bei Erreichen eines hohen *ee*- und *de*-Wertes die Reaktion zu stoppen und aufzuarbeiten, um die optische Reinheit des gebildeten Diols nicht zu verschlechtern.

3.8.1.3 Herstellung und Anwendung von Ganzzellkatalysatoren mit PPADH1 und GDH

Die Entwicklung von Ganzzellkatalysatoren (GZKs) und deren Einsatz bringt unter industriellen Gesichtspunkten viele Vorteile gegenüber dem Einsatz von isolierten Enzymen. Wichtige Faktoren sind hierbei Kosten und Zeit, da der Einsatz von isolierten Enzymen mit zusätzlichen Arbeitsschritten wie Zellaufschluss, Zentrifugationen und Proteinreinigungen verbunden ist. Zusätzlich können GZKs die intrazellulären Enzyme innerhalb der Zellen schützen und somit als natürliche Schutzschilde dienen. Um diese Vorteile zu nutzen, wurden verschiedene Ganzzellkatalysatoren entwickelt, wobei eine Ein-Plasmid- als auch eine Zwei-Plasmid-Strategie verfolgt wurde (Abbildung 52).

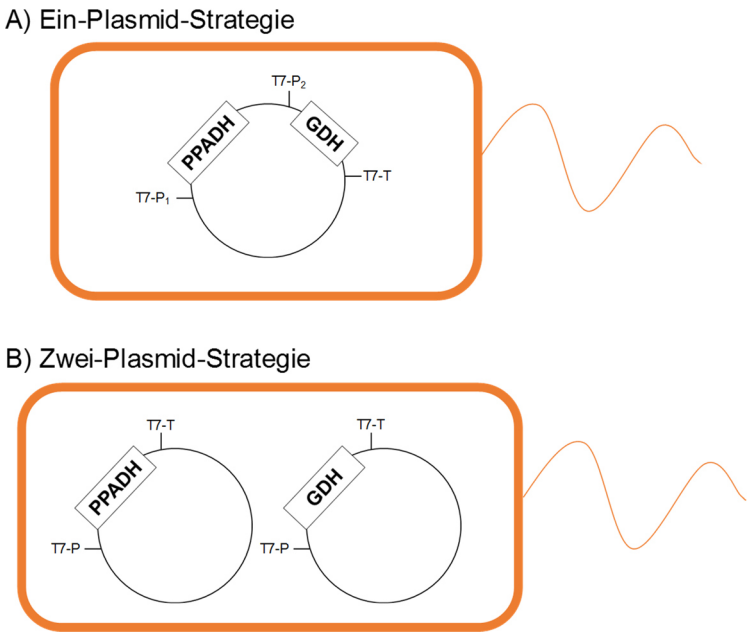


Abbildung 52: Strategien zur Entwicklung von Ganzzellkatalysatoren basierend auf einem Plasmid (A) oder zwei Plasmiden (B). T7-P= T7-Promoter; T7-T= T7-Terminator.

Dabei liegen die Gene, welche für die PPADH und GDH kodieren, entweder beide im gleichen Plasmid vorliegen oder die Gene sind in zwei unterschiedlichen Plasmiden kloniert. Dies hat den Vorteil, dass unterschiedliche Möglichkeiten bezüglich der Kopienanzahl der Plasmide sowie der Orientierung der beiden Gene eine Variation in

der Expressionsstärke und somit auch der Enzymaktivitäten erlauben. Es wurden drei unterschiedliche Ganzzellkonstrukte 1-3 erstellt (Tabelle 42):

Konstrukt 1) Das Plasmid pETDuet-1 (Amp^R) mit zwei „*multiple cloning sites* (MCS)“ wurde verwendet. In der MCSI wurde das Gen *ppadh1* über die *Nco*I-/*Not*I-Schnittstellen und das *gdh*-Gen in die MCSII über die *Nde*I-/*Xho*I-Schnittstellen kloniert. Das Plasmid wurde anschließend in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Konstrukt 2) Das gleiche Plasmid wie bei Konstrukt 1 (pETDuet-1) wurde verwendet. In der MCSI wurde das Gen *gdh* über die *Bsa*I-/*Not*I-Schnittstellen und das *ppadh1*-Gen in die MCSII über die *Nde*I-/*Xho*I-Schnittstellen kloniert. Das Plasmid wurde anschließend in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Konstrukt 3) Das Plasmid pACYC-Duet-1 (Cm^R) wurde verwendet und das *gdh*-Gen über die *Nco*I-/*Xho*I-Schnittstellen hineinkloniert. Das resultierte Plasmid pACYC-GDH wurde zusammen mit dem zuvor konstruierte Plasmid pET28a-PPADH1 (mit N-terminalem His-Tag) gleichzeitig in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Tabelle 42: Konstruierte Ganzzellkatalysatoren.

Ganzzellkatalysator (GZK)	Plasmid[a]
1	pETDuet-PPADH-GDH
2	pETDuet-GDH-PPADH
3	pET28a-PPADH1(N) + pACYC-GDH

[a]Anmerkungen: pETDuet-MCSI-MCSII, (N)= N-terminaler His-Tag

Alle drei Konstrukte konnten erfolgreich hergestellt und mittels Sequenzierung verifiziert werden. Die konstruierten Ganzzellkatalysatoren wurden anschließend in 1 L TB-Medium bei 37 °C mit einer Start-OD von 0,05 beimpft und bei Erreichen einer OD von 0,5-0,7 mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer ca. 18-stündigen Expression wurden die Kulturen geerntet. Von jedem GZK wurde eine 25%ige Zellsuspension hergestellt, welche anschließend mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen wurde. Nach Zentrifugation wurden die zellfreien Rohextrakte erhalten und die Expression der beiden Gene mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 53). Beim Rohextrakt des GZK3 sind deutliche Überexpressionsbanden bei etwa 42 kDa und 30 kDa erkennbar, welche gut mit den berechneten Molekulargewichten der PPADH1 (41,4 kDa) und der GDH (28,1 kDa) übereinstimmen. In den Rohextrakten des GZK1 und GZK2 sind keine eindeutigen Überexpressionsbanden erkennbar, sodass anhand der SDS-PAGE

Analyse keine Auskunft über die erfolgreiche Koexpression der beiden Gene gemacht werden kann. Aus diesem Grund wurden die zellfreien Rohextrakte anschließend bezüglich der ADH- und GDH-Aktivität photometrisch untersucht.

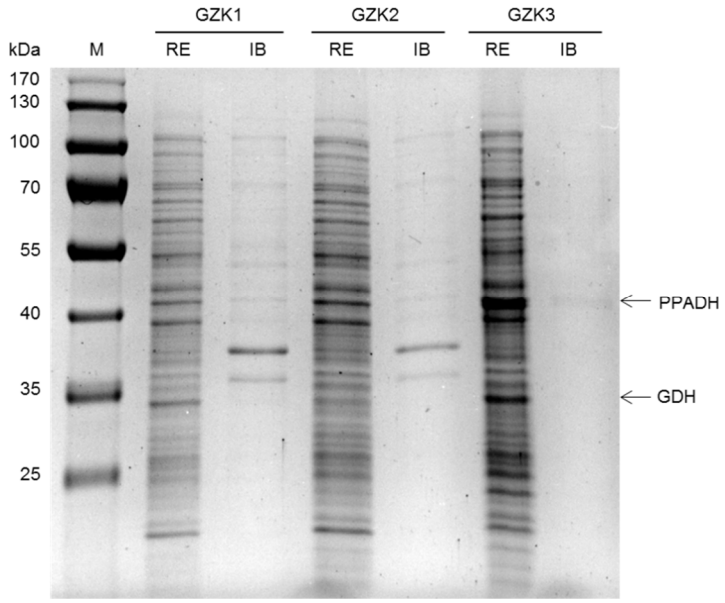


Abbildung 53: SDS-Polyacrylamidgel der Rohextrakte von Ganzzellkatalysatoren 1-3. M= Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); RE= Rohextrakt, IB= *inclusion bodies*. Es wurden 10 µg Protein pro Spur aufgetragen.

Die Aktivität der GDH wurde für die Oxidation von D-Glucose und die der PPADH für die Reduktion des *rac*-CF_3-Aldols bestimmt. Die Ergebnisse der photometrischen Aktivitäten sind in Tabelle 43 zusammengefasst. In allen Konstrukten konnte sowohl ADH- als auch GDH-Aktivität gemessen werden, sodass vorab gesagt werden kann, dass beide Gene koexprimiert werden konnten. Im Rohextrakt des GZK1 wurde eine nahezu 6-fach höhere spezifische GDH-Aktivität im Vergleich zur PPADH-Aktivität vermessen. Im Rohextrakt des GZK2 wurde ebenfalls eine höhere GDH-Aktivität gegenüber der PPADH vermessen, jedoch nur doppelt so hoch. Beim GZK3 hingegen konnte eine höhere spezifische Aktivität bei der PPADH gegenüber der GDH-Aktivität beobachtet werden. Auffällig hierbei war, dass bei den GZK1 und GZK2 deutlich niedrigere spezifische PPADH-Aktivitäten im Vergleich zum GZK3 gemessen werden konnten. Da beide Plasmide pET28a und pETDuet zu den sogenannten *„medium-copy“*-Plasmiden gehören, wird vermutet, dass der N-terminale His-Tag der PPADH im GZK3 vermutlich zu einer Aktivitätssteigerung führt im Vergleich zur nicht-getaggten PPADH in den GZK1 und GZK2. Der Einfluss des His-Tags auf die Aktivität im Rohextrakt konnte bereits in anderen Versuchen (Kapitel 3.5.5) ebenfalls beobachtet und bestätigt werden.

Tabelle 43: Vergleich der Aktivitäten der PPADH und GDH sowie Enzymverhältnis in den Rohextrakten der Ganzzellkatalysatoren 1-3. Aktivitäten wurden photometrisch vermessen.

Ganzzellkatalysator (GZK)	D-Glucose (Ox.)[a]	*rac*-CF_3-Aldol (Red.)[a]	GDH : PPADH
1	2,98	0,52	5,7 : 1,0
2	0,65	0,35	1,9 : 1,0
3	1,90	3,04	1,0: 1,6

[a]Aktivitäten in U mg^{-1}.

Die Ganzzellkatalysatoren wurden anschließend für die kinetische Racematspaltung des CF_3-Aldols eingesetzt und die Reaktionsverläufe sowie Umsätze verglichen. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen 40 mM rac CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 4,55 mg mL^{-1} GZK1-3 (Zellfeuchtmasse) auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 5 h schüttelnd bei 25 °C. In Abbildung 54 sind die ermittelten Umsätze in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Bei allen verwendeten Ganzzellkatalysatoren konnte ein Anstieg des Umsatzes mit der Zeit beobachtet werden. Der GZK1 erreichte hierbei minimal höhere Umsätze im Vergleich zu den GZKs 1 und 2 in den ersten 1,5 Stunden. Nach den ersten 1,5 Stunden wurden jedoch höhere Umsätze beim GZK3 beobachtet, sodass nach 5 Stunden das (*S*)-Enantiomer nahezu vollständig zum 1,3-Diol reduziert wurde (Umsatz 48 %). Die GZKs 1 und 2 erreichten nach 5 Stunden einen Umsatz von 37 % und 33 %. Anhand des zeitlichen Verlaufs der Umsetzungen wurden die Ganzzell-Aktivitäten im nahezu linearen Bereich (zwischen 1 h und 4 h) bestimmt.

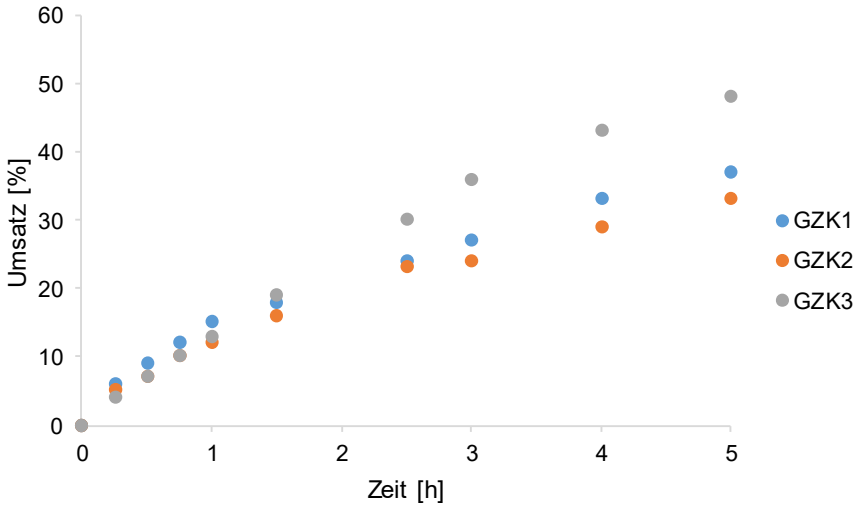


Abbildung 54: Einsatz der Ganzzellkatalysatoren für die kinetische Racematspaltung des racemischen CF_3-Aldols. Folgende Konditionen wurden verwendet: 40 mM *rac*-CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 4,55 mg mL^{-1} GZK1-3 (Zellfeuchtmasse) auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 5 h schüttelnd bei 25 °C. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels GC analysiert.

Für den GZK1 wurde eine Ganzzell-Aktivität von 41 mU, für GZK2 38 mU und für GZK3 67 mU bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass alle drei konstruierten Ganzzellkatalysatoren für die kinetische Racematspaltung des CF_3-Aldols eingesetzt werden können. Jedoch zeigte sich, dass der Ganzzellkatalysator 3 nicht nur die höchste PPADH-Aktivität aufwies, sondern auch am effektivsten bei der kinetischen Racematspaltung war und den höchsten Umsatz erreichte. Aus diesem Grund wurde der GZK3 einer Hochzelldichte-Fermentation (HZD-Fermentation) unterzogen, um ausreichend Biomasse für weitere Experimente vorrätig zu haben und um eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen hinsichtlich der Ganzzellkatalysator-Chargen, die bei Kultivierung im kleinen Maßstab nicht gegeben ist. Die durch HZD-Fermentation gewonnenen Zellen des GZK3 (FGZK3) wurden wie zuvor aufgeschlossen und der Rohextrakt für die Aktivitätsmessungen isoliert. Die gemessenen Aktivitäten sind in Tabelle 44 zusammengefasst. Die Aktivitäten der PPADH und GDH im Ganzzellkatalysator 3 konnten jeweils um einen Faktor von 2,4 durch HZD-Fermentation gesteigert werden, wobei das GDH:PPADH-Verhältnis unverändert blieb.

Tabelle 44: Aktivitäten der PPADH und GDH sowie Enzymverhältnis im Rohextrakt des durch HZD-Fermentation gewonnenen Ganzzellkatalysators 3. Aktivitäten wurden photometrisch vermessen.

Ganzzellkatalysator (GZK)	D-Glucose (Ox.)[a]	*rac*-CF_3-Aldol (Red.)[a]	GDH : PPADH
FGZK3	4,57	7,30	1,0 : 1,6

[a]Aktivitäten in U mg^{-1}.

Der durch HZD-Fermentation gewonnene Ganzzellkatalysator (FGZK3) wurde ebenfalls für die kinetische Racematspaltung des CF_3-Aldols eingesetzt, wobei folgender Reaktionsansatz gewählt wurde: 20 mM rac CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 1 mg mL^{-1} FGZK3 (Zellfeuchtmasse) auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 1 h schüttelnd bei 25 °C. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 55 dargestellt und zeigt eine nahezu vollständige Racematspaltung nach einer Reaktionsdauer von t= 1 h. Anhand des zeitlichen Verlaufs der Umsetzung wurde ebenfalls die Ganzzell-Aktivität im nahezu linearen Bereich (zwischen 0 min und 40 min) berechnet, welche bei 220 mU lag und somit die höchste Aktivität unter den bisher getesteten Ganzzellkatalysatoren aufwies. Aufgrund der hohen Aktivität und der einhergehenden effizienten Umsetzung des CF_3-Aldols wurde für die weiteren Arbeiten der fermentierte Ganzzellkatalysator (FGZK3) eingesetzt.

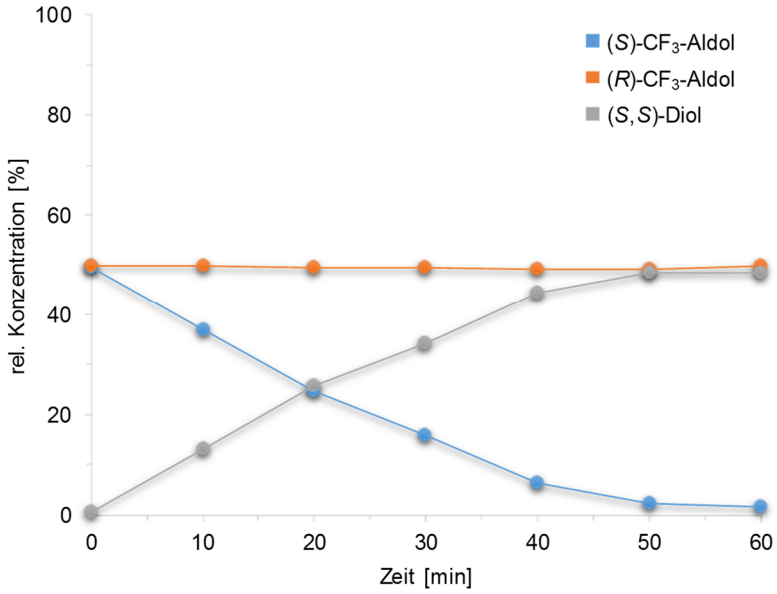


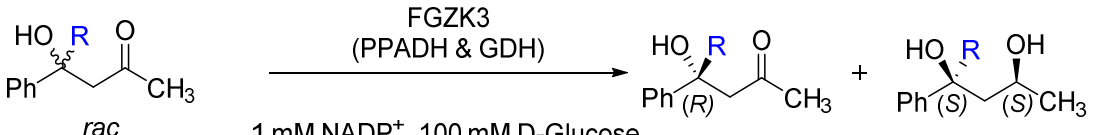
Abbildung 55: Kinetische Racematspaltung von 20 mM racemischem CF_3-Aldol mit FGZK3. Folgende Konditionen wurden verwendet: 20 mM *rac*-CF_3-Aldol, 200 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 1 mg mL^{-1} FGZK3 (Zellfeuchtmasse) auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 1 h schüttelnd bei 25 °C. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels GC analysiert.

3.8.1.4 Kinetische Racematspaltung von tertiären β-Hydroxyketonen mit FGZK3 im präparativen Maßstab

Im vorherigen Kapitel wurden unterschiedliche Ganzzellkatalysatoren erstellt und bezüglich der kinetischen Racematspaltung des CF_3-Aldols untersucht und analysiert. Hierbei erwies sich der GZK3 als effektivster, sodass dieser im größeren Maßstab (20 L) mittels HZD-Fermentation angezogen und ebenfalls für die kinetische Racematspaltung eingesetzt wurde. Zellen dieser HZD-Fermentation (FGZK3) wiesen hierbei höhere Enzymaktivitäten auf als der unter Standard-Kultivierungsbedingungen (im Schüttelkolben) hergestellte GZK3. Nach diesen Optimierungen sollte nun exemplarisch die kinetische Racematspaltung des zuvor eingesetzten CF_3-Aldols als auch für das nicht-fluorierte Analogon (CH_3 statt CF_3) im präparativen Maßstab mit dem FGZK3 durchgeführt werden. Im Gegensatz zum Trifluoracetophenon, welches durch die CF_3-Gruppe stark aktiviert wird, kann Acetophenon aufgrund des ungünstigen thermodynamischen Gleichgewichts nicht als Aldolakzeptor in einer organokatalysierten Aldolreaktion mit Aceton eingesetzt werden. Aus diesem Grund musste das racemische CH_3-Aldol über andere Wege hergestellt werden und zwar über eine Grignard-Reaktion durch die Addition von Phenylmagnesiumbromid an Acetylaceton. Die Synthese des racemischen CH_3-Aldols sowie dessen kinetische Racematspaltung mit dem FGZK3 wurden von Matthias Hammel (Universität Köln) durchgeführt. Für die kinetische

Racematspaltungen der beiden tertiären β-Hydroxyketone wurde der Standard-Reaktionsansatz von 1 mL auf 50 mL erhöht und je 1 mmol (entspricht 20 mM) der racemischen Substrate eingesetzt. Für das CF_3-Aldol wurde wie zuvor der FGZK3 in einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} (ZFM) eingesetzt, während aufgrund der schlechteren Aktivität die 5-fache Menge (5 mg mL^{-1}) für das nicht-fluorierte Substrat eingesetzt wurde. Es wurden 5 Äquivalente D-Glucose (100 mM) sowie 1 mM $NADP^+$ eingesetzt und die Reaktionsansätze für 4-6 Stunden bei RT in 50 mL Reaktionsgefäßen unter Rühren inkubiert und die Reaktionsverlaufe mittels GC überprüft. Bei nahezu vollständiger Reduktion des (*S*)-Enantiomeren zum korrespondierenden 1,3-Diol wurden die Reaktionsgemische durch mehrmaliges Extrahieren aufgearbeitet und die Rohprodukte anschließend säulenchromatographisch gereinigt, sodass die (*R*)-Aldol-Verbindungen von den 1,3-Diolen getrennt voneinander isoliert werden konnten. Die Ergebnisse dieser präparativen Racematspaltungen sind in Tabelle 45 zusammengefasst. Im Falle des fluorierten CF_3-Aldols konnte nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden das (*R*)-Aldol enantiomerenrein (>99 % *ee*) mit einer Ausbeute von 45 % erhalten werden. Das korrespondierende (*S*,*S*)-Diol konnte ebenfalls enantiomeren- als auch diastereomerenrein >99 % *ee* und *de* mit einer Ausbeute von 46 % isoliert werden (Tabelle 45, Eintrag 1). Bezüglich der Racematspaltung des nicht-fluorierten β-Hydroxyketons (CH_3-Aldol) konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 45, Eintrag 2). Durch den Einsatz der 5-fachen Menge an FGKZ3 im Vergleich zur CF_3-Aldol Racematspaltung konnte die CH_3-Aldol Racematspaltung in vergleichbarer Reaktionsdauer (4 h) durchgeführt werden.

Tabelle 45: Kinetische Racematspaltung tertiärer β-Hydroxyketone mit FGZK3 im präparativen Maßstab.



rac
1 mmol (20 mM)

1 mM $NADP^+$, 100 mM D-Glucose,
ad. 50 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7),
RT, 4-6 h

R= CH_3 oder CF_3

Eintrag	R	FGZK3 [mg]	Zeit [h]	Ausbeute [%][a]	(*R*)-Aldol[b]	(*S*,*S*)-Diol[c]
1	CF_3	50	6	91 (45/46)	>99 % *ee*	>99 % *ee*, *de*
2	CH_3	250	4	92 (46/46)	97 % *ee*	>99 % *ee*, >98 % *de*

[a]Isolierte Ausbeuten nach Säulenchromatographie. In Klammern Ausbeuten (*R*)-Aldol/(*S*,*S*)-Diol in %.
[b]Die *ee*-Werte der (*R*)-Aldole wurden mit chiraler GC oder HPLC bestimmt.
[c]Die *ee*- und *de*-Werte der Diole wurden mit HPLC bestimmt.

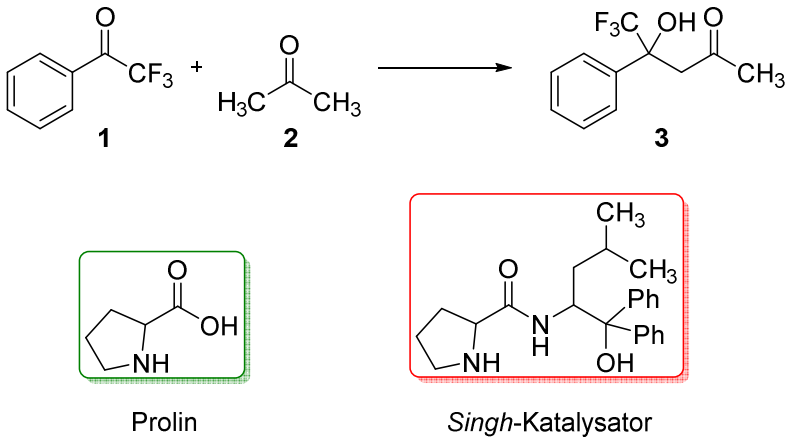
Das (*R*)-Aldol konnte hoch enantiomerenangereichert (97 % *ee*) und das (*S*,*S*)-Diol mit >99 % *ee* und >98 % *de* als 1:1-Gemisch (je 46 % Ausbeute) erhalten werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die kinetischen Racematspaltungen der fluorierten sowie nicht-fluorierten β-Hydroxyketone mittels Ganzzellkatalyse im präparativen Maßstab erfolgreich durchgeführt wurden.

3.8.2 Erste Versuche zur Entwicklung chemoenzymatischer Synthesen von chiralen 1,3-Diolen

Im vorherigen Kapitel konnte die PPADH1 erfolgreich für die kinetische Racematspaltung durch asymmetrische Reduktion des chiralen CF_3-Aldols und der Synthese von 1,3-Diolen eingesetzt werden. Der Nachteil von kinetischen Racematspaltungen ist, dass die maximal erreichbare Ausbeute bei 50 % liegt. Um diesem Nachteil entgegenzuwirken, sollte durch Kombination der organokatalytischen Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton und der anschließenden biokatalytischen Reduktion des Aldolproduktes ein dynamisches System entwickelt werden, um die Ausbeute des 1,3-Diols zu maximieren. Da die biokatalytische Reduktion mit der PPADH1 und dem Cofaktorregenerierungssystem im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich verschiedener Einflüsse gut analysiert worden war, sollte nun die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton als Aldoldonor in wässriger Lösung betrachtet werden.

3.8.2.1 Versuche zur Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton zur Darstellung des tertiären β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols)

Die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton als Aldoldonor ist literaturbekannt und kann mit Organokatalysatoren wie Prolin (D oder L) oder dem „*Singh*-Katalysator“ durchgeführt werden, um das tertiären β-Hydroxyketon (CF_3-Aldol) zu erhalten (siehe Schema 23). Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, konnte das racemische β-Trifluormethyl-β-hydroxyketon (CF_3-Aldol) mit DL-Prolin als Organokatalysator innerhalb einer kurzen Reaktionsdauer (3 h) sehr effizient hergestellt werden, allerdings wurde diese Aldolreaktion in Aceton, welches sowohl als Aldoldonor als auch als organisches Solvent diente, durchgeführt. In Anbetracht der späteren Kombination dieser Aldolreaktion mit der biokatalytischen Reduktion kann die Verwendung von Aceton als alleiniges Reaktionsmedium problematisch werden, da viele Enzyme in Gegenwart von organischen Lösungsmittel nicht aktiv sind.



Schema 23: Synthese des chiralen β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons (CF_3-Aldols) **3** durch organokatalysierte Aldolreaktion mit Prolin oder dem *Singh*-Katalysator.

Aus diesem Grund wurde zunächst die Aldolreaktion mit DL-Prolin als Organokatalysator in Abhängigkeit des Aceton/Puffer-Verhältnisses analysiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,5 M 2,2,2-Trifluoracetophenon, 10 mol% DL-Prolin (bezogen auf die Molarität des Eduktes), 20-100 % (v/v) Aceton /80-0 % (v/v) KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) auf ein Gesamtvolumen von 1 mL. Die Reaktionsansätze wurden bei RT für 20 Stunden schüttelnd inkubiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und mittels GC analysiert. Die Ergebnisse dieser Testreihe sind in Abbildung 56 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Aldolreaktionen von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton in Abhängigkeit des Aceton/ Puffer-Verhältnisses unterschiedliche Reaktionsverläufe zeigen. Beim Reaktionsansatz ohne Zugabe einer wässrigen Phase (Puffer) betrug der relative Anteil des Produktes ca. 98 % nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden, sodass die Umsetzung nahezu vollständig war. Im Gegensatz dazu verlagsamte sich die Aldolreaktion in Anwesenheit von 20 % (v/v) Puffer im Ansatz, sodass im Vergleich nach zwei Stunden der Produktanteil nur bei 73 % lag. Mit steigendem Puffer-Anteil sinkt nahezu linear auch der Produktanteil des CF_3-Aldols. Überwiegt der Anteil des Puffers den Aceton-Anteil im Ansatz (40/60 % (v/v) sowie 20/80 % (v/v) Aceton/Puffer) so wird auch nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden kein quantitativer Umsatz (>95 %) erreicht. Da DL-Prolin als Organokatalysator verwendet wurde, wurde das Aldolprodukt in allen Reaktionsansätzen als Racemat erhalten, sodass die Aldolreaktion nicht enantioselektiv verlief. In allen Reaktionsansätzen lag der Aldoldonor Aceton im Überschuss zum Aldolakzeptor 2,2,2-Trifluoracetophenon vor (ca. 5–27-fach), sodass angenommen werden kann, dass die veränderte Reaktionsgeschwindigkeit und die niedrigeren Umsätze mit der Erhöhung des Anteils an wässrigem Puffer einhergehen. In Hinblick auf

eine mögliche Kombination dieser Aldolreaktion mit der biokatalytischen Reduktion könnte dies problematisch sein, da sich zum einen die Aldolreaktion in Anwesenheit von wässrigen Lösungen (Puffer) verlangsamt und sich zum anderen eine zu hohe Acetonkonzentration nachteilig auf die Aktivität der Biokatalysatoren auswirken könnte.

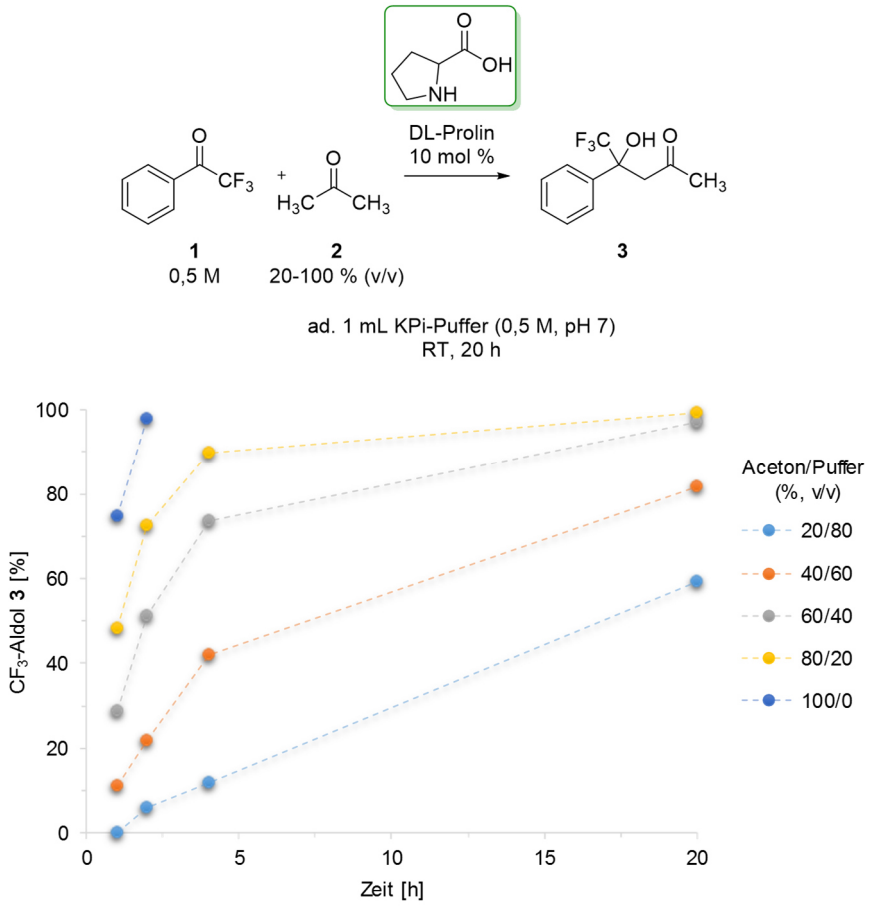


Abbildung 56: Prolin-katalysierte Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton in Abhängigkeit des Aceton/Puffer-Verhältnisses. Folgender Ansatz wurde verwendet: 0,5 M 2,2,2-Trifluoracetophenon, 10 mol% DL-Prolin, 20-100 % (v/v) Aceton/80-0 % (v/v) KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) auf ein Gesamtvolumen von 1 mL, RT, 20 h. Der relative Anteil des Produktes (CF_3-Aldols) wurde mittels GC bestimmt.

3.8.2.2 Versuche zur Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mit Hilfe des „*Singh*“-Katalysators und anschließender biokatalytischen Reduktion

Zur Realisierung des in Schema 21 (siehe Kapitel 3.8) vorgestellten Konzepts zur chemoenzymatischen Synthese von chiralen 1,3-Diolen basierend auf 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton, ist die Kompatibilität der Aldolreaktion mit der biokatalytischen Reduktion ein essentieller Aspekt. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Aldolreaktion von substituierten Benzaldehyden und Aceton

mit Hilfe des *Singh*-Katalysators erfolgreich im wässrigen Milieu durchgeführt werden kann.[85,90,91] DUANGDEE *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die Aldoladdition von 2,2,2-Trifluoracetophenon zu Aceton mit dem (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator und 10 mol% Wasser als Additiv schneller verläuft als in reinem Aceton.[89] Diese Eigenschaft, dass der *Singh*-Katalysator auch in wässrigen Milieu aktiv ist, ist für die Entwicklung einer Eintopfsynthese, also der direkten Kopplung der Aldolreaktion mit der enzymatischen Reduktion, sehr attraktiv. Daher wurde der (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator als Organokatalysator für die weiteren Arbeiten untersucht und verwendet.

Für die Aldolreaktion wurden 0,1 mmol Trifluoracetophenon (**1**, 14 µL) und Aceton **2** im Überschuss (35 Äquivalente, 257 µL) eingesetzt. Die Aldolreaktion wurde bei Raumtemperatur und einer Katalysatorkonzentration von 2 mol% (*S*,*S*)-**5** durchgeführt. Hierbei konnte ein Gesamtumsatz von ca. 95 % erreicht und das (*S*)-β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons **3** enantiomerenangereichert mit einem *ee*-Wert von 91 % nach einer Reaktionszeit von nur 3 Stunden erhalten werden (Abbildung 57), da der eingesetzte Katalysator enantioselektiv ist. Bei längerer Reaktionsdauer wurde kein höherer Umsatz erzielt und es konnte eine leichte Racemisierung des Produktes beobachtet werden, sodass bei t= 22 h der *ee*-Wert für (*S*)-**3** nur noch bei 86 % lag (nicht dargestellt).

Da die Aldolreaktion mit dem *Singh*-Katalysator erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte nun im weiteren Schritt die beschriebene Aldolreaktion mit der biokatalytischen Reduktion als Eintopfverfahren kombiniert werden. Hierfür wurde der zuvor beschriebene Ansatz für die Aldolreaktion verwendet und zusätzlich 0,15 M D-Glucose, 5 mg mL^{-1} FGZK3, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL Tris-HCl Puffer (0,5 M, pH 7) hinzugefügt und die Reaktionsmischung schüttelnd bei RT inkubiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der Reaktionsverlauf mittels GC überprüft. Die Ergebnisse der ersten Eintopfreaktion sind in Tabelle 46 zusammengefasst. Hierbei wird deutlich, dass die Kombination der beiden Einzelschritte als Eintopfreaktion nicht erfolgreich war, da nach einer Reaktionsdauer von 22 Stunden keine Produktbildung bezüglich des Diols beobachtet und nach 102 Stunden nur 1 % Diol gebildet wurde. Die Bildung von Nebenprodukten, welche durch direkte Reduktion des eingesetzten Trifluoracetophenons durch den GZK entstehen könnten, wurde ebenfalls nicht beobachtet.

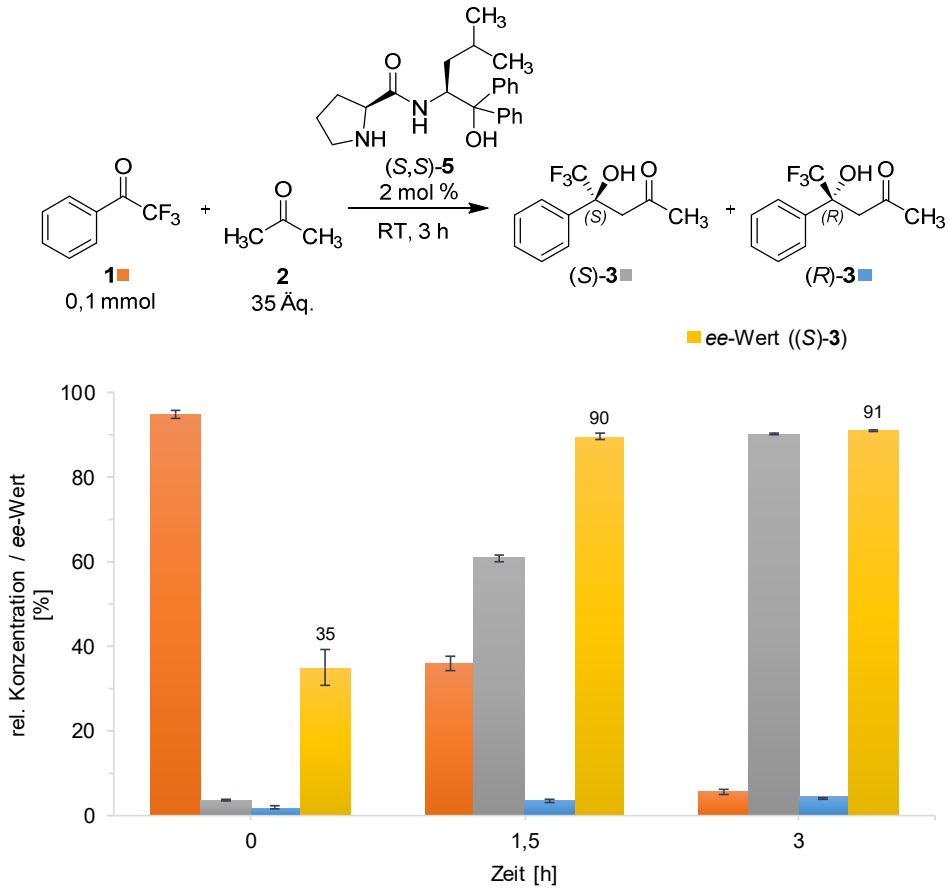
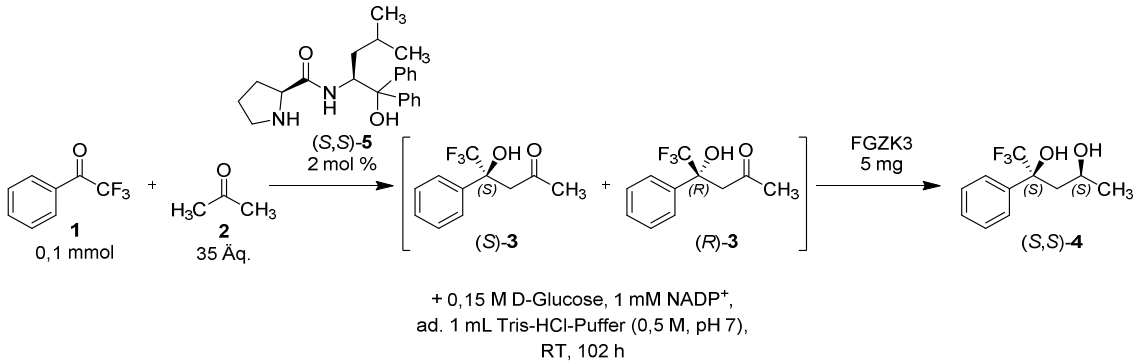


Abbildung 57: Organokatalysierte Aldolreaktion in Aceton als Reaktionsmedium zur Darstellung des (*S*)-β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons **3**. Dargestellt sind die Mittelwerte unter Angabe der Standardabweichung (n=2).

Hinsichtlich der Aldolreaktion betrug der relativer Anteil der Aldolprodukte **3** nach 3 Stunden 97 %, welcher sich im weiteren Verlauf der Reaktion nicht änderte. Bezüglich der Enantioselektivität des *Singh*-Katalysators für die Bildung des (*S*)-β-Trifluormethyl-β-hydroxyketons **3** zeigten sich deutliche Unterschiede zur Aldolreaktion ohne wässriger Phase. Nach 3 Stunden Reaktionszeit betrug der *ee*-Wert für das (*S*)-CF_3-Aldol in wässriger Lösung 16 %, wohingegen der *ee*-Wert bei 91 % ohne wässrige Phase lag. Die Racemisierung des β-Hydroxyketons verstärkte sich zunehmend mit fortlaufender Reaktionszeit, sodass nach t= 22 h der *ee*-Wert bei 6 % und nach 102 Stunden bei 0 % lag (Tabelle 46). Die Anwesenheit von Puffer bzw. wässriger Phase scheint die Selektivität des *Singh*-Katalysators und damit die Aldolreaktion zu beeinflussen und die Racemisierung des Aldolproduktes zu verstärken. Da die Aldolreaktion mit dem *Singh*-Katalysator in Puffer funktioniert und die Intermediate bzw. Aldolprodukte gebildet werden, liegt es nahe, dass die anschließende Reduktion durch den Ganzzellkatalysator nicht abläuft.

Tabelle 46: Erste Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols **4** durch Kombination der organokatalytischen Aldolreaktion und biokatalytischen Reduktion. Die relativen Verhältnisse [%] der einzelnen Komponenten sind angegeben.



Zeit [h]	Edukt **1** [%]	Intermediate [%]			Produkt **4** [%]
		(*S*)-**3**	(*R*)-**3**	*ee* für (*S*)-**3**	
0	72	16	12	14	0
3	3	56	41	16	0
22	3	52	45	6	0
102	3	48	48	0	1

Daraufhin wurden die Aldolreaktion und die biokatalytische Reduktion zeitlich getrennt und sequentiell durchgeführt. Hierfür wurde die Aldolreaktion, wie zuvor beschrieben (0,1 mmol Trifluoracetophenon, 35 Äq. Aceton), durchgeführt und nach einer Reaktionsdauer von 22 Stunden die für die Biokatalyse erforderlichen Komponenten (D-Glucose, $NADP^+$, FGZK3 und Puffer) zur Aldolreaktion hinzugefügt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst. Die Aldolreaktion zeigte, wie die zuvor beschriebenen Reaktionen, hohe Umsätze und gute *ee*-Werte für das (*S*)-CF_3-Aldol vor Zugabe der biokatalytischen Komponenten (Tabelle 47, t= 0 h bis 22 h).

Tabelle 47: Sequentielle Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols **4**. Es wurde der gleiche Reaktionsansatz verwendet wie in Tabelle 46 aufgeführt, wobei die biokatalytischen Komponenten nach 22 Stunden hinzugefügt wurden. Die relativen Verhältnisse [%] der einzelnen Komponenten sind angegeben.

Zeit [h]	Edukt **1** [%]	Intermediate [%]			Produkt **4** [%]
		(*S*)-**3**	(*R*)-**3**	*ee* für (*S*)-**3**	
0	85	10	5	36	0
3	5	91	4	92	0
22	3	90	7	86	0
Zugabe der biokatalytischen Komponenten nach t= 22 h					
25	3	82	15	70	0
102	3	53	34	22	10

Nach Zugabe der biokatalytischen Komponenten sank der *ee*-Wert innerhalb von 3 Stunden von 86 % auf 70 %, sodass erneut eine starke Racemisierung des Aldolproduktes **3** zu beobachten war. Nach einer Reaktionszeit von 102 Stunden konnte die Diolbildung von ursprünglich 1 % in der Eintopfreaktion auf 10 % gesteigert werden (Tabelle 47). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder die hohe Acetonkonzentration (ca. 26 % (v/v) im Ansatz) oder der *Singh*-Katalysator einen negativen Einfluss auf den Ganzzellkatalysator und somit auf die nachgeschaltete Reduktion ausüben.

Aus diesem Grund wurde die Aldolreaktion zunächst für 3,5 Stunden durchgeführt und anschließend einer Aufarbeitung unterzogen, in der das Aceton mit Hilfe der SpeedVac® entfernt wurde. Anschließend wurden die Reduktionskomponenten (D-Glucose, $NADP^+$, FGZK3 und Puffer) hinzugegeben und der Reaktionsverlauf mittels GC analysiert. In Abbildung 58 wird deutlich, dass bereits nach einer Reaktionsdauer von 0,5 h der Diolanteil bei ca. 20 % liegt und dieser stetig ansteigt im Laufe der Reaktionsdauer. Eine Racemisierung der Aldolprodukte mit längerer Reaktionsdauer kann ebenfalls beobachtet werden, sodass bei t= 73 h diese als racemischen Gemisch vorliegen.

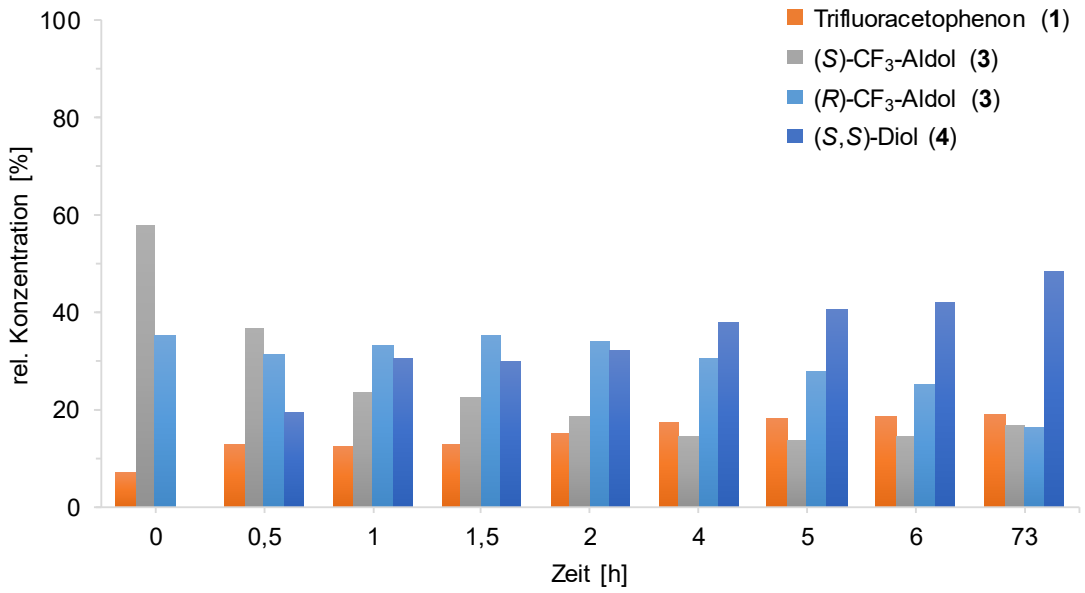


Abbildung 58: Sequentielle Eintopfreaktion mit Aufarbeitung (Entfernung des Acetons). Die Aldolreaktion (0,1 mmol 2,2,2-Trifluoracetophenon, 35 Äq. Aceton (257 µL), 2 mol% (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator) wurde für 3,5 h durchgeführt und das Aceton mittels SpeedVac® entfernt. Anschließend wurden die biokatalytischen Komponenten (0,25 M D-Glucose, 5 mg mL^{-1} FGZK3, 1 mM $NADP^+$, 5 % (v/v) Methanol, auf 1 mL Tris-HCl Puffer (0,5 M, pH 7) hinzugefügt. Dargestellt ist der Reaktionsverlauf nach Zugabe der biokatalytischen Komponenten.

Bezüglich des Eduktes kann beobachtet werden, dass sich der Anteil in der Gesamtreaktion mit fortlaufender Reaktionszeit erhöht (Abbildung 58). Es zeigt sich also, dass sich durch die Entfernung des Acetons, dem Aldoldonor, sich das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Retro-Aldolreaktion verschiebt. Im Zuge der Retro-Aldolreaktion würden die Aldolprodukte in die Edukte Trifluoracetophenon und Aceton gespalten werden und zu einer Erhöhung der Eduktkonzentration führen. Nach einer Reaktionszeit von 73 h konnte durch die Entfernung des Acetons nach der organokatalysierten Aldolreaktion der Diolanteil auf 48 % gesteigert werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass Aceton eine kritische Rolle sowohl für die Aldolreaktion als auch für die nachgeschaltete Bioreduktion spielt. Daher wurde der Einfluss von Aceton auf die Biokatalysatoren PPADH1 und GDH untersucht.

3.8.2.3 Einfluss von Aceton auf die Biokatalysatoren

Zunächst wurde der Einfluss von Aceton auf die Aktivitäten der PPADH und GDH photometrisch untersucht. Hierfür wurden Substratlösungen (20 mM Benzaldehyd/ 100 mM D-Glucose in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7) mit unterschiedlichen Acetonmengen (0-50 % v/v) hergestellt und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen. In Abbildung 59 ist erkennbar, dass mit steigender Acetonkonzentration im Ansatz die Aktivität beider Enzyme in linearer Korrelation sinkt. Mit 20 % (v/v) Aceton im Ansatz halbiert sich die Aktivität von PPADH und GDH im Vergleich zu den Aktivitäten ohne Zusatz von Aceton.

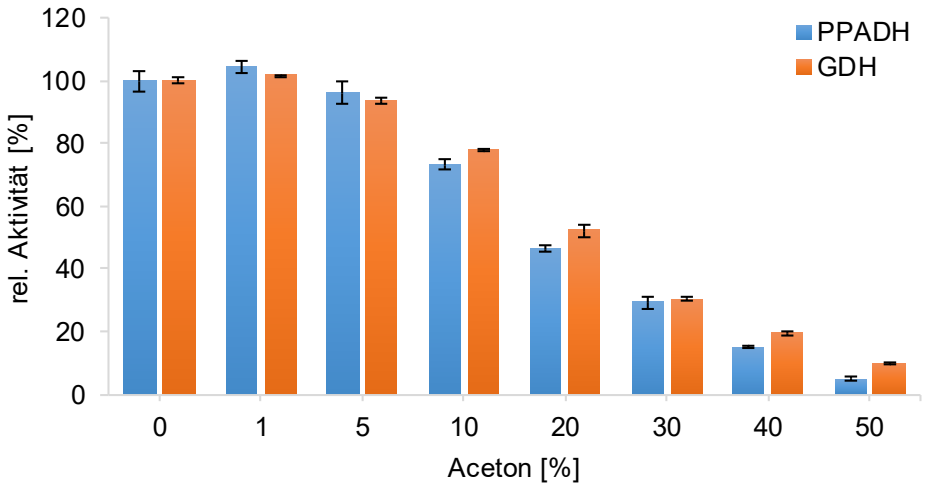


Abbildung 59: Einfluss von Aceton auf die Aktivitäten der PPADH und GDH. Benzaldehyd wurde als Substrat für die PPADH (Reduktion) und D-Glucose als Substrat für die GDH (Oxidation) verwendet. Relative Aktivitäten sind angegeben, wobei 100 % den Aktivitäten ohne Aceton von 51,3 U mg^{-1} für die gereinigte PPADH und 9,3 U mg^{-1} für die GDH (Rohextrakt) entsprechen. Aceton [%] bezieht sich auf den Anteil (v/v) im Gesamtansatz (1 mL).

In Anbetracht der eingesetzten Acetonkonzentration in der Eintopfreaktion (35 Äq.), welche ca. 26 % (v/v) entspricht und der Reaktionsdauer von mehreren Stunden, kann dies die Aktivitäten des Ganzzellkatalysators erheblich reduzieren. Die Reduzierung der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit der Acetonkonzentration könnte durch eine verminderte Enzymstabilität durch Aceton verursacht werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Stabilität der gereinigten PPADH untersucht. Hierfür wurde ein Aliquot des Enzyms in 20 % (v/v) Aceton und einmal ohne Aceton auf Eis inkubiert und anschließend die Restaktivität für die Reduktion von Benzaldehyd (20 mM in 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7) nach ausgewählten Zeitpunkten photometrisch bestimmt (Abbildung 60). Die Inkubation der PPADH in 20 % (v/v) Aceton scheint kaum einen Einfluss auf die Stabilität der ADH zu haben, da sich die Aktivität nach 2 Stunden Inkubation nur minimal verringert im Vergleich zur Aktivität zum Zeitpunkt t= 0 h. Allgemein kann gesagt werden, dass die PPADH in Anwesenheit von 20 % (v/v) Aceton über eine längere Inkubationsdauer stabil bleibt.

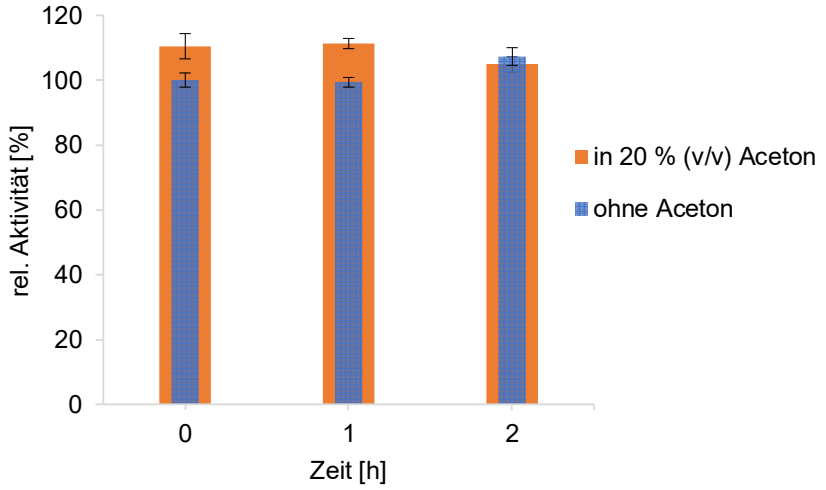


Abbildung 60: Einfluss von Aceton auf die Stabilität der PPADH. Aliquots der gereinigten PPADH wurden mit 20 % Aceton (v/v) und ohne Aceton auf Eis inkubiert und anschließend für die Reduktion von Benzaldehyd verwendet. Relative Aktivitäten sind angegeben, wobei 100 % einer Aktivität von 56,6 U mg^{-1} entspricht (ohne Aceton, t= 0 h).

Die aus Abbildung 59 hervorgegangenen Ergebnisse können daher nicht durch die Instabilität des Enzyms begründet werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Aceton auf die Enzymkinetik näher untersucht. Hierfür wurden für das Substrat Benzaldehyd die kinetischen Daten ohne Aceton, mit 1 M und 2 M Aceton (entspricht 7,4 % und 14,7 % (v/v) im Gesamtansatz) bestimmt und die Anfangs-reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte sowohl mittels nicht-lineare Regression unter

Verwendung der Software GraphPad Prism 5 als auch durch doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 61). Anhand der Michaelis-Menten-Kurvenverläufe ist erkennbar, dass Aceton einen deutlichen Einfluss auf die Kinetik der PPADH ausübt.

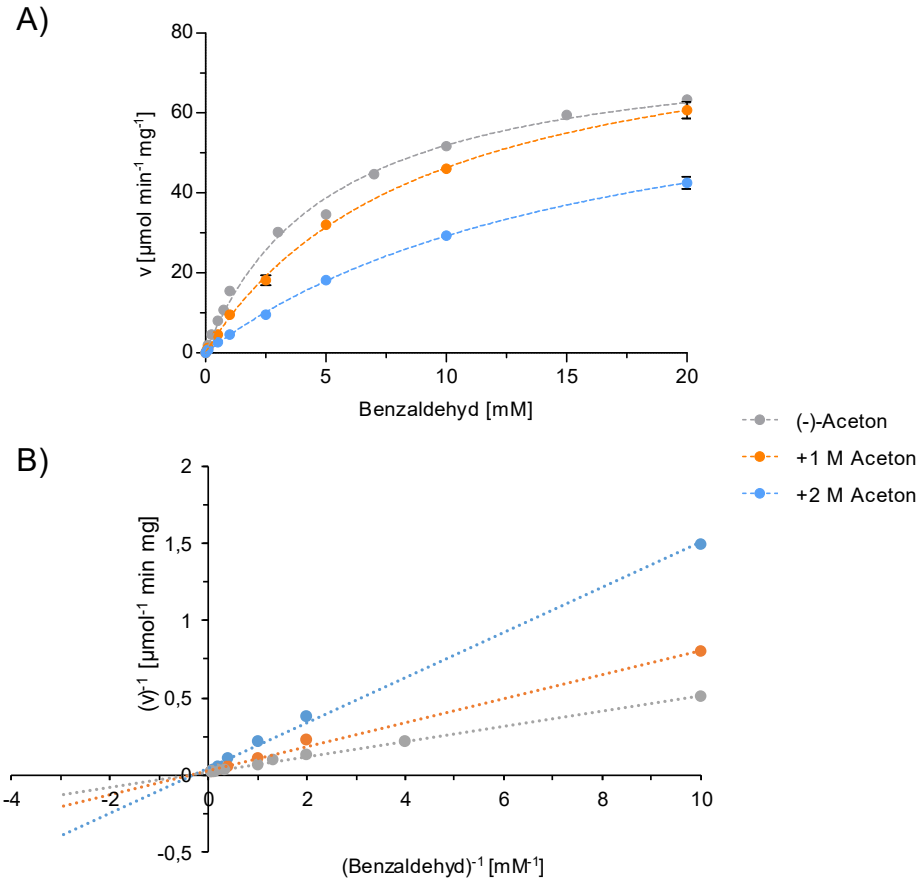


Abbildung 61: Kinetik-Messung der PPADH in Abhängigkeit der Acetonkonzentration für das Substrat Benzaldehyd nach Michaelis-Menten (A) und Lineweaver-Burk (B).

In Anwesenheit von 1 M Aceton, verschiebt sich der Kurvenverlauf nach unten, also hin zu niedrigeren Aktivitäten, im Vergleich zum Kurvenverlauf ohne Aceton. Dieser Unterschied wird insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen (<15 mM) deutlich, während bei 20 mM nahezu die gleichen Reaktionsgeschwindigkeiten gemessen wurde. Während die Kurven der Messungen ohne Aceton und 1 M Aceton einen hyperbolen Verlauf zeigen, verläuft die Kurve der Messung mit 2 M Aceton anfangs linear und anschließend schwach asymptotisch. Insgesamt ist dieser Kurvenverlauf stark nach unten in Richtung niedrigerer Aktivitäten verschoben im Vergleich zu den Kurvenverläufen ohne und mit 1 M Aceton (Abbildung 61A).

Durch die doppelt-reziproke Auftragung wird der Einfluss von Aceton auf die Kinetik der PPADH deutlicher. Je höher die Acetonkonzentration ist, desto größer ist die Steigung der Geraden. Auffällig ist hierbei, dass die drei Geraden einen ähnlichen y-Achsenabschnitt aufweisen (Abbildung 61B).

Die kinetischen Parameter der beiden Kinetik-Modelle sind in Tabelle 48 zusammengefasst. Nach Michaelis-Menten scheint Aceton einen starken Einfluss auf die Substrataffinität auszuüben, sodass sich der K_M-Wert von 5,2 mM auf nahezu das doppelte (9,0 mM) verschlechtert mit 1 M Aceton. Bei Erhöhung der Acetonkonzentration auf 2 M verschlechtert sich der K_M-Wert erneut auf 16,8 mM. Der V_{max}-Wert wird durch die Anwesenheit von Aceton kaum beeinflusst und liegt zwischen 78 und 88 U mg^{-1} (Tabelle 48A). Diese Ergebnisse deuten auf eine kompetitive Inhibition hin. Betrachtet man nun die kinetischen Parameter, welche nach Linearisierung (Lineweaver-Burk) ermittelt wurden, so zeigt sich ein deutlicher Einfluss von Aceton auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max}. Ohne Aceton wird ein V_{max}-Wert von ca. 55 U mg^{-1}, mit 1 M Aceton von ca. 40 U mg^{-1} und mit 2 M Aceton von ca. 23 U mg^{-1} erreicht. Der K_M-Wert hingegen ändert sich nur minimal von 2,7 mM (ohne Aceton), auf 3,1 mM (1 M Aceton) und 3,4 mM mit 2 M Aceton. Mit steigender Acetonkonzentration sinkt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit stark ab. Diese Ergebnisse deuten eher auf eine nicht-kompetitive oder gemischte Inhibition hin.

Tabelle 48: Bestimmung kinetischer Parameter für die Reduktion von Benzaldehyd mit nicht-linearer Regression (A) und Lineweaver-Burk (B) in Abhängigkeit der Acetonkonzentration.

	A) Nicht-lineare Regression (Michaelis-Menten)		B) Doppelt-reziproke Auftragung (Lineweaver-Burk)	
Additiv	K_M [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]	K_M [mM]	V_{max} [µmol min^{-1} mg^{-1}]
ohne Aceton	5,2	78,8	2,7	55,2
+ 1 M Aceton	9,0	87,9	3,1	39,7
+ 2 M Aceton	16,8	78,4	3,4	23,1

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in Anwesenheit von Aceton sich die Enzymkinetik der PPADH ändert, wobei der K_M- als auch der V_{max}-Wert beeinflusst werden. Dieser Effekt macht sich bei hohen Acetonkonzentrationen besonders bemerkbar. Aus diesem Grund sollten hohe Konzentrationen an Aceton in Biotransformationen vermieden werden, damit die PPADH unter optimalen Bedingungen arbeiten kann. In Hinblick auf die durchgeführten Eintopfreaktionen, insbesondere der

eingesetzten Acetonmenge für die Aldolreaktion, könnte die nachgeschaltete Biotransformation durch Aceton inhibiert worden sein, wodurch es nicht zur Diolbildung kommt. Daher sollte die Eintopfreaktion hinsichtlich des Parameters Aceton optimiert werden.

3.8.3 Optimierungen der chemoenzymatischen Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole

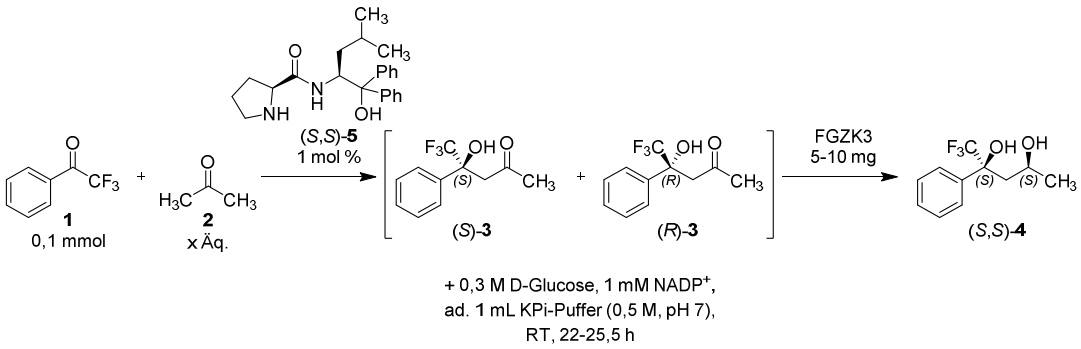
Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine sequentielle chemoenzymatische Eintopfreaktion, welche eine organokatalysierte Aldolreaktion mit einer biokatalysierten Reduktion des Aldolprodukts kombiniert, für die Synthese eines chiralen 1,3-Diols realisiert werden konnte. Beim Versuch die beiden Reaktionen in der Eintopfreaktion zeitgleich ablaufen zu lassen, konnte eine Inkompatibilität festgestellt werden. Nähere Untersuchungen konnten Aceton als „Engpass“ („*bottleneck*“) bzw. Inhibitor der biokatalytischen Reduktion identifizieren, sodass die Eintopfreaktion nun hinsichtlich des Faktors Aceton untersucht und optimiert werden sollte.

3.8.3.1 Variation der Acetonkonzentration

Als Konsequenz der festgestellten Ergebnisse wurde die Acetonkonzentration der Aldolreaktion variiert und die Eintopfreaktion mit 1-20 Äquivalenten Aceton durchgeführt. Unter Verwendung von 100 mM Substrat (2,2,2-Trifluoracetophenon), 1 mol-% Organokatalysator **5**, 1-20 Äq. Aceton **2** sowie den Komponenten der Biotransformation (0,3 M D-Glucose, 1 mM $NADP^+$ und 5-10 mg FGZK3), wurde die Bildung des Diols **4** in Abhängigkeit der eingesetzten Acetonäquivalente mittels GC analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 49 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen (Einfluss von Aceton), führte die Abnahme der Acetonäquivalente von 20 auf 5 Äquivalenten zu höherer Diolbildung von bis zu 78 % (Tabelle 49, Eintrag 1-3). Dies bestätigt die Annahme, dass Aceton die kritische Komponente für die nachgeschaltete Biotransformation ist. Eine weitere Senkung der Acetonäquivalente von 5 auf 1 führte hierbei nicht zu höheren Umsätzen, sondern bewirkte eher das Gegenteil: Die Diolbildung reduzierte sich von 80 % auf 58 % (Tabelle 49, Eintrag 4-6). Es kann davon ausgegangen werden, dass ein minimaler Überschuss an Aceton als Aldoldonor zur Überwindung der thermodynamischen Limitierung der Aldolreaktion aufgrund der Retro-Aldolreaktion benötigt wird. Der Überschuss an Aceton soll die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der Aldolreaktion und des Aldolprodukts gewährleisten. Durch die nachgeschaltete Biotransformation wird das Gleichgewicht Richtung

Aldolreaktion zusätzlich verschoben, da das Aldolprodukt kontinuierlich durch Reduktion zum Diol aus der Reaktion entfernt wird. Eine kinetische Betrachtung der Eintopfreaktion mit 5 Äquivalenten Aceton sowie der Aldolreaktion ohne Biotransformation ist in Abbildung 62 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Aldolreaktionen der beiden Ansätze mit 5 Äquivalenten Aceton gut funktioniert, sodass mit fortschreitender Reaktionsdauer der Eduktanteil sinkt und bei t= 1,5 h bei 3-4 % liegt.

Tabelle 49: Optimierung der Eintopfreaktion durch Variation der eingesetzten Acetonäquivalente.



Eintrag	Äquivalente Aceton (**2**)	Reaktionszeit [h]	Diol (**4**) [%]
1[a]	20	25,5	40
2[a]	10	25,5	63
3[a]	5	25,5	78
4[b]	5	22	80
5[b]	2,5	22	80
6[b]	1	22	58

[a]5 mg FGZK3 (ZFM).
[b]10 mg FGZK3 (ZFM).

Bei der Eintopfreaktion scheint die Reduktion nach einer Reaktionszeit von t= 0,5 h zu beginnen, sodass das (*S*)-CF_3-Aldol zum korrespondierenden Diol reduziert wird. Der höchste prozentuale Anteil an gebildeten (*S*)-CF_3-Aldol ist bei t= 1,5 h mit einem *ee* von nur 9 % zu beobachten. Der prozentuale Anteil des (*R*)-CF_3-Aldols steigt hingegen bis zur einer Reaktionsdauer von t= 2,5 h auf 45 % an. Nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden liegt dieser nur noch bei 16 %, sodass angenommen werden kann, dass eine Racemisierung stattfindet. Nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden konnte ein prozentualer Anteil von ca. 74 % Diol erreicht werden (Abbildung 62A). Bei der Aldolreaktion ohne nachgeschalteter Biotransformation wird der höchste prozentuale Anteil an gebildetem (*S*)-CF_3-Aldol ebenfalls bei t= 1,5 h mit einem *ee* von nur 28 % zu beobachten. Hier kann ebenfalls eine Racemisierung der Aldolprodukte anhand des *ee*-Wertes bei längerer Reaktionszeit beobachtet werden. Der *ee*-Wert von 31 % bei t= 0,5 h verschlechtert sich auf 22 % innerhalb von 2,5 h. Nach t= 21 h liegt das

Aldolprodukt nahezu als racemisches Gemisch (1 % *ee*) vor (Abbildung 62B). Die beobachtete Racemisierung des Aldolprodukts bei längerer Reaktionsdauer in Kombination mit der enantioselektiven Reduktion des (*S*)-CF_3-Aldols zum korrespondierenden Diol resultiert in eine dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR), welche theoretisch zu einer Diol-Ausbeute von 100 % führen kann. Da beim Einsatz von 5 und 2,5 Äquivalenten Aceton in der Eintopfreaktion keine Verbesserung bezüglich der Diolbildung beobachtet wurde (Tabelle 49, Eintrag 4-5), wurde für weitere Optimierungen der Eintopfreaktion standardmäßig 2,5 Äquivalente Aceton eingesetzt. Weitere Experimente zur Verbesserung der DKR und der Diolbildung wurden daher durchgeführt.

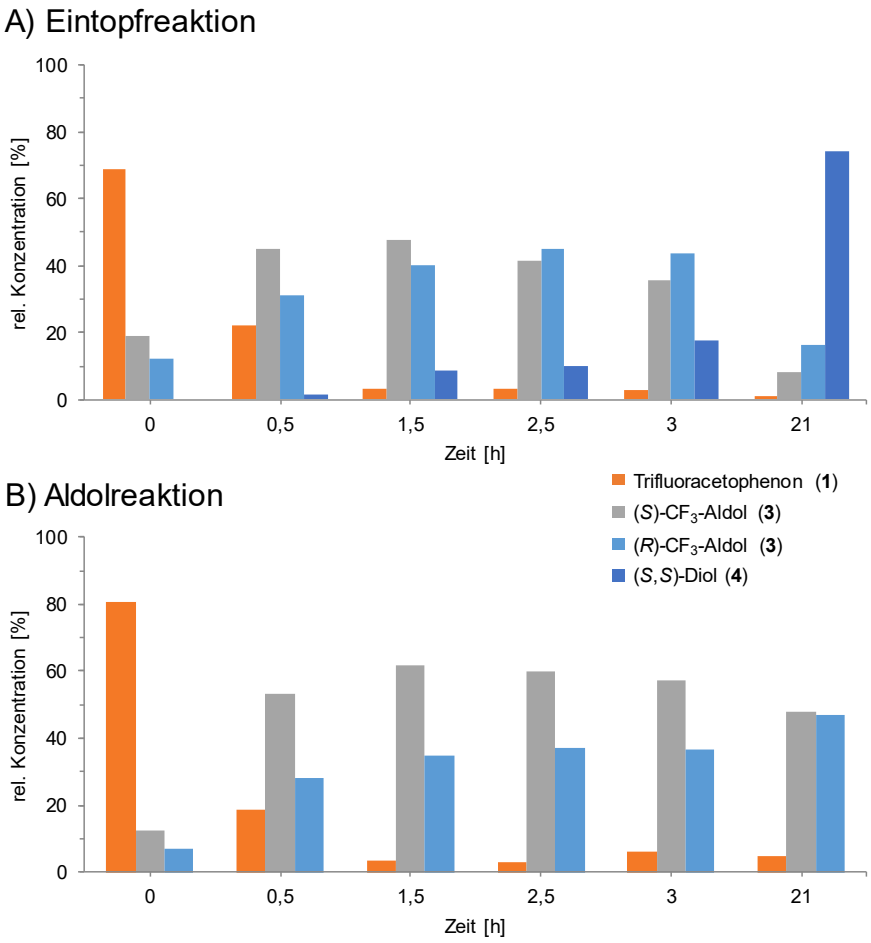


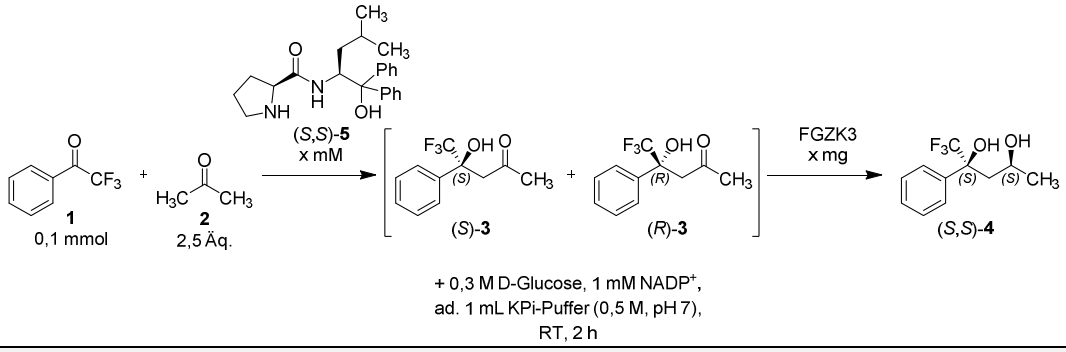
Abbildung 62: Kinetische Betrachtung der Eintopfreaktion (A) und der Aldolreaktion (B) mit 5 Äquivalenten Aceton in Puffer. Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen: A) 0,1 mmol 2,2,2-Trifluoracetophenon, 5 Äq. Aceton (37 µL), 1 mol% (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator + 0,3 M D-Glucose, 5 mg mL^{-1} FGZK3, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer Puffer (0,5 M, pH 7); B) 0,1 mmol 2,2,2-Trifluoracetophenon, 5 Äq. Aceton (37 µL), 1 mol% (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator auf 1 mL KPi-Puffer Puffer (0,5 M, pH 7), 21 h, 25 °C.

3.8.3.2 Variation der Katalysatorkonzentrationen

Nachdem gute Umsätze in den ersten Experimenten nach Optimierung der Acetonkonzentration erreicht wurden, folgten weitere Verbesserungen der Eintopfreaktion mit Fokus auf die Katalysatorkonzentration, um das beste Verhältnis zwischen Organokatalysator und Ganzzellkatalysator zu bestimmen und die Diolbildung zu steigern. In früheren mechanistischen Studien der asymmetrischen organokatalysierten Aldolreaktion konnte ein bedeutender Einfluss der Katalysatorbeladung auf den Umsatz und die Enantioselektivität beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit höherer Katalysatorbeladung die anfangs kinetisch kontrollierte Aldolreaktion mit fortschreitender Reaktionszeit einer thermodynamischen Kontrolle unterliegt und zu den thermodynamisch favorisierten Racemat als Produkt führt.[89,91] Eine Racemisierung des Aldolprodukts in Abhängigkeit von der Reaktionszeit konnte in den bisher durchgeführten Experimenten ebenfalls beobachtet werden. In Anbetracht der Eintopfreaktion ist eine schnelle Racemisierung des Aldolprodukts von Vorteil, um kontinuierlich neues (*S*)-CF_3-Aldol für die nachgeschaltete, enantioselektive Reduktion zur Verfügung zu stellen. Die Eintopfreaktion wurde wie zuvor beschrieben (100 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon (**1**), 2,5 Äq. Aceton (**2**), 0,3 M D-Glucose, 1 mM $NADP^+$) durchgeführt, jedoch mit variierender Katalysatorkonzentrationen von 0,2-1,0 mM *Singh*-Katalysator **5** und 5-20 mg mL^{-1} FGZK3. Die Ergebnisse dieser Umsetzungen sind in Tabelle 50 dargestellt und entsprechen den gemessenen Verhältnissen zum Zeitpunkt t= 2 h. Mit steigender Konzentration des *Singh*-Katalysators steigt auch der Anteil des Aldolprodukts **3**, sodass die Aldolreaktion mit steigender Katalysatorbeladung schneller abläuft. Mit 0,2 mM *Singh*-Katalysator und 5 mg FGZK3 konnte nach 2 Stunden kein Diol nachgewiesen werden (Tabelle 50, Eintrag 1), wird die Konzentration des *Singh*-Katalysators erhöht, so steigt auch die Diolbildung. Erhöht man zusätzlich die Menge des Ganzzellkatalysators FGZK3, so kann eine weitere Steigerung des Diolanteils beobachtet werden. Der höchste Diolanteil von 49 % konnte bei der Verwendung von 1 mM *Singh*-Katalysator und 20 mM FGZK3 nach 2 Stunden erreicht werden. Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden lag der Diolanteil bei 77 %. Bei Verwendung geringer Konzentrationen des Organokatalysators (0,2-0,5 mM) in Kombination mit hohen Mengen an FGZK3 (10-20 mg) konnte nach längerer Reaktionszeit eine vermehrte Bildung von Nebenprodukten ((*R*)- bzw. (*S*)-Trifluorphenylethanol **6**) beobachtet werden, welche durch die direkte Reduktion des Edukts 2,2,2-Trifluoracetophenon durch den GZK entstehen. Da die Aldolreaktion mit geringen Konzentrationen an Organokatalysator langsamer abläuft, steht zum einen weniger Aldolprodukt für die Reduktion zur Verfügung und zum anderen bleibt die

Eduktkonzentration in Gegenwart des GZKs sehr hoch, wodurch es bei längerer Reaktionszeit zur Reduktion des Edukts und zur Bildung von Nebenprodukten kommt.

Tabelle 50: Variation der Katalysatorkonzentrationen (*Singh*-Katalysator und FGZK3) in der Eintopfreaktion.



Eintrag	*Singh*-Katalysator **5** [mM]	FGZK3 [mg]	Edukt **1** [%]	Intermediate [%]		(*S*,*S*)-Diol **4** [%]
				(*S*)-**3**	(*R*)-**3**	
1	0,2	5	72	17	11	0
2	0,2	7,5	67	16	13	3
3	0,2	10	71	13	12	5
4	0,2	20	77	6	10	7
5	0,5	5	37	36	23	4
6	0,5	7,5	37	32	24	7
7	0,5	10	33	28	25	14
8	0,5	20	50	12	19	19
9	0,75	5	15	42	31	12
10	0,75	7,5	15	36	31	18
11	0,75	10	21	27	30	23
12	0,75	20	27	11	26	37
13	1	5	10	41	34	15
14	1	7,5	11	34	34	22
15	1	10	9	24	33	33
16	1	20	9	9	33	49

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Erhöhung des Organokatalysators als auch die des Ganzzellkatalysators in der Eintopfreaktion zu einer höheren Diolbildung führen. Jedoch sollte die Kombination geringe Organokatalysator-Konzentration und hohe Ganzzellkatalysator-Menge vermieden werden, da diese Bedingung die Bildung von Nebenprodukten (Trifluorphenylethanol **6**) begünstigt.

3.8.3.3 Optimierte Eintopfreaktion zur Synthese des chiralen 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** im 1 mL-Maßstab und *Scale-up*

Um die Aldolreaktion zur Vermeidung der Bildung von unerwünschten Nebenprodukten, noch schneller ablaufen zu lassen und zusätzlich eine schnellere Racemisierung der Aldolprodukte zu erreichen, wurde die Konzentration des *Singh*-Katalysators auf 5 mM erhöht. Die Eintopfreaktion wurde anschließend mit folgender Zusammensetzung wiederholt: 100 mM Edukt **1**, 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 0,5 M D-Glucose, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Der kinetische Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 63 dargestellt. Bereits zu Beginn der Reaktion (t= 0,25 h) lag der Eduktanteil nur bei 21 %, sodass die Aldolreaktion mit 5 mM Organokatalysator anscheinend sehr schnell verlief. Die nachfolgende Reduktion des Aldolprodukts konnte zu diesem Zeitpunkt ebenso beobachtet werden, sodass der Diolanteil bei 22 % lag. Im Laufe der Reaktion konnte ein kontinuierlicher Anstieg des Diolanteils beobachtet werden, der nach 8 Stunden bei 95 % lag.

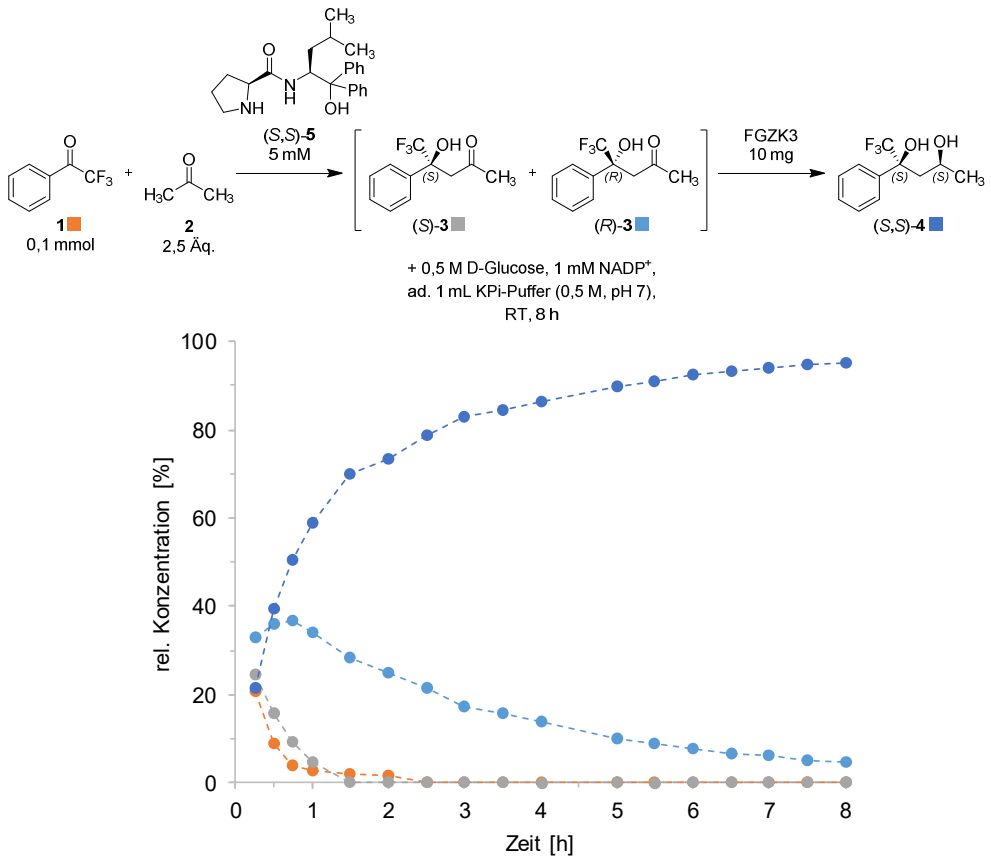
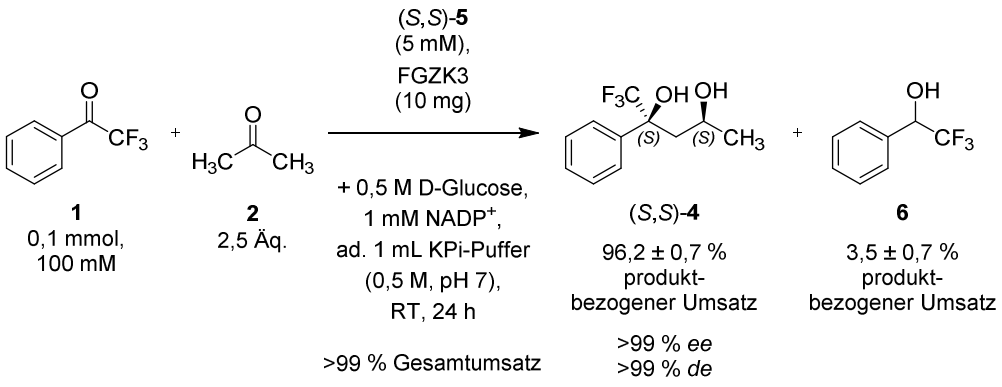


Abbildung 63: Kinetischer Verlauf der optimierten Eintopfreaktion zur asymmetrischen Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4**. Angegeben sind relative Konzentrationen in % sind angegeben, sie wurden mit chiraler GC bestimmt. Die Nebenproduktbildung (in der Regel <5 %) wurde hier vernachlässigt.

Anhand des zeitlichen Verlaufs wird deutlich, dass der prozentuelle Anteil des (*R*)-CF_3-Aldols bis t= 0,75 h zunächst minimal steigt, im weiteren Verlauf der Reaktion jedoch kontinuierlich im Zuge einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung, bedingt durch die hohe Katalysatorbeladung, sinkt. Es wird angenommen, dass durch die hohe Katalysatorbeladung eine verstärkte Racemisierung des Aldolprodukts stattfindet. Vermutlich erfolgt die Racemisierung über die Retro-Aldolreaktion, welche unter thermodynamischer Kontrolle zur Bildung des favorisierten racemischen Aldolprodukts führt. Dadurch würde neues (*S*)-CF_3-Aldol als Substrat für den Ganzzellkatalysator zur Verfügung stehen, welches direkt zum Diol reduziert werden könnte. Der kinetische Verlauf (Abbildung 63) unterstützt diese Annahme, da nach t= 1,5 h trotz steigender Diolkonzentration kein (*S*)-CF_3-Aldol mehr nachweisbar war.

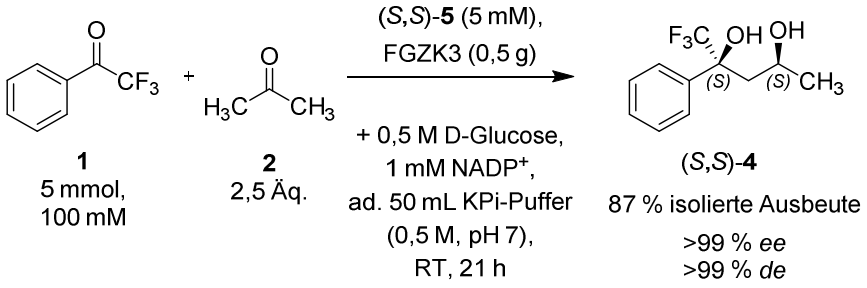
Mit den optimierten Reaktionsbedingungen in der Hand konnte ein produktbezogener Umsatz von ca. 96 % für das (*S*,*S*)-Diol **4** erhalten werden, wobei hervorragende Diastereo- und Enantioselektivitäten von >99 % *de* und *ee* erreicht wurden (Schema 24). Aufgrund der hohen Substratspezifität des Biokatalysators und der schnell ablaufenden Aldolreaktion wurde nur wenig Nebenprodukt **6** (<5 %) in der Eintopfreaktion gebildet.



Schema 24: Eintopfreaktion zur Synthese des (*S*,*S*)-Diols **4**. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten mit Standardabweichung sind angegeben. Umsätze wurden mittels chiraler GC bestimmt. Die Reinheit des Diols (*ee* und *de*) wurde mittels chiraler HPLC bestimmt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die in diesem Kapitel beschriebenen Optimierungen zur Synthese des chiralen 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** mittels Kombination einer organokatalysierten Aldolreaktion und biokatalytischen Reduktion in einer Eintopfreaktion erfolgreich hinsichtlich Effizienz und Selektivität etabliert werden konnte. Dabei konnte auf die Isolierung des Zwischenprodukts (β-Hydroxyketon **3**) verzichtet werden.

Aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse im 1 mL-Maßstab wurde die Robustheit des neu entwickelten Systems im präparativen Maßstab überprüft. Hierbei konnte die Eintopfreaktion mit einer Substratkonzentration von 100 mM in 50 mL Reaktionsvolumen realisiert werden und das 1,3-Diols (*S*,*S*)-4 nach einer Reaktionszeit von 21 Stunden ebenfalls enantiomeren- als auch diastereomerenrein (>99 % *ee* und *de*) in 87 % isolierter Ausbeute nach Säulenchromatographie erhalten werden (Schema 25).



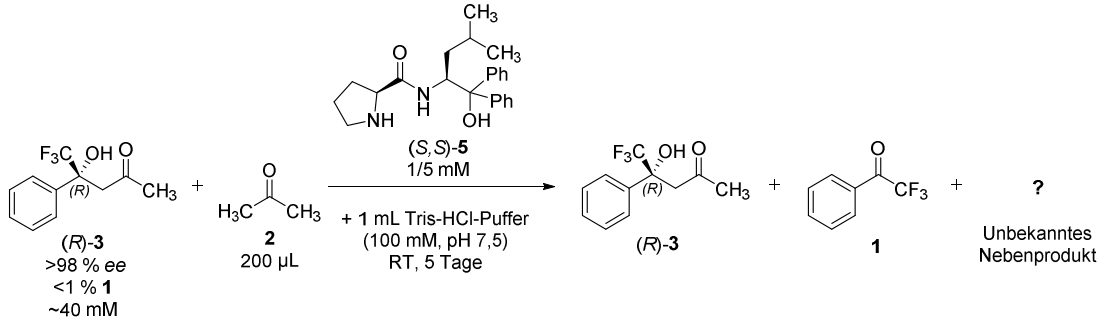
Schema 25: Präparative Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-4 bei einer Substratkonzentration von 100 mM im 50 mL-Maßstab.

3.8.3.4 Untersuchung des Reaktionsmechanismus einer möglichen Retro-Aldolreaktion

In den vorherigen Kapiteln konnte beobachtet werden, dass eine Racemisierung des Aldolprodukts in Abhängigkeit der Reaktionszeit beobachtet wurde und diese Racemisierung in Kombination mit der nachgeschalteten enantioselektiven Reduktion des (*S*)-Aldolprodukts durch den Biokatalysator in einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung resultierte. In früheren mechanistischen Studien der asymmetrischen organokatalysierten Aldolreaktion konnte gezeigt werden, dass mit höherer Katalysatorbeladung die anfangs kinetisch kontrollierte Aldolreaktion mit fortschreitender Reaktionszeit einer thermodynamischen Kontrolle unterliegt und zu den thermodynamisch favorisierten Racemat als Produkt führt.[89,91] Hierbei wurde angenommen, dass die Racemisierung über die Rückreaktion, also der Retro-Aldolreaktion, erfolgen müsste. Diese Hypothese kann für die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mit dem (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator und der beobachteten Racemisierung ebenfalls in Betracht gezogen werden. Um diese Hypothese experimentell zu untermauern, wurde das hoch enantiomerenangereicherte (*R*)-CF_3-Aldol (>98 % *ee*) aus einer Racematspaltung mit der PPADH isoliert und mit 200 µL Aceton sowie 1 und 5 mM *Singh*-Katalysator **5** einer Aldolreaktion unterzogen (Tabelle 51). Es wurde vermutet, dass unter thermodynamischer Kontrolle bedingt durch eine Retro-Aldolreaktion die Enantioselektivität bei längerer Reaktionszeit abnimmt.

Tatsächlich konnte dies auch beobachtet werden, sodass nach fünf Tagen Reaktionszeit der ursprüngliche *ee*-Wert des (*R*)-CF_3-Aldols von >98 % auf 89 % beim Ansatz mit 1 mM *Singh*-Katalysator und auf 70 % *ee* bei 5 mM *Singh*-Katalysator abnahm (Tabelle 51, Eintrag 3 und 6). Der *ee*-Wert des (*R*)-CF_3-Aldols im Kontrollansatz (ohne *Singh*-Katalysator) blieb dabei unverändert bei >98 %. Neben geringen Mengen des 2,2,2-Trifluoracetophenons wurde die Bildung eines weiteren Signalpeaks im GC beobachtet. Dieses unbekannte Nebenprodukt wurde erst bei längerer Reaktionsdauer gebildet. Auffällig war, dass der Anteil des unbekannten Nebenprodukts im Ansatz mit 5 mM *Singh*-Katalysator höher war als mit 1 mM. Es wird vermutet, dass es sich womöglich um das Enon, also dem Dehydrierungsprodukt des CF_3-Aldols handeln könnte. Insgesamt liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion trotz hoher Katalysatorbeladung stark auf der Seite des CF_3-Aldols, sodass die Racemisierung in diesem Experiment nur sehr langsam verläuft. Der hohe Überschuss an eingesetzten Aceton (hier 200 µL) könnte die Verschiebung des Gleichgewichts begünstigen. Trotz dieser sehr langsamen Racemisierung ist diese Reaktion die einzig denkbare zur Erklärung der nahezu vollständigen Umsetzung in der Eintopfreaktion entsprechend Abbildung 63. Zusammenfassend kann nur vermutet werden, dass die Racemisierung über einer Retro-Aldolreaktion verläuft, da mechanistisch keine andere Erklärung gegeben werden kann.

Tabelle 51: Untersuchung einer möglichen Retro-Aldolreaktion bei Einsatz des (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator **5** unter Verwendung von hoch enantiomerenangereichertem (*R*)-CF_3-Aldol. Relative Anteile von Edukt und Nebenprodukt sind angegeben in [%].



Eintrag	Katalysator **5** [mM]	Zeit [h/Tage]	Edukt **1** [%]	*ee* von (*R*)-CF_3-Aldol **3** [%]	Unbekanntes Nebenprodukt [%]
1	1	3 h	4	>98	0
2	1	26 h	3	94	2
3	1	5 Tage	2	89	8
4	5	3 h	3	>98	0
5	5	26 h	2	89	9
6	5	5 Tage	1	70	29

3.8.3.5 Weitere Optimierungen der chemoenzymatischen Eintopfreaktion hinsichtlich Komponenten der Biotransformation

3.8.3.5.1 Optimierungen bezüglich der eingesetzten $NADP^+$-Menge

Die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren bietet nicht nur den Vorteil, dass aufwendige Arbeitsschritte wie Zellaufschluss und Proteinreinigung entfallen, auch auf den externen Zusatz von Cofaktoren kann hierbei theoretisch verzichtet werden. Hierbei nutzt man die intrazellulären Cofaktormengen, welche durch den eigenen Zellmetabolismus bereitgestellt werden. In allen bisher durchgeführten Biotransformationen als auch Eintopfreaktionen mit dem Ganzzellkatalysator wurde 1 mM $NADP^+$ zugesetzt. Daher sollte nun überprüft werden, ob die bisher eingesetzte $NADP^+$-Konzentration reduziert oder sogar auf den externen Zusatz des Cofaktors verzichtet werden kann. Hierfür wurden folgende Ansätze verwendet: 100 mM Edukt **1**, 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 0,5 M D-Glucose, 0-1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Nach einer Reaktionszeit von 21 h wurden GC-Proben entnommen und die Produktbildung des Diols **4** sowie des Nebenprodukts **6** bestimmt. In Abbildung 64 ist erkennbar, dass sich die Diolbildung beim Zusatz von 0,5 mM und 1 mM $NADP^+$ kaum unterscheidet und bei 92-93 % liegt.

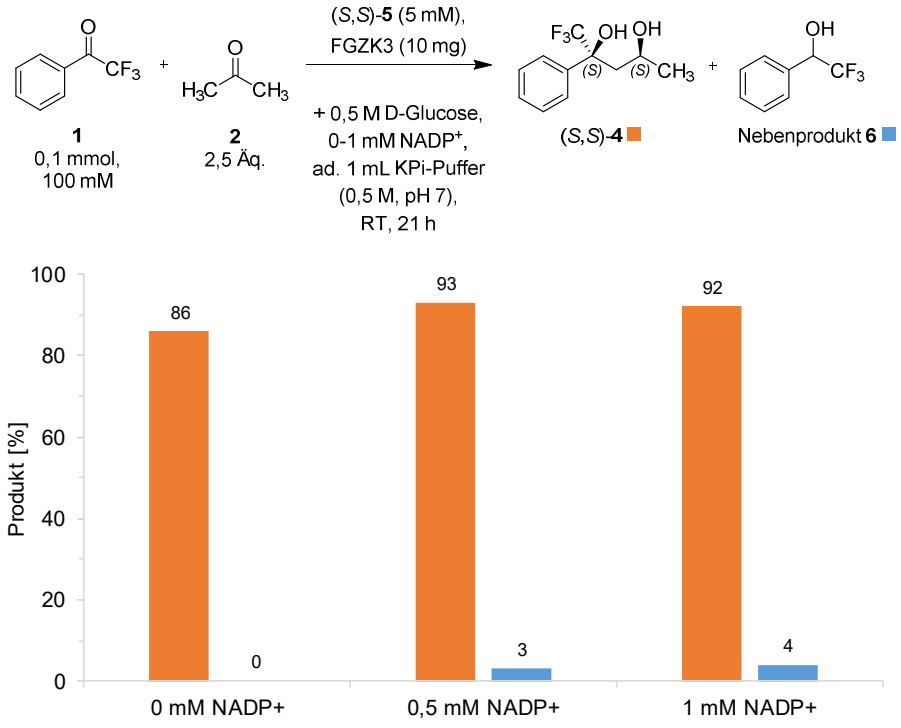


Abbildung 64: Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** in Abhängigkeit der $NADP^+$-Konzentrationen.

Beim Ansatz ohne externe $NADP^+$-Zugabe, wird überraschenderweise eine Diolbildung von 86 % erreicht, wobei keine Nebenprodukte beobachtet wurden. Offensichtlich ist die Bildung des Nebenprodukts Trifluorphenylethanol (**6**) mit der externen $NADP^+$-Zugabe korreliert. In allen Ansätzen wurde das (*S*,*S*)-Diol **4** mit einem *ee*- und *de*-Wert >99 % gebildet. Da der Umsatz ohne $NADP^+$-Zugabe etwas geringer war als die erreichten Umsätze mit 0,5 mM und 1 mM $NADP^+$ wurde der gleiche Ansatz ohne $NADP^+$-Zugabe wiederholt, jedoch mit der doppelten Ganzzellkatalysatormenge. Die Ergebnisse dieser Umsetzungen sind in Tabelle 52 zusammengefasst. Bei der Verwendung von 10 mg Ganzzellkatalysator wurde nach 24 Stunden ein Umsatz von 90 % (bezogen auf das Diol) erreicht und wiederholt keine Nebenprodukte nachgewiesen (Eintrag 1). Beim Einsatz der doppelte Menge (20 mg) des Ganzzellkatalysators konnte in der gleichen Reaktionszeit 97 % Diolbildung und 1 % Nebenprodukt erreicht werden (Eintrag 2). Daraus kann geschlossen werden, dass die intrazellulären Cofaktormengen im Ganzzellkatalysator ausreichen, um eine effiziente Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** ohne externe Zugabe des Cofaktors $NADP^+$ zu erreichen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Nebenproduktbildung deutlich zunimmt, wenn extern Cofaktor zugesetzt wird.

Tabelle 52: Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** ohne externe Zugabe des Cofaktors $NADP^+$ mit unterschiedlichen Ganzzellkatalysatormengen. Verwendeter Reaktionsansatz: 100 mM Edukt **1**, 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10/20 mg mL^{-1} FGZK3, 0,5 M D-Glucose auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), RT, 24 h.

Eintrag	FGZK3 [mg]	Diol [%]	Nebenprodukt [%]
1	10	90	0
2	20	97	1

3.8.3.5.2 Optimierungen bezüglich der eingesetzten D-Glucose-Menge

Hinsichtlich des bisher verwendeten Cofaktorregenerierungssystems mit GDH/D-Glucose als Coenzym/Cosubstrat ist die Verwendung von D-Glucose als Cosubstrat zwar kostengünstig, jedoch sollten unnötig hohe Überschüsse an D-Glucose vermieden werden. In der optimierten chemoenzymatischen Eintopfreaktionen wurden standardmäßig 0,5 M β-D-Glucose, also 5 Äquivalente, eingesetzt. Daher sollte nun überprüft werden, ob die bisher eingesetzte D-Glucose-Konzentration reduziert werden kann. Hierfür wurden folgende Ansätze verwendet: 100 mM Edukt **1**, 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 0-0,5 M D-Glucose, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Nach einer Reaktionszeit von 18 Stunden wurden GC-Proben entnommen und die Produktbildung des Diols **4** bestimmt. In Abbildung 65 ist ersichtlich, dass ohne Zugabe von D-Glucose keine Diolbildung stattfindet. Erhöht man die D-Glucose-Konzentration im Ansatz auf 0,05 M

so konnte erwartungsgemäß nahezu die Hälfte (47 %) des eingesetzten Edukts zum Diol umgesetzt werden, da für die Reduktion von 1 mol Substrat stöchiometrisch 1 mol D-Glucose für die Regenerierung des Cofaktors oxidiert werden muss. Beim Einsatz vom 100 mM D-Glucose konnte der Umsatz auf >90 % gesteigert werden, sodass eine äquimolare Menge an D-Glucose ausreicht. Eine kontinuierliche Steigerung der D-Glucose-Konzentration bis zu 0,5 M zeigten hierbei nur minimale Änderungen, die im Rahmen der Messungenauigkeit liegen, sodass 87-92 % Diolbildung erreicht wurden. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin, dass bei der Verwendung des Ganzzellkatalysators und einer Substratkonzentration von 100 mM äquimolare Konzentrationen an D-Glucose für eine effiziente Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** in der chemoenzymatischen Eintopfsynthese ausreichen sollten. Da man aber damit rechnen muss, dass die Zellen auch parallel zur gewünschten Reduktion etwas Glucose verstoffwechseln, wird D-Glucose mindestens im zweifachen Überschuss zur Eduktkonzentration eingesetzt, um sicher zu gehen, dass genügend Cosubstrat für die Cofaktorregenerierung zur Verfügung steht. Die zuvor eingesetzte D-Glucose-Konzentration von 0,5 M könnte somit auf 200 mM reduziert werden.

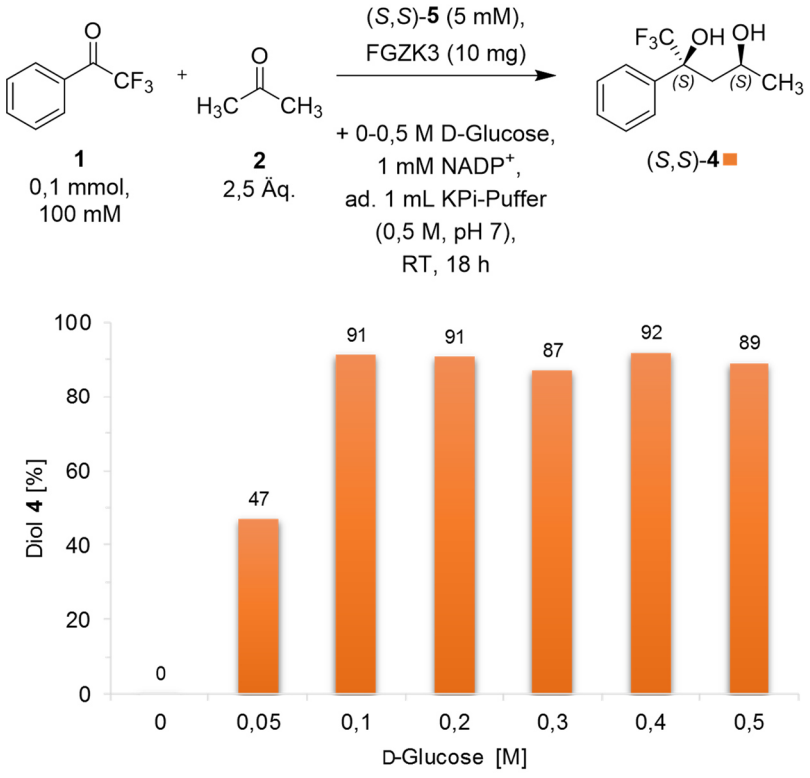
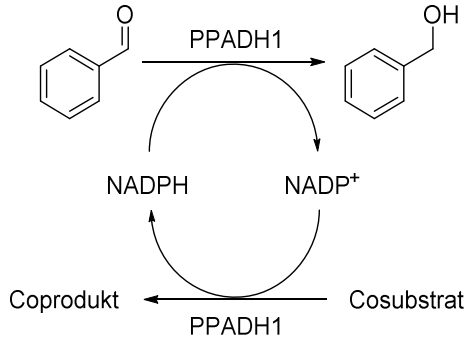


Abbildung 65: Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4** in Abhängigkeit der D-Glucose-Konzentration.

3.8.3.5.3 Optimierungen bezüglich des Cofaktorregenerierungssystems

In den bisher durchgeführten Biotransformationen wurde die GDH als Cofaktor-regenerierendes Enzym verwendet, welches die Oxidation von D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton unter NAD(P)H-Verbrauch katalysiert. Eine elegantere Methode, um den reduzierten Cofaktor zu regenerieren stellt die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung dar. Hierbei wird dem Reaktionsansatz ein zweites Substrat zugesetzt, welches vom eingesetzten Biokatalysator ebenfalls umgesetzt wird. Diese Methode bietet den Vorteil, dass kein zusätzliches Enzym verwendet wird und dadurch Kosten sowie die Komplexität des Systems vermindert werden. Um ein Substrat-gekoppeltes Cofaktorregenerierungssystem zu verwenden, wurde zunächst überprüft, welche Cosubstrate (Alkohole) für die PPADH1 geeignet sind, um eine effiziente Reduktion von 20 mM Benzaldehyd zu bewerkstelligen. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM Benzaldehyd, 4 Äq. Cosubstrat (80 mM), 1 mM $NADP^+$, 1 U PPADH1 (gereinigt) auf 1 mL Tris-HCl Puffer (0,5 M, pH 7), schüttelnd bei 25 °C. Nach einer Reaktionsdauer von 0,5 h und 18 h wurden Proben entnommen und mit GC analysiert. Die Ergebnisse dieser Testreihe sind in Tabelle 53 zusammengefasst. Für die Regenerierung des Cofaktors NADPH wurde die Reduktion von Benzaldehyd mit der Oxidation von sekundären, racemischen Alkoholen einer Kettenlänge von C3-C7 gekoppelt. Um das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Produktbildung (hier Benzylalkohol) zu verschieben, wurden die Cosubstrate im 4-fachen Überschuss eingesetzt. Bei der Verwendung von 2-Propanol (C3) und 2-Butanol (C4) als Cosubstrate konnte keine Produktbildung bzw. Umsatz beobachtet werden. Bei weiterer Verlängerung der Kohlenstoffkette konnte bereits nach einer kurzen Reaktionszeit von 0,5 h ein geringer Umsatz (<5 %) nachgewiesen werden. Nach einer Reaktionsdauer von 18 h konnte bei der Verwendung von 2-Pentanol ein Umsatz von 27 % erreicht werden, bei 2-Hexanol 72 % und bei 2-Heptanol 34 % Umsatz. Der beste Umsatz konnte somit bei der Verwendung von 2-Hexanol (C6) als Cosubstrat erreicht werden. Die Kettenlänge des verwendeten Cosubstrats scheint einen großen Einfluss auf den Umsatz auszuüben. Eine Kettenlänge von mindestens C4 scheint für die PPADH1 erforderlich zu sein, um einen minimalen Umsatz zu erzielen. Wird jedoch die Kettenlänge von C6 auf C7 erweitert, so halbiert sich nahezu der Umsatz (Tabelle 53, 72 % auf 34 %). Um diesen interessanten Effekt zu untersuchen, wurden die spezifischen Aktivitäten der PPADH1 bezüglich der Reduktion der Ketone 2-Butanon bis 2-Octanon (C4-C8) sowie der Oxidation der korrespondierenden Alkohole bestimmt und miteinander verglichen.

Tabelle 53: Untersuchung unterschiedlicher Cosubstrate für die Reduktion von Benzaldehyd mit der PPADH1. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM Benzaldehyd, 4 Äq. Cosubstrat (*rac*, 80 mM), 1 mM $NADP^+$, 1 U PPADH1 (gereinigt) auf 1 mL Tris-HCl Puffer (0,1 M, pH 7). Umsatz wurde mittels GC bestimmt.



Cosubstrat	Umsatz [%]	
	0,5 h	18 h
K	0	0
2-Propanol	0	0
2-Butanol	0	0
2-Pentanol	1	27
2-Hexanol	5	72
2-Heptanol	1	34

K= Kontrolle (ohne Cosubstrat).

Für die bessere Vergleichbarkeit der Aktivitäten wurde für die Reduktion 10 mM Substrat und für die Oxidation der racemischen Alkohole 20 mM Substrat für die photometrische Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Die Aktivitäten für Reduktion und Oxidation wurden im gleichen Puffer (Tris-HCl) und bei gleichem pH-Wert (pH 7) durchgeführt, da in den durchgeführten Biotransformationen ebenfalls Puffer mit pH-Wert von 7 verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 66 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass insgesamt geringe spezifische Aktivitäten für die Reduktion der Ketone als auch für die Oxidation der Alkohole gemessen wurden und diese unter 2 U mg^{-1} lagen. Die deckt sich allerdings auch mit den Aktivitätswerten, die im Rahmen des Substratspektrums für die PPADH1 aufgenommen wurden (Tabelle 17 und Tabelle 18). Die geringsten Aktivitäten wurden mit den Substraten 2-Butanon/2-Butanol also C4-Verbindungen gemessen, sodass diese nicht geeignete Regenerierungssubstrate für die PPADH1 darstellen. Die Aktivität steigert sich deutlich bei Verlängerung der Kohlenstoffkette um eine CH_3-Einheit (siehe 2-Pentanon/2-Pentanol). Mit den Substraten 2-Hexanon/2-Hexanol wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten sowohl für die Reduktion als auch für die Oxidation gemessen. Eine weitere Verlängerung der Kohlenstoffkette um eine CH_3-Einheit (2-Heptanon/2-Heptanol) führte zu einer Aktivitätsminderung ebenso bei einer weiteren Verlängerung der Kohlenstoffkette (2-Octanon/2-Octanol). Erstaunlicherweise unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten für die Reduktion und Oxidation bei pH 7

nur wenig, wobei der Quotient zwischen Reduktion 2-Hexanon/Oxidation 2-Hexanol mit 1,37 am kleinsten ist.

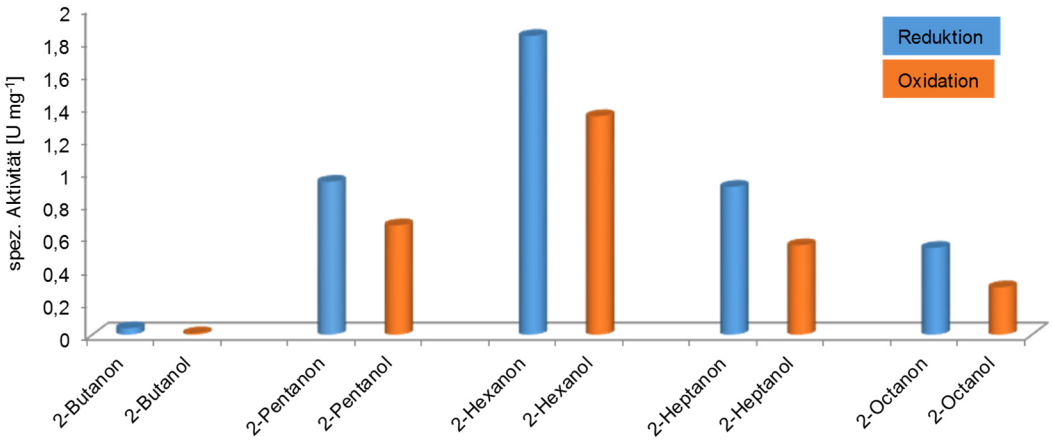


Abbildung 66: Spezifische Aktivitäten der PPADH1 für die Reduktion/Oxidation von C4-C8 Ketonen/Alkoholen bei pH 7. Für die Reduktion wurden 10 mM Keton in Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7) und für die Oxidation 20 mM Alkohol (*rac*) in Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7) verwendet und die Aktivitäten photometrisch bestimmt.

Es kann also angenommen werden, dass die PPADH1 die Reduktion der Ketone gegenüber der Oxidation der Alkohole nur minimal bei einem pH-Wert von 7 bevorzugt. Nachdem nun 2-Hexanol als bestes Cosubstrat für die PPADH1 identifiziert wurde, sollten im Folgenden weitere C6-Alkohole als Cosubstrate für die Regeneration des Cofaktors NADPH getestet werden. Es wurde der gleiche Ansatz wie zuvor beschrieben verwendet, jedoch wurden diesmal 2 U statt 1 U PPADH1 eingesetzt, um höhere Umsätze zu erzielen. Zusätzlich wurde die Biotransformation mit dem GDH/D-Glucose-System im Vergleich durchgeführt. In Abbildung 67 ist ersichtlich, dass effiziente Biotransformationen auch mit weiteren C6-Alkoholen wie 1-Hexanol, *trans*-2-Hexen-1-ol und (*S*)-2-Hexanol erfolgreich durchgeführt werden können. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde mit dem GDH/D-Glucose-System und mit (*S*)-2-Hexanol ein vollständiger Umsatz beobachtet. Mit *trans*-2-Hexen-1-ol als Cosubstrat wurde ein Umsatz von 99 % erreicht. Vergleicht man die erreichten Umsätze bei Verwendung der Cosubstrate 1-Hexanol und 2-Hexanol, so wird bei der Verwendung des racemischen, sekundären Alkohols 2-Hexanol ein etwas höherer Umsatz von 83 % erzielt. Das mit (*S*)-2-Hexanol als Cosubstrat im Vergleich zum racemischen 2-Hexanol die PPADH1 höhere Umsätze beobachtet wurden, könnte mit der Enantiospezifität der PPADH1 begründen werden. Im Kapitel 3.5.7 konnte gezeigt werden, dass die PPADH1 bevorzugt den (*S*)-Alkohol eines racemischen Gemisches oxidiert, sodass bei der Verwendung von

80 mM *rac*-2-Hexanol nur 2 Äquivalente des (*S*)-Enantiomeren für die Cofaktorregenerierung vorliegen und die Reaktion vermutlich langsamer abläuft als mit 80 mM (*S*)-2-Hexanol als Cosubstrat. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurden, abgesehen von der Umsetzung mit 1-Hexanol, in allen Biotransformationen vollständige Umsätze erreicht. Mit 1-Hexanol als Cosubstrat kann trotz eingesetzten Überschuss (4 Äquivalente) kein vollständiger Umsatz erreicht werden, sodass angenommen werden kann, dass sich das thermodynamische Gleichgewicht zwischen Reduktion und Oxidation eingestellt hat. Überraschenderweise verringerte sich der Umsatz von 73 % (nach 2 h) auf 63 % nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden.

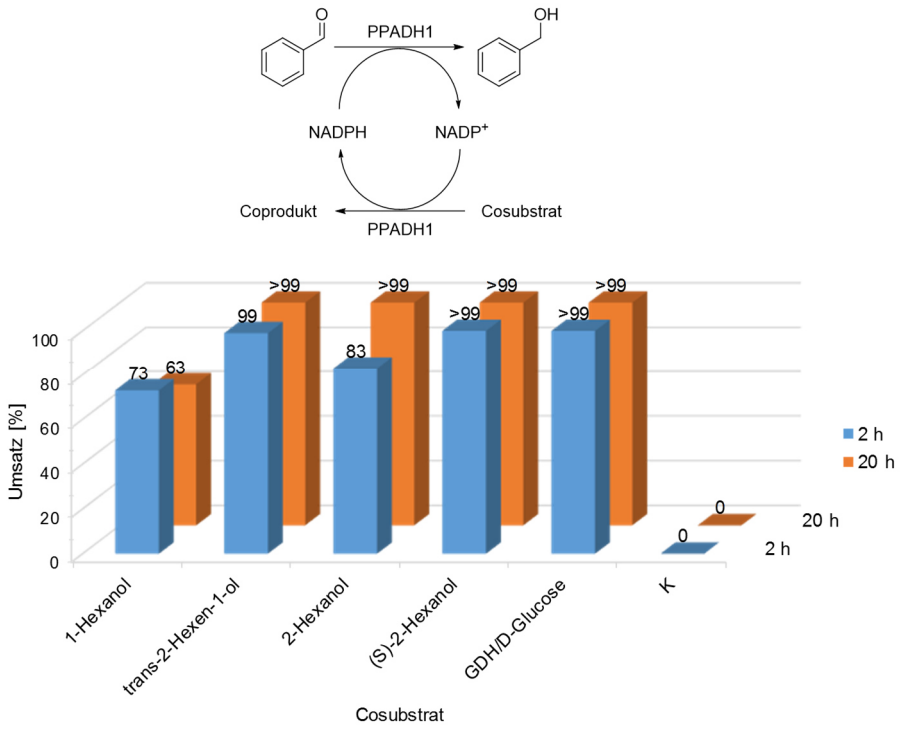
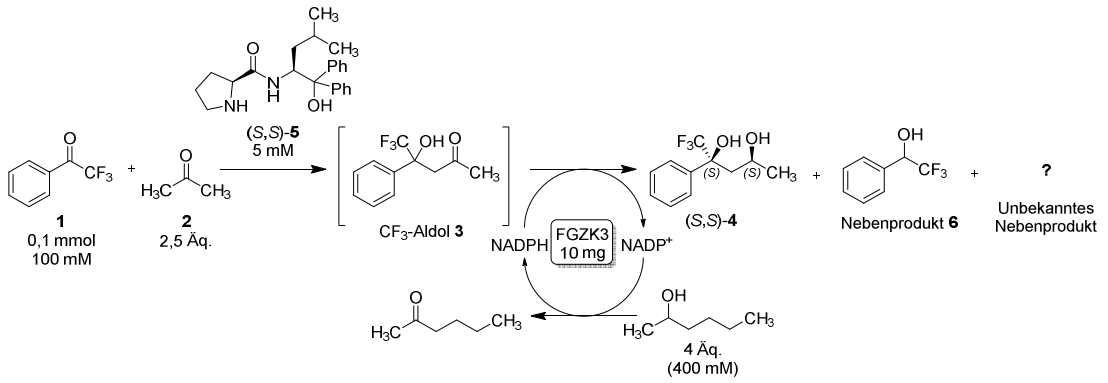


Abbildung 67: Kopplung der Reduktion von Benzaldehyd mit der Oxidation von C6-Alkoholen als Cosubstrate für die PPADH1. Folgender Ansatz wurde verwendet: 20 mM Benzaldehyd, 4 Äq. Cosubstrat (80 mM), 1 mM $NADP^+$, 2 U PPADH1 (gereinigt) auf 1 mL Tris-HCl Puffer (0,1 M, pH 7). Für das GDH/D-Glucose-System wurden 10 U GDH und 0,1 M D-Glucose verwendet. K= Kontrollansatz ohne Cosubstrat/Coenzym. Umsatz wurde mittels GC bestimmt.

Da *rac*-2-Hexanol kommerziell als Substrat um ein Vielfaches günstiger ist als das enantiomerenreine (*S*)-2-Hexanol, wurde der racemische Alkohol als Cosubstrat für die Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols **4** eingesetzt. Hierfür wurden folgende Ansatz verwendet: 100 mM Edukt **1**, 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 4 Äquivalente *rac*-2-Hexanol (400 mM), 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Nach einer Reaktionszeit von 23 Stunden wurde eine GC-Probe entnommen und die relativen Anteile von Edukt und Produkte bestimmt (Tabelle 54).

Tabelle 54: Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols **4** unter Verwendung von 2-Hexanol als Cosubstrat für die Regenerierung des Cofaktors NADPH.



Edukt **1** [%]	Aldolprodukt **3** [%]	Diol **4** [%]	Nebenprodukt **6** [%]	Unbekanntes Nebenprodukt [%]
3	15	65	0	17

Bei der Verwendung von 2-Hexanol als Cosubstrat konnte ein relativer Diolanteil von 65 % erreicht werden, wobei keine Bildung der Nebenprodukte, welche durch die direkte Reduktion des Edukts 2,2,2-Trifluoracetophenon durch den FGZK3 entstehen, beobachtet wurde (Tabelle 54). Stattdessen wurde mittels GC ein zusätzlicher Peak nachgewiesen, der zu diesem Zeitpunkt nicht identifizierbar war und einen relativen Anteil von 17 % aufwies. Da der einzige veränderte Parameter dieser etablierten Eintopfreaktion der Zusatz von 2-Hexanol war, wurde angenommen, dass entweder 2-Hexanol oder 2-Hexanon mit den Komponenten der Aldolreaktion reagieren und es zur Bildung eines neuen Nebenprodukts kommt. Um herauszufinden, um welches Nebenprodukt es sich handelt und welche Komponenten zusammen reagieren, wurden unterschiedliche Ansätze durchgeführt und mittels GC analysiert:

A) 100 mM Edukt **1**, 250 mM Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 4 Äquivalente *rac*-2-Hexanol (400 mM), 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7)

⇨Bildung des unbekannten Nebenprodukts

B) 100 mM Edukt **1**, 250 mM Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 4 Äquivalente 2-Hexanon (400 mM) auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7)

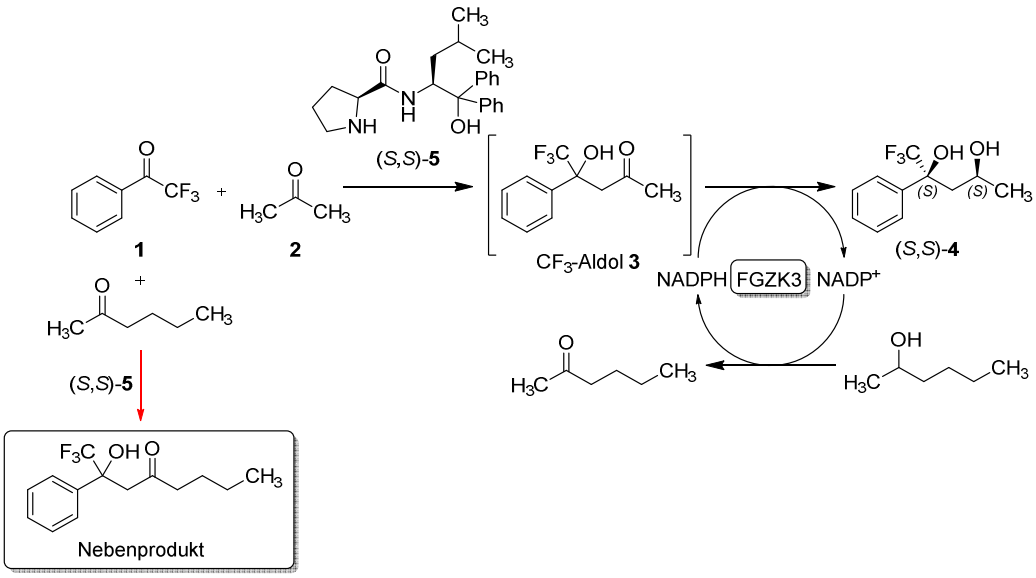
⇨Bildung des unbekannten Nebenprodukts

C) 250 mM Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 400 mM 2-Hexanon auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7)
⇨Keine Bildung des unbekannten Nebenprodukts

D) 5 mM Organokatalysator **5**, 400 mM 2-Hexanon auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7)
⇨Keine Bildung des unbekannten Nebenprodukts.

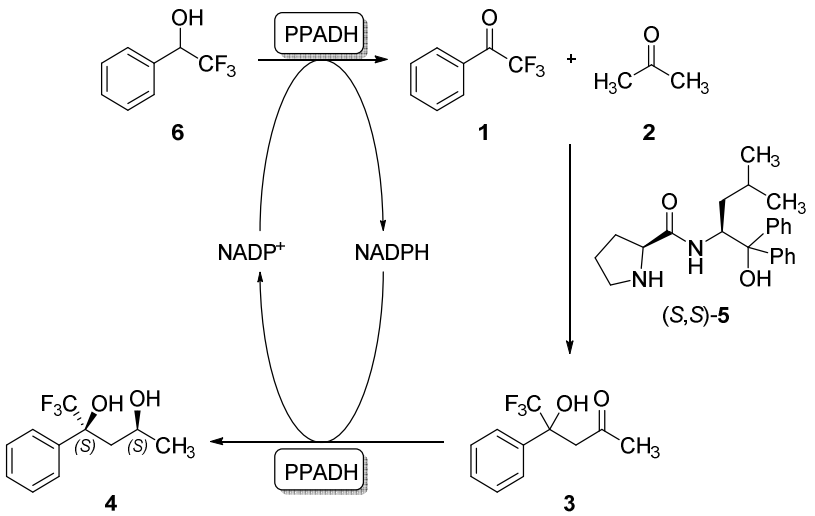
Anhand dieser Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, dass eine Aldolreaktion von zwei Molekülen 2-Hexanon oder eine Aldolreaktion von 2-Hexanon mit Aceton durch den Organokatalysator (*Singh*-Katalysator) stattfindet, da bei den Ansätzen C und D das Nebenprodukt nicht gebildet wurde. Zusätzlich konnte 2-Hexanon als Reaktionspartner identifiziert werden, da im Ansatz B nur 2-Hexanon statt 2-Hexanol vorlag und es erneut zur Bildung des unbekannten Nebenprodukts aus der Eintopfreaktion kam. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass 2-Hexanon als Aldoldonor und 2,2,2-Trifluoracetophenon als Aldolakzeptor fungieren könnten. Daraufhin wurde eine weitere Reaktion durchgeführt mit 50 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon (Edukt **1**), 200 mM 2-Hexanon, 0,5 mM Organokatalysator **5** in 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7). Nach einer Reaktionsdauer von 6 Stunden konnte die Bildung des unbekannten Nebenprodukts mit 58 % Umsatz nachgewiesen werden. Die Reaktion wurde nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden aufgearbeitet und das Produkt isoliert, welches anschließend sowohl mit H^1-NMR als auch GC-MS analysiert wurde. Hierbei bestätigte sich, dass es sich bei dem unbekannten Nebenprodukt um das Aldolprodukt von 2,2,2-Trifluoracetophenon und 2-Hexanon handelt (Schema 26).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das ursprüngliche GDH/D-Glucose-System durch ein Cosubstrat-gekoppeltes Regenerierungssystem mit 2-Hexanol ersetzt werden könnte, jedoch sollte es aufgrund einer konkurrierenden Aldolreaktion nicht in der Eintopfreaktion mit dem *Singh*-Katalysator und dem Edukt 2,2,2-Trifluoracetophenon verwendet werden.



Schema 26: Unerwünschte Aldoladdition von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit 2-Hexanon bei der Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols **4**. Bei der Verwendung von 2-Hexanol als Cosubstrat für die Cofaktorregenerierung entsteht durch Oxidation 2-Hexanon, welches durch den Organokatalysator an das Edukt **1** addiert wird.

Alternativ zur Verwendung eines Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierungssystems wurde eine abweichende Reaktionsführung der Eintopfreaktion konzipiert, welche ohne den Zusatz von Cosubstraten oder gar Coenzymen auskommt und als „*self sufficient*“ bezeichnet werden kann (Schema 27). Der erste Schritt dieser alternativen Route beinhaltet die Oxidation von Trifluorphenylethanol (**6**) zu 2,2,2-Trifluoracetophenon (**1**) unter $NADP^+$-Verbrauch durch die PPADH.



Schema 27: Alternative chemoenzymatische Route zur Synthese des chiralen 1,3-Diols **4** („*self sufficient*“).

Das Trifluoracetophenon wird anschließend mit Aceton in der organokatalysierten Aldolreaktion durch den *Singh*-Katalysator zum Aldol **3** addiert, welches wiederum als Substrat für die PPADH dient und zum 1,3-Diol **4** unter NADPH-Verbrauch reduziert wird. Der reduzierte/oxidierte Cofaktor wird dabei intern durch die Reduktion des Intermediats **3** regeneriert ohne Zusatz eines Cosubstrats oder Hilfsenzyms. Um diese alternative Route zu testen, wurde folgender Reaktionsansatz verwendet: 20 mM *rac*-Trifluorphenylethanol (**6**), 20 mM $NADP^+$, 10 Äquivalente Aceton (**2**, 14,7 µL), 2 mM (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator **5**, 5 mg mL^{-1} FGZK3 auf 1 mL KPi-Puffer (0,1 M, pH 7). Nach einer Reaktionsdauer von 24 Stunden konnte nur das Edukt (Trifluorphenylethanol (**6**)) mittels GC nachgewiesen werden, sodass angenommen werden kann, dass der erste Schritt, die Oxidation zu 2,2,2 Trifluoracetophenon, nicht stattfindet. Dies wurde durch photometrische Aktivitätsmessungen zur Oxidation von Trifluorphenylethanol durch PPADH bestätigt, in diesen Tests wurde durchweg keine Aktivität gemessen. Da die PPADH den ersten Schritt der in Schema 27 vorgeschlagenen Route nicht katalysieren kann, sollte mit Hilfe einer zusätzlichen $NADP^+$-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (LKADH aus *Lactobacillus kefir*) die Reaktionsführung realisiert werden. Allerdings haben auch hier photometrische Vortests bereits gezeigt, dass die LKADH keine oxidierende Aktivität gegenüber Trifluorphenylethanol zeigt. Dazu wurden die Reduktion und Oxidation einiger Substrate getestet unter anderem auch *rac*-Trifluorphenylethanol und (*R*)-Phenylethanol. Während mit (*R*)-Phenylethanol eine spezifische Aktivität von 13,7 U mg^{-1} gemessen wurde, war die LKADH mit Trifluorphenylethanol als Substrat inaktiv. Im Reduktionstest von Acetophenon und Trifluoracetophenon wurde allerdings bei beiden Substraten eine spezifische Aktivität von ca. 48 U mg^{-1} gemessen (Tabelle 55). Für die präparative Umsetzung entsprechend Schema 27 wurde nahezu der gleiche Reaktionsansatz wie zuvor beschrieben verwendet, jedoch mit Zusatz der LKADH (Rohextrakt, 10 µL) und statt KPi-Puffer wurde TEA-Puffer (50 mM, pH 7, Zusatz von 1 mM $MgCl_2$) verwendet. Auch hier konnte nur das Edukt Trifluorphenylethanol (**6**) mittels GC nachgewiesen werden. Weitere Enzyme (z. B. RRADH, 3α-HSDH etc.) wurden ebenfalls für die Oxidation von Trifluorphenylethanol getestet, jedoch zeigten diese ebenfalls keine Aktivität. Da kein geeignetes Enzym für die Oxidation von Trifluorphenylethanol zur Verfügung stand, konnte die in Schema 27 vorgestellte alternative chemoenzymatische Route nicht realisiert werden.

Tabelle 55: Photometrische Aktivitätsmessungen mit der LKADH (Rohextrakt).

Reaktion	Substrat	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]
Reduktion[a]	Acetophenon	48,9
	2,2,2-Trifluoracetophenon	48,3
Oxidation[b]	(*R*)-Phenylethanol	13,7
	rac-Trifluorphenylethanol[c]	0,0

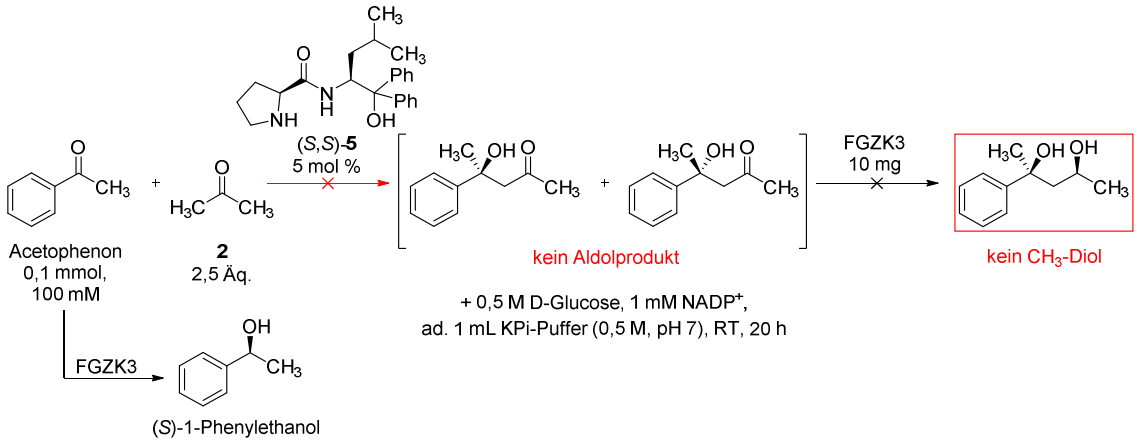
[a]10 mM Substrat in TEA-Puffer (50 mM, pH 7 + 1 mM $MgCl_2$), 0,2 mM NADPH.
[b]10-20 mM Substrat in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 9 + 1 mM $MgCl_2$), 0,2 mM $NADP^+$.
[c]20 mM wurden verwendet.

3.8.4 Erweiterung des Substratspektrums der Eintopfreaktion

Um das Potential der entwickelten Eintopfreaktion zu ergründen, wurden verschiedene Acetophenon-Derivate für die Tauglichkeit als Aldolakzeptoren getestet.

3.8.4.1 Verwendung von Acetophenon, 2,2-Difluoracetophenon und 2-Fluoracetophenon als Aldolakzeptoren

Um das Substratspektrum der Eintopfreaktion zu erweitern wurde zunächst angestrebt die optimierte Reaktion analog mit dem nicht-aktivierten Keton Acetophenon (statt 2,2,2-Trifluoracetophenon) als Aldolakzeptor durchzuführen. In Kapitel 3.8.1.4 konnte gezeigt werden, dass der Ganzzellkatalysator in der Lage ist, auch das nicht-fluorierte β-Hydroxyketon (CH_3-Aldol) enantioselektiv zum (*S*,*S*)-Diol zu reduzieren. Als Konsequenz sollte die Reduktion ebenfalls mit einer vorgeschalteten Aldolreaktion kombiniert werden. Da Acetophenon kein aktiviertes Keton ist, liegt das Gleichgewicht der Aldolreaktion von Acetophenon mit Aceton sehr stark auf der Eduktseite. Es wurde daher angestrebt das ungünstige Gleichgewicht dieser Aldolreaktion durch die nachgeschaltete biokatalytische Reduktion in Richtung Produktseite zu verschieben. Die Eintopfreaktion wurde analog zur optimierten Reaktion (mit 2,2,2-Trifluoracetophenon) durchgeführt. Die Eintopfreaktion mit Acetophenon brachte jedoch keinen Erfolg, weder wurde die Bildung des korrespondierenden Aldolprodukts noch die Bildung des Diols beobachtet (Schema 28).

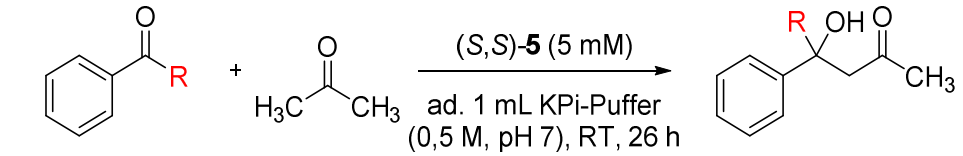


Schema 28: Versuch zur Eintopfreaktion ausgehend von Acetophenon als Aldolakzeptor. Ein Aldolprodukt konnte nicht nachgewiesen werden, dieser Ansatz führt lediglich durch direkte Reduktion des Edukts zur Bildung des unerwünschten Nebenprodukts (*S*)-1-Phenylethanol als einziges Produkt.

Als einziges Produkt dieser Reaktion konnte nach längerer Reaktionszeit (*S*)-1-Phenylethanol durch direkte Reduktion des Acetophenons nachgewiesen werden (Schema 28). Weitere Versuche, die zum einen die Reduzierung der Menge an Ganzzellkatalysator und zum anderen eine sequentielle Durchführung der Teilschritte (zeitliche Trennung der Aldolreaktion von der Reduktion) beinhalteten, waren ebenfalls nicht erfolgreich. Die Aldolreaktion ohne biokatalytische Komponente zeigte keine Bildung des Aldolprodukts, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Aldolreaktion von Acetophenon mit Aceton unter diesen Bedingungen nicht funktioniert.

Daraufhin wurden Acetophenon-Derivate mit unterschiedlicher Anzahl an Fluor-Atomen getestet, um der Zielstruktur des CH_3-Diols (siehe Schema 28, rote Umrandung) näher zu kommen. Als Edukte dienten 2,2-Difluoracetophenon sowie 2-Fluoracetophenon als Aldolakzeptoren. Zunächst wurde die organokatalysierte Aldolreaktion mit dem (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator **5** untersucht, wobei je 100 mM Edukt, 2,5 Äquivalente Aceton und 5 mM Organokatalysator **5** auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7) verwendet wurden. Zum Vergleich wurde die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon mit Aceton unter analogen Bedingungen durchgeführt. In Tabelle 56 ist ersichtlich, dass der Umsatz bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit der organokatalysierten Aldolreaktion von der Anzahl der Fluor-Atome abhängig ist. Mit 2,2,2-Trifluoracetophenon konnte bereits nach einer Reaktionsdauer von 15 Minuten ein quantitativer Umsatz erzielt werden, sodass kein Edukt nachweisbar war (Eintrag 1, Tabelle 56).

Tabelle 56: Organokatalysierte Aldolreaktionen ausgehend von Fluor-substituierten Acetophenonen als Aldolakzeptoren. Relative Konzentrationen in % wurden mit chiraler GC bestimmt.



100 mM
R=CF_3, CF_2H, CFH_2

2
2,5 Äq.

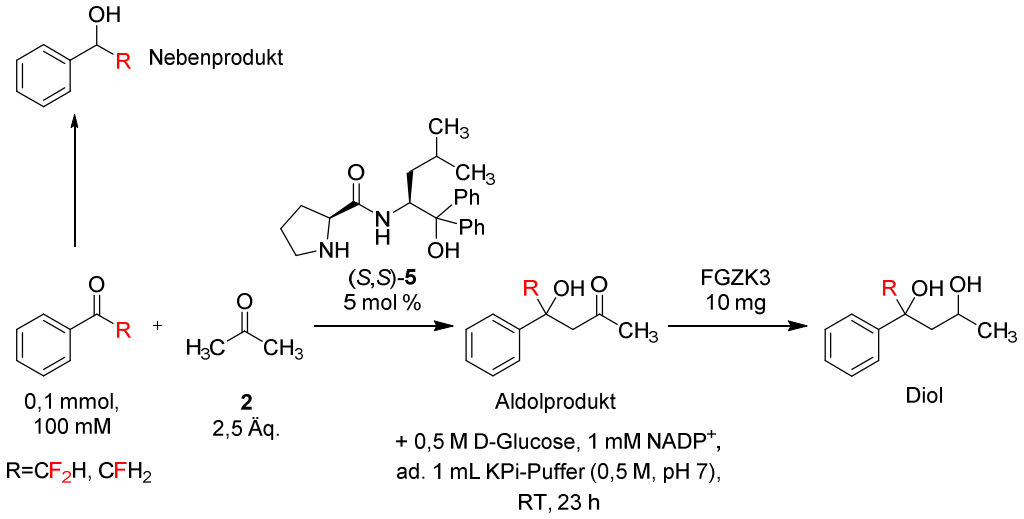
Aldolprodukt

Aldolakzeptor	Eintrag	Zeit [h]	Edukt [%]	Aldolprodukt [%]
2,2,2-Trifluoracetophenon (R= CF_3)	1	0,25	<1	>99
	2	1	<1	>99
2,2-Difluoracetophenon (R= CF_2H)	3	8	15	85
	4	24	16	86
2-Fluoracetophenon (R= CFH_2)	5	3	>99	<1
	6	26	94	6

Mit 2,2-Difluoracetophenon verlangsamt sich die Aldolreaktion, sodass nach 8 Stunden nur 85 % Aldolprodukt vorliegt und bei verlängerter Reaktionszeit auf 24 Stunden kein weiterer Anstieg des Umsatzes beobachtet wurde (Eintrag 3-4, Tabelle 56). Hierbei kann angenommen werden, dass sich das thermodynamische Gleichgewicht eingestellt hat. Die Aldolreaktion mit 2-Fluoracetophenon verlief im Vergleich zu den anderen durchgeführten Aldolreaktionen sehr langsam, sodass nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden keine Produktbildung beobachtet wurde, erst nach 26 Stunden konnte eine Produktbildung von 6 % gemessen werden (Eintrag 5-6, Tabelle 56). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Aldolreaktion korreliert offensichtlich mit der Anzahl an Fluor-Atomen (an C2-Position des Acetophenons), d.h. mit abnehmender Anzahl an Fluor-Atomen sinkt die Aktivierung des Ketons und das Gleichgewicht der Aldolreaktion verschiebt sich stärker in Richtung Eduktseite.

Die organokatalysierten Aldolreaktionen der Fluor-substituierten Acetophenone (2,2-Difluoracetophenon und 2-Fluoracetophenon) und Aceton wurden anschließend mit der biokatalytischen Reduktion als Eintopfreaktion kombiniert und analysiert. In Tabelle 57 sind die Ergebnisse der beiden Reaktionen zusammengefasst. Anhand der prozentuellen Verteilung von Edukt, Produkt und Nebenprodukt wird deutlich, dass die Aldolreaktion anscheinend zu langsam abläuft, dadurch reduziert der Ganzzellkatalysator die Edukte hauptsächlich zu den korrespondierenden Alkoholen. Im Falle von 2,2-Difluoracetophenon konnte immerhin nach 23 Stunden 21 % Diol gebildet werden (Eintrag 1, Tabelle 57).

Tabelle 57: Eintopfreaktion mit 2,2-Difluor- und 2-Fluoracetophenon als Aldolakzeptoren in der organokatalysierten Aldolreaktion.



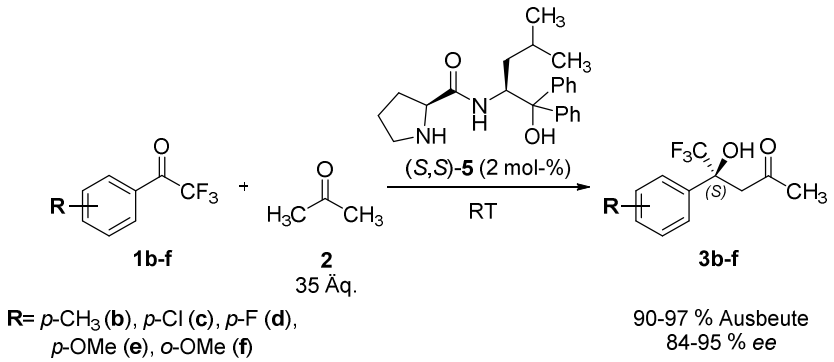
Eintrag	Aldolakzeptor	Edukt [%]	Aldolprodukt [%]	Diol[a] [%]	Nebenprodukt [%]
1	2,2-Difluoracetophenon (R= CF_2H)	<1	12	21	67
2	2-Fluoracetophenon (R= CFH_2)	2	<1	1	97

[a]Peakzuordnung der Diole ist unsicher, da keine Referenzverbindungen vorlagen.

Eine schneller ablaufende Aldolreaktion könnte eventuell durch die Erhöhung der Aceton-Äquivalente sowie der Katalysatormenge (*Singh*-Katalysator) erfolgen, um eine Nebenproduktbildung zu vermeiden. Weitere Versuche zur Verbesserung dieser Eintopfreaktionen wurden nicht durchgeführt.

3.8.4.2 Verwendung von substituierten 2,2,2-Trifluoracetophenonen als Aldol-Akzeptoren

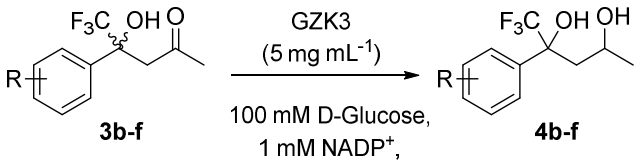
Im vorherigen Teilabschnitt konnte gezeigt werden, dass die zuvor entwickelte Eintopfreaktion ausgehend von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton nur mäßig auf andere Acetophenon-Derivate, welche statt der CF_3-Gruppe eine CF_2H-, CFH_2- oder CH_3-Gruppe aufweisen, übertragbar ist aufgrund des ungünstigen thermodynamischen Gleichgewichts der Aldolreaktion. In einer früheren Arbeit von DUANGDEE *et al.* (2012) konnte aber gezeigt werden, dass die Aldolreaktion mit fünf weiteren substituierten Trifluoracetophenonen und Aceton in Gegenwart des (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysators erfolgreich durchgeführt werden konnte, wobei hohe Ausbeuten (bis 97 %) und hohe Enantiomerenreinheiten (bis 95 % *ee*) erreicht wurden (Schema 29).[89]



Schema 29: Enantioselektive Addition von Aceton (**2**) an verschiedene Trifluoracetophenon-Derivate **1b-f** in Anwesenheit des *Singh*-Katalysators (*S*,*S*)-**5** für die Synthese von Aldolen **3b-f** nach DUANGDEE *et al.* (2012).[89]

Aufgrund der in Schema 29 erzielten Ergebnisse sollte die chemoenzymatische Eintopfreaktion (vom unsubstituierten Trifluoracetophenon) auf *para*- und *ortho*-substituierte Trifluoracetophenone übertragen werden. Da die Aldolreaktionen mit diesen Verbindungen ähnliche Ergebnisse erzielten wie beim unsubstituierten Trifluoracetophenon, wurde zunächst überprüft, ob der Ganzzellkatalysator in der Lage ist, die substituierten Aldolprodukte enantioselektiv zu reduzieren. Diese substituierten β-Hydroxyketone wurden teilweise in (*S*)-angereicherter Form oder racemisch von der Arbeitsgruppe Prof. A. Berkessel (Universität Köln) als *Screening*-Substrate zur Verfügung gestellt. Die Substrate wurden in Biotransformationen getestet, wobei folgender Reaktionsansatz verwendet wurde: 9,1-10,7 mM Substrat, 5 % (v/v) Methanol, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$, 5 mg mL^{-1} GZK3 auf 1 mL Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7), 30 °C, 2 h schüttelnd. Die Ergebnisse dieser Biotransformationen sind in Tabelle 58 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass der GZK bzw. die PPADH1 auch in der Lage ist, substituierte CF_3-Aldole als Substrate zu tolerieren, wobei wiederholt nur das (*S*)-Enantiomer zum korrespondierenden Diol reduziert wurde. Alle *para*-substituierten CF_3-Aldole wurden hinsichtlich des (*S*)-Enantiomers nahezu vollständig umgesetzt, während das *ortho*-substituierte Methoxy-Derivat schlechter umgesetzt wurde (Tabelle 58, Edukt **3f**). Daraufhin wurde die etablierte Eintopfreaktion ausgehend von 2,2,2-Trifluoracetophenon auf diverse substituierte Trifluoracetophenone übertragen. Ausgehend von 100 mM Edukt (**1a**-**h**), 2,5 Äquivalente Aceton **2**, 5 mM Organokatalysator **5**, 10 mg mL^{-1} FGZK3, 0,5 M D-Glucose, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C schüttelnd wurden nach einer Reaktionszeit von 17 h GC-Proben entnommen und die relative Bildung der korrespondierenden 1,3-Diole bestimmt (Tabelle 59).

Tabelle 58: Biotransformationen substituierter CF_3-Aldole.

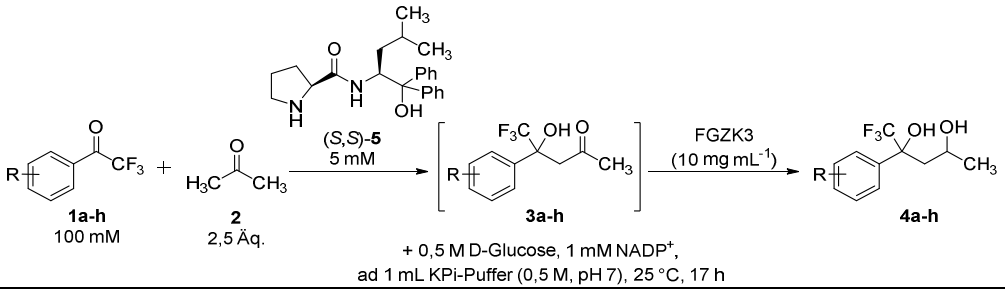


Edukt	Substituent (R)	*ee*[a] [CF_3-Aldol, %]	c [CF_3-Aldol, mM]	Enantio-selektivität	Umsatzstärke für *S*[b]
3b	*p*-Me	90 (*S*)	10,2	*S*	++++
3c	*p*-Cl	2 (*R*)	9,4	*S*	++++
3d	*p*-F	47 (*S*)	10,4	*S*	++++
3e	*p*-OMe	41 (*S*)	9,1	*S*	++++
3f	*o*-OMe	87 (*S*)	10,7	*S*	++

[a]Der *ee*-Wert wurde mittels chiraler GC bestimmt zum Zeitpunkt t=0 h.
[b]Umsatzstärken: 0-25 %= +, 25-50 %= ++, 50-75 %= +++, 75-100 %= ++++.

Es konnte mit allen *para*-substituierten Trifluoracetophenonen mit Ausnahme vom *p*-CF_3-Derivat relative Diolanteile von >92 % im Reaktionsansatz erreicht werden, lediglich mit dem *ortho* substituierten Methoxy-Derivat wurde nur ein Diolanteil von 30 % beobachtet (Edukt **1f**, Tabelle 59). Hierbei muss deutlich gesagt werden, dass der 2. Schritt, also die Reduktion durch den Biokatalysator der geschwindigkeits-bestimmende Faktor ist, das trifft auch auf das Substrat *p*-CF_3-Trifluoracetophenon zu, da alle Aldolreaktionen mit dem *Singh*-Katalysator in kurzer Zeit ablaufen.

Tabelle 59: Eintopfreaktion zur Synthese von diversen substituierten 1,3-Diolen. Der rel. Diolanteil wurde mittels GC bestimmt.



Edukt	Substituent (R)	rel. Diolanteil **4** [%]
1a	*p*-H	94
1b	*p*-Me	93
1c	*p*-Cl	96
1d	*p*-F	95
1e	*p*-OMe	92
1f	*o*-OMe	30
1g	*p*-CF_3	78
1h	*p*-Br	95

Die absolute Konfiguration der neuen substituierten Diole konnten zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden, jedoch wurde angenommen, dass die substituierten 1,3-Diole ebenso (*S*,*S*)-konfiguriert sind wie das unsubstituierte CF_3-Diol.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse im 1 mL-Maßstab wurde die Eintopfreaktion mit den substituierten Trifluoracetophenonen im präparativen Maßstab durchgeführt, um die neuen Diole zu isolieren und umfassend analytisch zu charakterisieren. Hierfür wurden die zuvor durchgeführten Eintopfreaktionen von 1 mL auf ein Reaktionsvolumen von 25 mL vergrößert (0,1 mmol auf 2,5 mmol Edukt). Alle Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und nach einer Reaktionszeit bis zu 22 h (48 h), anschließend mehrmalig mit Diethylether extrahiert. Die isolierten Rohprodukte wurden von M. Sc. Matthias Hammel (Universität Köln, AK Berkessel) säulenchromatographisch gereinigt und anschließend analytisch untersucht.[203] Auf dieser Weise konnten diverse *para*-substituierte (*S*,*S*)-1,3-Diole **4b**-**e** und **4h** in hohen Ausbeuten und exzellenten Enantio- als auch Diastereoselektivitäten mit >99 % *ee*, *de* erhalten werden (Tabelle 60). Es wurden *para* Halogen-, Alkyl- und Methoxy-substituierte CF_3-Derivate toleriert. Ein *Up-Scaling* der Ansätze mit *ortho*-Methoxy- sowie mit dem *para*-CF_3-substituierten CF_3-Derivat waren nicht erfolgreich, sodass kein Umsatz beobachtet wurde, im 1 mL-Maßstab erfolgte die Reduktion nur sehr langsam (Eintrag **1f** und **1g**, Tabelle 60).

Tabelle 60: Ergebnisse der Eintopfreaktionen zur Synthese CF_3-substituierter 1,3-Diole.

Edukt/Eintrag	Substituent	Zeit [h]	Aldol [%]	Diol[c] [%]]	*ee* [%]	*de* [%]	$[\alpha]_D^{20}$
1a[a]	*p*-H	21	-	87	>99[d]	>99[d]	-21,8 °
1b	*p*-Me	18	-	92	>99[e,g]	>99[g]	-20,8 °
1c	*p*-Cl	18	-	92	>99[e,g]	>99[g]	-21,7 °
1d	*p*-F	19	-	80	>99[f,g]	>99[g]	-17,5 °
1e	*p*-OMe	22	-	95	>99[f,g]	>99[g]	-17,2 °
1f[b]	*o*-OMe	48	~75	15	nb	nb	nb
1g[b]	*p*-CF_3	48	8	81	nb	nb	nb
1h	*p*-Br	17	-	94	>99[e,g]	>99[g]	-20,0 °

[a]Dieser Ansatz entspricht dem aus Schema 25 (5 mmol Maßstab).

[b]*Up-Scaling* hat nicht funktioniert, daher wurden diese Ansätze nur in 0,1 mmol-Maßstäben durchgeführt und aufgearbeitet. nb= nicht bestimmbar, aufgrund der geringen Ausbeuten.

[c]Isolierte Ausbeuten.

[d]Mittels chiraler HPLC bestimmt.

[e]Zu Eintrag 1a identisches CD-Vergleichsspektrum erhalten.

[f]Abnormales, nicht aussagekräftiges CD-Vergleichsspektrum erhalten.

[g]Nach Derivatisierung mit *N*,*O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid mittels chiraler GC bestimmt.

3.9 Zugang zu allen vier Stereoisomeren des CF_3-1,3-Diols („*proof of concept*“)

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass das (*S*,*S*)-CF_3-Diol in enantiomeren- als auch diastereomerenreinen Form (>99 % *ee*, *de*) in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung durch Kombination von Organo- und Biokatalyse erhalten werden kann. Maßgeblich für den Erfolg dieser Reaktionsführung war die Verwendung der Alkohol-Dehydrogenase PPADH1 aus *P. pastoris*. Da diese Methode auf die Synthese des (*S*,*S*)-Diols limitiert ist, sollte nun durch Variation sowohl des Organo- als auch des Biokatalysators ein Zugang zu allen vier Stereoisomeren des CF_3-Diols ermöglicht werden. Mit der Wahl des *Singh*-Katalysators **5** im ersten Schritt erhält man jeweils das gewünschte Enantiomer des Aldolprodukts im Überschuss. Anschließend reduziert man das gewünschte CF_3-Aldol mit einer geeigneten (*S*)- oder (*R*)-spezifischen ADH (Abbildung 68). Da hier ebenfalls eine Eintopfreaktion geplant war, in der Organo- und Biokatalysator variiert werden, wurde erstmal überprüft, ob die arbeitsgruppeninternen Dehydrogenasen eine genauso hohe Substratspezifität gegenüber dem CF_3-Aldol aufweisen wie die PPADH1. Anhand photometrischer Aktivitätstests mit dem Edukt 2,2,2-Trifluoracetophenon und dem Zwischenprodukt (CF_3-Aldol) der Eintopfreaktion wurden Rohextrakte verschiedener Dehydrogenasen (unter anderem die ADH aus *Lactobacillus kefir* (LKADH), aus *Rhodococcus ruber* (RRADH), oder die 3α-Hydroxysteroid-DH aus *Comamonas testosteroni* (3α-HSDH)) getestet.

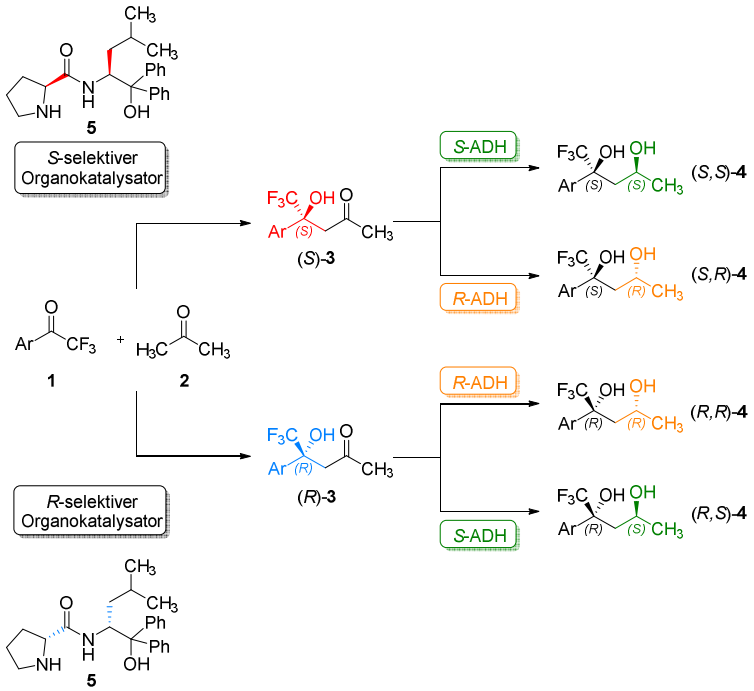


Abbildung 68: Kombinierte Organo- und Biokatalyse zur Darstellung aller vier Stereoisomere des CF_3-Diols **4**. Ar= Aryl.

Hierbei wurden hohe Substratspezifitäten und Aktivitäten gegenüber dem Edukt 2,2,2-Trifluoroacetophenon beobachtet, im Vergleich dazu wurde das CF_3-Aldol mit deutlich geringeren Aktivitäten reduziert. Diese hohe Spezifität/Aktivität gegenüber 2,2,2-Trifluoracetophenon wurde auch in Test-Umsetzungen (Eintopfreaktion mit organokatalysierter Aldolreaktion) beobachtet, wobei nahezu nur die Alkohole durch Reduktion des Trifluoracetophenons gebildet wurden. Da keine der getesteten Dehydrogenasen eine höhere Substrataffinität/-aktivität gegenüber dem CF_3-Aldol zeigte, kann eine Eintopfreaktion, in der die Aldolreaktion und die biokatalytische Reduktion simultan ablaufen, nicht zur Synthese der übrigen Stereoisomere des CF_3-Diols realisiert werden. Aus diesem Grund wäre nur eine sequentielle bzw. modulare Eintopfreaktion denkbar. Da die Aldolreaktion durch den *Singh*-Katalysator bereits erfolgreich durchgeführt und ausführlich beschrieben wurde, wurde der Fokus auf die biokatalytische Reduktion durch verschiedene Dehydrogenasen gelegt. Für die Untersuchung der enzymatischen Reduktionen mit anderen ADHs wurde entweder das racemische CF_3-Aldol oder enantiomerenangereichertes (*R*)-CF_3-Aldol (**3**) und das (*S*)-CF_3-Aldol (**3**) mit einem *ee*-Wert von 89 % eingesetzt, welche zuvor mittels organokatalysierte Aldolreaktion mit dem *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** und (*R*,*R*)-**5** von DUANGDEE *et al*. synthetisiert und bereitgestellt wurden.[188] In der ersten Testreihe wurden einige arbeitsgruppenintern verfügbare rekombinante ADHs für die Reduktion verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 61 zusammengefasst. Bei der Verwendung der RRADH (*R. ruber* ADH) wird deutlich, dass diese für das 1. Stereozentrum (C-1 der Seitenkette) unselektiv ist und sowohl das (*R*)- als auch das (*S*)-Enantiomer zum korrespondieren Diol reduziert (Eintrag 1). Die Bildung des neuen Stereozentrums erfolgt allerdings hochspezifisch, sodass ausschließlich die (*R*,*S*)- und (*S*,*S*)-Diole mit *ee*-Werten >99 % entstehen. Hinsichtlich der LKADH (*L. kefir* ADH), welche normalerweise (*R*)-Alkohole bildet, scheint diese ebenfalls für das 1. Stereozentrums des CF_3-Aldols unselektiv zu sein. Die Bildung des zweiten Stereozentrums durch die LKADH folgt dabei keinem vorhersehbaren Muster. Das enantiomerenangereicherte (*R*)-CF_3-Aldol (Überschussenantiomer) wird sowohl zum (*R*,*S*)- als auch zum (*R*,*R*)-Diol reduziert. Das Unterschussenantiomer in diesem Ansatz ((*S*)-CF_3-Aldol) wird ausschließlich zum (*S*,*R*)-Diol reduziert. Beim Ansatz mit dem enantiomerenangereicherten (*S*)-CF_3-Aldol wird das Überschussenantiomer hauptsächlich zum (*S*,*R*)-Diol reduziert und das Unterschussenantiomer sowohl zum (*R*,*S*)- als auch zum (*R*,*R*)-Diol umgesetzt. Die 3α-HSDH (aus *C. testosteroni*) konnte in beiden Ansätzen vollständige Umsätze erzielen. Auch diese Dehydrogenase zeigte keine Selektivität bezüglich des 1. Stereozentrums des CF_3-Aldols, sodass beide Enantiomere zu den korrespondierenden Diolen reduziert werden. Die Bildung des

2. Stereozentrums erfolgte dabei mit einer hohen (*R*)-Spezifität, sodass beim enantiomerenangereicherten (*R*)-CF_3-Aldol (Überschussenantiomer) hauptsächlich das (*R*,*R*)-Diol gebildet wird und mit dem enantiomerenangereicherten (*S*)-CF_3-Aldol hauptsächlich das (*S*,*R*)-Diol entsteht (Eintrag 3, Tabelle 61). Bei der Verwendung der CTADH (*C. testosteroni* ADH) konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der 3α-HSDH und dem enantiomerenangereicherten (*R*)-CF_3-Aldol als Substrat erreicht werden. Nur mit dem enantiomerenangereicherten (*S*)-CF_3-Aldol als Substrat wird die Bildung des (*S*,*S*)-Diols gegenüber dem (*S*,*R*)-Diols bei der CTADH bevorzugt (Eintrag 4). Bei der PAPADH (*P. pantotrophus* ADH) wurde das racemische CF_3-Aldol als Substrat eingesetzt und es zeigte sich, dass die PAPADH das (*R*)-Enantiomer ausschließlich zum (*R*,*S*)-Diol reduziert, das (*S*)-Enantiomer hingegen wurde zum (*S*,*R*)- und (*S*,*S*)-Diol im Verhältnis 2:1 reduziert (Eintrag 5,Tabelle 61).

Tabelle 61: Reduktion des CF_3-Aldols mit verschiedenen Dehydrogenasen. Die verwendeten ADH sind: RRADH= ADH aus *Rhodococcus ruber*, LKADH= ADH aus *Lactobacillus kefir*, 3α-HSDH= Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni*, CTADH= ADH aus *Comamonas testosteroni*, PAPADH= ADH aus *Paracoccus pantotrophus*).

Eintrag	Enzym	Substrat	Rel. Diol [%][e]	CF_3-Diol Verteilung [%][f]			
				R,*S*	*R*,*R*	*S*,*R*	*S*,*S*
1[a]	RRADH	(*R*)-CF_3	56	95	0	0	5
		(*S*)-CF_3	42	6	0	0	94
2[a]	LKADH	(*R*)-CF_3	99	55	40	5	0
		(*S*)-CF_3	89	4	2	88	6
3[a]	3α-HSDH	(*R*)-CF_3	>99	9	86	5	0
		(*S*)-CF_3	>99	1	5	85	9
4[b]	CTADH	(*R*)-CF_3	63	7	88	1	4
		(*S*)-CF_3	23	0	9	20	71
5[c]	PAPADH	*rac*-CF_3	86	51	0	35	14
6[d]	PPADH	*rac*-CF_3	52	4	0	0	96

[a]10 mM Substrat (89 % *ee*), 0,5 U Enzym (Rohextrakt), 5 U GDH, 50 mM D-Glucose, 1 mM $NAD(P)^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C, 24 h.
[b]10 mM Substrat (89 % *ee*), 10 % (v/v) Rohextrakt, 5 U GDH, 100 mM D-Glucose, 1 mM $NADP^+$ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C, 19 h.
[c]10 mM Substrat, 10 % (v/v) Rohextrakt, 5 U GDH, 50 mM D-Glucose, 1 mM NAD^+ auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C, 22 h.
[d]Ergebnisse aus Tabelle 34 entnommen.
[e]Mit chiraler GC bestimmt.
[f]Mit chiraler HPLC bestimmt.

Diese erste *Screening*-Runde zeigt, dass es möglich sein sollte, alle vier Stereoisomere durch Variation des Biokatalysators und durch Einsatz einer geeigneten CF_3-Aldol-Vorstufe zugänglich zu machen. Die erreichten *ee*-Werte für die Diole liegen zwischen 91 % und >99 %, die *de*-Werte zwischen 71-90 % (Tabelle 62).

Tabelle 62: Zugang zu den Stereoisomeren des CF_3-Diols durch Variation des Biokatalysators. Die *ee*-/*de*-Werte wurden anhand der Ergebnisse aus Tabelle 61 berechnet.

Eintrag	Enzym	Substrat	Diol	*ee* [%]	*de* [%]
1	RRADH	(*R*)-CF_3, (89 % *ee*)	*R,S*	>99	90
2	3α-HSDH	(*R*)-CF_3, (89 % *ee*)	*R*,*R*	>99	72
3	CTADH	(*R*)-CF_3, (89 % *ee*)	*R*,*R*	91	83
4	LKADH	(*S*)-CF_3, (89 % *ee*)	*S*,*R*	92	83
5	3α-HSDH	(*S*)-CF_3, (89 % *ee*)	*S,R*	98	71

Diese Werte bzw. die Reinheit der Diole hängen natürlich von der Enantiomerenreinheit der eingesetzten Substrate ab, welche in diesem Fall bei 89 % *ee* sowohl für das (*R*)- als auch für das (*S*)-CF_3-Aldol lagen. Da, von der PPADH abgesehen, alle verwendeten Biokatalysatoren bezüglich des 1. Stereozentrums unselektiv sind, werden also beide Enantiomere zu den korrespondierenden Diolen reduziert, daher ist es notwendig, enantiomerenreines Substrat für die Dehydrogenasen anzubieten. Da die organokatalysierte Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mit dem (*R*,*R*)- bzw. (*S*,*S*)-*Singh*-Katalysator nur enantiomerenangereichertes (*R*)- oder (*S*)-CF_3-Aldol mit einem Enantiomerenüberschuss von bis zu 93 % *ee* hervorbringt,[89,188] wurde das (*R*)-CF_3-Aldol mittels kinetischer Racematspaltung durch die PPADH1 mit einem *ee*-Wert >99 % nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten. Das enantiomerenreine (*R*)-CF_3-Aldol wurde anschließend als Substrat für die enzymatische Reduktion mit RRADH, 3α-HSDH und die PAPADH eingesetzt. In Tabelle 63 sind die Ergebnisse dieser Umsetzungen dargestellt. Für das (*R*,*S*)-Diol konnten exzellente *ee*- und *de*-Werte mit >99 % mit der RRADH und PAPADH erreicht werden. Für das (*R*,*R*)-Diol konnte mit Hilfe der 3α-HSDH ein *ee*-Wert >99 % und 85 % *de* erhalten werden. Somit konnten für beide Diole die *ee*- und *de*-Werte aufgrund der Verwendung von enantiomerenreinem Substrat deutlich gesteigert werden (vergleiche Ergebnisse aus Tabelle 62 und Tabelle 63).

Tabelle 63: Zugang zu denen CF_3-Diolen (*R*,*S*) und (*R*,*R*) durch Verwendung von enantiomerenreinem (*R*)-CF_3-Aldol und verschiedenen Dehydrogenasen.

Eintrag	Enzym	Substrat	Diol	Umsatz [%][c]	*ee* [%][d]	*de* [%][d]
1[a]	RRADH	(*R*)-CF_3, >99 % *ee*	*R,S*	98	>99	>99
2[b]	PAPADH	(*R*)-CF_3, >99 % *ee*	*R*,*S*	>99	>99	>99
3[a]	3α-HSDH	(*R*)-CF_3, >99 % *ee*	*R*,*R*	>99	>99	85

[a]10 mM Substrat, 0,5 U Enzym, 6 U GDH, 1 mM NAD^+, 150 mM D-Glucose, auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M pH 7), t=21h.
[b]10 mM Substrat, 0,17 U Enzym, 7,4 U GDH, 1 mM NAD^+, 50 mM D-Glucose, auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M pH 7), t=22h.
[c]Mit chiraler GC bestimmt.
[d]Mit chiraler HPLC bestimmt.

Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine (*R*)-spezifische ADH gefunden werden konnte, die selektiv im Sinne einer kinetischer Racematspaltung nur das (*R*)-Enantiomer des racemischen CF_3-Aldols zum Diol reduziert, um reines (*S*)-CF_3-Aldol zu erhalten, kann folglich das (*S*,*R*)-Diol nicht enantio- als auch diastereomerenrein erhalten werden. Falls das (*S*)-CF_3-Aldol zukünftig mit höheren *ee*-Werten (>93 %) erhalten werden kann, könnte durch Reduktion mit der LKADH oder der 3α-HSDH das (*S*,*R*)-Diol in hoher optischer Reinheit dargestellt werden.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Zugang zu allen vier Stereoisomeren des CF_3-1,3-Diols einerseits durch Variation des Organokatalysators (*Singh*-Katalysators) und anderseits durch Variation des Biokatalysators möglich ist. Die optische Reinheit der Diole hängt hierbei stark von der optischen Reinheit des eingesetzten Substrats (Aldol) ab, da die untersuchten Dehydrogenasen keine oder nur eine geringe Enantiospezifität bezüglich des 1. Stereozentrums vorweisen und somit beide Enantiomere zu den korrespondierenden Diolen reduziert werden.

3.10 Synthese geruchsaktiver 1,3-Dioxane (Floropal®) aus chiralen 1,3-Diolen

Die meisten natürlichen Geruchsstoffe sind chirale Moleküle, wobei diese eine ganz bestimmte Enantiomerenzusammensetzung aufweisen. Wenn ein neues, chirales Duftstoff-Molekül entwickelt wird, sind Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit bzw. Geruchseigenschaften der korrespondierenden Stereoisomere (Enantiomere und Diastereomere) notwendig. Um allgemein den Anteil an Chemikalien in kommerziellen Produkten wie z. B. Kosmetika oder Parfüms zu senken, ist es sinnvoll, nur das geruchsaktive Stereoisomere enantiomerenrein anzubieten.[204] Die Anwesenheit von

z. B. nicht-geruchsaktiven Isomeren kann zur Minderung der Qualität des Duftstoffes beitragen, wie es bei der Verwendung von racemischen Gemischen der Fall wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chirale 1,3-Diole hergestellt, welche durch einen chemischen Folgeschritt in 1,3-Dioxane überführt werden können. Ein recht bekannter 1,3-Dioxan-Duftstoff ist 2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxane, kommerziell bekannt unter den Handelsnamen Floropal® oder Vertacetal®. Obwohl Floropal® drei Stereozentren aufweist, werden hauptsächlich nur vier Stereoisomere des Floropals gebildet (Abbildung 69), da das Stereozentrum C-2 labil ist und sich die Methylgruppe diastereoselektiv in die äquatoriale Position ausrichtet.[203] Die 4,6-*trans*-Diastereomere weisen einen Geruch auf, der sich als „stark, krautig-frisch, grün, typisch Grapefruit“ beschreiben lässt, während die 4,6-*cis*-Diastereomere (2*RS*,4*RS*,6*RS*) eher als „sehr schwach, chemisch-lösemittelartig“ beschrieben werden.[205] Die beiden Handelsprodukte Floropal® und Vertacetal® werden dennoch als racemische Gemische verkauft und unterscheiden sich nur hinsichtlich ihres Gehalts an den 4,6-*trans*- und 4,6-*cis*-Diastereomeren (Floropal®: 63,71 % 4,6-*trans* und 34,52 % 4,6-*cis*; Vertacetal®: 54,38 % 4,6-*trans* und 44,33 % 4,6-*cis*).[205] Nur die 4,6-*trans*-Diastereomere wirken hierbei als aktive Riechstoffkomponenten, wobei insbesondere das (2*S*,4*R*,6*S*)-Stereoisomer das gewünschte Isomer des Floropals® darstellt. In Anbetracht der Handelsprodukte Floropal® und Vertacetal® liegt damit der Anteil des geruchsstoffaktiven (2*S*,4*R*,6*S*)-Stereoisomeren nur bei ca. 32 % und 27 %. Aus diesem Grund wäre eine alternative und effiziente Syntheseroute sinnvoll, welche das (2*S*,4*R*,6*S*)-Stereoisomer in enantiomerenreiner Form anbietet.

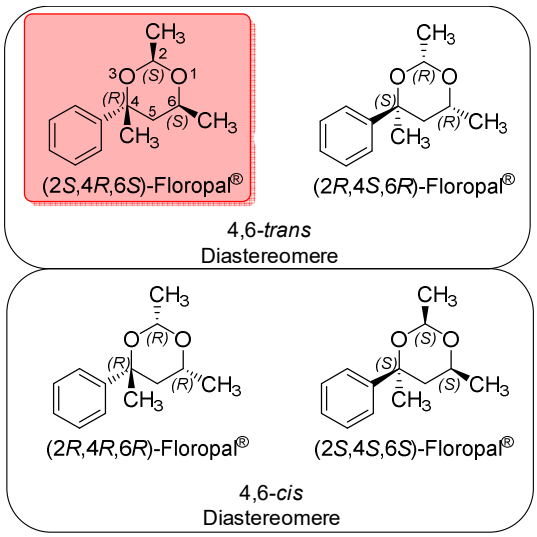
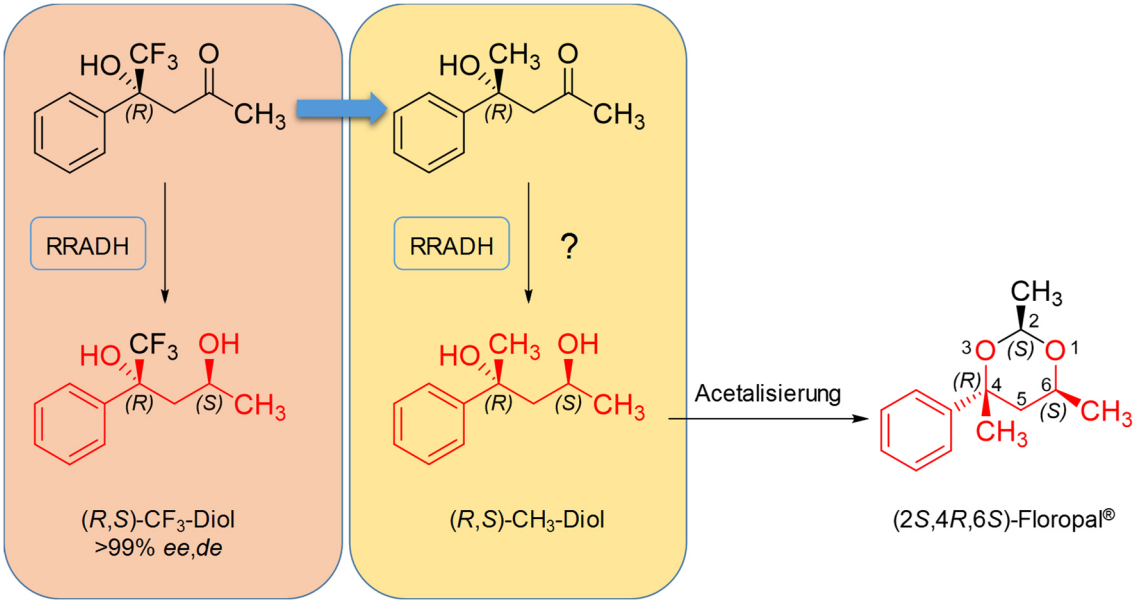


Abbildung 69: Die vier Stereoisomere des Duftstoffes Floropal®/Vertacetal®. Mit einer roten Umrandung gekennzeichnet ist das meist gewollte Stereoisomer.

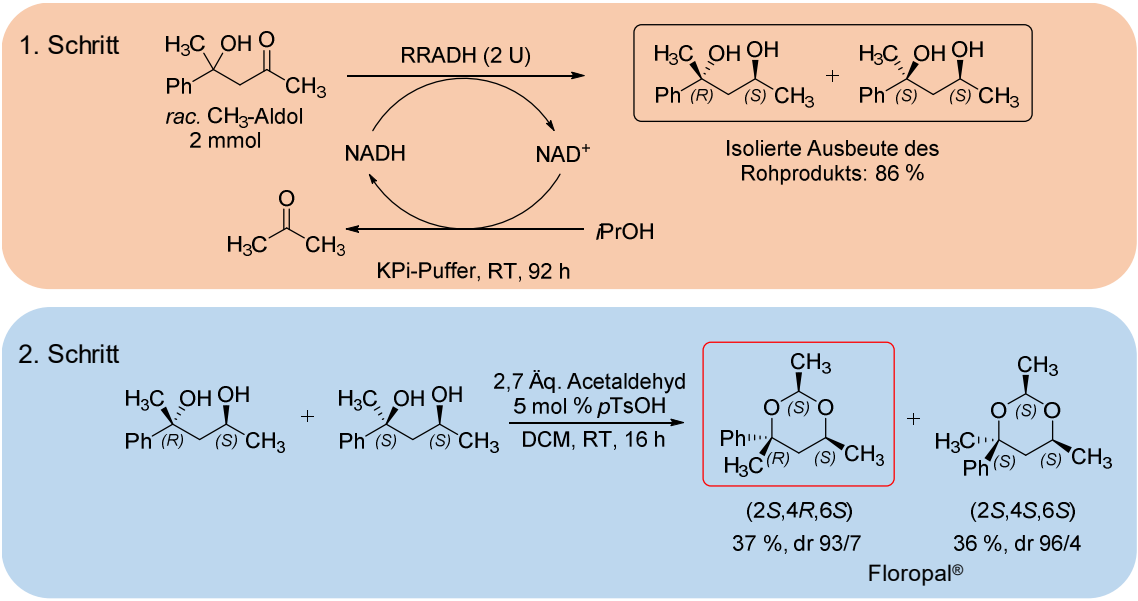
In Kapitel 3.9 konnte gezeigt werden, dass die RRADH das racemische CF_3-Aldol zu den (*R*,*S*) und (*S*,*S*)-Diolen reduziert. Bei der Verwendung von enantiomerenreinem (*R*)-CF_3-Aldol konnte das (*R*,*S*)-CF_3-Diol mit >99 % *ee* und *de* erhalten werden. Dieses (*R*,*S*)-CF_3-Diol kann als Vorstufe des (2*S*,4*R*,6*S*)-Floropals® betrachtet werden, da das Grundgerüst des Floropals® bis auf die CF_3-Gruppe mit dem 1,3-Diol übereinstimmt (rot markierte Strukturen, Schema 30). Die RRADH wurde daraufhin in Umsetzungen mit racemischen CH_3-Aldol als Substrat getestet und hierbei konnten vergleichbare Ergebnisse wie mit dem CF_3-Aldol als Substrat erzielt werden, sodass beide Enantiomere ausschließlich zu den (*R*,*S*)- und (*S*,*S*)-Diolen reduziert wurden.



Schema 30: Biokatalytische Synthesen von chiralen (*R*,*S*)-Diolen als Vorstufen für (2*S*,4*R*,6*S*)-Floropal®.

Mit diesem Ergebnis wurde anschließend ein präparativer Ansatz durchgeführt mit folgender Zusammensetzung: 2 mmol (200 mM) *rac*-CH_3-Aldol (von AK *Berkessel*), 1 mM NAD^+, 20 % (v/v) Isopropanol, 2 U RRADH (Rohextrakt) auf 10 mL KPi-Puffer (0,1 M, pH 7), rührend bei RT, 92 h. Hierbei wurde ein substratgekoppeltes Cofaktorregenerierungssystem mit Isopropanol als Cosubstrat für die RRADH verwendet. Nach einer Reaktionsdauer von 92 Stunden wurde die Reaktionslösung durch mehrmaliges Extrahieren aufgearbeitet und das Rohprodukt mit einer Ausbeute von 86 % isoliert (1. Schritt, Schema 31). Eine GC-Analyse zeigte, dass das eingesetzte CH_3-Aldol zu den (*R*,*S*)- und (*S*,*S*)-Diolen im Verhältnis 1:1 reduziert wurde. Das Rohprodukt wurde anschließend von Matthias Hammel (AK Berkessel, Universität Köln) ohne Aufreinigung mit Acetaldehyd in Gegenwart von *para*-Toluolsulfonsäure zu den

entsprechenden 1,3-Dioxanen umgesetzt, welche anschließend säulenchromatographisch voneinander getrennt isoliert werden konnten. Auf dieser Weise konnte das (2*S*,4*R*,6*S*)-Dioxan enantiomerenrein und hoch diastereomerenrein (dr 96/4) erhalten werden (2. Schritt, Schema 31).



Schema 31: Biokatalytische Floropal®-Synthese mit RRADH ausgehend von *rac*-CH_3-Aldol.

3.11 Bestimmung der absoluten Konfiguration der 1,3-Diole

Die absolute Konfiguration des unsubstituierten CF_3-Diols **4a**, welches sowohl in der kinetischen Racematspaltung als auch in der Eintopfreaktion mittels PPADH-Reduktion hergestellt wurde, konnte zweifelsfrei per HPLC-Vergleichschromatogramme (Abbildung 70) sowohl durch eigene Messungen als auch durch Analysen beim Kooperationspartner (Matthias Hammel, AK Berkessel, Universität Köln) als (*S,S*) identifiziert und verifiziert werden.[203,206] Hierbei konnte auf Vorarbeiten von DUANGDEE zurückgegriffen werden, wobei alle vier Stereoisomere des unsubstituierten CF_3-Diols **4a** nach Natriumborhydrid-Reduktion mittels HPLC getrennt und jedem Signal eine absolute Konfiguration zugeordnet werden konnte (siehe Abbildung 70).[188] Die absolute Konfiguration des verbliebenen (*R*)-Aldols **3a** wurde indirekt auch durch Röntgenstrukturanalyse als (*R*)-konfiguriert bestätigt.[203]

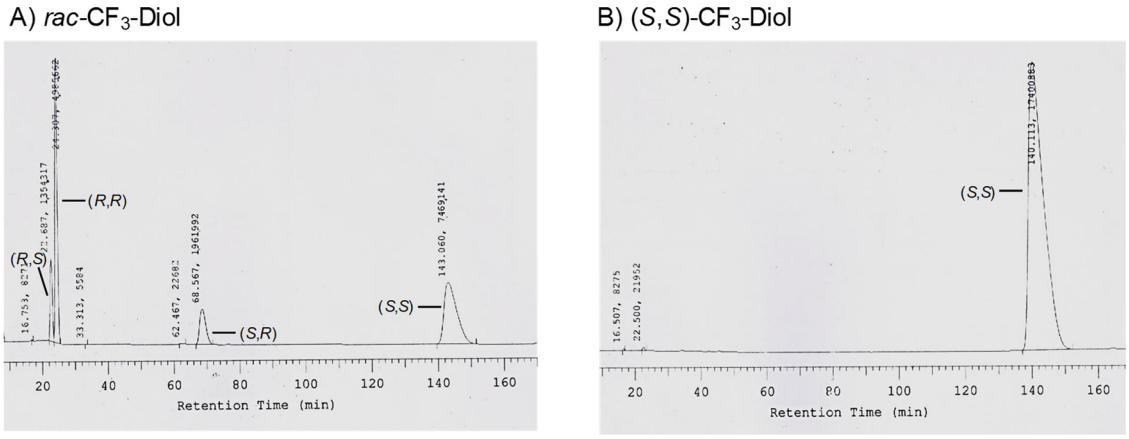


Abbildung 70: Bestimmung der absoluten Konfiguration des CF_3-Diols mittels HPLC-Analyse. A) Zuordnung aller Stereoisomere des CF_3-Diols. B) Isoliertes enantio- und diastereomerenreines (*S,S*)-CF_3-Diol nach PPADH1-katalysierter Racematspaltung.[188,203]

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des entsprechenden nicht-flourierten CH_3-Diols, welches mittels PPADH1-katalysierter Racematspaltung erhalten wurde, konnten Kristalle des CH_3-Diols, des 1,3-Dioxans und des Dinitrobenzoats erhalten werden. Die röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen bekräftigten hierbei eine (*S,S*)-Konfiguration der beiden Stereozentren des CH_3-Diols (Abbildung 71). Zugleich wurde das hoch enantiomerenangereicherte (*R*)-CH_3-Aldol (aus der kinetischen Racematspaltung) als auch racemisches CH_3-Aldol einer Natriumborhydrid-Reduktion unterzogen, wodurch jedem Signal eine eindeutige absolute Konfiguration mittels HPLC zugeordnet werden konnte.[203]

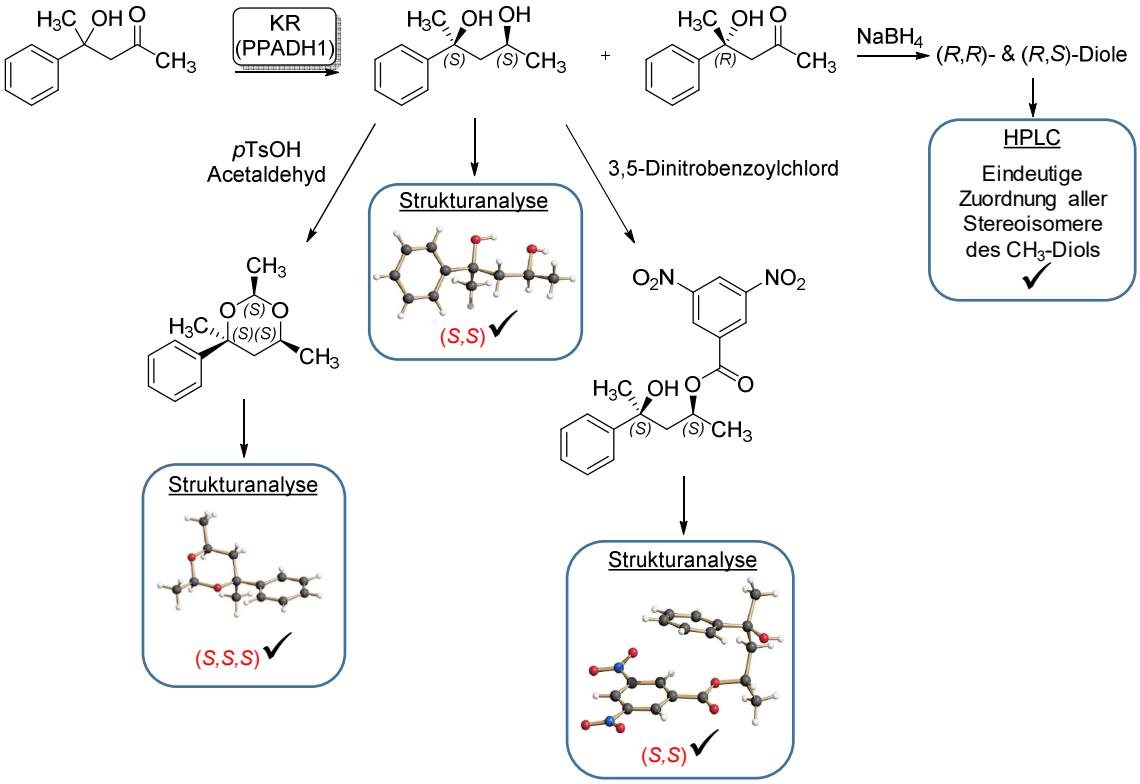
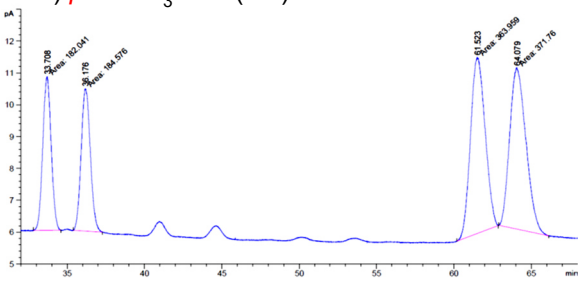


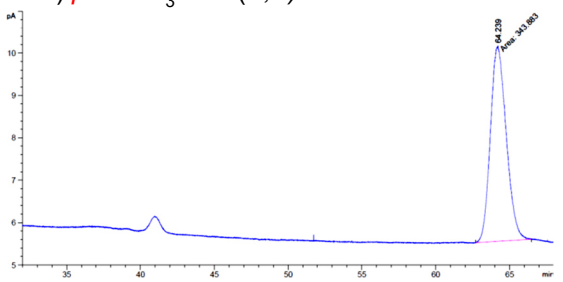
Abbildung 71: Bestimmung der absoluten Konfiguration des (*S,S*)-CH_3-Diols (durchgeführt von Matthias Hammel, AK Berkessel, Universität Köln).[203] KR= Kinetische Racematspaltung.

Bezüglich der Bestimmung der Enantiomeren- und Diastereomerenüberschüsse der substituierten CF_3-Diole aus den präparativen Eintopfreaktionen (Kapitel 3.8.4.2, Tabelle 60) wurden racemisch hergestellte Diole und die mittels dynamisch-kinetischer Racematspaltung erhaltene Diole mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) derivatisiert und mittels GC vermessen (durchgeführt von Matthias Hammel, AK Berkessel, Universität Köln). Anhand der GC-Chromatogramme in Abbildung 72 ist ersichtlich, dass die substituierten (*S,S*)-CF_3-Diole zum einen wie erwartet alle die höchsten Retentionszeiten aufwiesen und zum anderen nahezu in reiner Form vorlagen.[203] Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurden CD (Circulardichroismus)-Spektren der substituierten CF_3-Diole (*p*-Br, *p*-Cl, *p*-F, *p*-Me, *p*-OMe) aus den präparativen Eintopfreaktionen mit dem CD-Spektrum des unsubstituierten (*S,S*)-CF_3-Diols (*p*-H), dessen Konfiguration durch HPLC-Analysen als auch Strukturdaten bestätigt wurde, verglichen (Abbildung 73).

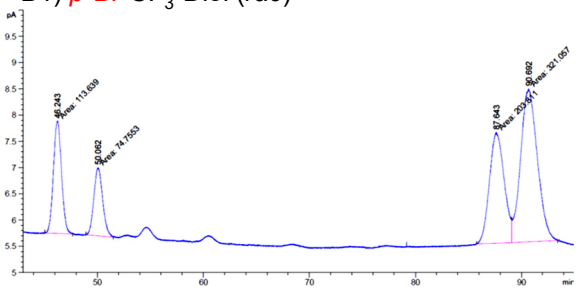
A1) *p*-Cl-CF_3-Diol (*rac*)



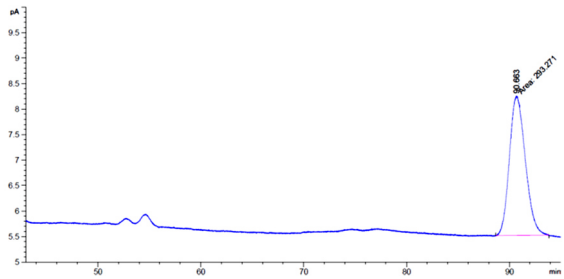
A2) *p*-Cl-CF_3-Diol (*S,S*)



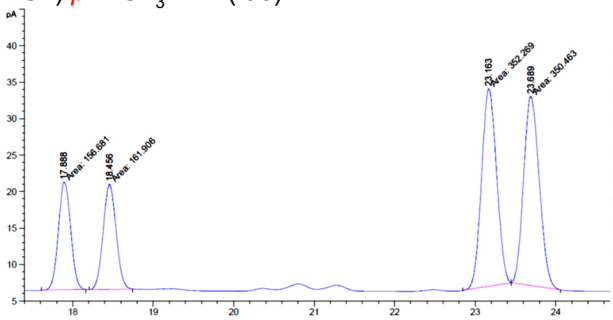
B1) *p*-Br-CF_3-Diol (*rac*)



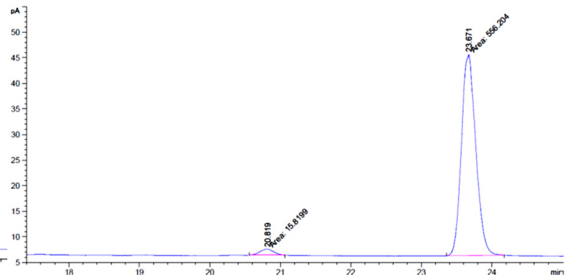
B2) *p*-Br-CF_3-Diol (*S,S*)



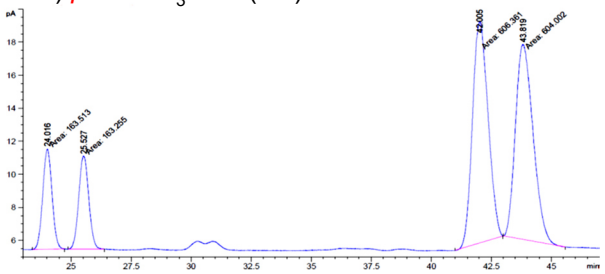
C1) *p*-F-CF_3-Diol (*rac*)



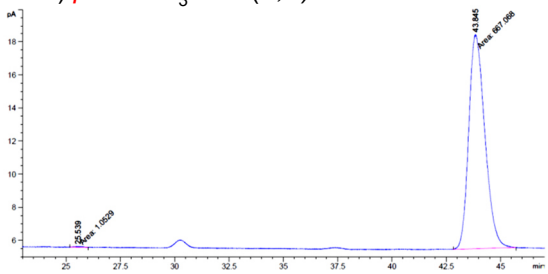
C2) *p*-F-CF_3-Diol (*S,S*)



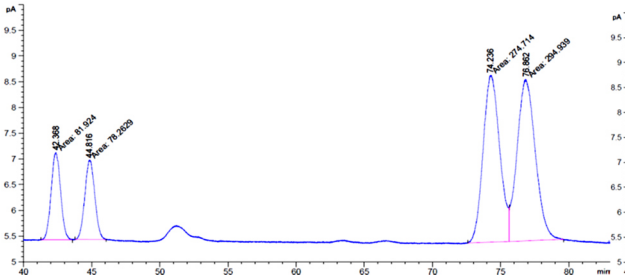
D1) *p*-Me-CF_3-Diol (*rac*)



D2) *p*-Me-CF_3-Diol (*S,S*)



E1) *p*-OMe-CF_3-Diol (*rac*)



E2) *p*-OMe-CF_3-Diol (*S,S*)

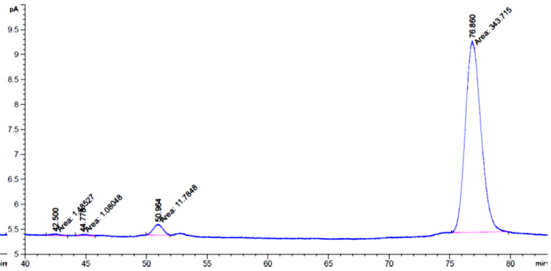


Abbildung 72: Bestimmung von *ee*- und *de*-Werten der substituierten CF_3-Diole mittels chiraler GC-Analyse nach Derivatisierung mit *N*,*O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA).[203]

In Abbildung 73A wird deutlich, dass die substituierten CF_3-Diole *p*-Br, *p*-Cl und *p*-Me ein sehr ähnliches CD-Spektrum im Vergleich zum CD-Spektrum des unsubstituierten (*S*,*S*)-CF_3-Diol (*p*-H) zeigen. Unterschiede, wie die höheren Intensitäten sowie der teilweise größeren Wellenlängen, können durch die verschiedenen Substituenten an *para*-Stellung des Phenylrings begründet werden. Insgesamt ist das Bild jedoch schlüssig, sodass die substituierten CF_3-Diole *p*-Br, *p*-Cl und *p*-Me ebenfalls (*S*,*S*) konfiguriert sind. Das CD-Spektrum des *p*-F-CF_3-Diols (Abbildung 73B) deutet zwar auf ein ähnliches Peak-Muster wie das der anderen hin, jedoch ist es nicht aussagekräftig. Das *p*-OMe-CF_3-Diol lieferte ebenfalls ein abnormales CD-Spektrum (Abbildung 73C), welches für die Bestimmung der absoluten Konfiguration absolut nicht verwendbar war. Mögliche Ursachen für die abnormalen CD-Spektren könnten technische Probleme mit dem Messgerät oder eine falsche Probenvorbereitung sein.[203] Es kann jedoch mit großer Sicherheit angenommen werden, dass die beiden substituierten CF_3-Diole (*p*-F und *p*-OMe) ebenfalls (*S*,*S*)-konfiguriert sind.

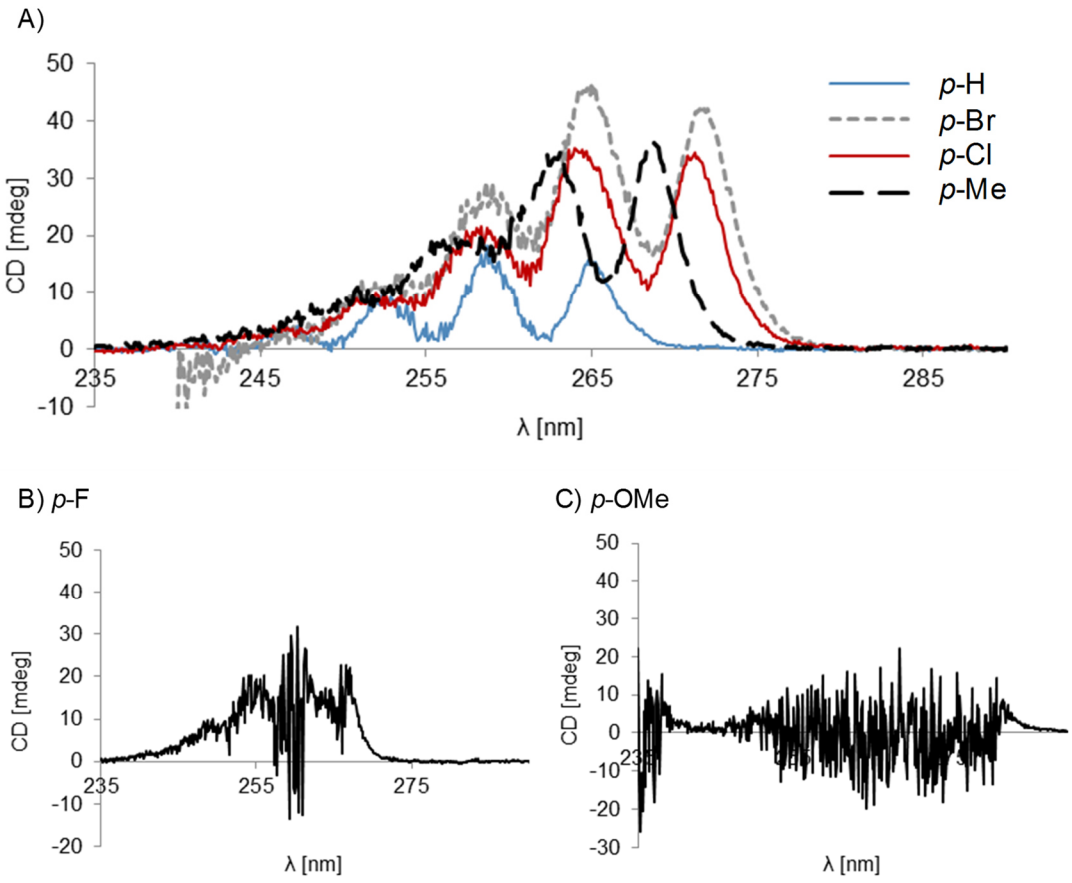
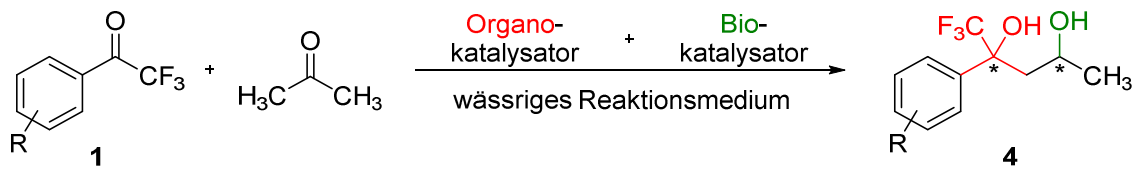


Abbildung 73: CD-Spektren der präparativ hergestellten CF_3-Diole aus der Tandem-Eintopfreaktion. A) CD-Spektren des (*S*,*S*)-CF_3-Diols (*p*-H) sowie der substituierten CF_3-Diole (*p*-Br, *p*-Cl, *p*-Me). B) und C) abnormale CD-Spektren.[203]

Wichtige Anhaltspunkte, die diese These bekräftigen, sind z. B. in Vorversuchen durchgeführte asymmetrische Reduktionen mit (*S*)-angereichertem *p*-F-CF_3-Aldol als auch mit *p*-OMe-CF_3-Aldol (ca. 41-47 % *ee*) im Sinne einer kinetischen Racematspaltung mit der PPADH, sodass auch hier das erste Stereozentrum der gebildeten Diole (*S*)-konfiguriert sein müsste. Zugleich folgt die PPADH1-katalysierte Reduktion für nahezu alle Edukte der PRELOG-Regel, sodass der Hydrid-Transfer von der *re*-facialen Seite des CF_3-Aldols durchgeführt wird und in der Bildung des (*S*)-Alkohols resultiert. Da die Position der Substituenten *p*-F und *p*-OMe sich nicht von denen der anderen substituierten CF_3-Diole unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass die Substratbindung im aktiven Zentrum der PPADH auf ähnlicher oder gar gleicher Weise erfolgt. Eine nähere Betrachtung der PPADH1-Kristallstruktur mit gebundenem (*S*)-CF_3-Aldol liefert zudem keine Anhaltspunkte für eine Änderung der Substratbindung durch die Substituenten *p*-F und *p*-OMe am Phenylring des CF_3-Aldols. Ein weiteres Argument für eine (*S*,*S*)-Konfiguration der *p*-F- und *p*-OMe-CF_3-Diole ist das beobachtete Retentionsverhalten während der GC-Analyse (Abbildung 72): alle isolierten CF_3-Diole weisen die höchsten Retentionszeiten auf (letzter Signalpeak). Für eine zweifelsfreie Bestimmung der absoluten Konfiguration der *p*-F- und *p*-OMe-CF_3-Diole wäre eine Wiederholung der CD-Messung oder weiterführende Experimente (kinetische Racematspaltung racemischer *p*-F- und *p*-OMe-CF_3-Aldole und anschließender Natriumborhydrid-Reduktion der (*R*)-CF_3-Aldole) notwendig.

4. DISKUSSION UND AUSBLICK

Chirale 1,3-Diole mit zwei Stereozentren sind wichtige Strukturmotive und werden oft als Bausteine pharmazeutisch aktiver Wirkstoffe wie z. B. Grahamimycin A (weist eine starke antibakterielle und antimykotische Wirkung auf),[207] Rifamycin B (Medikament zur Behandlung von Tuberkulose bei HIV-infizierten Patienten),[208] oder Statinen (Cholesterinsenker) eingesetzt.[209] Daher ist die stereoselektive Synthese von neuen synthetischen Molekülen mit einem 1,3-Diol-Motiv derzeit von großem Interesse in der organischen Chemie. Ein breites Methodenspektrum zur stereoselektiven Synthese von 1,3-Diolen mit zwei Stereozentren wurde entwickelt, welches chemische als auch enzymatische Synthesestrategien umfasst.[66,210] Eine der vielen Synthesemöglichkeiten besteht darin, eine organokatalysierte asymmetrische Aldolreaktion mit einer diastereoselektiven Biotransformation zu kombinieren, um zu chiralen 1,3-Diolen zu gelangen. In der Arbeitsgruppe von GRÖGER konnte diese chemoenzymatische Reaktionsführung, ausgehend von substituierten Benzaldehyden und Aceton, als modulare Eintopfreaktion sogar in wässrigem Medium erfolgreich realisiert werden.[86] Auf diesem Konzept basierend sollte die Aldolreaktion zweier Ketone zum tertiären β-Hydroxyketon und die anschließende Reduktion zum chiralen 1,3-Diol als Tandem-Eintopfreaktion in dieser Arbeit realisiert werden (Schema 32). Der Wechsel von Aldehyden auf Ketone als Aldol-Akzeptoren ist jedoch aufgrund des ungünstigen thermodynamischen Gleichgewichts der Aldolreaktion schwierig. Aus diesem Grund gibt es nur wenige Beispiele für die direkte Aldolreaktion zweier nicht-aktivierter Ketone.[116] ZHANG *et al*. konnten erstmals die Prolin-katalysierte Aldolreaktion von einem aktivierten Keton 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton zum chiralen β-Hydroxyketon (48 % *ee*, 99 % Ausbeute) realisieren.[117] BERKESSEL *et al.* konnten diese Reaktion mit Hilfe des *Singh*-Katalysators hinsichtlich der Enantioselektivität optimieren.[89] Für die Realisierung der Tandem-Eintopfreaktion war die Auffindung der PPADH als geeigneter Biokatalysator für die asymmetrische Reduktion des Aldolprodukts der Schlüsselschritt.



Schema 32: Tandem-Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole durch kombinierte Organo- und Biokatalyse.

4.1 Identifizierung der PPADH1 als neue Alkohol-Dehydrogenase für die asymmetrische Reduktion des CF_3-Aldols

Wie bereits in der Einleitung erläutert, stellen Biokatalysatoren durch eine Reihe von Vorteilen gegenüber chemischen Synthesereaktionen eine attraktive Alternative für die chemische Industrie dar. Aus diesem Grund ist die Erschließung neuer Enzyme mit neuen, definierten Eigenschaften erforderlich, um den Bedarf an neuen Biokatalysatoren zu decken oder bestehende biokatalytische Prozesse leistungsfähiger zu machen.
Erstes vorrangiges Ziel war es, einen effizienten Biokatalysator für die asymmetrische Reduktion des sterisch anspruchsvollen Substrats β-Trifluormethyl-β-hydroxyketon (CF_3-Aldol) zu finden. In institutsinternen Vorarbeiten wurden einige rekombinant verfügbare und literaturbekannte Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) auf die enantioselektive Reduktion des CF_3-Aldols getestet, jedoch zeigten diese entweder keine Aktivitäten oder nur schwache, wobei letztere keine Enantioselektivität gegenüber dem eingesetzten Substrat aufwiesen. Aus diesem Grund sollte eine neue Alkohol-Dehydrogenase identifiziert werden, welche in der Lage ist, dass CF_3-Aldol mit hoher Aktivität und Enantioselektivität zum chiralen 1,3-Diol zu reduzieren. Die Identifizierung neuer oder verbesserter Enzyme stellt keine einfach Aufgabe dar und wird dementsprechend auch mit der Suche nach der berühmten Nadel im Heuhaufen verglichen.[211]
Um zunächst herauszufinden, ob die asymmetrische Reduktion des CF_3-Aldols überhaupt durch ein entsprechendes Enzym katalysiert werden kann, wurden Rohextrakte aus über 200 verschiedenen mikrobiellen Stämmen der institutsinternen Stammsammlung isoliert und diese einem Aktivitäts-basierten Vorscreening unterzogen. Diese *Screening*-Methode unter Verwendung von Stammsammlungsstämmen bietet den Vorteil, dass bei einem positiven Treffer der jeweilige Stamm bekannt ist und eine gezielte Datenbanksuche nach Genomsequenzen erleichtert und so der Zugang zu einem rekombinanten Enzym ermöglicht wird. Anhand dieser ersten Aktivitäts-basierten Durchmusterung konnten zwei Hefe-Stämme, *Candida boidinii* und *C. methanolica,* identifiziert werden, deren Rohextrakte die enantioselektive Reduktion des (*S*)-Enantiomeren des racemischen CF_3-Aldols zum 1,3-Diol durchführten. Die Tatsache, dass zunächst nur zwei Hefe-Stämme die gewünschte Aktivität katalysieren konnten, deutete zum einen daraufhin, dass die Reduktion des CF_3-Aldols eine für Enzyme anspruchsvolle Reaktion darstellt und zum anderen, dass das gesuchte Enzym nicht ubiquitär zu finden ist und spezielle Eigenschaften aufweisen sollte. Da sich die gewünschte Aktivität auf Rohextrakte von Hefen beschränkte, wurden in einer weiteren *Screening*-Runde fünf weitere Hefe-Stämme identifiziert, die die asymmetrische

Reduktion des CF_3-Aldols katalysierten. Alle positiv getesteten Stämme zeigten eine hohe Enantiospezifität für die Reduktion des (*S*)-Enantiomeren, sodass angenommen werden konnte, dass die Reduktionsaktivität des CF_3-Aldols exklusiv mit der (*S*)-Enantiospezifität einhergeht. Zusätzlich konnte eine Cofaktorpräferenz für NADP(H) gegenüber dem nicht-phosphorylierten Cofaktor festgestellt werden. Bei keinem der im *Screening* identifizierten Stämme konnte die CF_3-Reduktionsaktivität photometrisch quantifiziert werden, sodass die Aktivität nur mittels GC-Analyse nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die schwache Aktivität im Rohextrakt könnte mit einer schwachen, basalen Expression des entsprechenden Gens begründet werden. Präparative und technische Anwendungen fordern die Verfügbarkeit eines rekombinanten Enzyms, daher war die Identifizierung des verantwortlichen Gens für die CF_3-Reduktion eine zwingende Voraussetzung für die weiteren Arbeiten. Nachdem ein weiterer Stamm (*Pichia pastoris* GS115) mit Sequenzinformationen für die Reduktion des CF_3-Aldols identifiziert worden war, wurden zwei Strategien für die Identifikation des Zielproteins bearbeitet:

I) Klonierung und Überexpression von *in silico* annotierten Genen aus *P. pastoris* GS115, welche für putative ADHs kodieren, in *E. coli* BL21(DE3);

II) Reinigung des Zielproteins aus dem zellfreien Rohextrakt von *P. pastoris* GS115 und anschließender Identifizierung mittels Massenspektrometrie.

Beide Strategien weisen Vor- und Nachteile auf. Die erst genannte Methode ist Sequenz-basiert, sodass *in silico* Genom- oder Sequenzdaten aus Datenbanken wie z. B. GenBank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) und Uniprot (www.uniprot.org) des jeweiligen Stamms vorhanden sein müssen. Diese Methode erschien auf den ersten Blick effizienter, da die entsprechenden Gene mittels PCR und genspezifischer Oligonukleotide einfach und schnell verfügbar gemacht und in den entsprechenden Expressionsvektoren kloniert werden könnten. Problematisch erschien jedoch die Auswahl der entsprechenden Gene, da der Stamm *P. pastoris* eine Vielzahl von putativen Oxidoreduktasen bzw. Ketoreduktasen aufweist und zudem die Annotierung der Gene aufgrund ähnlicher Sequenzabschnitte oder Domänen automatisch erfolgt, sodass die Möglichkeit besteht, dass einige putative Alkohol-Dehydrogenasen nicht als solche annotiert werden und schließlich auf diesem Wege nicht gefunden werden. Mit diesem Wissen wurde in der Uniprot-Datenbank mit dem Suchbegriff „alcohol dehydrogenase“ nach entsprechenden Proteinsequenzen gesucht und im Vorfeld diejenigen ausgeschlossen, die hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu bereits biochemisch charakterisierten und ubiquitär vorkommenden Proteinen aufwiesen und als NADH-spezifisch bezeichnet wurden.

Schlussendlich wurden vier ADH-Gene mittels PCR amplifiziert, in pET-Vektoren kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Hierbei zeigte sich, dass die Proteine überwiegend als unlösliche Aggregate (*inclusion bodies*) vorlagen (siehe Kapitel 3.2.1, Abbildung 15). Änderungen der Expressionsbedingungen hinsichtlich der Temperatur und dem Medium sowie der Koexpression mit Chaperonen brachten keinen Erfolg, die ADHs als lösliche Proteine im zellfreien Rohextrakt zu erhalten. Da die ausgewählten Gene aus *P. pastoris*, einem eukaryotischen Organismus, stammen, kann die Expression dieser Gene in prokaryotischen Systemen wie *E. coli* zu Problemen führen, wenn z. B. post-translationale Modifikationen wie Glykosylierung oder die Bildung von intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken für die Faltung und Funktionalität des Proteins benötigt werden.[212–214] Dennoch wurden die Rohextrakte der vier heterolog exprimierten ADH-Gene in *E. coli* für die Reduktion des CF_3-Aldols sowohl photometrisch als auch mittels GC-Analyse überprüft mit dem Resultat, dass die gewünschte CF_3-Reduktionsaktivität in keinem der getesteten Rohextrakte nachgewiesen werden konnte. Nachdem Strategie I nicht zur Identifikation des gesuchten Enzyms geführt hat, wurde die Strategie II, welche die Reinigung des Zielproteins aus dem Rohextrakt von *P. pastoris* darstellt, durchgeführt.

Die auch als „Wildtyp-Reinigung“ bezeichnete Methode ist im Gegensatz zur Strategie I sehr stark von den Eigenschaften und der Aktivität des gesuchten Proteins abhängig. Da die Reinigung von Zielproteinen aus dem Rohextrakt Aktivitäts-basiert erfolgt und Aktivitäten überwiegend gegenüber nicht-physiologischen Substraten getestet werden, muss mit schwachen Aktivitäten und der damit einhergehenden zeitaufwendigen Aufkonzentrierung von Enzym-Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt gerechnet werden.[215] Neben der Auswahl von geeigneten Chromatographie-Materialien stellt nicht nur die Aktivität, sondern auch die Stabilität des Enzyms eine große Herausforderung für die „Wildtyp-Reinigung“ dar. Bleibt das gesuchte Enzym während einer mehrstufigen Reinigung nicht stabil, ist eine Identifizierung des gesuchten Proteins anhand der Aktivität schwer möglich. Ein weiterer Nachteil der „Wildtyp-Reinigung“ ist, dass möglicherweise parallel mehrere Enzyme mit ähnlichen Eigenschaften wie isoelektrischer Punkt (pI), Molekulargewicht, Stereoselektivität und Substratspezifität gereinigt werden.[215] Da ein hoher Reinigungsgrad des gesuchten Proteins für eine anschließende Identifizierung über Massenspektrometrie (z. B. MALDI-TOF) oder N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau) benötigt wird, können Verunreinigungen eine eindeutige Identifizierung erschweren oder gar verhindern. Trotz dieser genannten Herausforderungen lassen sich viele erfolgreiche Bespiele für die Identifizierung eines bestimmten Zielproteins durch „Wildtyp-Reinigung“ in der Literatur finden.[166,216–219]

Da die erste Strategie (Sequenz-basiert) nicht zur Identifikation des Zielproteins geführt hat, wurde der Zellrohextrakt von *P. pastoris* GS115 einer mehrstufigen Reinigung unterzogen. Nach jedem Reinigungsschritt wurden Fraktionen hinsichtlich der Reduktion des CF_3-Aldols getestet, wobei photometrische Aktivitätstests aufgrund der niedrigen Aktivitäten nicht möglich waren. Aus diesem Grund wurden *in vitro* Biotransformationen mit Aliquots der Fraktionen und der GDH als Cofaktor-regenerierendes Enzym durchgeführt und die asymmetrische Reduktion des CF_3-Aldols mittels GC-Analyse verfolgt. Da nur positive Fraktionen mit hohen Umsatzstärken gesammelt und für die nächste Reinigung eingesetzt wurden, konnte das Zielprotein stark angereichert werden. Das gesuchte Enzym erwies sich als recht stabil, da die Aktivität des Zielproteins während des gesamten mehrstufigen Reinigungsprozesses mittels GC-Analyse nachgewiesen werden konnte. Anhand eines SDS-Gels konnte der Reinigungsfortschritt verfolgt und die Anreicherung von zwei Proteinbanden beobachtet werden, welche schlussendlich für die MALDI-TOF MS-Analyse ausgewählt wurden. Da die gesamte Genomsequenz von *P. pastoris* in Datenbanken verfügbar ist,[177] konnten die ermittelten Peptidmassen nach dem tryptischen In-Gel-Verdau der Proteinbanden mit denen in der Proteinsequenz-Datenbank verglichen und einer spezifischen Proteinsequenz mit hohen Mascot-Score und guter Sequenzabdeckung zugeordnet werden (Tabelle 14).

Bei einer der beiden identifizierten Proteinbanden handelt es sich um eine „Glyceraldehyd-3-phospat Dehydrogenase“ (GAPDH), die die reversible Oxidation und Phosphorylierung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter Verbrauch des Cofaktors NAD^+ katalysiert. Dieses Enzym ist essentiell für die Glykolyse und kann als sogenanntes „*housekeeping*“-Protein bezeichnet werden. Eine BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins zeigte hohe Sequenzähnlichkeiten zu einer Vielzahl ähnlicher Proteine aus anderen Hefe-Stämmen. Hierbei weist die identifizierte GAPDH eine Sequenzähnlichkeit von 99,7 % zu einer bereits literaturbekannten GAPDH aus *P. pastoris* auf. Es wird beschrieben, dass das GAPDH-codierende Gen (*GAP*) in *P. pastoris* konstitutiv unter einem sehr starken Promoter (P_{GAP}) exprimiert wird.[220] Diese starke Expression könnte eine mögliche Erklärung sein, warum dieses Enzym zusammen mit dem Zielprotein im Laufe des Reinigungsprozesses angereichert wurde. Hierbei kann angenommen werden, dass die GAPDH in einer sehr hohen intrazellulären Proteinkonzentration im Rohextrakt vorlag und dadurch überrepräsentiert war. Aufgrund ähnlicher Proteineigenschaften wie z. B. dem isoelektrischen Punkt (GAPDH: 6,24 und PPADH1: 6,03) und dem Molekulargewicht (GAPDH: 35,6 kDa und PPADH1: 39,2 kDa) wurde die GAPDH trotz Aktivitäts-basierter Reinigung parallel angereichert. Aufgrund der beschriebenen

Enzymeigenschaften (katalysierte Reaktion, Cofaktorabhängigkeit, Vorkommen) der GAPDH konnte dieses mittels MALDI-TOF MS identifizierte Protein für die Reduktion des CF_3-Aldols allerdings ausgeschlossen werden.

Der Peptidmassen-Fingerabdruck der zweiten angereicherten Proteinbande wurde einer „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktase“ in *P. pastoris* GS115 zugeordnet. Das entsprechende Gen (*ppadh*) wurde in den pET28a-Vektor kloniert und anschließend heterolog im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Eine anschließende Umsetzung mit dem zellfreien Rohextrakt zeigte schließlich die asymmetrische Reduktion des CF_3-Aldols zum 1,3-Diol, sodass das Zielprotein PPADH1 (*Pichia pastoris* Alkohol-Dehydrogenase) mittels „Wildtyp-Reinigung“ erfolgreich identifiziert werden konnte. Vollständige Genomsequenzdaten des Stammes *P. pastoris* GS115, eine nachweisbare Enzymaktivität für die Reduktion des CF_3-Aldols sowie hohe Enzymstabilität während des Reinigungsprozesses waren entscheidend für die erfolgreiche Identifizierung der PPADH1. Rückblickend wäre die Identifikation der PPADH1 aufgrund der Annotierung als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktase“ mit der ersten durchgeführten Strategie nicht möglich gewesen.

4.2 Biochemische Charakterisierung der PPADH und Vergleich mit Gre2, der Methylglyoxal-Reduktase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Nachdem die PPADH als das CF_3-Aldol reduzierende Enzym identifiziert werden konnte, wurde das Gen, kodierend für die PPADH, nach erfolgreicher Klonierung in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Hierbei zeigten anschließende SDS-Gel-Analysen, dass das korrespondierende Gen zwar exprimiert wird, aber der Anteil des Proteins im Rohextrakt nicht sehr hoch ist. Anfangs wurde angenommen, dass das Protein in Form von „*inclusion bodies“* gebildet wird und dadurch weniger lösliches Protein im Rohextrakt vorliegt, jedoch zeigten die SDS-Gelbilder der entsprechenden Fraktion keine entsprechende Proteinbande. Die PPADH konnte mittels Ni-NTA über den N-terminalen His-Tag mit hoher Homogenität aus dem Rohextrakt gereinigt werden. Die gereinigte PPADH-Fraktion zeigte im SDS-Gel weitere Proteinbanden mit Molekulargewichten <35 kDa. Diese zeigten ebenfalls mit einem Anti-His-Antikörper im Western-Blot eine Reaktion, sodass es sich hierbei entweder um partielle Abbauprodukte oder um unvollständig translatierte Proteinfragmente der PPADH handeln müsste. Da das Gen für die PPADH aus einem eukaryotischen Organismus (*Pichia pastoris*) stammt, könnte es aufgrund der unterschiedlichen „*codon usage*“ zu Expressionsproblemen in *E. coli* führen. Eine Analyse der PPADH-Nukleotidsequenz zeigte, dass die Aminosäure Arginin überwiegend durch das Triplet „AGA“ kodiert wird, dieses aber in *E. coli* nur sehr selten verwendet wird.[221–223] Aus diesem Grund wurde ein synthetisches, codon-optimiertes *ppadh*-Gen für *E. coli* konstruiert, jedoch konnte in den entsprechenden Rohextrakten nach Expression keine Aktivitäten gemessen und im SDS-Gel keine Überexpressionsbanden beobachtet werden. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnten sein, dass aufgrund der Codonoptimierung eine Aminosäure überwiegend durch das gleiche Triplet kodiert wird und dies rasch zu einer Erschöpfung der entsprechenden tRNA und folglich zu einem Ungleichgewicht des tRNA-Pools führt. Dies wiederum kann zu erhöhten Fehlerraten in der Translation führen.[224,225] Ebenso könnten die mRNA-Stabilität oder die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen (*hairpin loops*) die Translationseffizienz negativ beeinflussen.[226] Um zukünftig eine bessere Expression des wildtypischen PPADH-Gens zu erreichen, könnten *E. coli* Stämme verwendet werden, die die Gene für seltene Codon-tRNAs coexprimieren wie z. B. *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus oder *E. coli* Rosetta (DE3). Für die biochemische Charakterisierung der PPADH und präparativen Umsetzungen im kleinen Maßstab reichten die Proteinmengen, welche aus der Expression des wildtypischen PPADH-Gens in *E. coli* BL21(DE3) gewonnen wurden, aufgrund der hohen spezifischen Aktivitäten vollkommen aus.

Die PPADH1 kann als ein durchaus stabiles und robustes Enzym bezeichnet werden, da unterschiedliche Faktoren wie z. B. Puffertyp, Pufferstärke und Salze gut toleriert werden und die Stabilität kaum beeinflusst wird (siehe Kapitel 3.5.2). Diese hohe Toleranz und Stabilität erwies sich als besonders vorteilhaft während des mehrstufigen Reinigungsprozesses aus dem Rohextrakt des wildtypischen *Pichia*-Stammes. Zwei kritische Faktoren, die die Stabilität der PPADH stark beinflussen, sind zum einen der pH-Wert und zum anderen die Temperatur. Mit Hilfe des Thermofluor-*Screens* konnte gezeigt werden, dass die PPADH einen weiten pH-Bereich von 6-9 toleriert jedoch bei pH-Werten <6 instabil ist. Im Gegensatz dazu wurde die höchste Aktivität für die Reduktion von Ethyl-4-chloroacetoacetat bei einem pH-Wert von 5,5 gemessen. Bezüglich des Einsatzes der PPADH in Biotransformationen insbesondere in Kombination mit Glucose und der GDH als Cofaktor-regenerierendes Enzym sollte der pH-Wert bei 7 liegen, um eine hohe Stabilität als auch Aktivität beider Enzyme zu gewährleisten. Zusätzlich muss beachtet werden, dass aufgrund der entstehenden Gluconsäure bei der Cofaktorregeneration ein geeigneter Puffer mit ausreichender Pufferstärke verwendet wird, um den pH-Wert stabil zu halten. Bezüglich des Faktors Temperatur konnte festgestellt werden, dass die PPADH thermolabil ist und ab einer Temperatur von ca. 45 °C beginnt zu denaturieren. Die Schmelztemperatur T_m, bei der die PPADH zu 50 % denaturiert ist, wurde mit dem Thermofluor-*Screen* bestimmt und beträgt 50 °C. In Übereinstimmung mit der ermittelten Thermostabilität wurde für die Reduktion von Ethyl-4-chloroacetoacetat ein Temperaturoptimum zwischen 40 °C und 45 °C ermittelt. Um eine Denaturierung der PPADH zu verhindern und gute Aktivitäten über eine längere Reaktionsdauer zu gewährleisten, wurden die Biotransformationen in dieser Arbeit bei 25-30 °C durchgeführt.

Die PPADH wurde hinsichtlich verschiedener Substrate getestet, um zum einen die natürliche Funktion bzw. die natürliche Substratklasse des Enzyms herauszufinden und zum anderen das biotechnologische Potential zu ergründen. Die PPADH favorisiert die Reduktion von linearen und verzweigten, aliphatischen Aldehyden wie z. B. Butyraldehyd oder 2-Methylvaleraldehyd. Desweiteren werden β-Ketoester mit guter bis moderater Aktivität von der PPADH reduziert, wobei die Aktivität steigt, wenn eine elektronenziehende Gruppe im Substrat vorliegt wie z. B. bei Ethyl-4-chloroacetoacetat. Der Einfluss eines elektronenziehenden Substituenten konnte vor allem bei den β-Hydroxyketonen CF_3-Aldol und CH_3-Aldol beobachtet werden. Während das CF_3-Aldol ein sehr gutes Substrat darstellt und mit hoher spezifischer Aktivität (>30 U mg^{-1}) reduziert wird, konnte mit dem CH_3-Aldol photometrisch nur eine geringe Aktivität (<1 U mg^{-1}) gemessen werden. Mögliche Gründe für diese Aktivitätsunterschiede

könnten zum einen elektronische und zum anderen sterische Effekte sein, da die CF_3-Gruppe einen deutlich größeren *van der Waals*-Radius als auch ein größeres *van der Waals*-Volumen als eine CH_3-Gruppe aufweist und von der „Größe“ her eher einer Ethyl-Gruppe ähnelt.[227–230] Vermutlich kann das CF_3-Aldol durch eine größere Raumerfüllung der CF_3-Gruppe im aktiven Zentrum der PPADH besser gebunden werden als das unfluorierte Substratanalogon (CH_3-Aldol). Mit Ausnahme des racemischen CF_3-Aldols werden unfunktionalisierte Ketone wie Acetophenon, Trifluoracetophenon sowie aliphatische Ketone wie 2-Butanon kaum reduziert. Hierbei kann vermutet werden, dass Ketone mit zusätzlichen H-Brückendonoren oder -akzeptoren für eine stärkere Substratbindung im aktiven Zentrum benötigt werden. Insgesamt lässt sich für die PPADH weder ein vorhersagbares Substratmuster erkennen, noch erhält man auf Grund der gut-umsetzbaren Substrate einen Hinweis auf die natürliche Funktion. Die PPADH wurde als putative Dihydrokaempferol-4-Reduktase in der Datenbank annotiert, jedoch wurden keine Aktivitäten hinsichtlich der Reduktion von Flavonoiden durch die PPADH beobachtet. Die BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz der PPADH in der UniprotKB-Datenbank zeigte die höchste Sequenzähnlichkeit von 50,8 % bis 90,4 % zu denen der PPADH2-PPADH6. Mit Sequenzähnlichkeiten von ca. 35-45 % zur PPADH wurden einige Proteine gelistet, die als NADPH-abhängige Methylglyoxal-Reduktasen annotiert sind. Eines der bekanntesten Enzyme stellt hierbei die Gre2 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar, welches *in vivo* die Detoxifikation von Methylglyoxal durch Reduktion zu (*S*)-Lactaldehyd katalysiert und eine wichtige Rolle als Suppressor in der Filament-Bildung spielt.[231,232] Darüberhinaus stellt Gre2 einen wertvollen Biokatalysator dar, der eine Vielzahl von Carbonyl-Verbindungen (Ketone, Diketone und Ketoester) zu industriell wichtigen chiralen Molekülen wie z. B. (2*S*,5*S*)-Hexandiol oder (*S*)-3-Chlor-1-phenylpropanol umsetzt.[166,233,234] Die Struktur der Gre2 wurde kürzlich aufgeklärt und zeigte strukturelle Ähnlichkeiten zu einer Carbonyl-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* (SSCR).[235,236] Vergleicht man die PPADH mit den beiden Enzymem Gre2p und SsCR, so wird deutlich, dass die drei Enzyme einige Gemeinsamkeiten aufweisen (Tabelle 64): Alle drei Enzyme gehören zu der sogenannten „*extended*“ SDR (*Short Chain* Dehydrogenase/Reduktase)-Familie, sie sind strikt NADP(H)-abhängig, (*S*)-spezifisch für die Reduktion von Keto-Gruppen, weisen ähnliche Molekulargewichte auf und stammen aus Hefen. Die Reduktasen Gre2 und SsCR zeigen ein deutlich breiteres Substratspektrum im Vergleich zur PPADH, die bezüglich der Reduktion von Ketonen sehr eingeschränkt ist. Enzyme aus der SDR-Familie zeichnen sich inbesondere dadurch aus, dass sie sich strukturell im N-terminalen Bereich aufgrund der

Rossmann-Falte (Cofaktor-Bindung) sehr ähneln und sich im C-terminalen Bereich der Substratbindung stark unterscheiden.[201]

Tabelle 64: Vergleich einiger Eigenschaften der PPADH mit denen der Reduktasen Gre2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und der SsCR aus *Sporobolomyces salmonicolor*. SDR= *Short-chain* Dehydrogenase/Reduktase

Enzym	PPADH (*P. pastoris*)	Gre2 (*S. cerevisiae)*	SSCR (*S. salmonicolor*)
Uniprot-ID	C4R4L0	Q12068	Q9UUN9
Proteinfamilie	*Extended* SDR	*Extended* SDR	*Extended* SDR
Struktur	Dimer	Monomer	Monomer
Molekulargewicht [kDa]	39,244	38,139	37,318
Cofaktor	NADP(H)	NADP(H)	NADP(H)
pH-Optimum	5,5	7	5,5
Temperatur-Optimum [°C]	40-45	54	40
Substratspektrum	Aldehyde, β-Ketoester	Diketone, α-/β-Ketoester, Aldehyde	α-/β-Ketoester, Ketone, Aldehyde
Stereopräferenz	(*S*)	(*S*)	(*S*)
Referenz	diese Arbeit [206]	[166]	[237–239]

Die Unterschiede in den Substratspektren der Gre2 und der PPADH konnten in Vorarbeiten anhand der Substrate 2,5-Hexandion, Benzaldehyd und dem CF_3-Aldol besonders deutlich gezeigt werden (Tabelle 65).[198] Die PPADH zeigt mit dem Standardsubstrat Benzaldehyd eine spezifische Aktivität von 50,2 U mg^{-1}, die Gre2 dagegen nur 25,8 U mg^{-1}. In Bezug auf das Standardsubstrat 2,5-Hexandion der Gre2 wurde eine Aktivität von 2,8 U mg^{-1} bei der PPADH und eine 17-fach höhere Aktivität von 47,7 U mg^{-1} bei der Gre2 gemessen. Im Gegensatz dazu liegt die Aktivität der PPADH für das racemische CF_3-Aldol mit 46,8 U mg^{-1} um das nahezu 30-fache höher als bei Gre2 (Tabelle 65).[198] Es kann zunächst vermutet werden, dass aufgrund der strukturellen Unterschiede im C-terminalen Bereich der Substratbindung oder des Substrattunnels sich PPADH und Gre2 hinsichtlich ihrer Substrataffinitäten unterscheiden. In Anbetracht des erstellten Struktur-Alignments von PPADH und Gre2 in Abbildung 74 wird deutlich, dass trotz der geringen Aminosäuresequenz-Identität von nur 41 % die Strukturen weitestgehend mit Ausnahme einer Region in der C-terminalen Domäne übereinstimmen (rote Markierung). Dies erklärt insbesondere die gemeinsamen Eigenschaften wie z. B. die strikte NADP(H)-Präferenz sowie die (*S*)-Spezifität der beiden Enzyme (Tabelle 64), da die Position bzw. die Orientierung des Cofaktors in beiden Strukturen nahezu identisch ist.

Tabelle 65: Vergleich der Substratakzeptanz der gereinigten PPADH und der Gre2. Die Aktivitäten wurden photometrisch mit 20 mM Substrat in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7) und 0,2 mM NADPH bei 25 °C vermessen.[198]

Substrat	PPADH	Gre2
	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]	Spez. Aktivität [U mg^{-1}]
Benzaldehyd	50,2	25,8
2,5-Hexandion	2,8	47,7
rac-CF_3-Aldol	46,8	1,6

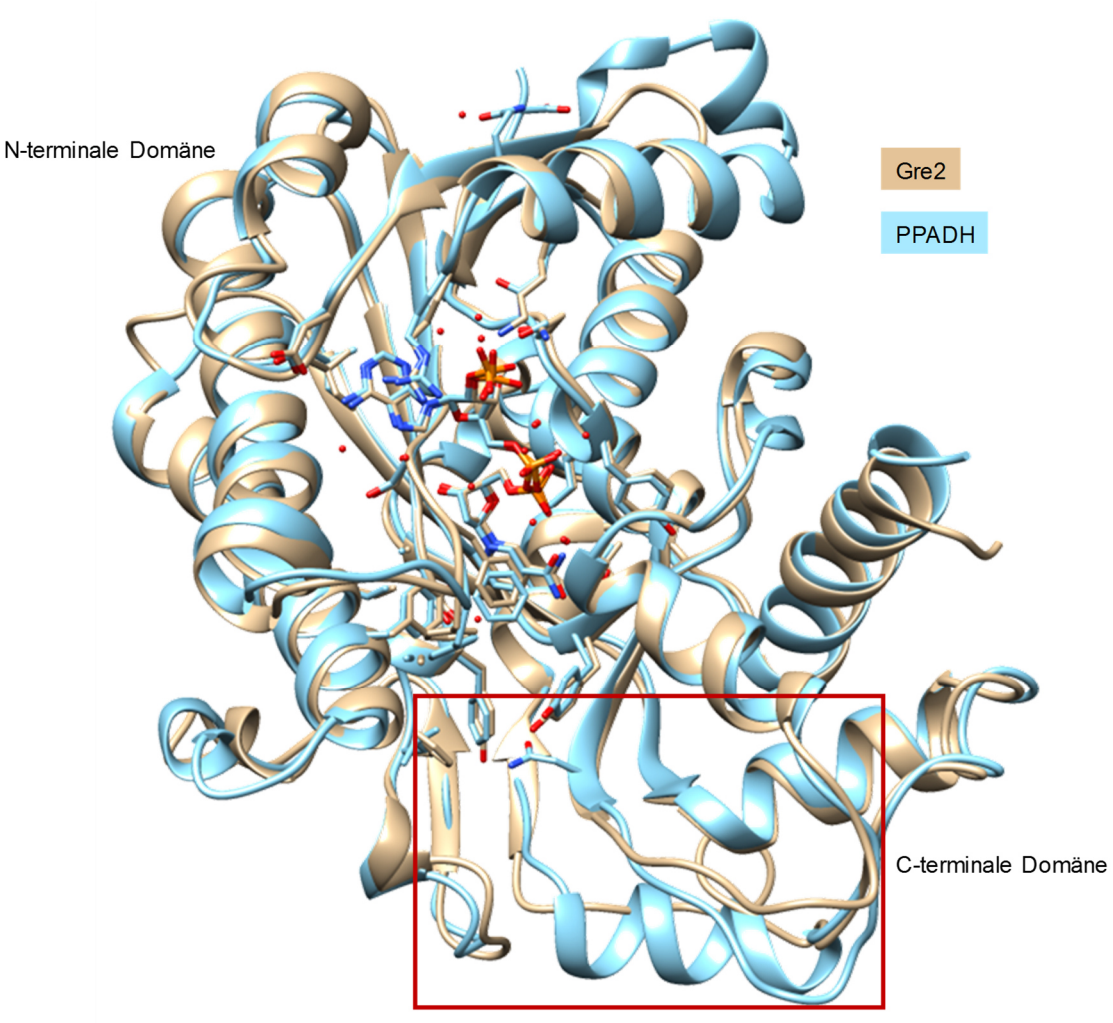


Abbildung 74: Struktur-Alignment von PPADH (Y176F+$NADP^+$+CF_3-Aldol (nicht dargestellt)) und Gre2 (4PVD, +NADPH). Rote Markierung veranschaulicht eine Region der C-terminalen Domäne, in der sich PPADH und Gre2 besonders deutlich unterscheiden. Für die Darstellung wurde die Software UCSF Chimera unter Verwendung des „MatchMaker"-Tools (Algorithmus: Needleman-Wunsch, Matrix: BLOSUM-62) verwendet.[240,241]

Bei genauerer Betrachtung der Oberflächenstrukturen von PPADH und Gre2 können jedoch Unterschiede hinsichtlich der Substratbindetasche bzw. des Substrattunnels festgestellt werden (Abbildung 75). Während die Substratbindetasche der Gre2 aus einem breiten Eingang und einem tiefen, hydrophoben Tunnel besteht (Abbildung 75A), zeigt die PPADH eher einen schmaleren Eingang und einen kürzeren Substrattunnel. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser tiefe, hydrophobe Substrattunnel der Gre2 der Grund ist, warum vor allem lineare Substrate wie z. B. Butanal, Pentanal, Octanal und 2,5-Hexandion mit hoher Reduktionsaktivität von der Gre2 umgesetzt werden können.[166,235]

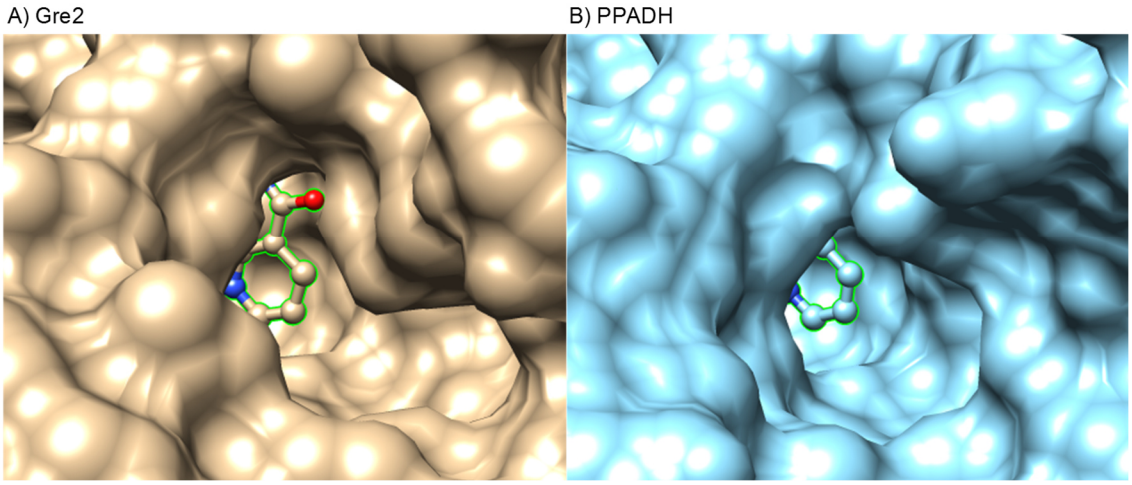


Abbildung 75: Vergleich der Substrattunnel von A) Gre2 (4PVD, +NADPH) und B) PPADH (Y176F+$NADP^+$+CF_3-Aldol (nicht dargestellt)). Die Positionen der Cofaktoren (grün markiert) sind nahezu identisch. Für die Darstellung wurde die Software UCSF Chimera verwendet.[241]

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich die Gre2 aus *S. cerevisiae* und die PPADH aus *P. pastoris* strukturell trotz der geringen Aminosäuresequenzidentität von ca. 41 % sehr ähneln. Die Methylglyoxal-/Isovaleraldehyd-Reduktase Gre2 kann als ferner „Verwandter“ bzw. als homologes Enzym der PPADH betrachtet werden. Hierbei kann spekuliert werden, ob die physiologische Funktion der PPADH in Äquivalenz zur Gre2 in z. B. der Detoxifikation von Methylglyoxal in *P. pastoris* liegt und das PPADH-kodierende Gen wie das Gre2-kodierende Gen durch Stressbedingungen (z. B. osmotischer Stress, oxidativer Stress, Hitzeschock) induziert wird.[242–245] Zur Aufklärung der physiologischen PPADH-Funktion könnte die Konstruktion eines *ppadh*-defizienten *P. pastoris*-Stammes hilfreich sein, da sich mögliche Unterschiede aufgrund der Gendeletion am einfachsten im Wachstum unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen lassen. Um eine stressbedingte Abhängigkeit der *ppadh*-Induktion festzustellen, kann eine Analyse des Transkriptionslevels des *ppadh*-Gens unter Stressbedingungen aufschlussreich sein.

4.3 Zielgerichtete Mutagenese der PPADH1 und PPADH4 zur Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen

Die zielgerichtete Mutagenese zeigt gegenüber der chemischen Mutagenese und der Mutagenese durch fehlerhafte PCR viele Vorteile. Der wichtigste Punkt hierbei ist, dass bei chemischer Mutagenese, wie z. B. dem Einsatz von UV-Strahlung oder mutagenen Substanzen, die Veränderungen von Eigenschaften auf DNA-Ebene nicht vorhersehbar sind. Die zielgerichtete Mutagenese hingegen bietet eine präzise und punktgenaue Veränderung des Erbguts, die die Analyse der hervorgerufenen, veränderten Eigenschaften erleichtert. Die zielgerichtete Mutagenese findet vor allem Anwendung bei Funktionsanalysen von Proteinen und Enzymen, da die Veränderung eines Nukleotids bereits zum Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein führen kann. Da Aminosäuren sich in ihrer Größe der Seitenkette, Ladung und Eigenschaften unterscheiden, kann der Austausch in einer relevanten Position das Protein grundlegend verändern. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist allerdings, dass es Vorstellungen zur Struktur des Proteins gibt, entweder auf Basis einer gelösten Struktur oder eines Strukturmodells. Welche Bedeutung diese Veränderung für die Proteinaktivität, Substratbindung, Stabilität, Stereospezifität, etc. hat, kann dann anschließend analysiert werden. Durch zielgerichtete Mutagenese ist es also möglich, die Funktionsweise und den Aufbau der Proteine bzw. Enzyme besser verstehen zu können.

Bei der Auffindung des PPADH-Gens aus *P. pastoris* und der genaueren Analyse der Genlokalisation ist aufgefallen, dass das identifizierte *ppadh*-Gen zusammen mit drei weiteren als „putative Dihydrokaempferol 4-Reduktasen“-annotierten Gene (kodierend für PPADH2-PPADH4) nacheinander geschaltet im Genom vorliegt. Erstaunlicherweise konnten bei der PPADH1 und der PPADH4, trotz hoher Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene von 90,4 %, deutliche Unterschiede in der Genexpression, den katalytischen Eigenschaften sowie der Stereospezifität festgestellt werden (Kapitel 3.6). Mit Hilfe eines semirationalen Ansatzes auf Basis eines Aminosäuresequenz-Vergleichs sowie der Strukturdaten der PPADH1 wurden zwei Regionen, 94-96 sowie 136-142, für die zielgerichtete Mutagenese ausgewählt. Es wurden Mehrfach- und Einzelmutanten der PPADH4 erstellt, wobei in beiden Fällen Aminosäure-Sequenzen aus der PPADH1 eingebracht wurden. Im Falle der Mehrfach-Mutanten konnte die Stereoselektivität der PPADH4 in die der PPADH1 durch Austausch der Aminosäuren V-A-L zu F-I-F (Region 94-96) verändert werden, wobei insbesondere die Position 94 eine wichtige Rolle hinsichtlich der Stereoselektivität zu haben scheint. Diese Hypothese konnte mit

den Ergebnissen der PPADH1-Mutanten bekräftigt werden. Hierbei zeigte sich, dass nur der Aminosäureaustausch der Position 94 von Phenylalanin zu Valin eine Änderung der Stereospezifität bewirkt. Um die Wichtigkeit der Region 94-96, insbesondere der Position 94, sowie der Region 136-142 zu verdeutlichen, wurden die Strukturen der PPADH1 (Y176F+NADP$^+$+CF_3-Aldol) sowie der PPADH4 (vorläufige Struktur) näher untersucht. Bei genauerer Betrachtung der Oberflächenstrukturen von PPADH1 und PPADH4 können Unterschiede hinsichtlich der Substratbindetasche bzw. des Substrattunnels festgestellt werden (Abbildung 76A). Die Substratbindetasche der PPADH4 ist deutlich größer als die der PPADH1. Hierbei kann angenommen werden, dass die Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum der PPADH4 mit einer gewissen Flexibilität möglich ist. Dies könnte auch der mögliche Grund sein, warum die PPADH4 im Vergleich zur PPADH1 eine nur moderate Enantioselektivität für die Bildung von z. B. (*S*)-Phenylethanol aufweist. Zusätzlich konnte bei der Reduktion des CF_3-Aldols gezeigt werden, dass die PPADH4 die Bildung des *anti*-Diastereomeren ((*S*,*R*)-CF_3-Diol) bevorzugt, während die PPADH1 eine umgekehrte Diastereoselektivität mit Bildung des *syn*-Diastereomeren ((*S*,*S*)-CF_3-Diol) zeigt. Beide Enzyme sind also für das Stereozentrum (C-1) hochselektiv und reduzieren nahezu ausschließlich das (*S*)-Enantiomer des racemischen CF_3-Aldols, die Bildung des zweiten Stereozentrums an C-3 bzw. der Hydridtransfer erfolgt bei der PPADH1 strikt von der *re*-facialen Seite, sodass das neue Stereozentrum stets (*S*)-konfiguriert ist. Im Gegensatz dazu erfolgt der Hydridtransfer an C-3 bei der PPADH4 überwiegend von der *si*-facialen Seite, sodass das (*S*,*R*)-Diol als Hauptprodukt erhalten wird. Diese *anti*-Diol-Präferenz der PPADH4 konnte ebenfalls durch Mutagenese der Region 94-96 (V-A-L zu F-I-F) zur Präferenz der PPADH1, also einer *syn*-Diol-Bildung, geändert werden. Die Wichtigkeit der Aminosäure an Position 94 für die Diastereoselektivität konnte erneut anhand der Ergebnisse der PPADH1 F94V-Mutante gezeigt werde, die als einzige PPADH1-Mutante in der Lage war, das (*S*,*R*)-Diol zu bilden. In Abbildung 76B sind die beiden Regionen 94-96 sowie 136-142 der PPADH1 und PPADH4 im Vergleich gezeigt. Hierbei scheint die Größe der Aminosäure an Position 94 einen deutlichen Einfluss auf die Substratbindetasche auszuüben. Das Phenylalanin (in PPADH1) ist sterisch sehr anspruchsvoll und verengt die Substrattasche auf einer Seite hin, was anhand der Oberflächenstrukturen in Abbildung 76B deutlich erkennbar ist. Hierbei kann vermutet werden, dass das Phenylalanin an Position 94 (F94) an der Substratbindung und der Positionierung *via* hydrophober Wechselwirkung im aktiven Zentrum der PPADH1 beteiligt ist. In der PPADH4 scheint die Substitution von Valin zu Phenylalanin einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms auszuüben, da im Vergleich zu den übrigen PPADH4-Mutanten nur geringe Umsätze beobachtet wurden.

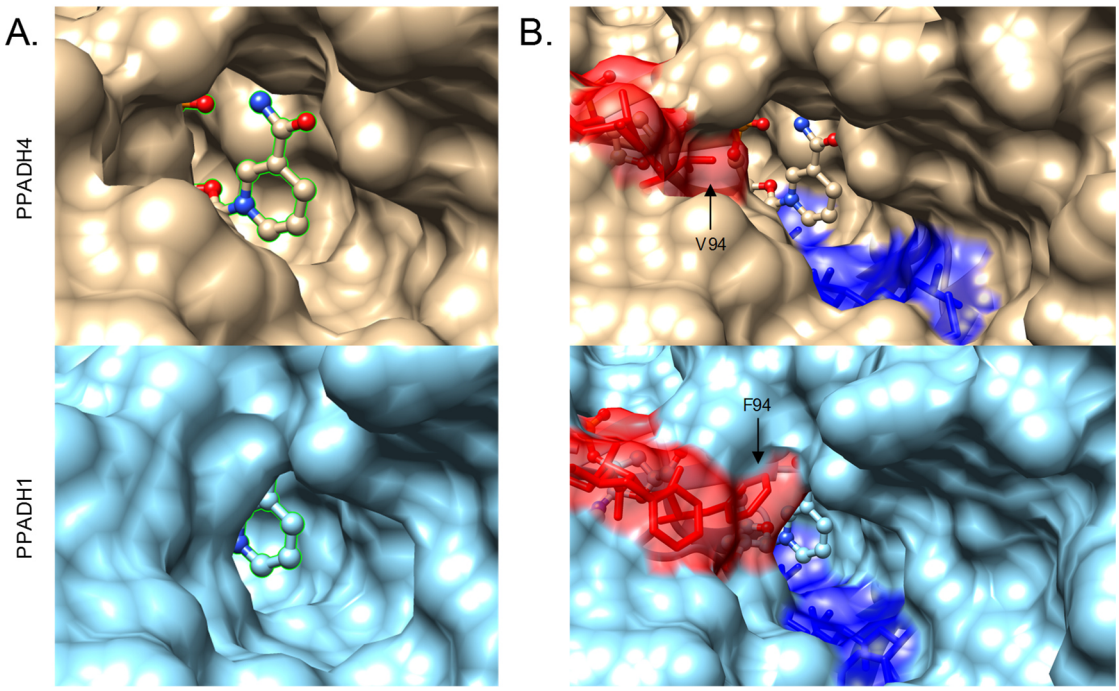


Abbildung 76: Vergleich der Substrattunnel von PPADH4 (braun, +$NADP^+$) und PPADH1 (türkis, Y176F+$NADP^+$+CF_3-Aldol (nicht dargestellt)). A) Darstellung der Substratbindetaschen. B) Darstellung der Regionen 94-96 (rot) und 136-142 (blau). Pfeile verdeutlichen die an der Position 94 befindlichen Aminosäuren Phenylalanin (F) in PPADH1 und Valin (V) in PPADH4. Für die Darstellung wurde die Software UCSF Chimera verwendet.[241]

GUO *et al*. konnten durch zielgerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren der Substratbindetasche in Gre2 und der anschließenden Analyse der kinetischen Parameter zeigen, dass die Mutante F85A einen 77-fach höheren K_M-Wert für die Reduktion von Isovaleraldehyd im Vergleich zur wildtypischen Gre2 aufwies. Daraufhin wurde postuliert, dass F85 maßgeblich an der Substratbindung beteiligt ist, da diese zusammen mit einigen weiteren Aminosäuren eine hydrophobe Umgebung im aktiven Zentrum schafft und zur Substratstabilisierung beiträgt.[235] Die Aminosäure F85 in Gre2 entspricht den Aminosäuren F94 sowie V94 in der PPADH1- und PPADH4-Struktur (Abbildung 77). Anhand des Strukturalignments von Gre2, PPADH1 und PPADH4 ist ersichtlich, dass die Aminosäuren des aktiven Zentrums hochkonserviert sind, vor allem die katalytische Triade bestehend aus Tyrosin, Lysin und Serin (Abbildung 77). Die Ergebnisse von GUO *et al*. bestätigen die wichtige Rolle des Phenylalanins an der Position 85 für die Substratbindung in Gre2, allerdings wurde der Einfluss dieser Position auf die Stereoselektivität nicht untersucht. Anhand der PPADH1-Ergebnisse kann jedoch vermutet werden, dass die Substitution des Phenylalanins (F85) durch Alanin oder Valin in Gre2 mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Vergrößerung der Substratbindetasche einhergehend mit einer Verringerung der Stereoselektivität führt.

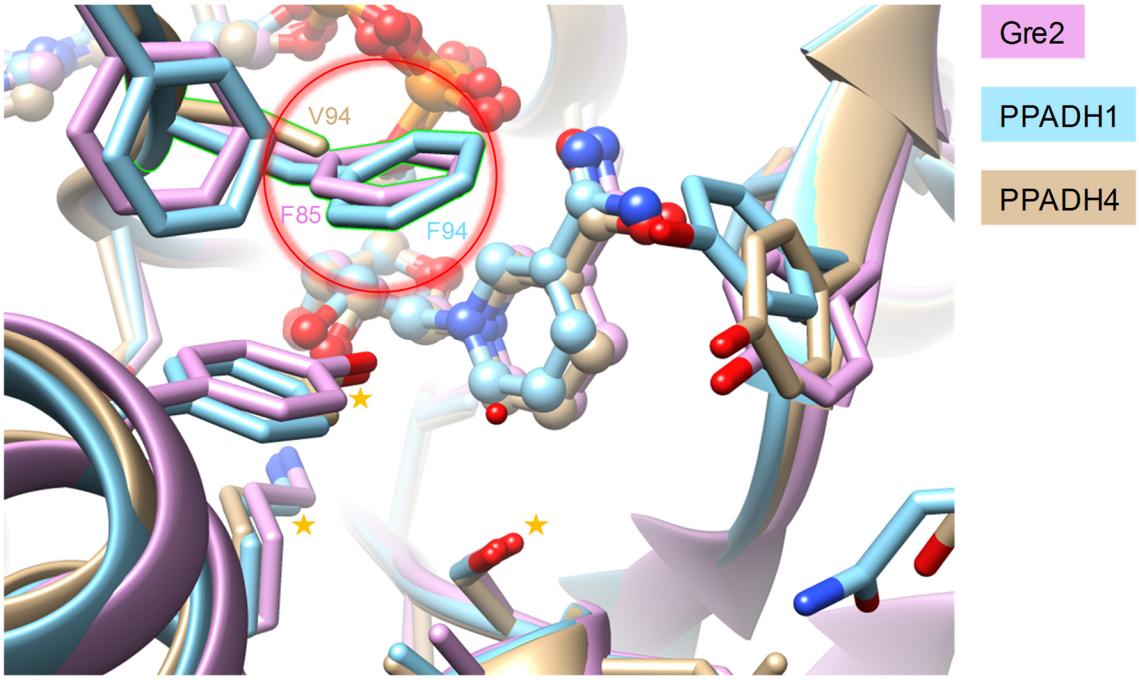


Abbildung 77: Struktur-Alignment von PPADH1 (türkis, Y176F+NADP⁺+CF_3-Aldol (nicht dargestellt)), PPADH4 (braun, +NADP⁺) und Gre2 (violett, 4PVD, +NADPH). Roter Kreis veranschaulicht die Position 85 (Gre2) sowie Position 94 (PPADH1, PPADH4). Die Sterne markieren die katalytische Triade (Serin, Lysin und Tyrosin). Für die Darstellung wurde die Software UCSF Chimera unter Verwendung des „MatchMaker"-Tools (Algorithmus: Needleman-Wunsch, Matrix: BLOSUM-62) verwendet.[240,241]

Neben der für die Substratbindung wichtige Region 94-96, konnte die Region 136-142 als weiterer *hot spot* identifiziert werden. Bei der PPADH4 und der Dreifach-Mutante (PP4 3x, 94-96) wurde eine Substratüberschussinhibierung festgestellt, hingegen bei den Vierfach- und Siebenfach-Mutanten eine normale Michaelis-Menten-Kinetik beobachtet wurde. Dabei scheint insbesondere die Region 136-142 der PPADH4 für die Substratüberschussinhibierung eine wichtige Rolle einzunehmen, da es mit dem Einbringen von Aminosäure-Motiven aus der PPADH1 an diesen Positionen zur Eliminierung der Substratüberschussinhibition kommt. Eine Substratüberschuss-inhibierung liegt dann vor, wenn ein Enzym zwei Bindestellen für ein Substrat aufweist, wobei eines davon katalytisch inaktiv ist und die Bindung des Substrats an der katalytisch aktiven Bindestelle negativ beeinflusst bzw. stört.[246] Da die Region 136-142 die untere Seite bzw. den Boden der Substratbindetasche formt (Abbildung 76B), könnte der größere Tunneleingang der PPADH4 durchaus die Bindung eines weiteren Substratmoleküls ermöglichen, wodurch in Anwesenheit hoher Substratkonzentrationen die Katalyse negativ beeinflusst wird.

4.4 Vor- und Nachteile bei der Verwendung von Ganzzellkatalysatoren für die Reduktion des CF_3-Aldols und für die Synthese von chiralen 1,3-Diolen

Alkohol-Dehydrogenasen benötigen Cofaktoren wie z. B. NAD(P)H als Redoxäquivalente. Für industrielle Anwendungen ist es daher notwendig, ein simultanes Cofaktorregenerierungssystem zu verwenden, um Prozesse effizienter und nachhaltiger zu gestalten. Es gibt viele verschiedene Methoden um reduzierte Cofaktoren zu regenerieren (siehe Kapitel 1.5.2). Für den Einsatz der PPADH1 für die Racematspaltung des racemischen CF_3-Aldols sowie für die Etablierung der Eintopfreaktion zur Synthese von 1,3-Diolen wurde überwiegend die GDH von *B. subtilis* und D-Glucose als Cosubstrat für Regenerierung des reduzierten Cofaktor eingesetzt. Die Verwendung der GDH als regenerierendes Enzym bietet neben der dualen Cofaktorspezifität, hohen spezifischen Aktivität und Stabilität den Vorteil, dass D-Gluconolacton im Zuge der Oxidation von D-Glucose spontan und quasi irreversibel zu Gluconsäure hydrolysiert und dadurch das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung Produktseite verschoben wird.[138]

Biotransformationen lassen sich grundsätzlich mit isolierten Enzymen oder mit Ganzzellkatalysatoren in Form von Wildtyp-Stämmen oder rekombinanten Stämmen (meist *E. coli*) durchführen. In der vorliegenden Arbeit wurden die PPADH1 und die GDH als isolierte Enzyme (Kapitel 3.8.1.1-3.8.1.2) und als Ganzzellkatalysatoren für Racematspaltung des CF_3-Aldols eingesetzt (Kapitel 3.8.1.3-3.8.1.4). Beide Methoden weisen ihre Vor- und Nachteile auf, die im Folgenden ausführlich beschrieben werden.

Vorteilhaft bei der Verwendung von isolierten Enzymen ist die hohe Produktivität und Selektivität, sodass störende Nebenreaktionen und die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten minimiert werden können. Dadurch wird eine anschließende Produktaufarbeitung erleichtert, da auf aufwendige chromatographische Trennverfahren verzichtet werden kann.[122,142,247] Da Dehydrogenasen Cofaktor-abhängig sind, muss bei der Verwendung von isolierten Enzymen extern Cofaktor zugegeben werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Herstellung von isolierten Enzymen zeitaufwendig und kostenintensiv ist. So wird beschrieben, dass bereits die Herstellung eines Zellrohextrakts doppelt so teuer ist wie die Herstellung eines Ganzzellkatalysators und sich diese Kosten bei einer kompletten Reinigung um mehr als ein 10-faches erhöhen.[248] Die generellen Unterschiede hinsichtlich der notwendigen Prozessschritte bei der Verwendung von isolierten Zellen und einem Ganzzellkatalysator sind bespielhaft für die PPADH und GDH schematisch in Abbildung 78 dargestellt.

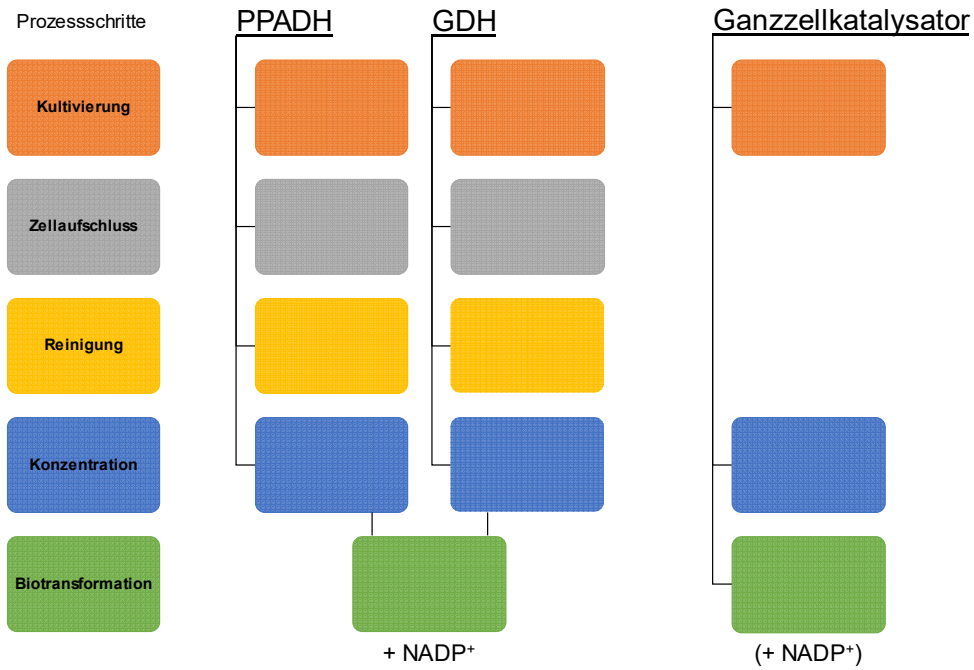


Abbildung 78: Vergleich der benötigten Prozessschritte bei der Verwendung von isolierten Enzymen (beispielhaft für PPADH und GDH) und eines Ganzzellkatalysators, modifiziert nach GRÖGER *et al*. (2006).[249]

Die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren bietet nicht nur den Vorteil, dass aufwendige Arbeitsschritte wie Zellaufschluss und Proteinreinigung entfallen (siehe Abbildung 78), auch auf den externen Zusatz von Cofaktoren kann theoretisch verzichtet werden. Hierbei nutzt man die intrazellulären Cofaktormengen, welche durch den eigenen Zellmetabolismus bereitgestellt werden.

Im Gegensatz zu isolierten Enzymen kann bei der Koexpression von zwei Genen das Verhältnis der exprimierten Enzymaktivitäten in Ganzzellkatalysatoren nur schwer beeinflusst oder verändert werden. Eine Möglichkeit, dieser Limitierung entgegenzuwirken, liegt in der Durchführung einer Zwei-Plasmid-Strategie. Hierbei werden Plasmide verwendet, die eine unterschiedliche Kopienanzahl innerhalb der Zelle aufweisen und folglich Enzymaktivitäten angepasst werden können. MENZEL *et al*. (2004) konnten durch diese Strategie die spezifischen Aktivitäten der Leucin-Dehydrogenase (LeuDH, ~400 U mg^{-1}) und Formiat-Dehydrogenase (FDH, ~6 U mg^{-1}), die sich um einen Faktor von >65 unterscheiden, auf 2 U mg^{-1} für die LeuDH und 0,3 U mg^{-1} für die FDH erfolgreich anpassen.[250] Alternativ können Promotoren unterschiedlicher Stärke verwendet oder die Expressionsbedingungen (z. B. Medium, Temperatur) variiert werden, um das Verhältnis der notwendigen Enzyme innerhalb der Zellen zu optimieren. Als Beispiel konnten RICHTER *et. al*. (2010) zeigen, dass durch Variation des Mediums

(LB, TB, M9, AI, HDF) und der Expressionstemperatur (25, 30, 37 °C) das Verhältnis zweier koexprimierter Enzyme (Glycerol-Dehydrogenase (GlyDH) und GDH) von 0,7 bis 18,1 variiert werden kann.[251]

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Ganzzellkatalysatoren für die Koexpression der PPADH und der GDH in *E. coli* erstellt, die sich zum einen hinsichtlich der verwendeten Plasmide und zum anderen hinsichtlich der Genorientierung unterscheiden (Tabelle 66). Dabei lagen die Gene, welche für die PPADH und GDH kodieren, entweder beide im gleichen Plasmid vor (Ein-Plasmid Strategie, MCS I und MCS II) oder die Gene wurden in zwei unterschiedliche Plasmide kloniert (Zwei-Plasmid Strategie). Dies hat den Vorteil, dass unterschiedliche Möglichkeiten bezüglich der Kopienanzahl der Plasmide sowie der Orientierung der beiden Gene eine Variation in der Expressionsstärke und somit auch der Enzymaktivitäten erlauben.

Tabelle 66: Übersicht über die verwendeten Plasmide für die Konstruktion der Ganzzellkatalysatoren in dieser Arbeit.

Ganzzell-konstrukt	Verwendete Plasmide	Replikon [Ursprung]	Enthaltene Genprodukte	Kopienanzahl pro Zellen[a]
GZK1	pETDuet-1	ColE1 [pBBR322]	PPADH+GDH	~40
GZK2	pETDuet-1	ColE1 [pBBR322]	GDH+PPADH	~40
GZK3, FGZK3	pET28a	ColE1 [pBBR322]	PPADH	~40
	pACYCDuet-1	P15A [pACYC184]	GDH	~10-12

[a]Referenzangaben (Kopienanzahl wurde anhand von Gel-Analysen abgeschätzt).[252,253]

Um die Expression der PPADH und der GDH in den drei Konstrukten vergleichen zu können, wurden die spezifischen Aktivitäten in den Rohextrakten aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen gegenübergestellt (Abbildung 79). Die GZKs 1 und 2 unterscheiden sich nur in der Reihenfolge der Gene und es wird deutlich, dass das GDH-Gen in beiden multiplen Klonierungsstellen (MCS) im pETDuet-Plasmid besser exprimiert wird als das PPADH-Gen. Liegt das GDH-Gen in der MCSII, wie es beim GZK1 der Fall ist, so wird das GDH-Gen deutlich stärker exprimiert als in der MCSI. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bei der Verwendung des pETDuet-1, welcher zwei Promotoren aber nur einen Terminator aufweist, die RNA-Polymerase an beide Promotoren binden kann. Bei der Bindung der RNA-Polymerase am zweiten Promotor wird nur das zweite Gen transkribiert. Bindet hingegen die RNA-Polymerase an den ersten Promotor, wird nicht nur das erste Gen transkribiert, sondern auch das zweite, da keine Terminatorsequenz zwischen den beiden Genen liegt. Somit würde man annehmen, dass das zweite Gen im pETDuet-1 Vektor stärker exprimiert wird als das Gen in der

ersten MCS. Diese Annahme bestätigt sich jedoch nicht für das PPADH-Gen, da die Aktivität im GZK2 (*ppadh* in MCSII) niedriger ist als im GZK1 (*ppadh* in MCSI). Eventuell könnte eine zu starke Expression des PPADH-Gens in diesem Fall sogar einen nachteiligen Effekt auf die korrekte Faltung ausüben und dadurch zu einer niedrigeren Aktivität führen. Betrachtet man hingegen die Aktivitäten im GZK3 so wird deutlich, dass die PPADH höhere Aktivitäten aufweist im Vergleich zu GZK1 und GZK2, obwohl die Kopienanzahl pro Zelle bei beiden Plasmiden bei ca. 40 liegt (Tabelle 66). Im GZK3 wird die PPADH mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert, hingegen die PPADH in GZK1 und GZK2 ohne His-Tag exprimiert wird. Der positive Einfluss des N-terminalen His-Tags auf die Aktivität der PPADH wurde in Kapitel 3.5.5 ausführlich untersucht und beschrieben. Hier zeigte sich, dass der N-terminale His-Tag einen Einfluss auf V_{max} ausübt und diesen im Vergleich zu einem C-terminalen His-Tag erhöht (Kapitel 3.5.5, Tabelle 23). Mit Hilfe dieser Ergebnisse könnte die hohe PPADH-Aktivität im Rohextrakt des GZK3 gegenüber den niedrigen Aktivitäten in GZK1 und GZK2 erklärt werden. Die GDH-Aktivität im GZK3 ist im Gegensatz zu den anderen GZKs niedriger als die der PPADH-Aktivität. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das GDH-Gen auf ein sogenanntes „*low-copy*“-Plasmid vorliegt, welches eine deutlich geringere Kopienanzahl in der Zelle aufweist als die pET-Vektoren (Tabelle 66). In Abbildung 79 ist ebenfalls erkennbar, dass der GZK3, der mittels Hochzelldichte-Fermentation gewonnen wurde (FGZK3), um ein 2,4-fach höhere PPADH/GDH-Aktivitäten im Rohextrakt aufweist als der GZK3 (Kultivierung im Schüttelkolben).

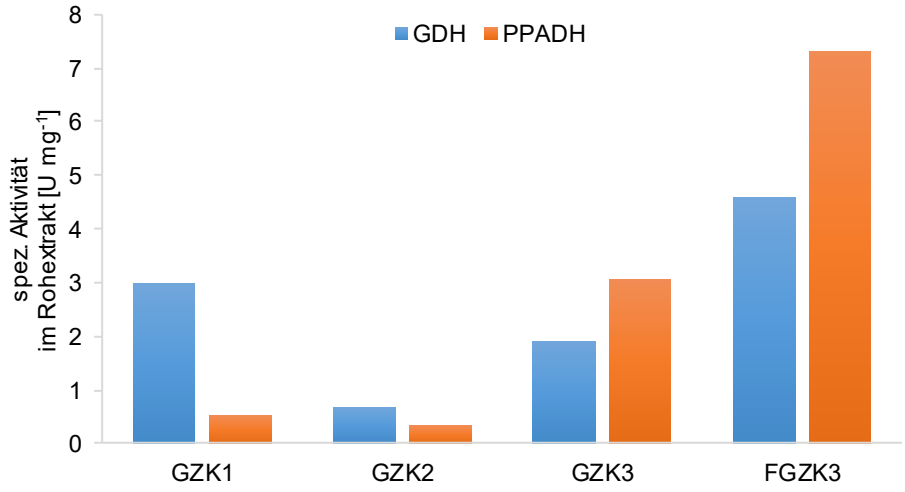


Abbildung 79: Übersicht der spezifischen Aktivitäten der PPADH und GDH in den Rohextrakten der *E. coli* Ganzzell-Katalysatoren.

Hier kann angenommen werden, dass die Kultivierungsbedingungen (längere Kultivierungszeit, niedrigere Expressionstemperatur, Medium, Induktorkonzentration) der HZD-Fermentation die Expression der beiden Gene steigert und dadurch höhere Aktivitäten erreicht werden.

Um die Qualität der Ganzzellumsetzungen zu beurteilen, wurde berechnet, wie gut die intrazelluläre Enzymaktivität ausgenutzt wird. Hierfür wurden die Zellaktivitäten der Ganzzellkonstrukte berechnet und den entsprechenden Enzymaktivitäten gegenübergestellt (Tabelle 67).

Tabelle 67: Vergleich der Zellaktivität bei der Reduktion des *rac*-CF_3-Aldols mit den Enzymaktivitäten pro g Zellen (Feuchtgewicht) für die verschiedenen Ganzzellkatalysatoren. Die Zellaktivität wurde anhand des zeitlichen Verlaufs der Umsetzungen aus Kapitel 3.8.1.3 im nahezu linearen Bereich bestimmt und entspricht µmol Produkt min^{-1} (U) g^{-1} Zellen.

Konstrukt	Enzymaktivitäten pro g Zellen [U]		Zellaktivität [U g^{-1}]	Ausnutzung [%][a]
	GDH	PPADH		
GZK1	162,6	28,6	9,0	31,5
GZK2	35,4	19,2	8,4	43,6
GZK3	112,0	178,7	14,7	8,2
FGZK3	251,8	402,4	220,0	54,7

[a]Zellaktivität/PPADH-Enzymaktivität*100

Bei Betrachtung der Tabelle 67 fällt auf, dass alle berechneten Zellaktivitäten niedriger sind als die gemessenen Enzymaktivitäten der PPADH, sodass anscheinend die intrazelluläre Enzymaktivität nicht optimal ausgenutzt wird. Die Zellen in den Ganzzellumsetzungen nutzen schätzungsweise 8,2-54,7 % der intrazellulären Enzymaktivitäten aus. Die Zellaktivitäten der GZKs 1 und 2 liegen zwischen 8-9 U g^{-1}, im Vergleich dazu ist die Zellaktivität von GZK3 nahezu doppelt so hoch (14,7 U g^{-1}). Die erhöhte GZK3-Zellaktivität kann mit den hohen intrazellulären Enzymaktivitäten der PPADH und GDH im GZK3 erklärt werden. Die intrazelluläre PPADH-Aktivität im GZK3 ist um ein 6-9-faches höher als in den GZK1 und GZK2, sodass eigentlich eine weitaus höhere Zellaktivität erwartet wird. Hohe intrazelluläre Enzymaktivitäten sind für effiziente Biotransformation nur bedingt notwendig, vielmehr spielt auch das richtige Enzymverhältnis zwischen PPADH und GDH in den Ganzzellkatalysatoren eine wichtige Rolle für eine effiziente Umsetzung.

In Vorversuchen mit gereinigter PPADH und GDH (Kapitel 3.8.1.1) wurde das optimale Verhältnis von PPADH zu GDH für die Racematspaltung des CF_3-Aldols untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die GDH als Cofaktor-regenerierendes Enzym im leichten Überschuss zur PPADH eingesetzt werden sollte, um in einer kurzen Reaktionszeit hohe Umsätze zu erzielen. Bei einem Enzymverhältnis von 1:1 oder bei Einsatz der GDH im

Unterschuss reichte vermutlich die NADPH-Konzentration nicht aus, um die PPADH optimal auszunutzen. In Anbetracht der entsprechenden K_M-Werte für NADPH und $NADP^+$ wird jedoch deutlich, dass die PPADH einen geringfügig niedrigeren K_M-Wert für NADPH (0,016 mM) als die GDH für $NADP^+$ (K_M= 0,025 mM) aufweist und somit die K_M-Werte in etwa der gleichen Größenordnung liegen.[206,254] Möglicherweise beeinflussen andere Faktoren wie z. B. Substrat, gebildetes Produkt oder pH-Wert während der Reaktion die GDH-Aktivität, wodurch ein Überschuss an GDH für eine effiziente Reduktion des CF_3-Aldols benötigt wird.

In Anbetracht der Enzymverhältnisse von PPADH und GDH in den konstruierten GZKs wird deutlich, dass in GZK1 und GZK2 die GDH-Aktivität im Überschuss zur PPADH-Aktivität vorliegt und das PPADH:GDH-Verhältnis mit dem ermittelten optimalen Enzymverhältnis von 1:3 vergleichbar ist (Tabelle 68). Die Aktivitätsverhältnisse, die in GZK3 und FGZK3 vorliegen, entsprechen nicht dem ermittelten optimalen Enzymverhältnis, da die PPADH für eine optimale Reduktion des CF_3-Aldols im Unterschuss zur GDH vorliegen sollte.

Tabelle 68: Übersicht der ermittelten Enzymverhältnisse von PPADH und GDH in den verschiedenen Ganzzellkatalysatoren.

Konstrukt	Aktivitätsverhältnis PPADH : GDH
GZK1	1 : 5,7
GZK2	1 : 1,8
GZK3	1,6 : 1
FGZK3	1,6 : 1

Trotz des suboptimalen Enzymverhältnisses im GZK3 konnte anfangs ein ähnlicher Reaktionsverlauf für die Reduktion des CF_3-Aldols im Vergleich zu GZK1 und GZK2 beobachtet werden (siehe Abbildung 54). Mit fortschreitender Reaktionszeit verlangsamte sich die Reaktionsgeschwindigkeit der GZK1- und GZK2-katalysierten Reaktion, sodass bei längerer Reaktionszeit der GZK3 aufgrund der höheren intrazellulären Enzymaktivitäten höhere Umsatzraten erzielte. Um dennoch den GZK3 (FGZK3) hinsichtlich der Enzymverhältnisse zu optimieren (GDH im Überschuss), könnten die beiden Gene kodierend für die GDH und PPADH, jeweils in das andere Plasmid kloniert werden, sodass das GDH-Gen im pET28a-Vektor (*medium-copy*) und das PPADH-Gen mit N-terminaler His-Tag-Sequenz im pACYCDuet-1 (*low-copy*) vorliegen. Dies sollte theoretisch dazu führen, dass das GDH-Gen stärker als das PPADH-Gen aufgrund der höheren Kopienanzahl des pET28a-Vektors exprimiert wird.

Rückblickend auf Tabelle 67 fällt auf, dass sich GZK3 und FGZK3 hinsichtlich der berechneten Zellaktivitäten und der Ausnutzung der intrazellulären Aktivitäten stark unterscheiden. Die höchste Zellaktivität von 220 U g^{-1} weist der FGZK3 auf, wobei ca. 55 % der intrazellulären Enzymaktivität ausgenutzt werden, hingegen mit 15 U g^{-1} Zellaktivität nur 8,2 % der intrazellulären Enzymaktivität im GZK3 ausgenutzt werden. Hinsichtlich der unterschiedlichen Ausnutzung der intrazellulären Enzymaktivitäten kann vermutet werden, dass die Kultivierungsbedingungen von FGZK3 während der Hochzelldichte-Fermentation die Membranbeschaffenheit der *E. coli*-Zelle beeinflussen und verändern können und dies womöglich zu einem verbesserten Stofftransport über die Zellmembran führt. Es gibt viele Studien, die eine Abhängigkeit der Membran-Komposition von einer Vielzahl von Wachstumsbedingungen dokumentieren.[255–259]

Allgemein ist jedoch bekannt, dass Ganzzellkatalysatoren in der Regel erhebliche Aktivitätsverluste im Vergleich zu ihren entsprechenden zellfreien Rohextrakten zeigen.[260–262] Die niedrigen Zellaktivitäten der Ganzzellkatalysatoren bzw. der Verlust von teilweise >90 % der Aktivität wird dem limitierten Massentransfer über die Zellwand oder der Zellmembran zugeschrieben und führt zu geringen intrazellulären Konzentrationen des Substrats oder Cosubstrats.[247] Um dieser Limitierung entgegenzuwirken, können die Zellen z. B. durch Behandlung mit Toluol permeabilisiert und dadurch der Stofftransfer begünstigt werden. Durch Permeabilisierung der Zellen können jedoch auch Cofaktoren und Enzyme aus den Zellen austreten, sodass eine Wiederverwendung der Zellen für weitere Reaktionszyklen nicht möglich ist. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Ganzzellkatalysatoren sollte ebenfalls vermieden werden, da die Bildung von Eiskristallen die Zellen schädigen und zu einer ungewollten Permeabilisierung bzw. Zelllyse führen. Die in dieser Arbeit hergestellten Ganzzellkatalysator-Zellen wurden daher nach der Zentrifugation bei -20 °C gelagert und je nach Bedarf Zellen eingewogen, in Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Aliquots wurden anschließend langsam auf Eis aufgetaut und gelagert, um eine zu starke Permeabilisierung zu vermeiden.

Gram-negative Bakterien wie *E. coli* weisen zwei Zellmembranen auf, eine äußere und einer innere Zellmembran. Die innere Zellmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, welche für hydrophobe Moleküle gut passierbar ist. Hydrophile Moleküle können die innere Zellmembran nur mit Hilfe spezifischer Transportproteine passieren.[263] Die Struktur der äußeren Zellmembran unterscheidet sich stark von der der inneren Zellmembran, da diese mit Lipopolysacchariden (LPS) assoziiert ist. Dicht-gepackte LPS stellen eine gute Barriere sowohl für hydrophile als

auch hydrophobe Moleküle aufgrund des amphiphilen Charakters der LPS dar.[264] Kleine hydrophile Moleküle (<600 Da) wie Zucker, Aminosäuren und Ionen, die essentiell für das bakterielle Wachstum sind, passieren die äußere Membran mittels passiver Diffusion durch Kanäle (oder Porine).[264] Glucose und Formiat, welche am häufigsten als Cosubstrate für die Cofaktorregenerierung bei enzymatischen Reduktionen eingesetzt werden, gelangen durch spezifische Transport-Systeme in die Zelle.[247] Hydrophobe Moleküle wie z. B. langkettige Fettsäuren passieren die äußere Membran durch *outer membran* (OM)-Proteine wie FadL.[265,266] Die äußere Membran von *E. coli* stellt somit eine natürliche Barriere dar und erschwert den Stofftransport für eine effiziente Biotransformation mit ganzen Zellen. Jedoch kann diese Barriere bzw. Limitierung bei der Verwendung von Ganzzellkatalysatoren auch vorteilhaft sein, da die intrazellulär vorliegenden Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung meist stabiler sind als in isolierter Form.[247,267,268] So bieten Zellen einen natürlichen Schutz gegenüber äußeren Einflüssen und minimieren die direkte Exposition der Enzyme gegenüber Molekülen, die einen womöglich toxischen oder inhibitorischen Effekt auf die Enzyme ausüben. In Parallelversuchen wurde die optimierte Eintopfreaktion (Kapitel 3.8.3.3) auch mit isolierten Enzymen durchgeführt, wobei in diesem Zusammenhang festgestellt wurde, dass relativ hohe Enzymmengen bzw. Enzymeinheiten (Units) für eine nahezu vollständige Umsetzung benötigt werden (Tabelle 69). Hierbei kann angenommen werden, dass die Stabilität der eingesetzten Enzyme bei längerer Reaktionszeit abnimmt. Das starke Schütteln der Reaktionsgefäße (üblicherweise bei 900 UpM) sowie die hohen Eduktkonzentrationen (100 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon und 250 mM Aceton) können bei einer langen Reaktionsdauer zur Inaktivierung oder Destabilisierung der freien Enzyme führen, sodass im Gegenzug hohe Enzymmengen für effiziente Umsetzungen benötigt werden.

Tabelle 69: Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols mit isolierten Enzymen.

Verhältnis PPADH : GDH	PPADH : GDH [U mL^{-1}]	Zeit [h]	rel. Diolanteil [%][a]
1 : 1	0,2 : 0,2	19	10
1 : 5	0,2 : 1,0	19	29
1 : 10	0,2 : 2,0	19	27
1 : 3	3,0 : 9,0	24	75
1 : 2	5,0 : 10,0	21	96

Reaktionsbedingungen: 100 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon; 250 mM Aceton; 5 mM Singh-Katalysator (*S*,*S*); 0,5 M D-Glucose; 1 mM NADP$^+$, auf 1 mL KPi-Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C, 900 UpM.
[a]Mit chiraler GC gemessen.

In der Literatur wird der bevorzugte Einsatz von Ganzzellkatalysatoren gegenüber isolierten Enzymen in der Regel damit begründet, dass auf eine externe Zugabe von Cofaktoren verzichtet werden kann, da intrazellulär vorhandene Cofaktoren für die Reaktionen ausgenutzt werden können. Die intrazelluläre Verfügbarkeit der Nicotinamid-Cofaktoren stellt somit ein limitierender Faktor für die Effizienz der Redoxreaktion in ganzen Zellen dar. Der Einfluss von zugesetztem Cofaktor auf die Ganzzell-biotransformation wurde in Kapitel 3.8.3.5.1 untersucht, wobei die zugesetzte Cofaktorkonzentration für die Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols variiert wurde. Beim Betrachten der Tabelle 70 fällt auf, dass mit Zusatz von $NADP^+$ höhere Gesamtumsätze erzielt wurden. Zusätzlich konnten in Vorversuchen anhand kinetischer Messungen des Reaktionsverlaufs beobachtet werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Ganzzellbiotransformation (Reduktion des CF_3-Aldols) ohne $NADP^+$-Zusatz um ein ca. 6-faches langsamer abläuft im Vergleich zur Reaktion mit 0,5 mM $NADP^+$. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intrazellulären Cofaktormengen nicht vollständig ausreichen um vergleichbare Umsätze wie mit $NADP^+$-Zugabe zu erhalten. Die intrazellulären Cofaktorkonzentrationen in rekombinanten *E. coli*-Zellen liegen laut Literatur bei 566 µM für NAD^+, 47,8 µM für $NADP^+$, 3,14 µM für NADH und 0,59 µM für NADPH betragen.[269]

Tabelle 70: Einfluss von zugesetztem Cofaktor auf den Umsatz in der Eintopfreaktion zur Synthese des 1,3-Diols.

$NADP^+$-Zugabe [mM]	GZK [mg mL^{-1}]	Zeit [h]	rel. Diolanteil [%][a]	Nebenprodukte [%][a]
0	10	21	86	0
0	10	24	90	0
0	20	24	97	1
0,5	10	21	93	3
1	10	21	92	4

Reaktionsbedingungen: 100 mM 2,2,2-Trifluoracetophenon; 250 mM Aceton; 5 mM Singh-Katalysator (*S*,*S*); 0,5 M D-Glucose; auf 1 mL KPi Puffer (0,5 M, pH 7), 25 °C, 900 UpM.
[a]Mit chiraler GC gemessen.

Der entsprechende K_M-Wert der PPADH für NADPH beträgt ca. 16 µM, während der K_M-Wert der Cofaktor-regenerierenden GDH ca. 25 µM für $NADP^+$ beträgt.[206,254] Somit würde die intrazelluläre $NADP^+$-Konzentration (48 µM) zwar über dem K_M-Wert der GDH für $NADP^+$ liegen, aufgrund der geringen intrazellulären NADPH-Konzentration könnte eine optimalen Aktivität der PPADH aber kaum erreicht werden. Der Zusatz von Cofaktoren zur Erhöhung des zellinternen Cofaktorspiegels führt deshalb zu höheren

Umsätzen und Reaktionsgeschwindigkeiten. Der Zusatz von teuren Nicotinamid-Cofaktoren kann jedoch umgegangen werden, indem eine größere Zellmenge bei den Umsetzungen eingesetzt wird (Tabelle 70). Hierbei zeigte sich, dass die doppelte Menge GZK ausreichend ist, um eine effiziente Eintopfreaktion ohne externe $NADP^+$-Zugabe durchzuführen. Interessanterweise korrelierte die Nebenproduktbildung mit einer höheren $NADP^+$-Zugabe. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass *E. coli*-eigene ADHs durch die hohen intrazellulären Cofaktorkonzentrationen zu höheren Aktivitäten und folglich zu einer stärken Nebenproduktbildung führen.

4.5 Bewertung der zweistufigen Tandem-Eintopfreaktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung einer neuartigen, zweistufigen Tandem-Eintopfreaktion zur Synthese von chiralen 1,3-Diolen, in der die organokatalysierte Aldolreaktion zweier Ketone und die biokatalytische Reduktion mittels Ganzzellkatalysator simultan in wässriger Lösung ablaufen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Aldolreaktion zweier Ketone nur dann möglich, wenn stark elektrophile Ketone als Aldolakzeptoren (z. B. Trifluormethylketone) oder reaktive Donoren (z. B. als Silylenolether) eingesetzt werden.[114–116] Der Einsatz von Trifluormethylketonen als Aldolakzeptoren bietet den Vorteil, dass die Carbonylaktivität aufgrund der elektronenziehenden CF_3-Gruppe erhöht ist und sich dadurch das Keton wie ein Aldehyd verhält. Aus diesem Grund kann die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon und Aceton mittels Organokatalysator realisiert werden. In den ersten Versuchen, die Aldolreaktion mit DL-Prolin als Organokatalysator durchzuführen, wurde festgestellt, dass mit Erhöhung der wässrigen Phase sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Aldolreaktion stark verlangsamt (Kapitel 3.8.2.1, Abbildung 56). Dieser Effekt wurde ebenfalls in anderen Prolin-katalysierten Aldolreaktionen in Wasser beobachtet.[110] MASE *et al.* untersuchten verschiedene Katalysatoren für die direkte asymmetrische Aldoladdition von Cyclohexanon an *p*-Nitrobenzaldehyd in Wasser, wobei mit L-Prolin als Katalysator kein Umsatz innerhalb von 96 Stunden beobachtet wurde. Führt man die Reaktion jedoch in DMSO statt Wasser durch, wird eine Ausbeute von 65 % nach 24 Stunden erreicht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits der Austausch der Carboxy-Gruppe des L-Prolins durch eine Alkohol-Funktion zu einer erfolgreichen Durchführung der Aldolreaktion in Wasser führt (77 % Ausbeute nach 5 Stunden). Es wurde festgestellt, dass die Säure-Funktionalität in Pyrrolidin-Derivaten nicht für die Katalyse der Aldolreaktion in Wasser benötigt wird. Vielmehr kann eine Aldolreaktion nur in Wasser stattfinden, wenn der Prolin-basierte Katalysator hydrophobe Gruppen aufweist.[110,270] Da Prolin als Katalysator aufgrund des zwitterionischen Charakters wasserlöslich ist und die Reaktanden der Aldolreaktion (vor allem aromatische und aliphatische Edukte) sich eher schlecht in Wasser lösen, entsteht ein Art biphasisches System wodurch eine Interaktion zwischen Katalysator und Reaktanden erschwert wird. Ist eine hydrophobe Gruppe am Prolin- oder Prolinamid-Katalysator angebracht, gelangen die organischen Reagenzien (hydrophober Katalysator und Edukte) in räumlicher Nähe, sodass die Aldolreaktion in einer konzentrierten organischen Phase stattfindet.[110,111,271,272]

Dieses Phänomen wird auch als „hydrophober Effekt“ bezeichnet, wobei vermutet wird, dass die Aggregation der lipophilen Edukte und des lipophilen Katalysators eine Abschirmung des Übergangszustands (Enaminintermediat) bewirkt und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird (Abbildung 80).[110,270] Der hydrophobe Effekt wird zusätzlich noch verstärkt, wenn gesättigte NaCl-Lösung statt Wasser verwendet wird, sodass die Polarität des wässrigen Lösungsmittels erhöht und dadurch die Wasserlöslichkeit von Aldoldonoren wie z. B. Aceton durch „Aussalzen“ (*salting out effect*) reduziert wird.[90]

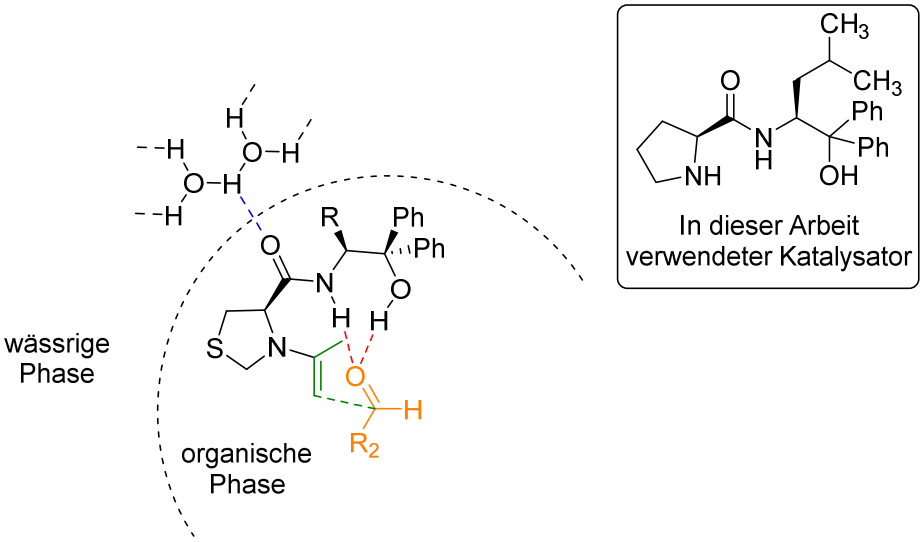


Abbildung 80: Vorgeschlagenes Model zur organokatalysierten Aldoladdition eines Aldehyden (orange) zu Aceton (grün) in wässrigen Milieu nach SINGH *et al.*[270]

Der in dieser Arbeit verwendete *Singh*-Katalysator ((*S,S*)-**5**) basiert zwar strukturell auf Prolin, jedoch ist das Rückgrat mit einer unpolaren *gem*-Diphenyl-Gruppe modifiziert und es existiert im Vergleich zum Prolin keine freie Carboxy-Gruppe. Dadurch ist der *Singh*-Katalysator im Vergleich zum Prolin nahezu unlöslich in wässrigen Lösungen, sodass dieser aufgrund des hydrophoben Effekts in wässriger Umgebung für Aldolreaktionen effektiv eingesetzt werden kann.[90] In Vorarbeiten von BAER und RULLI konnte bereits gezeigt werden, dass die Aldolreaktionen von substituierten Benzaldehyden mit nur 9 Äquivalenten Aceton mit dem *Singh*-Katalysator in gesättigter NaCl-Lösung (50 % v/v) erfolgreich durchgeführt und hohe Umsätze sowie hohe Enantioselektivitäten für die Aldolprodukte erhalten werden konnten.[273,274] Nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch die Selektivität des *Singh*-Katalysators wird durch das wässrige Milieu beeinflusst, da Hydroxy-Gruppen des Wassers aus der Solvatationshülle die Carbonyl-Gruppe des Prolinamid-Katalysators durch

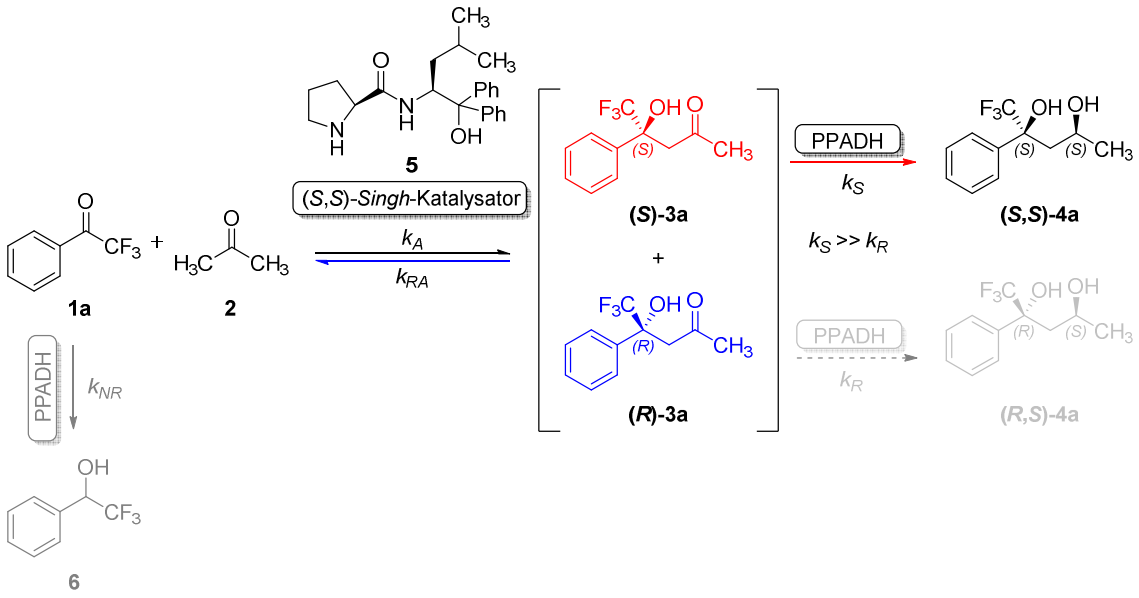
Wasserstoffbrückenbindung aktiviert. Dadurch steigt die Acidität der NH-Bindung, wodurch die Wasserstoffbrückenbindung zum Aldolakzeptor verstärkt und der Übergangszustand stabilisiert wird (Abbildung 80).[270,275] Beispielsweise konnte RULLI zeigen, dass das Aldolprodukt, ausgehend von 3-Chlorbenzaldehyd und Aceton, mit 0,5 mol-% *Singh*-Katalysator nach 48 Stunden mit 83 % *ee* ohne Cosolvens gebildet wurde, hingegen mit Zusatz von 20 Äq. gesättigte NaCl-Lösung ein *ee*-Wert von 94 % für das Aldolprodukt erhalten wurde.[274] Bezüglich der in dieser Arbeit durchgeführten Aldoladdition von 2,2,2-Trifluoracetophenon zu Aceton mit dem *Singh*-Katalysator konnten DUANGDEE *et al.* zeigen, dass der Zusatz von 10 mol-% Wasser (entsprechen ca. 0,36 µL) die Aldolreaktion beschleunigt, sodass bereits nach 1,5 Stunden ein quantitativer Umsatz bei einer geringen Abnahme der Enantioselektivität (90 % *ee*) beobachtet wurde.[89]

Für die geplante Eintopfreaktion war das Ziel, die Aldolreaktion überwiegend in wässriger Lösung durchzuführen, um eine hohe Kompatibilität zur nachgeschalteten enzymatischen Reduktion zu gewährleisten. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen hohen Enantioselektivität des *Singh*-Katalysators sollte im Zuge der Aldolreaktion von Trifluoracetophenon und Aceton, das (*S*)-β-Hydroxyketon in hohem Überschuss gebildet werden, welches anschließend von der (*S*)-spezifischen PPADH zum 1,3-Diol reduziert werden sollte. In den ersten Versuchen zur Entwicklung der Eintopfreaktion wurde die Aldolreaktion von 2,2,2-Trifluoracetophenon (0,1 mmol) und Aceton (35 Äq.) mit dem *Singh*-Katalysator (2 mol-%) in wässriger Phase, bestehend aus D-Glucose, $NADP^+$, Ganzzellkatalysator (ZFM) sowie Puffer (Tris-HCl/KPi), durchgeführt. Hierbei wurde ein starker Einfluss der wässrigen Komponenten auf die Selektivität der organokatalysierten Aldolreaktion festgestellt. Wird die Aldolreaktion nur in Aceton durchgeführt, so wird für das (*S*)-Aldolprodukt (β-Hydroxyketon) ein *ee*-Wert >90 % nach drei Stunden erreicht. Führt man die gleiche Aldolreaktion in einer überwiegend wässrigen Phase (>70 % v/v) durch, wird das Aldolprodukt nahezu racemisch mit 16 % *ee* nach drei Stunden Reaktionszeit bei vergleichbaren Umsatz gebildet. Diese starke Racemisierung konnte ebenfalls bei der sequentiellen Durchführung der beiden Schritte beobachtet werden: vor Zugabe der wässrigen Phase betrug der *ee*-Wert des Aldolprodukts 86 % (nach 22 Stunden Reaktionszeit), nach Zugabe der wässrigen Komponenten sank dieser auf 70 % *ee* innerhalb von drei Stunden (Kapitel 3.8.2.2). Anhand dieser Beobachtungen wird eine signifikante Abhängigkeit der Selektivität der Aldolreaktion vom eingesetzten wässrigen Reaktionsmedium deutlich. Reaktionsbedingungen, die eine Racemisierung des Aldolprodukts begünstigen und die Enantioselektivität beeinflussen sind: protische Lösungsmittel z. B. wässrigen Lösungen, die Anwesenheit von Säuren, hohe

Katalysator-Mengen (≥5 mol-%), sowie lange Reaktionszeiten.[89] Eine mögliche Erklärung für die schnelle Racemisierung in wässriger Lösung könnte sein, dass sich durch eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit das dynamische Gleichgewicht der Reaktion schneller einstellt, wodurch die anfangs kinetisch kontrollierte Reaktion zunehmend einer thermodynamischen Kontrolle unterliegt. Dies würde schlussendlich dazu führen, dass das enantioselektiv-gebildete kinetische Produkt irreversibel zum Racemat als thermodynamisches Produkt abgebaut wird, wie es z. B. in Abbildung 62B (Kapitel 3.8.3.1) zu sehen ist. Es wird angenommen, dass die Racemisierung über die Rückreaktion, also die Retro-Aldolreaktion, verläuft. Hinweise für diese Annahme lieferten Versuche von RULLI *et al*. als auch eigene Untersuchungen aus Kapitel 3.8.3.4 bezüglich des Reaktionsmechanismus.[86,91] Hierbei konnte eine Abnahme der Enantiomerenreinheit des Aldolproduktes in Abhängigkeit der Katalysatormenge mit der Zeit beobachtet werden, die auf eine Racemisierung des β-Hydroxyketons im Sinne einer Retro-Aldolreaktion zurückzuführen ist.

In Anbetracht der anfänglichen konzeptionellen Überlegungen zur Eintopfreaktion sollte die organokatalysierte Aldolreaktion hochselektiv verlaufen, sodass das (*S*)-β-Hydroxyketon anschließend von der PPADH zum (*S*,*S*)-1,3-Diol reduziert werden sollte. Die Ausbeute und optische Reinheit des gebildeten 1,3-Diols ist hierbei stark von der Selektivität der Aldolreaktion abhängig, da die anschließende PPADH1-katalysierte Reduktion hoch enantio- und auch diastereoselektiv verläuft. Die starke Racemisierung der organokatalysierten Aldolreaktion in gepufferter, wässriger Lösung stellte sich im Verlauf des Optimierungsprozesses als vorteilhaft heraus, da die Eintopfreaktion im Sinne einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR) realisiert werden konnte (Schema 33). Hierbei war eine starke Racemisierung des β-Hydroxyketons durch den *Singh*-Katalysator erwünscht und für die effiziente Synthese des 1,3-Diols notwendig, da das nicht-umgesetzte (*R*)-Aldolprodukt (**3a**) im Zuge der Retro-Aldolreaktion zurück zu den Edukten Trifluoracetophenon (**1**) und Aceton (**2**) gespalten wird und diese anschließend zum thermodynamisch bevorzugten racemischen Aldolprodukt umgesetzt werden. Dadurch steht kontinuierlich neues (*S*)-Aldolprodukt für die PPADH1-katalysierte Reduktion zur Verfügung, sodass im Laufe der Reaktion sich ausschließlich das (*S,S*)-1,3-Diol **4** anreichert. Zusammengefasst konnte eine schnelle Racemisierung durch 1.) Verwendung von gepufferter, wässriger Lösung als Reaktionsmedium, 2.) Erhöhung der *Singh*-Katalysatorbeladung und 3.) lange Reaktionsdauer erreicht werden. Zudem könnte die niedrige Acetonkonzentration (2,5 Äquivalente im Überschuss zum Edukt) die Racemisierung bzw. die Retro-Aldolreaktion aufgrund einer geänderten Gleichgewichtslage begünstigen. Im

Grunde wird ein chiraler Organokatalysator wie der *Singh*-Katalysator **5** nicht benötigt, vielmehr ist ein achiraler, billiger Katalysator für die Aldolreaktion wünschenswert. Versuche, die Eintopfreaktion mit Prolin als Organokatalysator durchzuführen, waren aufgrund der langsamen Aldolreaktion und der hohen Nebenproduktbildung nicht erfolgreich. Matthias Hammel (Kooperationspartner, Universität Köln, AK Berkessel) versuchte, die Aldolreaktion mit Piperidin und Pyrrolidin als Aldol-Katalysatoren durchzuführen, jedoch ohne Erfolg (Matthias Hammel, persönliche Mitteilung). Hierbei kann vermutet werden, dass sterisch-anspruchsvolle, hydrophobe Reste für eine Aktivität in wässriger Umgebung sowie Wasserstoffdonorgruppen für die Stabilisierung des Enaminintermediates benötigt werden.



Schema 33: Dynamisch-kinetische Racematspaltung zur Synthese des 1,3-Diols (*S*,*S*)-**4a** in einer Tandem-Eintopfreaktion. Das (*S*)-β-Hydroxyketon **3a** wird zum (*S*,*S*)-1,3-Diol **4a** reduziert (rot), während das nicht-umgesetzte (*R*)-β-Hydroxyketon **3a** via Retro-Aldolreaktion racemisiert wird (blau). Erläuterung der Geschwindigkeitskonstanten (*k*): Aldolreaktion (k_A), Retro-Aldolreaktion (k_{RA}), Nebenreaktion (k_{NR}), Reduktion des (*S*)-β-Hydroxyketons (k_S), Reduktion des (*R*)-β-Hydroxyketons (k_R).

Für die erfolgreiche Etablierung der Tandem-Eintopfreaktion gemäß Schema 33 war vor allem die Verfügbarkeit der PPADH1 von entscheidender Bedeutung aufgrund der exklusiven Eigenschaft, nur das (*S*)-Enantiomer des chiralen CF_3-Aldols **3** asymmetrisch zu reduzieren (k_S >> k_R), sodass eine effiziente kinetische Racematspaltung durchgeführt werden konnte (siehe Kapitel 3.8.1.4, Tabelle 45). Aus kinetischer Betrachtung handelt sich hierbei um eine einfache Parallelreaktion, die mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten k_S (schnelle Reaktion) und k_R (langsame Reaktion) charakterisiert werden kann (Schema 33). Im Falle der PPADH1-katalysierten

kinetischen Racematspaltung unterscheiden sich die Geschwindigkeitskonstanten k_S und k_R deutlich voneinander, sodass zunächst das (*S*)-β-Hydroxyketon **3a** zum (*S*,*S*)-Diol **4a** reduziert wird. Dabei verlangsamt sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit fortschreitender Reaktionsdauer, da das schnell reagierende (*S*)-β-Hydroxyketon **3a** verbraucht wird. Unter idealen Bedingungen (k_R= 0) könnten das (*S*,*S*)-Diol **4a** und das nicht-umgesetzte (*R*)-β-Hydroxyketon **3a** nach vollständiger Racematspaltung in einem Verhältnis von 1:1 erhalten werden, da die Reaktion automatisch bei exakt 50 % Umsatz stoppen würde. Dies wird in erster Annäherung auch tatsächlich erreicht, wenn man – ohne *Singh*-Katalysator – nur das Racemat mit der PPADH1 umsetzt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsdauer und die Enzymaktivität die optische Reinheit des (*S*,*S*)-Diol **4a** beeinflussen (Kapitel 3.8.1.2). Es wurde beobachtet, dass nach Verbrauch des (*S*)-β-Hydroxyketons **3a** kein vollständiger Stillstand der Reaktion bei 50 % Umsatz stattfindet und das (*R*)-β-Hydroxyketon **3a** mit einer sehr langsamen Reaktionsgeschwindigkeit zum (*R*,*S*)-Diol **4a** reduziert wird. Da die PPADH1 bezüglich der Bildung des 2. Stereozentrums (*S*)-spezifisch ist, entstehen diastereomere Diolprodukte. Die optische Reinheit des (*S*,*S*)-Diols **4a** hängt somit vom Umsatz der kinetischen Racematspaltung ab, da die Reaktionsgeschwindigkeit für die Reduktion des (*R*)-β-Hydroxyketons nicht k_R= 0 sondern k_R> 0 entsprechen müsste und der Umsatz bei 50 % nicht zum Stillstand kommt. Allerdings handelt es sich hier anscheinend um eine schwache Nebenreaktion, die erst nach Beendigung der Reduktion von (*S*)-**3a** abläuft, nicht um eine Unspezifität der PPADH1, die permanent, also auch schon zu Beginn der Reaktion, zu beobachten wäre. Um enantiomeren- und diastereomerenreines 1,3-Diol zu erhalten, ist eine zeitnahe Verfolgung des Reaktionsverlaufs sowie eine sofortige Beendigung der Reaktion nach Erreichen hoher *ee*- und *de*-Werte des (*R*)-Aldols sowie 1,3-Diols notwendig.

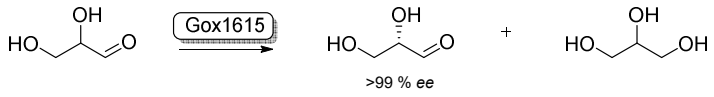
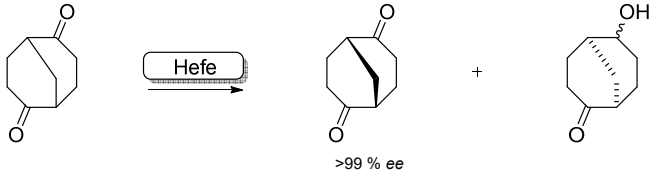
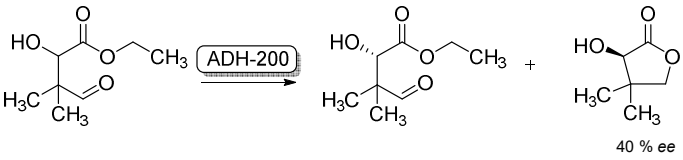
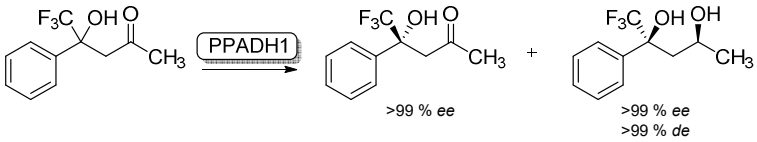
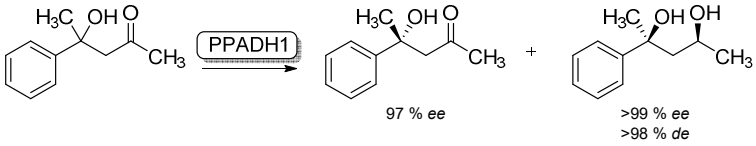
Qualitativ werden Racematspaltungen durch den dimensionslosen E-Wert (*Enantiomeric Ratio*) beschrieben, der als Maß für die Güte bzw. die Selektivität der kinetischen Racematspaltung dient. Als Faustregel gilt, dass E-Werte <15 als inakzeptabel für praktische Anwendungen gelten, E-Werte zwischen 15-30 werden als moderat bis gut und E-Werte >30 als exzellent eingestuft.[276] Dieser kann z. B. mit Hilfe der Gleichung 1 und den experimentell ermittelten Enantiomerenüberschüssen von Produkt (ee_P) und Substrat (ee_S) berechnet werden:[187]

Gleichung 1

$$E = \frac{\ln\frac{[ee_P(1-ee_S)]}{ee_P+ee_S}}{\ln\frac{[ee_P(1+ee_S)]}{ee_P+ee_S}}$$

Anhand der durchgeführten präparativen Racematspaltungen der tertiären β-Hydroxyketone (CH_3- und CF_3-Aldol) und den ermittelten *ee*- und *de*-Werten der isolierten (*R*)-β-Hydroxyketone und der (*S*,*S*)-Diole (Kapitel 3.8.1.4, Tabelle 45) kann die Selektivität der PPADH1-katalysieren Racematspaltung beurteilt werden. Da durch Reduktion der Keto-Gruppe ausschließlich die (*S*)-Konfiguration am neu entstehenden Stereozentrum gebildet wird, kann der *de*-Wert des Diols äquivalent zum ee_P-Wert für die Berechnung verwendet werden. Mit Hilfe des Programms „*Enantioselectivity*" der Universität Graz wurden für beide Racematspaltungen E-Werte >100 berechnet (420 für CH_3-KR und 1057 für CF_3-KR).[186] Somit laufen die kinetischen Racematspaltungen der β-Hydroxyketone durch die PPADH1 hoch selektiv und effizient ab. In der Literatur lassen sich einige Beispiele für kinetische Racematspaltungen mit Oxidoreduktasen in oxidativer Richtung ausgehend von racemischen Alkoholen finden.[277–280] Oxidative Racematspaltungen, ausgehend von racemischen Aminosäuren wie z. B. DL-*tert*-Leucin oder DL-Glutamat, konnten mit Aminosäure-Dehydrogenasen wie z. B. der L-Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) oder der L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) erfolgreich durchgeführt und die entsprechenden D-Aminosäuren mit >99 % *ee* erhalten werden.[281,282] Im Vergleich dazu sind nur wenige Arbeiten mit Dehydrogenasen bekannt die eine reduktive Racematspaltung beschreiben. In Tabelle 71 sind Beispiele für asymmetrische Reduktionen von racemischen Substraten aufgelistet. Im Vergleich zu den hoch selektiven Racematspaltungen der PPADH1 (Eintrag 4-5) verlaufen die Reduktionen von racemischem Bicyclo[3.3.1]nonan-2,6-dion mit ganzen Zellen eines genetisch modifizierten *S. cerevisiae*-Stammes (Eintrag 2)[283] und die Reduktion der racemischen Pantolacton-Vorstufe mit einer ADH (Eintrag 3)[284] in Bezug auf den E-Wert nicht sehr selektiv (Tabelle 71). RICHTER *et al.* identifizierten eine D-spezifische Glycerol-Dehydrogenase (GlyDH) Gox1615 aus *Gluconobacter oxydans*, die für die kinetische Racematspaltung von *rac*-Glyceraldehyd eingesetzt wurde. Hierbei konnte ein Umsatz von 50 % erreicht und enantiomerenreines L-Glyceraldehyd (>99 % *ee*) erhalten werden (Tabelle 71, Eintrag 1).[219] Der berechnete E-Wert liegt bei >100, sodass die Racematspaltung mit der GlyDH als hoch selektiv klassifiziert werden kann. Da Glyceraldehyd ein sehr kleines Substrat ist, wurde angenommen, dass Aminosäuren in direkter Nachbarschaft des aktiven Zentrums die Spezifität der GlyDH bestimmen. Strukturmodellierungen mit L-Glyceraldehyd und D-Glyceraldehyd konnten ein Methionin (Met326) als Schlüsselkandidaten für die beobachtete Enantiospezifität identifizieren. Es zeigte sich, dass Met326 eine Wasserstoffbrückenbindung nur zu D-Glyceraldehyd als Substrat ausbilden kann und dies zur Favorisierung des D-Enantiomeren gegenüber dem L-Enantiomeren führt.[285]

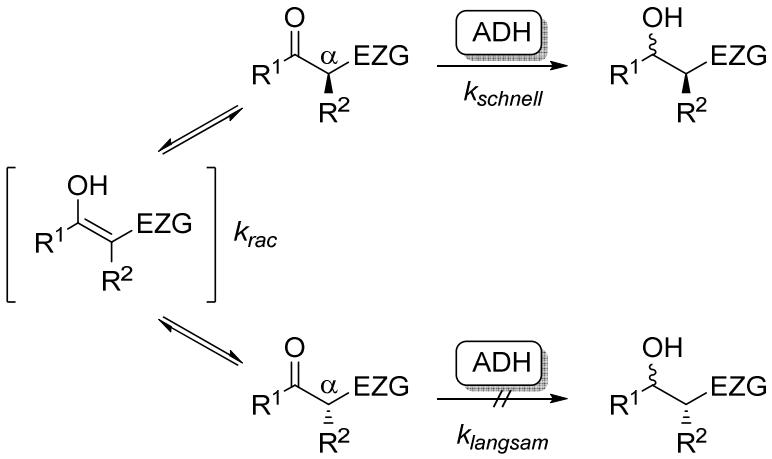
Tabelle 71: Beispiele kinetischer Racematspaltungen durch asymmetrische Reduktion.

Eintrag/ Referenz	Reaktion	Umsatz [%]	E-Wert
1/[286]		50	>100[a]
2/[283]		75	10,3
3/[284]		51	3[a]
4/[b]		50[a]	>100[a]
5/[b]		50[a]	>100[a]

[a]Berechnet mit Hilfe des Programms „*Enantioselectivity*“.[186]
[b]Ergebnisse aus dieser Arbeit.

Allen hoch-selektiven kinetischen Racematspaltungen ist gemein, dass eine maximale Ausbeute von 50 % des Edukts oder Produkts erreicht werden kann. Diese Limitierung kann durch Kombination mit einer *in situ* Racemisierung des verbleibenden Enantiomeren als dynamisch-kinetische Racematspaltung umgangen werden, in der eine Ausbeute bis zu 100 % möglich ist. Üblicherweise werden Lipasen sowohl für kinetische Racematspaltungen als auch für dynamisch-kinetische Racematspaltungen eingesetzt,[287–292] da sie 1.) keine zusätzlichen Cofaktoren und somit keine Cofaktorregenerierungssysteme benötigen und 2.) hohe Stabilitäten und Aktivitäten in organischen Lösungsmitteln aufweisen und dadurch einfacher zu handhaben sind. Dennoch entwickelten sich in den letzten Jahren neue DKR-Systeme mit Alkohol-Dehydrogenasen oder Carbonyl-Reduktasen in reduktiver Richtung, die auch als dynamisch reduktive kinetische Racematspaltungen (DYRKR/DRKR) bezeichnet werden.[293,294] In nahezu allen beschriebenen DRKR werden racemische Substrate eingesetzt, die ein epimerisierbares Stereozentrum mit einem aciden Proton neben einer

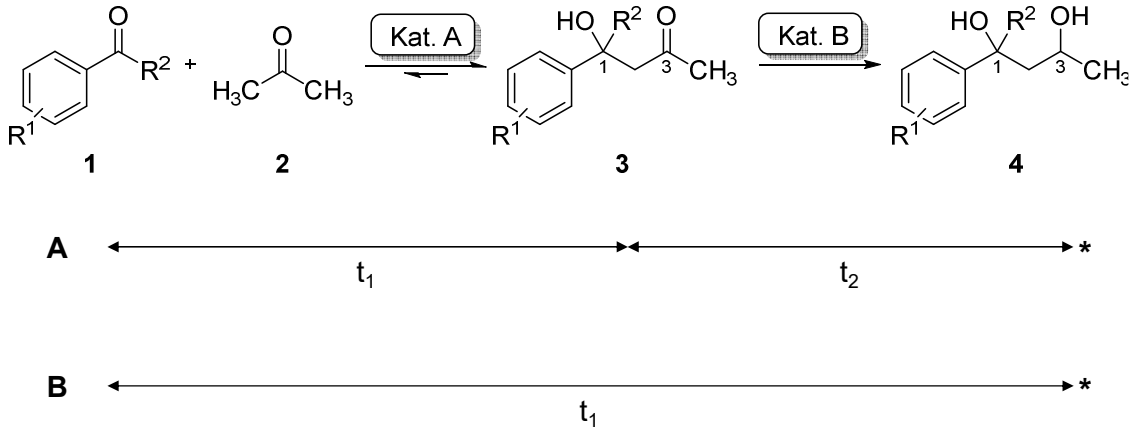
Carbonylgruppe aufweisen.[293,295–298] Unter gewählten Reaktionsbedingungen können die beiden Enantiomere spontan über ein Enol-Intermediat ineinander überführt bzw. racemisiert werden (Schema 34).[293] Vorteilhaft bei der Verwendung solcher Substrate ist, dass in der Regel keine chemischen Katalysatoren für die Racemisierung benötigt werden und dadurch der Prozess insgesamt einfacher und kostengünstiger erscheint. Nachteilig ist jedoch, dass eine effiziente Racemisierung nur bei Substraten erfolgen kann, wenn benachbart zur Carbonyl-Gruppe das α-Stereozentrum ein acides Proton aufweist. Dadurch sind DRKR, die über Enol-Intermediate racemisieren, auf die beschriebene Substratklasse und eine hohe C-H-Acidität limitiert.



Schema 34: Dynamisch reduktive kinetische Racematspaltung (DYRKR/DRKR) mit epimerisierbarem α-Stereozentrum modifiziert nach APPLEGATE und BERKOWITZ.[293] EZG= Elektronenziehende Gruppe (erhöht die C-H-Acidität).

Erstaunlicherweise lassen sich kaum Beispiele für DRKR mit ADHs finden, in der die Racemisierung des chiralen Edukts über andere Wege, z. B. mit Hilfe chemischer Metallkatalysatoren (Palladium, Ruthenium), verläuft. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Kombination von Chemo- und Biokatalyse als DKR eine hohe Kompatibilität der beiden Systeme voraussetzt und diese insbesondere bei der Verwendung von ADHs, die überwiegend in wässriger Umgebung arbeiten, nicht gewährleistet werden kann. Dennoch lassen sich viele erfolgreiche chemoenzymatische Prozesse finden, die zwar nicht als DKR, aber als Eintopfreaktion realisiert werden konnten (siehe Kapitel 1.5.3). Eine Übersicht chemoenzymatischer Eintopfreaktionen zur Synthese von aromatischen 1,3-Diolen sind in Tabelle 72 zusammengefasst und werden hinsichtlich der Prozesseffizienz verglichen und bewertet.

Tabelle 72: Eintopfreaktionen zur Synthese chiraler 1,3-Diole durch Kombination von Organo- und Biokatalyse in wässriger Lösung. Es handelt sich jeweils um eine Aldol-Reaktion mit nachfolgender Reduktion des β-Hydroxyketons in C-3 Position. A= sequentiell, B= simultan (Tandem), *= Aufarbeitung, RSADH= ADH aus *Rhodococcus* sp., LKADH= ADH aus *Lactobacillus kefir*,



Eintrag	Typ	Edukt **1**	Aceton [Äq.]	Kat. A	Kat. B	Zeit [h]	Diol **4**	Ref.
1[a]	A	R^1= 4-Cl, R^2= H (0,5 mmol)	4	(*S,S*)-*Singh* (5 mol%)	RSADH	38	(*R,S*) 80 % Umsatz, 45 % Ausbeute >99 % *ee*, *dr* 1:10 (*syn*:*anti*)	[85]
2a	A	R^1= 4-Cl, R^2= H (0,5 mmol)	9	(*S,S*)-*Singh* (1 mol%)	LKADH	96	(*R,R*) 67 % Umsatz, 58 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* >25:1 (*syn*:*anti*)	[273]
2b	A	R^1= 4-Cl, R^2= H (0,5 mmol)	9	(*S,S*)-*Singh* (1 mol%)	RSADH	72	(*R,S*) 79 % Umsatz 73 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* >25:1 (*anti*:*syn*)	
3a	A	R^1= 3-Cl, R^2= H (0,5 mmol)	9	(*S,S*)-*Singh* (0,5 mol%)	LKADH	48	(*R,R*) 72 % Umsatz 65 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* >25:1 (*anti*:*syn*)	[86]
3b	A	R^1= 3-Cl, R^2= H (0,5 mmol)	9	(*S,S*)-*Singh* (0,5 mol%)	RSADH	48	(*R,S*) 89 % Umsatz, 80 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* >25:1 (*syn*:*anti*)	

(Fortsetzung der Tabelle 72)

Eintrag	Typ	Edukt **1**	Aceton [Äq.]	Kat. A	Kat. B	Zeit [h]	Diol **4**	Ref.
4a	A	R^1= 4-Cl, R^2= H (0,125 mmol)	~22	L-ZnL^3 (10 mol%)	E039[b]	96	(*R*,*R*) 60 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* 24:1 (*syn*:*anti*)	[299,300]
4b	A	R^1= 4-Cl, R^2= H (0,125 mmol)	~22	L-ZnL^3 (10 mol%)	E001[b]	96	(*R*,*S*) 68 % Ausbeute, >99 % *ee*, *dr* 24:1 (*syn*:*anti*)	
5	B	R^1= H, R^2= CF_3 (5 mmol)	2,5	(*S*,*S*)-*Singh* (5 mol%)	FGZK3	21	(*S*,*S*) 87 % Ausbeute, >99 % *ee*, >99 % *de*	diese Arbeit

[a]Aldolreaktion nur in Aceton als Reaktionsmedium.
[b]Chiralscreen OH-Kit (Daicel Co., Ltd., Japan)

Alle aufgeführten Beispiele zeigen die Kombination einer Aldolreaktion mit einer enzymatischen Reduktion zur Synthese chiraler 1,3-Diole gemäß dem Schema in Tabelle 72. Im Gegensatz zur entwickelten Tandem-Eintopfreaktion (Typ B) in dieser Arbeit (Eintrag 5) zeigen alle Beispielreaktionen einen sequentiellen Reaktionsablauf nach Typ A (Tabelle 72, Einträge 1-4). Hier kann davon ausgegangen werden, dass ein gleichzeitiger Ablauf der Aldolreaktion und der enzymatischen Reduktion aufgrund einer niedrigen oder fehlenden Substratspezifität der eingesetzten ADHs nicht realisiert werden kann, in den Beispielen 4a und 4b ist wahrscheinlich auch die Aceton-Konzentration für eine direkte Kopplung mit einer ADH zu hoch. Da es sich bei den eingesetzten Edukten **1** um substituierte Benzaldehyde handelt, können diese von den ADHs zu den entsprechenden Benzylalkoholen reduziert werden. Bei der Verwendung der PPADH findet die Reduktion des Eduktes Trifluoracetophenon aufgrund der hohen Substratspezifität (k_S >> k_{NR}, Schema 33) nur minimal statt (<5 %), wodurch eine simultane Reaktionsführung nach Typ B möglich ist. Der Unterschied des Reaktionstyps (sequentiell oder simultan) macht sich vor allem in den Reaktionszeiten bemerkbar. Die sequentiell durchgeführten chemoenzymatischen Reaktionen benötigen deutlich längere Reaktionszeiten (36-96 Stunden) im Vergleich zur entwickelten Tandem-Eintopfreaktion mit einer Reaktionszeit von 21 Stunden (Tabelle 72). Im sequentiellen Modus muss definitiv das Ende der Aldolreaktion abgewartet werden, da ansonsten durch eine frühzeitige Zugabe der enzymatischen Komponenten die Reaktion aufgrund der direkten Reduktion des Eduktes durch den Biokatalysator abgestoppt wird.

Im Gegensatz dazu fängt die enzymatische Reduktion in der Tandem-Eintopfreaktion mit nur einem geringen Zeitversatz nahezu parallel zur Aldolreaktion an, wodurch kürzere Reaktionzeiten möglich sind. Hinsichtlich der eingesetzten Aceton-Mengen sind ebenfalls deutliche Unterschiede erkennbar. Während die entwickelte Tandem-Eintopfreaktion nur 2,5 Äquivalente für eine effiziente Aldolreaktion benötigt (Eintrag 5), werden in den sequentiellen Eintopfreaktionen (Einträge 2-4) deutlich höhere Aceton-Mengen (9-22 Äq.) eingesetzt. Da bei der sequentiellen Reaktionsführung der Biokatalysator erst nach Beendigung der Aldolreaktion hinzugefügt und zusätzlich die Reaktion mit Puffer verdünnt wird, spielt der Einfluss von Aceton auf die ADHs wohl eher eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz dazu konnte die entwickelte Tandem-Eintopfreaktion erst nach Identifizierung von Aceton als Inhibitor der PPADH und der anschließenden Optimierung der Aceton-Äquivalente in der Aldolreaktion erfolgreich realisiert werden (Kapitel 3.8.3.1). Da es sich bei der Aldolreaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, muss der Aldoldonor (Aceton) meist im Überschuss eingesetzt werden, um das Gleichgewicht in Richtung Aldolseite zu verschieben. Da die Aldolreaktion im simultanen Reaktionsmodus direkt an die enzymatische Reduktion gekoppelt ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Gleichgewicht aufgrund der stätigen Reduktion des Intermediates (β-Hydroxyketon) **3** zum stabilen 1,3-Diol **4** in Richtung Produktseite verschiebt, sodass 2,5 Äq. Aceton für eine effiziente Aldolreaktion ausreichend sind. Die Kopplung der enzymatischen Reduktion an die Aldolreaktion stellt somit eine zusätzliche Triebkraft für die Aldolreaktion dar, die in den sequentiell durchgeführten Eintopfreaktionen vermutlich nicht gegeben ist.

Für die Aldolreaktionen wurde überwiegend der Prolinamid-basierte *Singh*-Katalysator verwendet, der sowohl die intermolekulare Aldoladdition von aromatischen Aldehyden als auch von aktivierten Ketonen an Aceton katalysiert und in wässrigen Solventien aktiv ist (Tabelle 72, Einträge 1-3, 5). Bezüglich der eingesetzten *Singh*-Katalysatormenge ist ersichtlich, dass diese stark variieren und zwischen 0,5-5 mol% liegen. Für die Tandem-Eintopfreaktion in dieser Arbeit wurde eine Katalysatorbeladung von 5 mol% eingesetzt, die im Vergleich zu den anderen Beispielreaktionen sehr hoch liegt. Obwohl der gleiche chirale Katalysator für die Aldolreaktionen verwendet wird, sind die Intentionen sehr unterschiedlich. In der sequentiellen Eintopfreaktion werden Reaktionsbedingungen vermieden, die eine Racemisierung des Aldolprodukts verursachen, um eine hohe Enantioselektivität zu erreichen. Der gleiche chirale Katalysator wird in dieser Arbeit jedoch für eine effiziente Racemisierung des Aldolprodukts verwendet, um die Tandem-Eintopfreaktion als DKR durchzuführen. RULLI *et al*. konnten eine hohe Abhängigkeit der Enantioselektivität von der eingesetzten

Katalysatormenge feststellen, sodass bei zunehmender Katalysatorbeladung die Enantioselektivität abnimmt. Anderseits führt eine hohe Katalysatorbeladung zu einer Beschleunigung der Reaktion, sodass in kürzerer Zeit höhere Produkt-bezogene Umsätze erhalten werden können einhergehend mit der Einleitung einer Racemisierungsreaktion und einer erhöhten Nebenprodukt-Bildung.[86,89,91] In Bezug auf die Herstellung optisch reiner 1,3-Diole in sequentiellen Eintopfreaktionen wird eine Reduzierung der Katalysatorbeladung auf 0,5-1 mol% empfohlen, um die Reaktion kinetisch kontrolliert ablaufen zu lassen. Dies wirkt sich jedoch nachteilig auf die Reaktionsdauer aus (vergleiche Einträge 1 und 2a, Tabelle 72). Die β-Hydroxyketone können im Zuge der Aldolreaktion mit hohen *ee*-Werten gebildet und durch die (*S*)- und (*R*)-spezifischen ADHs zu enantiomerenreinen und hochdiastereomeren-angereicherten 1,3-Diolen reduziert werden (>99 % *ee*, *dr* >25:1). Die optische Reinheit der 1,3-Diole in der sequentiellen Reaktionsführung hängt folglich von der Enantioselektivität der Aldolreaktion ab, da die eingesetzten ADHs bezüglich der Bildung des neuen Stereozentrums enantiospezifisch sind. Dabei handelt es sich um die (*R*)-spezifische ADH aus *L. kefir* (LKADH) und die (*S*)-spezifische ADH aus *Rhodococcus* sp. (RSADH), die beide Isopropanol als Cosubstrat zur Cofaktorregenerierung nutzen können. Dadurch entfällt der Zusatz eines weiteren Coenzyms, sodass Kosten und Arbeitsschritte für die Herstellung des regenerierenden Biokatalysators reduziert werden können. Da Isopropanol kein Substrat für die PPADH darstellt, wurde die GDH als Cofaktor-regenerierendes Enzym verwendet und beide Enzyme in Form eines Ganzzellkatalysators (FGZK3) eingesetzt.

Neben der Verwendung des Prolinamid-basierten *Singh*-Katalysators für die Aldolreaktionen wurde von AOKI *et al.* ein chiraler Zn^{2+}-Komplex (L-ZnL^3, 10 mol%) als Katalysator für die Aldolreaktion von 4-Chlorbenzaldehyd und Aceton verwendet (Tabelle 72, Eintrag 4), der ebenfalls in wässrigen Lösungen aktiv ist. Während der Prolinamid-basierte *Singh*-Katalysator die Aldolreaktion über die Bildung eines Enamins katalysiert (wie bei Typ-I-Aldolasen),[93,104–108] wird angenommen, dass der Reaktionsmechanimus des chiralen Zn^{2+}-Komplexes (L-ZnL^3) von AOKI *et al.* dem der Typ-II-Aldolasen ähnelt und über ein Zn^{2+}-Enolatintermediat verläuft.[299,300] Zusätzlich wurden die ADHs E001 und E039 aus dem Chiralscreen OH-Kit (Daicel Co., Ltd., Japan) für die anschließende Reduktion verwendet, die ebenfalls Isopropanol als Cosubstrat für die Cofaktorregenerierung nutzen und für die Bildung des zweiten Stereozentrums entweder (*S*)- oder (*R*)-spezifisch sind (Tabelle 72, Eintrag 4a-b). Die erreichten *ee*- und *de*-Werte der 1,3-Diole sind dabei vergleichbar mit denen der Eintopfreaktion von BAER und RULLI *et al*. (vgl. Einträge 2, 3 und 4, Tabelle 72). Die chiralen 1,3-Diole konnten in

den sequentiellen Eintopfreaktionen mit nur mäßigen Ausbeuten von 45-80 %, >99 % *ee* und bis zu >25:1 *dr* isoliert werden, während das (*S*,*S*)-CF_3-Diol mit 87 % Ausbeute und >99 % *ee*, *de* nach bereits 21 Stunden erhalten werden konnte. Folglich kann gesagt werden, dass sich die entwickelte Tandem-Eintopfreaktion im Vergleich zu den anderen aufgeführten Beispielreaktionen durch eine höhere Prozesseffizienz und Selektivität auszeichnet. Diese außergewöhnliche Enantioselektivität der PPADH limitiert jedoch das entwickelte DKR-System dieser Arbeit auf die Synthese von enantiomeren- und diastereomerenreinen (*S,S*)-CF_3-Diol (Tabelle 72, Eintrag 5). Die anderen eingesetzten ADHs (E001, E039, LKADH und RSADH) der aufgeführten Beispiele in Tabelle 72 können nicht zwischen den beiden Enantiomeren des β-Hydroxyketons differenzieren. Das kann allerdings vorteilhaft ausgenutzt werden, da unter geeigneten Reaktionsbedingungen (enantiomerenreine β-Hydroxyketone) mit (*S*)- oder (*R*)-spezifischen ADHs und dem jeweiligen chemischen Katalysator der Zugang zu allen vier Stereoisomeren möglich ist. Der Zugang zu den anderen Stereoisomeren des CF_3-Diols konnte mit anderen ADHs ermöglicht werden (siehe Kapitel 3.9), jedoch können die 1,3-Diole aufgrund der geringen Substratspezifität und Enantioselektivität der ADHs nicht als Tandem-Eintopfreaktion realisiert werden. Das Substratspektrum der entwickelten Tandem-Eintopfreaktion konnte ebenfalls auf diverse *para*-subsituierte Trifluoracetophenone als Aldolakzeptoren erweitert werden, jedoch nicht auf *p*-CF_3- und *o*-OMe-substituierte Trifluoracetophenone. Hier zeigte sich, dass die Reduktion der entsprechenden β-Hydroxyketone zu den 1,3-Diolen durch die PPADH nur sehr langsam verläuft. Anhand der Kristallstruktur der PPADH ist ersichtlich, dass zu große Reste wie das *p*-CF_3 als auch das *o*-OMe am Phenylring zu sterischen Hinderungen im aktiven Zentrum führen und diese daher schlechter umgesetzt werden.

4.6 Die PPADH1 als Schlüsselelement für die Kombination von Organo- und Biokatalyse in einer Tandem-Eintopfreaktion

Die Kombination von Organo- und Biokatalyse in Form einer Eintopfreaktion in wässriger Lösung stellt ein ökonomisch als auch ökologisch attraktives Konzept dar, da Reaktionsdauer, Aufarbeitungsschritte und der Verbauch an toxischen Lösungsmitteln reduziert werden können.[171] Um die beiden „Welten“ erfolgreich in einer Tandem-Eintopfreaktion zu koppeln, liegt die größte Herausforderung darin, eine hohe Kompatibilität der beiden Systeme bzw. Reaktionsschritte zu erreichen, sodass diese parallel ablaufen können. Die entwickelte Tandem-Eintopfreaktion in dieser Arbeit konnte daher nur realisiert werden aufgrund folgender Besonderheiten:

1) Beide Reaktionsschritte (organokatalysierte Aldolreaktion und enzymatische Reduktion) laufen effizient in wässriger Lösung und geringer Aceton-Konzentration ab, wodurch eine Eintopfreaktion möglich ist.

2) Die identifizierte PPADH1 weist eine ungewöhnlich hohe Substratspezifität und Aktivität gegenüber dem Intermediat (β-Hydroxyketon) auf, während „normale“ aliphatische und aromatische Ketone mit nur schwacher oder keiner Aktivität umgesetzt werden. Daher wird das Edukt der Aldolreaktion Trifluoracetophenon nur im geringem Maße von der PPADH reduziert. Durch diese selektive Substratspezifität gegenüber Ketonen wird eine Tandem-Eintopfreaktion erst möglich.

3) Die PPADH1 reduziert mit hoher Selektivität (nahezu) ausschließlich das (*S*)-Enantiomer des racemischen CF_3-Aldols in Form einer kinetischen Racematspaltung und ist somit hochselektiv bezüglich des ersten Stereozentrums (C-1).

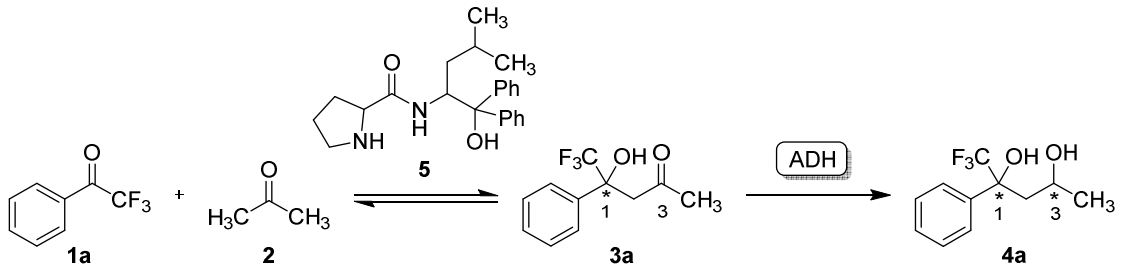
4) Die PPADH1 ist stereospezifisch bezüglich der Reduktion der Carbonylgruppe an C-3, sodass das neue Stereozentrum immer (*S*)-konfiguriert ist.

5) Der *Singh*-Katalysator ist in der Lage, dass nicht-umgesetzte (*R*)-Enantiomer des CF_3-Aldols zu racemisieren, wodurch in Verbindung mit Punkt 3 eine dynamisch-kinetische Racematspaltung möglich ist.

6) Aufgrund der besonderen Eigenschaften der PPADH1 (Punkt 3 und 4) wird ausschließlich das (*S,S*)-CF_3-Diol enantiomeren- als auch diastereomerenrrein gebildet.

Anhand der aufgeführten Punkte wird deutlich, dass die PPADH1 das Schlüsselelement für die erfolgreiche Etablierung der Tandem-Eintopfreaktion aufgrund ihrer besonderen katalytischen Eigenschaften darstellt. Diese werden vor allem im Vergleich mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten Biokatalysatoren deutlich (Tabelle 73). Alle verwendeten ADHs zeigten im Vergleich zur PPADH1 nur geringe spezifische Aktivitäten hinsichtlich der Reduktion des CF_3-Aldols. Zusätzlich wiesen die anderen ADHs im Gegensatz zur PPADH eine höhere Substratspezifität gegenüber dem Edukt Trifluoracetophenon statt dem β-Hydroxyketon auf (**1a** >> **3a**, Tabelle 73), wodurch eine Tandem-Eintopfreaktion aufgrund der hohen Reduktionsaktivität nicht realisierbar ist. Eine exklusive Eigenschaft der PPADH ist die Selektivität für die Reduktion des (*S*)-CF_3-Aldols **3a** in Form einer kinetischen Racematspaltung. Alle anderen getesteten ADHs zeigten keine Selektivität bezüglich des ersten Stereozentrums an C-1 Position des CF_3-Aldols **3a**, es konnten lediglich schwache Präferenzen beobachtet werden. Diese Enzyme können daher nur dann eingesetzt werden, wenn für die enzymatische Reduktion reine Isomere des CF_3-Aldols eingesetzt werden.

Tabelle 73: Vergleich der verwendeten Biokatalysatoren bezüglich ihrer Eigenschaften für die Synthese chiraler 1,3-Diole **4a**. RRADH= ADH aus *Rhodococcus ruber*, LKADH= ADH aus *Lactobacillus kefir*, 3α-HSDH= Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni*, CTADH= ADH aus *Comamonas testosteroni*, PAPADH= ADH aus *Paracoccus pantotrophus*).



Enzym	Hohe Substratspezifität (**3a** >> **1a**)	Hohe Aktivität (**3a**)	Selektivität C-1 (**3a**)	Spezifität C-3 (**3a**)	Tandem (T)/ Sequenziell (S)[b]
PPADH1	✓	✓	(*S*)✓	(*S*)✓	T/S→(*S*,*S*)-**4a**
LKADH	✗	✗	✗	✗	S→(*S*,*R*)-**4a**
RRADH	✗	✗	✗	(*S*)✓	S→(*S*,*S*)-*I*(*R*,*S*)-**4a**
3α-HSDH	✗	✗	✗	✗	S→(*R*,*R*)-*I*(*S*,*R*)-**4a**
CTADH	/[a]	/[a]	✗	✗	/[a] S→(*R*,*R*)-**4a**
PAPADH	✗	✗	✗	(*S*) bei (*R*)-**3a**	S→(*R*,*S*)-**4a**

[a]Experimentell nicht überprüft (Aktivitäten, Tandem-Modus).
[b]Möglicher Zugang zu den Stereoisomeren des CF_3-Diols **4a**, wenn β-Hydroxyketon **3a** enantiomerenrein ist.

Unterschiede konnten auch hinsichtlich der Stereospezifität des neu gebildeten Stereozentrums an C-3 Position beobachtet werden. In Tabelle 73 ist erkennbar, dass die PPADH und RRADH ausschließlich (*S*)-spezifisch reduzieren. Die PAPADH war ebenfalls (*S*)-spezifisch, aber nur für die Reduktion des (*R*)-CF_3-Aldols **3a**. Die übrigen ADHs zeigten nur mäßige Stereospezifitäten bezüglich des 2. Stereozentrums an C-3. Aufgrund der fehlenden Selektivität an C-1 für das CF_3-Aldol **3a** sowie den unterschiedlichen Stereospezifitäten an C-3 können die ADHs im sequentiellen Modus mit der organokatalysierten Aldolreaktion kombiniert werden, um den Zugang zu allen Stereoisomeren des CF_3-Diols **4a** zu ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

Die stereoselektive Synthese von chiralen 1,3-Diolen ist derzeit in der Organischen Chemie von besonderem Interesse, da dieses Motiv häufig als *syn*- oder *anti*-Isomer in einer Vielzahl von natürlichen Produkten zu finden ist. Aufgrund der Wichtigkeit dieser 1,3-Diole als chirale Bausteine wurden eine Vielzahl von chemischen und biokatalytischen Verfahren zur stereoselektiven Synthese von 1,3-Diolen entwickelt. In dieser Arbeit sollte eine chemoenzymatische „Tandem"-Eintopfreaktion entwickelt werden, die eine organokatalysierte Aldolreaktion zweier Ketone mit einer enzymatischen Reduktion des *in situ* gebildeten tertiären β-Hydroxyketons unter Ausbildung von diastereo- und enantiomerenreinen 1,3-Diolen kombiniert.

Das Ziel des ersten Schwerpunktes dieser Arbeit war die Auffindung einer neuen Alkohol-Dehydrogenase, die das chirale trifluormethylierte β-Hydroxyketon (CF_3-Aldol) effizient und stereoselektiv im Sinne einer kinetischen Racematspaltung (KR) zum korrespondierenden 1,3-Diol reduziert. Nach einem umfassenden *Screening* verschiedener mikrobieller Stämme wurden einige Hefestämme positiv für die asymmetrische Reduktion des racemischen CF_3-Aldols getestet. Mittels verschiedener chromatographischer Reinigungsschritte konnte das gesuchte Zielprotein aktivitätsbasiert aus dem Rohextrakt der Hefe *Pichia pastoris* bis nahezu zur Homogenität angereichert und mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden. Als Resultat wurde eine neue NADPH-abhängige Alkohol-Dehydrogenase PPADH aus *P. pastoris* als das CF_3-Aldol-reduzierende Enzym identifiziert. Nach Klonierung und Expression wurde die neu identifizierte PPADH gereinigt und umfassend biochemisch charakterisiert. Die PPADH katalysiert bevorzugt die Reduktion aliphatischer Aldehyde und die Oxidation primärer als auch sekundärer Alkohole. Aromatische Aldehyde wie Benzaldehyd sowie β-Ketoester werden ebenfalls mit guter Aktivität reduziert. Überraschenderweise zeigte die PPADH keine vergleichbare Aktivität für andere Ketone als das CF_3-Aldol. Reduktive als auch oxidative Biotransformationen von prochiralen Ketonen und racemischen Alkoholen konnten zeigen, dass die PPADH eine (*S*)-spezifische ADH ist.

Im Genom von *P. pastoris* wurden fünf weitere ADHs (PPADH2-PPADH6) mit sehr hohen Sequenzähnlichkeiten zur PPADH gefunden. Diese wurden ebenfalls kloniert, exprimiert und hinsichtlich der Reduktion des CF_3-Aldols getestet. Hierbei wurden bei PPADH4, die eine Sequenzähnlichkeit von 90,4 % zur PPADH1 aufwies, große Unterschiede sowohl hinsichtlich Expression, Enantio- und Diastereoselektivität als auch

der kinetischen Parameter festgestellt. Durch semirationale Mutagenese auf Basis eines Aminosäuresequenz-Vergleichs als auch von Strukturdaten konnten zwei wichtige Regionen 94-96 sowie 136-142 als *hot spots* identifiziert werden, welche den Substrattunnel und die Position bzw. die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum beeinflussen. Darüber hinaus, gelang es im Rahmen einer Kooperation, die Struktur der PPADH1, der PPADH4 und einiger Mutanten röntgenkristallographisch mit einer Auflösung bis zu 1,79 Å aufzuklären. Insbesondere lieferte die Kristallstruktur des ternären Komplexes mit gebundenem Cofaktor und Substrat wichtige Einblicke in den molekularen Mechanismus der PPADH.

Das Ziel des zweiten Schwerpunkts dieser Arbeit war der Einsatz der PPADH für präparative Anwendungen. Hierfür wurden Ganzzellkatalysatoren konstruiert, die PPADH und die Glucose-Dehydrogenase (GDH) für die Cofaktorregenerierung beinhalten. Nach Evaluation der Reaktionsparameter konnte mit Hilfe des Ganzzellkatalysators die kinetische Racematspaltung des trifluormethylierten CF_3-Aldols als auch des nicht-fluorierten Analogons (CH_3 statt CF_3) erfolgreich durchgeführt und die (*R*)-β-Hydroxyketone und die (*S*,*S*)-1,3-Diole in sehr guten Ausbeuten und hervorragenden Enantio- und Diastereoselektivitäten isoliert werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte die PPADH-katalysierten Racematspaltung mit der von BERKESSEL *et al.* entwickelten organokatalysierte Aldolreaktion von Trifluoracetophenon und Aceton als Tandem-Eintopfreaktion kombiniert und in Hinblick auf Nachhaltigkeit und Kompatibilität in wässrigen Milieu durchgeführt werden. Nach notwendigen Optimierungsmaßnahmen durch Veränderung der Reaktionsparameter wie beispielsweise Katalysatormenge, Reaktionszeit und Acetonmenge der Einzelreaktionen konnte eine effiziente und robuste Tandem-Eintopfreaktion in wässrigem Reaktionsmedium entwickelt werden, in der beide Reaktionsschritte simultan mit hoher Kooperativität ablaufen (Abbildung 81). Da der verwendete *Singh*-Katalysator in wässrigen Lösungen sehr reaktiv ist, reichen 5 mol% aus, um eine effiziente Racemisierung des (*R*)-Aldols über eine Retro-Aldolreaktion zu gewährleisten. In Verbindung mit der kinetischen Racematspaltung des *in situ* gebildeten β-Hydroxyketons **3** mittels Ganzzellkatalysator konnte so der gesamte Prozess als dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR) realisiert und das (*S*,*S*)-CF_3-Diol **4** in enantiomeren- als auch diastereomerenreiner Form isoliert werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass aufgrund der hohen Substratspezifität der PPADH gegenüber dem *in situ* gebildeten β-Hydroxyketon das Edukt Trifluoracetophenon nur im minimalen Umfang (<5 %) zum korrespondierenden Alkohol reduziert wird und dadurch eine simultane Reaktionsführung möglich ist.

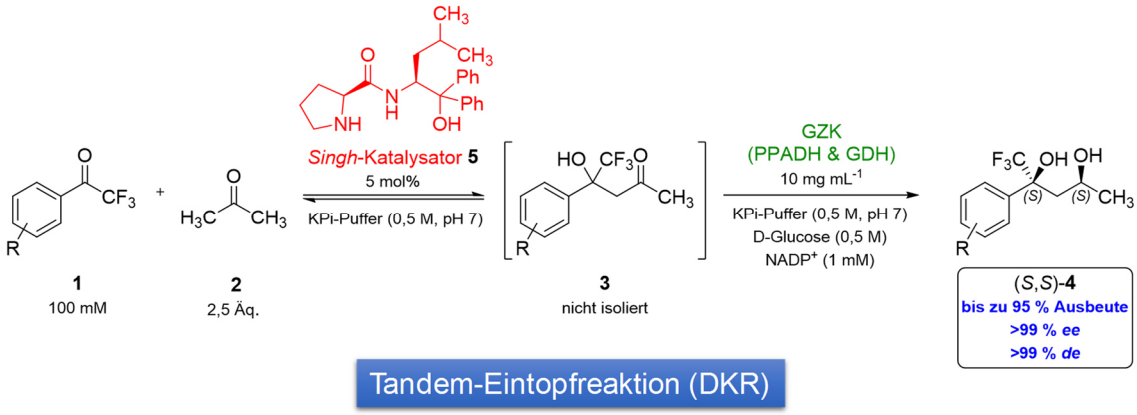


Abbildung 81: Kombinierte Organo- und Biokatalyse zur Synthese trifluormethylierter 1,3-Diole als Tandem-Eintopfreaktion *via* DKR.

Die Anwendbarkeit der entwickelten Tandem-Eintopfreaktion konnte im präparativen Maßstab ebenfalls auf diverse *para*-substituierte Trifluoracetophenone als Aldolakzeptoren übertragen und die substituierten (*S*,*S*)-CF_3-Diole äquivalent zum unsubstituierten CF_3-Diol in optisch reiner Form erhalten werden. Die hier vorgestellte Syntheseroute stellt die bis dato erste Eintopfreaktion dar, in der die organokatalysierte Aldolreaktion und die enzymatische Reduktion simultan in Puffer als Reaktionsmedium in Form einer DKR ablaufen.

Zusätzlich wurde der Zugang zu allen vier Stereoisomeren des CF_3-Diols **4** als „*proof of concept*“ durch Variation des Biokatalysators ((*R*)- oder (*S*)-spezifische ADH) gezeigt. Weiterhin ist es gelungen, geruchsaktive 1,3-Dioxane aus chiralen 1,3-Diolen herzustellen.

ABSTRACT

The stereoselective synthesis of chiral 1,3-diols is currently of considerable interest in organic chemistry, because this motif can be found frequently in either *syn* and *anti* relationship in a large variety of natural products. Due to the importance of these chiral 1,3-diols as building blocks, a wide range of chemical and biocatalytic processes for the stereoselective synthesis of 1,3-diols have been developed. In this work, a chemoenzymatic "tandem" one-pot synthesis was developed including an organocatalyzed aldol reaction of two ketones combined with an enzymatic reduction of the *in situ* formed tertiary β-hydroxy ketone to generate chiral 1,3-diols in stereochemically defined form.

The aim of the first section of this thesis was the identification of a new alcohol dehydrogenase, which efficiently reduces the chiral β-hydroxy-β-trifluoromethyl ketone (CF_3-aldol) to its corresponding 1,3-diol in a stereoselective manner resulting in a kinetic resolution (KR). After extensive screening of various microbial strains only a few yeast strains were positively tested for the asymmetric reduction of the racemic CF_3-aldol. Finally, the desired enzyme was partially purified from the crude cell extract of wildtype *Pichia pastoris* strain by several chromatographic purification steps and identified by a subsequent MALDI-TOF mass spectrometric analysis. As a result, a new NADPH-dependent alcohol dehydrogenase (PPADH) from *P. pastoris* was identified responsible for the asymmetric reduction of the CF_3-aldol. After recombinant cloning and expression of the new gene coding for PPADH, the enzyme was purified and biochemically characterized. The PPADH catalyzes preferentially the reduction of aliphatic aldehydes and the oxidation of primary and secondary alcohols. Additionally, aromatic aldehydes such as benzaldehyde and β-keto esters are reduced with good activities. Surprisingly, the enzyme shows no comparable activity towards ketones other than the CF_3-aldol. Reductive and oxidative biotransformations of prochiral ketones and racemic alcohols showed that the PPADH is a (*S*)-specific ADH. Five other ADHs (PPADH2-PPADH6) were found in the genome of *P. pastoris*, which showed high sequence similarities on amino acid level to the PPADH. Their coding genes were also cloned, expressed and the enzymes were tested for the reduction of the CF_3-aldol. For the PPADH4, which shows a sequence similarity of 90.4 % to PPADH1, great differences were observed with regard to expression, enantio- and diastereoselectivity as well as kinetic parameters. By a semi-rational mutagenesis approach based on amino acid sequence alignment and structural data, two important regions, 94-96 and 136-142, were

identified as hot spots which influence the substrate tunnel and the binding or the position of the substrate in the active site. Furthermore, the protein structures of the PPADH1, PPADH4 and some mutants were elucidated by X-ray crystallography at a resolution up to 1.79 Å by our cooperation partner. Especially, the crystal structure of PPADH as ternary complex with bound cofactor and substrate delivered important insights into the molecular mechanism of the PPADH.

The aim of the second section of this thesis was the use of the PPADH for preparative applications. Therefore, different whole cell catalysts were constructed, which contain the PPADH and glucose dehydrogenase (GDH) for cofactor regeneration. After evaluation of the reaction parameters the kinetic resolutions of the trifluoromethylated CF_3-aldol and its unfluorinated analogue (CH_3-aldol) were successfully performed by the whole cell catalyst and the (*R*)-β-hydroxy ketone and the (*S*,*S*)-1,3-diols were isolated in good yields and high enantio- and diastereomeric excesses. Based on this results, the PPADH-catalyzed kinetic resolution was combined with the organocatalytic aldol reaction of trifluoroacetophenone and acetone developed by BERKESSEL *et al.* as a tandem one-pot procedure, which should be carried out in aqueous medium in terms of substainability and compatibility. After important optimization steps of the reaction parameters such as catalysts loading, reaction time and acetone amount of the individual reactions, an efficient and robust tandem one-pot reaction in aqueous buffer was developed, in which the two reaction steps took place simultaneously with high cooperativity (Figure 1). Due to the high reactivity of the Singh's catalyst in aqueous solutions, only 5 mol% was sufficient for an efficient racemization of the remaining (*R*)-aldol through reto-aldol reaction. In combination with the kinetic resolution of the *in situ* formed β-hydroxy ketone **3** by the whole cell catalyst, the entire process was implemented as a dynamic kinetic resolution (DKR) leading to the (*S*,*S*)-CF_3-diol **4** in high yield and enantio- and diastereomerically pure form. Remarkably, the PPADH showed high substrate specificity towards the *in situ* formed β-hydroxy ketone, whereas the substrate trifluoroacetophenone was only reduced in a minimal extent (<5 %) to its corresponding alcohol facilitating a simultaneous reaction mode. The applicability of the developed tandem one-pot reaction could also be transferred on preparative scale on various *para*-substituted trifluoroacetophenones as aldol acceptors, so that the substituted (*S*,*S*)-CF_3-diols were obtained in optically pure form as the unsubstituted CF_3-diol. The presented synthetic route in this thesis represents to date the first tandem one-pot reaction, in which the organocatalyzed aldol reaction and the enzymatic reduction took place simultaneously in buffer as reaction medium *via* DKR.

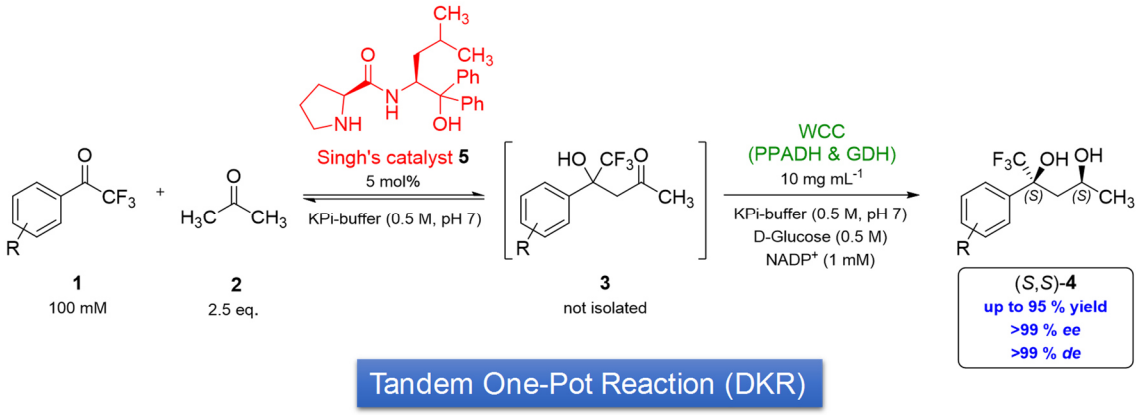


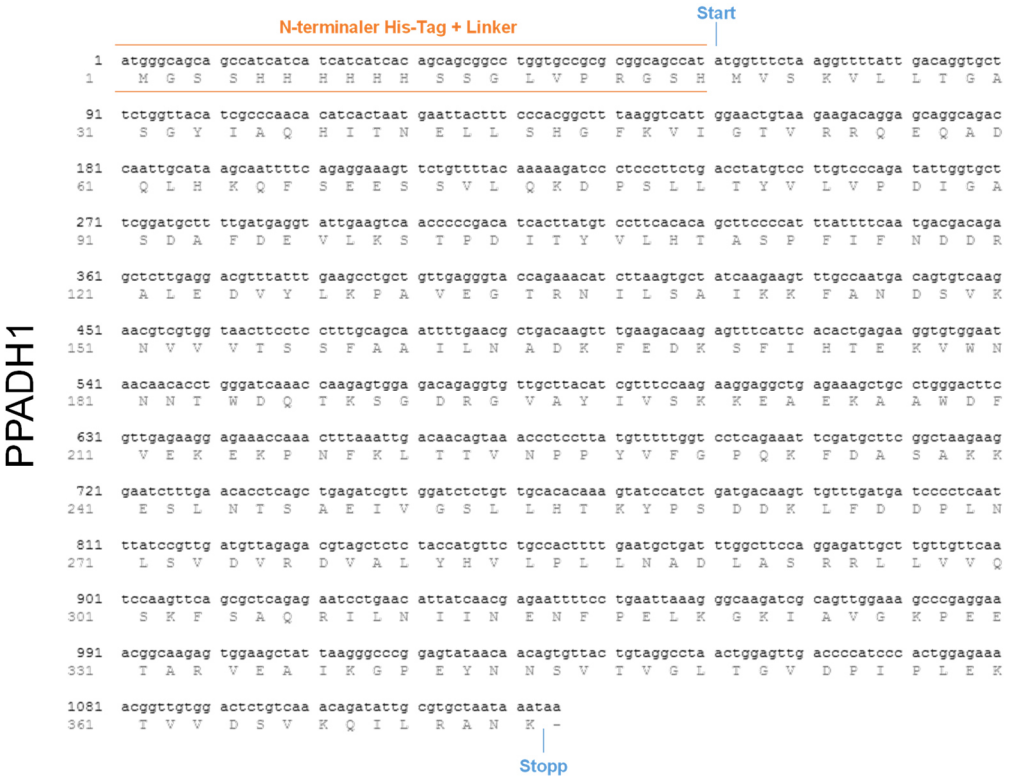
Figure 1: Combined organo- and biocatalysis for the synthesis of trifluoromethylated 1,3-diols as tandem one-pot process *via* DKR.

Moreover, the access to all four stereoisomers of the CF_3-diol **4** by variation of the biocatalyst ((*R*)- or (*S*)-specific ADH) has been demonstrated as a proof of concept. Furthermore, the synthesis of odour-active 1,3-dioxanes from chiral 1,3-diols was successfully achieved.

6. ANHANG

6.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (PPADH1 & PPADH4)

PPADH1




```
                                                
```

6.2 Analytik

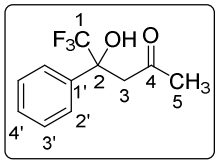
6.2.1 Synthese von racemischen 5,5,5-Trifluoro-4-hydroxy-4-phenylpentan-2-one (*rac*-CF_3-Aldol)[117]

[Synthese und Analytik erfolgten an der Universität Köln unter Anleitung von Dr. Nongnaphat Duangdee (AK Berkessel), NOD423]



2,2,2-Trifluoracetophenon (**1a**)	+	Aceton (**2**)	DL-Prolin (10 mol %), RT, 3 h	*rac*-CF_3-Aldol (**3a**), >95 %

In einem 100 mL Rundkolben mit Magnetrührer wurden 4,35 g 2,2,2-Trifluoroacetophenon (**1a**) (25 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und mit 0.29 g DL-Prolin (2.5 mmol, 0.01 Äq.) und mit 50 mL trockenem Aceton (**2**) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und die organische Phase isoliert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt *rac*-CF_3-Aldol (**3a**) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten, welches bei Inkubation auf Trockeneis zum Feststoff kristallisierte. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.[117,188]



Ausbeute: 5,6 g (24.3 mmol, >95 %, 0 % *ee*)

Molmasse: $C_{11}H_{11}F_3O_2$, 230.20 g/mol

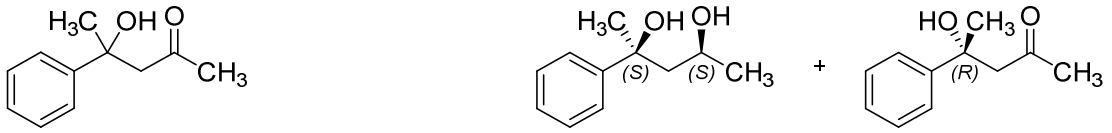
HPLC: *Daicel OD-H* (*n*-Hexan/Isopropanol 99/1 (v/v); Flussrate 1 mL/min, 215 nm): (*R*)-CF_3-Aldol = 16,6 min; (*S*)-CF_3-Aldol = 34,5 min.

^{1}H-NMR: Daten nicht verfügbar

6.2.2 Präparative kinetische Racematspaltungen von racemischen β-Hydroxyketonen mittels Ganzzellkatalysator (FGZK3)

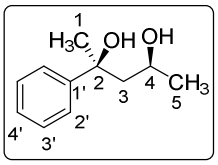
6.2.2.1 Biokatalytische Synthese von (2*S*,4*S*)-2-Phenylpentan-2,4-diol (CH_3-Diol)

[Von Matthias Hammel in Köln durchgeführt, MHA 461]



rac-CH_3-Aldol	FGZK3 (PPADH+GDH) → KPi-Puffer, RT, 4 h	(*S*,*S*)-CH_3-Diol, 46 %	(*R*)-Aldol, 46 %

In einem Rundkolben mit Magnetrührer wurden 178 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des *rac*-CH_3-Aldols in 0,5 mL Methanol gelöst und mit 2 mL Glucoselösung (2.5 M, 5.0 mmol, 5.00 Äq.), 500 µL $NADP^+$-Lösung (0.1 M, 0.05 mmol, 0.05 Äq.) und 1 mL (250 mg in KPi-Puffer) einer Suspension von *E coli*-Zellen (FGZK3) versetzt. Es wurde mit KPi-Puffer (0.5 M, pH 7) auf ca. 50 mL aufgefüllt und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 5 mal mit EtOAc extrahiert, die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-CH_3-Diol als farbloser Feststoff in guter Ausbeute neben dem enantiomerenangereicherten Substrat (*R*)-CH_3-Aldol erhalten werden.[203]



Ausbeute: 83 mg (0.46 mmol, 46 %, >99 % *ee*, >98 % *de*)

Molmasse: $C_{11}H_{16}O_2$, 180.24 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: −37.1 ° (c = 0.72 in $CHCl_3$)

DC: R_f = 0.16 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat 7/3).

CHN: Berechnet: C: 73.30 %, H: 8.95 %.
Gefunden: C: 72.98 %, H: 8.80 %.

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 11.34 min (m/z = 165 ([M-Me]), 162 ([M−H_2O])).

Chirale GC: *Hydrodex γ-TBDAc,* 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm
60 °C (5 min), 15 °C/min, 135 °C, 1 °C/min, 140 °C (25 min), 15 °C/min, 170 °C (10 min). t_R (*S*,*S*) = 47.14 min.

HPLC: *Daicel AD-H* (*n*-Hexan/Isopropanol 99.2/0.8 (v/v); Flussrate 0.8 mL/min): (*S*,*R*)-Diol 69.8 min, (*R*,*S*)-Diol 83.7 min, (*R*,*R*)-Diol 115.7 min, (*S*,*S*)-Diol 148.4 min.

^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-Diol (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.46 (d, ^3J = 7.7 Hz, 2H, H-2‘), 7.34 (Ψt, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H-3‘), 7.24 (Ψt, ^3J = 6.7 Hz, 1H, H-4‘), 4.30 (dqd, ^3J = 9.2 Hz, 6.2 Hz, 3.0 Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 1H, O*H*), 3.43 (s, 1H, O*H*), 1.87 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 9.6 Hz, 1H, H-3), 1.79 (dd, ^2J = 14.7 Hz, ^3J = 2.9 Hz, 1H, H-3), 1.65 (s, 3H, H-1), 1.19 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).

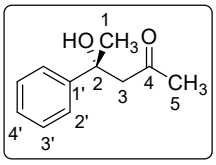
Die Signalzuordnung erfolgte mittels 2D-NMR Experimenten.

^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-Diol (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 149.3 (s, C-1’), 128.4 (d, C-3’), 126.8 (d, C-4’), 124.4 (d, C-2’), 75.1 (s, C-2), 65.9 (d, C-4), 51.0 (t, C-3), 28.1 (q, C-1), 24.4 (q, C-5).

Die Signalzuordnung erfolgte mittels 2D-NMR Experimenten.

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3310 (w, *br*), 2972 (w), 2934 (w), 2361 (w), 1499 (w), 1464 (w), 1447 (m), 1418 (w), 1375 (m), 1319 (w), 1225 (w), 1128 (s), 1072 (s), 1028 (m), 959 (m).

Ausbeute: 82 mg (0.46 mmol, 46 %, 97 % *ee*)



Molmasse: $C_{11}H_{14}O_2$, 178.23 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: −52.5 ° (c = 0,04 in Dichlormethan)

DC: R_f = 0.21 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat 7/3).

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min);
He, (1.2 mL/min).
t_R = 9.95 min (m/z = 163 ([M-Me]), 160 ([M−H_2O]), 121 ([M−CH_2COCH_3]).

Chirale GC: *Hydrodex γ-TBDAc,* 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm
60 °C (5 min), 15 °C/min, 135 °C, 1 °C/min, 140 °C (25 min), 15 °C/min, 170 °C (10 min)
t_R (*R*) = 27.84 min, t_R (*S*) = 30.40 min.

^{1}H-NMR: (*R*)-CH_3-Aldol (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.43 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-2‘), 7.33 (Ψt, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-3‘), 7.22 (Ψt, ^3J = 7.2 Hz, 1H, H-4‘), 4.51 (m, 1H, O*H*), 3.19 (d, ^2J = 17.0 Hz, 1H, H-3), 2.84 (d, ^2J = 17.0 Hz, 1H, H-3), 2.07 (s, 3H, H-5), 1.52 (s, 3H, H-1).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

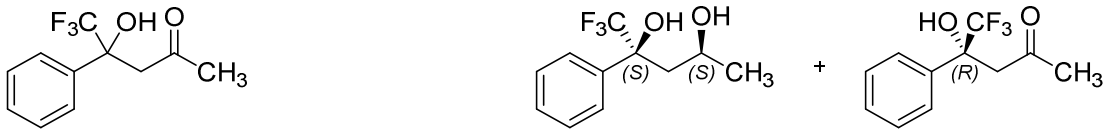
^{13}C-NMR: (*R*)-CH_3-Aldol (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 210.7 (s, C-4), 147.4 (s, C-1'), 128.4 (d, C-3'), 126.9 (d, C-4'), 124.4 (d, C-2'), 73.4 (s, C-2), 54.1 (t, C-3), 32.0 (q, C-1), 30.8 (q, C-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3462 (br, w), 2976 (w), 1697 (s), 1494 (q), 1446 (w), 1359 (m), 1328 (w), 1271 (s), 1170 (m), 1095 (w), 1066 (m).

6.2.2.2 Biokatalytische Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-phenylpentan-2,4-diol

[Die säulenchromatographische Reinigung und die Analytik wurden von Matthias Hammel (AK Berkessel) an der Universität Köln durchgeführt; MHA 602]

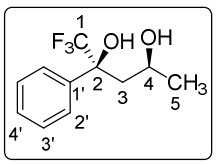


rac-CF_3-Aldol	FGZK3 (PPADH+GDH)	(*S*,*S*)-CF_3-Diol	(*R*)-CF_3-Aldol
(**3a**)	KPi-Puffer, RT, 6 h	(**4a**), 46 %	(**3a**), 46 %

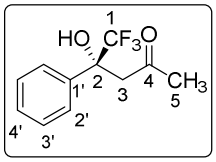
In einem 50 mL-Reaktionsgefäß mit Magnetrührer wurden 233 mg (1.00 mmol, 1.00 eq) des *rac*-CF_3-Aldols (**3a**) in 0.5 mL Methanol gelöst und mit 2 mL Glucoselösung (2.5 M, 5.0 mmol, 5.00 eq), 500 µL $NADP^+$-Lösung (0.1 M, 0.05 mmol, 0.05 eq) und 1 mL (50 mg in KPi-Puffer) einer Suspension von *E coli*-Zellen (FGZK3) versetzt. Es wurde mit KPi-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.5 M, pH=7) auf ca 50 mL aufgefüllt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 5 mal mit EtOAc extrahiert, über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4a**) als farblose Flüssigkeit in guter Ausbeute neben dem hoch enantiomerenangereicherten Substrat (*R*)-CF_3-Aldol (**3a**) erhalten werden.[203]

Ausbeute: 108 mg (0.46 mmol, 46 %, >99 % *ee, de*)

Molmasse: $C_{11}H_{13}F_3O_2$, 234.21 g/mol



Analytik siehe Abs. 6.2.3.1



Ausbeute: 105 mg (0.45 mmol, 45 %, >99 % *ee*)

Molmasse: $C_{11}H_{11}F_3O_2$, 232.20 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: –23.3 ° (c = 0.195 in $CHCl_3$)

DC: R_f = 0.45 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat 7/3).

HPLC: *Daicel OD-H* (*n*-Hexan/Isopropanol 99:1 (v/v), Flussrate 1 mL/min): (*R*)-CF_3-Aldol 17.3 min, (*S*)-CF_3-Aldol 38.1 min.

^{1}H-NMR: (*R*)-CF_3-Aldol (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.56 (m, 2H, H-2'), 7.38 (m, 3H, H-3'/4'), 7.45 (s, OH), 3.37 (d, ^2J = 17.2 Hz, 1H, H-3), 3.20 (d, ^2J = 17.2 Hz, 1H, H-3), 2.20 (s, 3H, H-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[89]

^{13}C-NMR: (*R*)-CF_3-Aldol (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 209.1 (s, C-4), 137.6 (s, C-1'), 129.0 (d, C-4'), 128.6 (d, C-3'), 126.3 (d, C-2'), 124.6 (q, ^1J = 284.9 Hz, C-1), 76.2 (q, ^2J = 29.2 Hz, C-2), 45.2 (t, C-3), 32.2 (q, C-5).

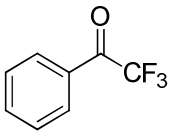
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[89]

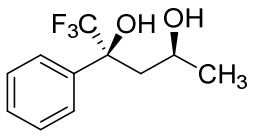
^{19}F-NMR: (*R*)-CF_3-Aldol (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = –80.3 (CF_3).

6.2.3 Chemoenzymatische Eintopfreaktionen zur Herstellung von chiralen 1,3-Diolen ((2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(aryl)pentan-2,4-diolen)

[Die säulenchromatographische Reinigung und die Analytik wurden von Matthias Hammel (AK Berkessel) an der Universität Köln durchgeführt]

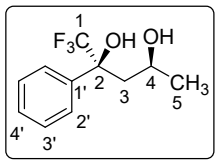
6.2.3.1 Synthese von (2S,4S)-1,1,1-Trifluor-2-phenylpentan-2,4-diol (CF_3-Diol **4a**)





2,2,2-Trifluoracetophenon (**1a**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5**, FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**) → KPi-Puffer (pH 7), RT, 21 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4a**), 87 %

In einem 50 mL-Reaktionsgefäß mit Magnetrührer wurden 859 mg (4.94 mmol, 1.00 Äq.) des Substrates 2,2,2-Trifluoracetophenon (**1a**) vorgelegt und mit 920 µL Aceton (**2**) (12.5 mmol, 2.50 Äq.), 92 mg *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** (0.25 mmol, 0.05 Äq.), 4.95 g D-Glucosemonohydrat (25.0 mmol, 0.5 M, 5 Äq), 500 µL $NADP^+$-Lösung (0.1 M, 0.05 mmol, , 0.01 Äq.) und 0,5 g *E coli*-Zellen (FGZK3, ZFM) versetzt. Es wurde mit KPi-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.5 M, pH 7) auf ca. 50 mL aufgefüllt und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 5 mal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 85/15) konnte das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-CF_3-Diol **4a** als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten werden.



Ausbeute:	1.00 g (4.28 mmol, 87 %)
Molmasse:	$C_{11}H_{13}F_3O_2$, 234.21 g/mol
$[\alpha]_D^{20}$:	–21.8° (c = 1 in $CHCl_3$)
GC-MS:	HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min). t_R (*syn*) = 10.75 min (m/z = 234 ([M]), 196 ([M–F_2]), 165 ([M–CF_3])).
HPLC:	*Daicel OD-H* (*n*-Hexan/Isopropanol 98:2, 0.8 mL/min, 215 nm): (*R*,*S*)-**4a** 22.1 min, (*R*,*R*)-**4a** 24.1 min, (*S*,*R*)-**4a** 68.8 min, (*S*,*S*)-**4a** 141.8 min.

DC: R_f = 0.34 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

CHN: Ber. C: 56.41 % H: 5.59 %
Gef. C: 56.02 % H: 5.77 %

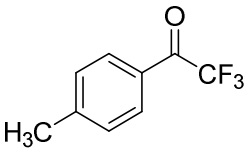
^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4a** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.59 (d, ^3J = 7.7 Hz, 2H, H-2'), 7.43 - 7.32 (m, 3H, H-3'/4'), 5.86 (s, 1H, O*H*), 4.51 (m, 1H, H-4), 2.38 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 2.22 (m, 1H, O*H*), 1.93 (ddq, ^2J = 15.4 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.24 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

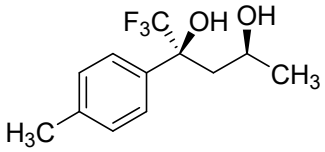
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4a** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 139.7 (s, C-1'), 128.4 (d, C-3'), 128.4 (d, C-4'), 126.1 (q, ^1J = 287.2 Hz, C-1), 125.6 (q, ^4J = 1.4 Hz, C-2'), 77.1 (q, ^2J = 28.0 Hz, C-2), 66.7 (q, ^4J = 1.9 Hz, C-4), 44.0 (t, C-3), 25.2 (q, C-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4a** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.1 (CF_3).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3354 (w, *br*), 2976 (w), 2934 (w), 1452 (w), 1423 (w), 1379 (w), 1329 (w), 1267 (w), 1206 (m), 1151 (s), 1076 (m), 1057 (m), 999 (m), 947 (w), 918 (w).

6.2.3.2 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-methylphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-Me-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4b**)

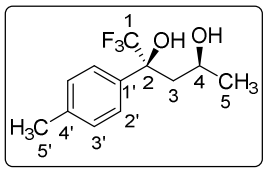




4'-Methyl-2,2,2-trifluoracetophenon (**1b**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**), KPi-Puffer (pH 7), RT, 18 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4b**), 92 %

In einem 25 mL-Reaktionsgefäß mit Magnetrührer wurden 471 mg (2.50 mmol, 1.00 Äq.) des Substrates 4'-Methyl-2,2,2-trifluoracetophenon (**1b**) vorgelegt und mit 460 µL Aceton (**2**) (6.25 mmol, 2.50 Äq.), 46 mg *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** (0.125 mmol, 0.05 Äq.), 2.5 g D-Glucosemonohydrat (12.5 mmol, 0.5 M, 5 Äq), 250 µL $NADP^+$-Lösung (0.1 M, 0.025 mmol, , 0.01 Äq.) und 0,25 g *E coli*-Zellen (FGZK3, ZFM) versetzt. Es

wurde mit KPi-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.5 M, pH 7) auf ca. 25 mL aufgefüllt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 5 mal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 85/15) konnte das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-CF_3-Diol **4b** als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten werden. Zur Analytik per chiraler GC wurden die 1,3-Diole mit BSA derivatisiert.



Ausbeute: 558 mg (2.25 mmol, 92 %)

Molmasse: $C_{12}H_{15}F_3O_2$, 248.24 g/mol

$[\alpha]_D$: −20.8 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 11.54 min (m/z = 248 ([M]), 179 ([M−CF_3])).

Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 112 °C (70 min), 15 °C/min, 180 °C (5 min). t_R (*S*,*S*)-**4b** = 43.8 min

DC: R_f = 0.39 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

CHN: Ber. C: 58.06 % H: 6.09 %
Gef. C: 57.72 % H: 6.01 %

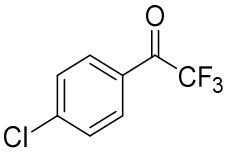
^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4b** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.47 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H, H-2‘/3’), 7.19 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H, H-2’/3‘), 5.68 (s, 1H, O*H*), 4.48 (m, 1H, H-4), 2.36 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 2.35 (s, 3H, H-5‘), 2.07 (s, 1H, O*H*), 1.92 (ddq, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.24 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

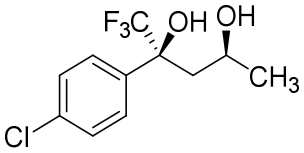
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4b** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 138.2 (s, C-4’), 136.7 (s, C-1’), 129.2 (d, C-3’), 126.2 (q, ^1J = 287.1 Hz, C-1), 125.6 (q, ^4J = 1.4 Hz, C-2’), 77.0 (q, ^2J = 27.9 Hz, C-2), 66.7 (q, ^4J = 1.8 Hz, C-4), 43.9 (t, C-3), 25.3 (q, C-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4b** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.3 (CF_3).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3356 (w), 2974 (w), 2359 (w), 1516 (w), 1456 (w), 1423 (w), 1379 (w), 1292 (w), 1267 (w), 1221 (w), 1204 (m), 1151 (s), 1111 (s), 1057 (m), 1022 (w), 999 (m), 941 (m).

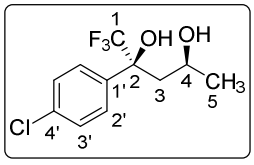
6.2.3.3 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-chlorphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-Cl-CF_3-Diol **4c**)





4'-Chlor-2,2,2-trifluoracetophenon (**1c**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** FGZK3 2,5 Äq. Aceton (**2**) KPi-Puffer (pH 7), RT, 18 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4c**), 92 %

Zur Herstellung des 1,3-Diols **4c** wurden 521 mg (2.50 mmol, 1.00 Äq) des Substrates 4'-Chlor-2,2,2-trifluoracetophenon (**1c**) eingesetzt und die Synthese nach der Synthesevorschrift von Abs. 6.2.3.2 durchgeführt, wobei das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-**4c** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/ Ethylacetat 85/15) als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten wurde. Zur Analytik per chiraler GC wurden die 1,3-Diole mit BSA derivatisiert



Ausbeute:	614 mg (2.29 mmol, 92 %)
Molmasse:	$C_{11}H_{12}F_3O_2Cl$, 268.66 g/mol
[*α*]$_D^{20}$:	-21.7 ° (c = 1 in $CHCl_3$)
GC-MS:	HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min). t_R (*syn*) = 11.61 min (m/z = 268 ([M]), 233 ([M-Cl]), 109 ([M–$CH_2CH(OH)CH_3$]), 199 ([M–CF_3])).
Chirale GC:	*CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 115 °C (78 min), 15 °C/min, 180 °C (5 min). t_R (*S*,*S*)-**4c** = 64.2 min
DC:	R_f = 0.38 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).
CHN:	Ber. C: 49.18 % H: 4.50 % Gef. C: 48.98 % H: 4.77 %
^{1}H-NMR:	(*S*,*S*)-**4c** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.53 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-2'/3'), 7.35 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H-2'/3'), 5.98 (s, 1H, O*H*), 4.52 (m, 1H, H-4), 2.36 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 1.8 Hz, 1H, H-3), 2.03 (s, 1H, O*H*), 1.89 (ddq, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.26 (d, ^3J = 6.1 Hz, 3H, H-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

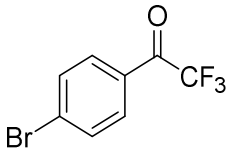
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4c** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 138.4 (s, C-1'), 134.4 (s, C-4'), 128.5 (d, C-3'), 127.3 (q, ^4J = 1.4 Hz, C-2'), 125.9 (q, ^1J = 287.2 Hz, C-1), 76.8 (q, ^2J = 28.3 Hz,C-2), 66.8 (q, ^4J = 1.9 Hz, C-4), 43.8 (t, C-3), 25.3 (q, C-5).

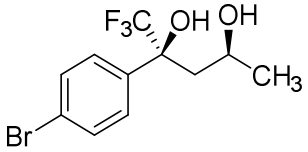
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4c** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.1 (CF_3).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3355 (w, *br*), 2975 (w), 2932 (w), 1710 (w), 1597 (w), 1496 (m), 1458 (w), 1424 (w), 1402 (w), 1379 (w), 1329 (w), 1286 (w), 1264 (w), 1205 (m), 1155 (s), 1095 (s), 1058 (m), 1016 (m), 1000 (m), 952 (w), 941 (m), 918 (w).

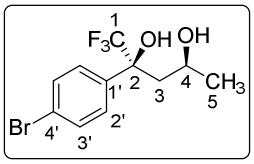
6.2.3.4 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-bromphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-Br-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4h**)





4'-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon (**1h**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** FGZK3 2,5 Äq. Aceton (**2**) KPi-Puffer (pH 7), RT, 17 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4h**), 94 %

Zur Herstellung des 1,3-Diols **4h** wurden 633 mg (2.50 mmol, 1.00 Äq) des Substrates 4'-Brom-2,2,2-trifluoracetophenon (**1h**) eingesetzt und die Synthese nach der Synthesevorschrift von Abs. 6.2.3.2 durchgeführt, wobei das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-**4h** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/ Ethylacetat 85/15) als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten wurde. Zur Analytik per chiraler GC wurden die 1,3-Diole mit BSA derivatisiert.



Ausbeute: 725 mg (2.32, 94 %)

Molmasse: $C_{11}H_{12}F_3O_2Br$, 313.11 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: −20.0 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).

t_R (*syn*) = 12.13 min (m/z = (314 ([M]), 313 ([M]), 312 ([M]) typische Isotopenverteilung von Brom), 243 ([M–CF_3])).

Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 118 °C (95 min), 15 °C/min, 180 °C (5 min). t_R (*S*,*S*)-**4h** = 90.7 min

DC: R_f = 0.42 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

CHN: Ber. C: 42.20 % H: 3.86 %
Gef. C: 42.41 % H: 3.74 %

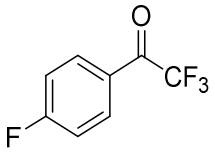
^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4h** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.52 - 7.45 (m, 4H, H-2'/3'), 6.04 (s, 1H, O*H*), 4.50 (m, 1H, H-4), 2.34 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 2.32 (s, 1H, O*H*), 1.88 (ddq, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.24 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

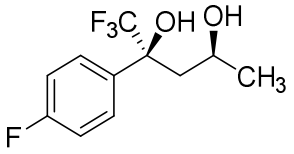
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4h** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 138.9 (s, C-1'), 131.5 (s, C-3'), 127.6 (q, ^4J = 1.3 Hz, C-2'), 125.8 (q, ^1J = 287.2 Hz, C-1), 122.7 (s, C-4'), 76.9 (q, ^2J = 28.3 Hz, C-2), 66.7 (q, ^4J = 1.7 Hz, C-4), 43.7 (t, C-3), 25.2 (q, C-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4h** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.1 (CF_3).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3356 (w), 2974 (w); 2359 (w), 1491 (m), 1456 (w), 1423 (w), 1396 (w), 1379 (w), 1329 (w), 1288 (w); 1265 (w), 1202 (m), 1155 (s), 1125 (s), 1103 (s), 1076 (s), 1057 (m), 1011 (m), 999 (m), 941 (m).

6.2.3.5 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-fluorphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-F-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4d**)





4'-Fluor-2,2,2-trifluoracetophenon (**1d**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**), KPi-Puffer (pH 7), RT, 19 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4d**), 80 %

Zur Herstellung des 1,3-Diols **4d** wurden 481 mg (2.50 mmol, 1.00 Äq) des Substrates 4'-Fluor-2,2,2-trifluoracetophenon (**1d**) eingesetzt und die Synthese nach der

Synthesevorschrift von Abs. 6.2.3.2 durchgeführt, wobei das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-**4d** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/ Ethylacetat 85/15) als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten wurde. Zur Analytik per chiraler GC wurden die 1,3-Diole mit BSA derivatisiert.

Ausbeute: 500 mg (1.98 mmol, 80 %)

Molmasse: $C_{11}H_{12}F_4O_2$, 252.21 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: −17.5 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 10.47 min (m/z = 252 ([M]), 193 ([M−$CH_2CH(OH)CH_3$]), 183 ([M−CF_3])).

Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 60 °C (5 min), 15 °C/min, 120 °C (10 min), 1 °C/min, 126 °C (5 min), 15 °C/min, 180 °C (5 min).
t_R (*S*,*S*)-**4d** = 23.7 min

DC: R_f = 0.49 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

CHN: Ber. C: 52.39 % H: 4.80 %
Gef. C: 52.06 % H: 4.88 %

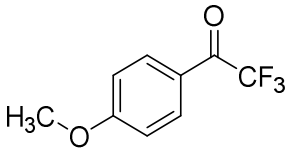
^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4d** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.57 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^3J = 5.3 Hz, 2H, H-3'), 7.08 - 7.04 (m, 2H, H-2'), 5.95 (s, 1H, O*H*), 4.52 (m, 1H, H-4), 2.37 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 2.14 (s, 1H, O*H*), 1.90 (ddq, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.26 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

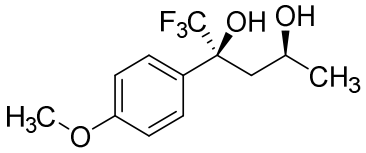
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4d** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 162.7 (d, ^1J = 247.0 Hz, C-4'), 135.6 (s, C-1'), 127.6 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.4 Hz, C-2'), 126.0 (q, ^1J = 287.3 Hz, C-1), 76.8 (q, ^2J = 28.3 Hz, C-2), 66.8 (q, ^4J = 1.8 Hz, C-4), 43.9 (t, C-3), 25.3 (q, C-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4d** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.3 (CF_3), −114.4 (CF).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3337 (w), 2976 (w), 2361 (w), 2330 (w), 1607 (w), 1512 (s), 1456 (w), 1420 (w), 1381 (w), 1302 (w), 1267 (w), 1227 (m), 1155 (s), 1098 (s), 1057 (m), 1001 (m), 939 (w).

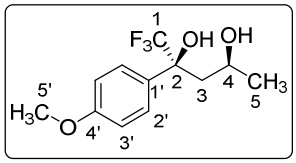
6.2.3.6 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-methoxyphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-OMe-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4e**)





4'-Methoxy-2,2,2-trifluoracetophenon (**1e**)	5 mol% *Singh*-Katalysator (*S*,*S*)-**5** FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**), KPi-Puffer (pH 7), RT, 22 h	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4e**), 95 %

Zur Herstellung des 1,3-Diols **4e** wurden 511 mg (2.50 mmol, 1.00 Äq) des Substrates 4'-Methoxy-2,2,2-trifluoracetophenon (**1e**) eingesetzt und die Synthese nach der Synthesevorschrift von Abs. 6.2.3.2 durchgeführt, wobei das enantiomerenreine Produkt (*S*,*S*)-**4e** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/ Ethylacetat 85/15) als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten wurde. Zur Analytik per chiraler GC wurden die 1,3-Diole mit BSA derivatisiert.



Ausbeute: 620 mg (2.35 mmol, 95 %)

Molmasse: $C_{12}H_{15}F_3O_3$, 264.24 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: −17.2 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 12.40 min (m/z = 264 ([M]), 195 ([M−CF_3])).

Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 118 °C (93 min), 15 °C/min, 180 °C (5 min). t_R (*S*,*S*)-**4e** = 76.9 min

DC: R_f = 0.35 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4e** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.49 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H-2'/3'), 6.92 - 6.88 (m, 2H, H-2'/3'), 5.87 (s, 1H, O*H*), 4.45 (m, 1H, H-4), 3.80 (s, 3H, H-5'), 2.57 (s, 1H, O*H*), 2.34 (dd, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, H-3), 1.91 (ddq, ^2J = 15.3 Hz, ^3J = 11.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.21 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

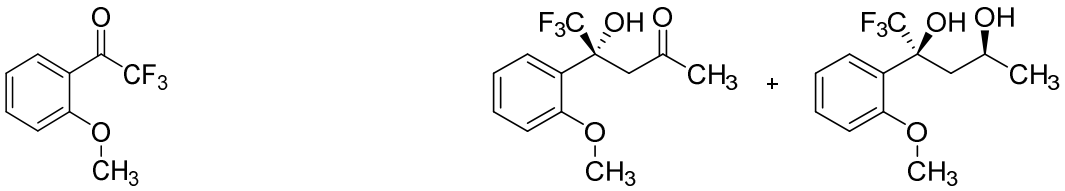
^{13}C-NMR: (*S*,*S*)-**4e** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 159.5 (s, C-4'), 131.8 (s, C-1'), 127.0 (q, ^4J = 1.3 Hz, C-2'), 126.1 (q, ^1J = 287.1 Hz, C-1), 113.7 (d, C-3'), 76.8 (q, ^2J = 28.1 Hz, C-2), 66.5 (q, ^4J = 1.8 Hz, C-4), 55.4 (q, C-5'), 43.9 (t, C-3), 25.0 (q, C-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

^{19}F-NMR: (*S*,*S*)-**4e** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −76.5 (CF_3).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3356 (w), 2974 (w), 2936 (w), 2359 (w), 2344 (w), 1611 (w), 1514 (m), 1456 (m), 1420 (w); 1379 (w), 1302 (w), 1252 (m), 1209 (m), 1150 (s), 1109 (s), 1057 (m), 1034 (m), 999 (m), 939 (w).

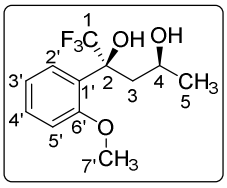
6.2.3.7 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(2-methoxyphenyl)pentan-2,4-diol (*o*-OMe-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4f**)



2'-Methoxy-2,2,2-trifluoracetophenon (**1f**)	5 mol% (*S*,*S*)-**5** FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**) → KPi-Puffer (pH 7), 25 °C, 48 h	(*R*)-CF_3-Aldol (**3f**), ~75 %	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4f**), ~15 %

In einem 2 mL-Eppendorfgefäß wurden 20.4 mg (0.10 mmol, 100 mM 1.00 Äq.) des Substrates 2'-Methoxy-2,2,2-trifluoracetophenon (**1f**) vorgelegt und mit 18 µL Aceton (**2**) (0.25 mmol, 250 mM, 2.50 Äq.), 50 µL einer Katalysator-Lösung (*S*,*S*)-**5** in Methanol (0,1 M, 0.005 mmol, 5 mol%), 200 µL einer D-Glucosemonohydrat-Lösung (2.5 M, 0.5 mmol, 5 Äq), 10 µL $NADP^+$-Lösung (0,1 M, 0.001 mmol, 0.01 Äq.) und 100 µL Ganzzellkatalysator-Lösung (FGZK3, 100 mg mL^{-1} in Puffer) versetzt. Es wurde mit KPi-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.5 M, pH 7) auf 1 mL aufgefüllt und für 48 h bei 25 °C und 1100 UpM im Thermomixer geschüttelt. Es wurde 4 mal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt **4f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*n*-Pentan/Diethylether 8/1) als farbloses Öl in nicht bestimmter Ausbeute

erhalten. Der Reaktionsfortschritt war nicht vollständig, wodurch weniger als 5.00 mg isoliert wurden, was nur eine ^{1}H-NMR und eine GC-MS Analytik zulies. Konfiguration und Enantiomerenreinheit wurden aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht bestimmt. Die Analytik des *o*-OMe-(*R*)-CF_3-Aldols **3f** stimmt mit der Literatur überein.[89]



Ausbeute: < 5.00 mg

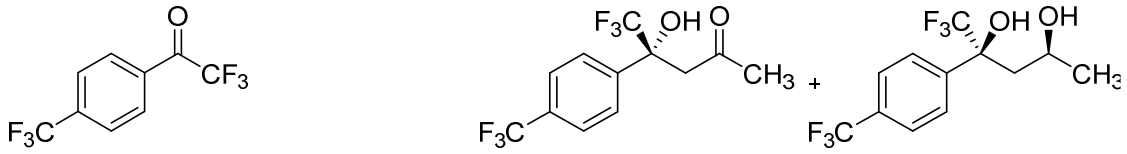
Molmasse: $C_{12}H_{15}F_3O_3$, 264.24 g/mol

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 11.93 min (m/z = 264 ([M]), 195 ([M−CF_3])).

DC: R_f = 0.35 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4f** (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.41 - 7.33 (m, 2H, H-2‘/3’/4’/5’), 7.06 - 6.98 (m, 2H, H-2’/3‘/4’/5’), 6.66 (s, 1H, O*H*), 4.37 (m, 1H, H-4), 3.94 (s, 3H, H-7’), 2.90 (s, 1H, O*H*), 2.47 - 2.43 (m, 1H, H-3), 2.28 - 2.17 (m, 1H, H-3), 1.24 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[188]

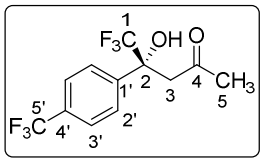
6.2.3.8 Synthese von (2*S*,4*S*)-1,1,1-Trifluor-2-(4-trifluormethylphenyl)pentan-2,4-diol (*p*-CF_3-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4g**)



4’-Trifluormethyl-2,2,2-trifluoracetophenon (**1g**)	5 mol% (*S*,*S*)-**5** FGZK3, 2,5 Äq. Aceton (**2**), KPi-Puffer (pH 7), 25 °C, 48 h	(*R*)-CF_3-Aldol (**3g**), 8 %	(*S*,*S*)-CF_3-Diol (**4g**), 81 %

Zur Herstellung des 1,3-Diols **4g** wurden 24.0 mg (0.10 mmol, 1.00 Äq.) des Substrates 4’-Trifluormethyl-2,2,2-trifluoracetophenon **1g** eingesetzt und die Synthese nach der Synthesevorschrift von Abs. 6.2.3.7 durchgeführt, wobei das Produkt **4g** nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 85/15) zusammen mit dem (*R*)-CF_3-Aldol **3g** als farbloses Öl in guter Ausbeute erhalten wurde.

Konfiguration und Enantiomerenreinheit wurden aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht bestimmt. Dem ^{1}H-NMR Spektrum liegt die Ausbeuteberechnung zugrunde.



Ausbeute: 2.00 mg (0.01 mmol, 8 %)

Molmasse: $C_{12}H_{10}F_6O_2$, 300.20 g/mol

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 10.05 min (m/z = 300 ([M]), 281 ([M–F]), 231 ([M-CF_3])).

DC: R_f = 0.41 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

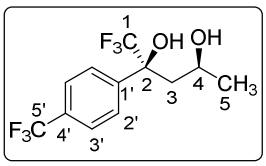
CHN: Ber. C: 48.01 % H: 3.36 %
Gef. C: 48.06 % H: 3.46 %

^{1}H-NMR: (*R*)-**3g** (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.71 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H, H-2‘/3’), 7.66 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 2H, H-2’/3‘), 5.88 (s, 1H, O*H*), 3.34 (d, ^{2}J = 17.4 Hz, 1H, H-3), 3.26 (d, ^{2}J = 17.4 Hz, 1H, H-3), 2.24 (s, 3H, H-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[89]

^{13}C-NMR: (*R*)-**3g** (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 208.8 (s, C-4), 141.7 (q, ^{5}J = 1.1 Hz, C-1’), 131.3 (q, ^{2}J = 32.6 Hz, C-4’), 126.9 (q, ^{4}J = 1.2 Hz, C-2’), 125.6 (q, ^{3}J = 3.7 Hz, C-3’), 124.3 (q, ^{1}J = 285.1 Hz, C-1), 124.0 (q, ^{1}J = 272.2 Hz, C-5’), 76.1 (q, ^{2}J = 29.3 Hz, C-1), 45.1 (t, C-3), 32.1 (q, C-5).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[89]

^{19}F-NMR: (*R*)-**3g** (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) = −62.8 (CF_3), −80.1 (CF_3-*Ar*).

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 3474 (w), 2988 (w), 2359 (w), 2344 (w), 1717 (m), 1418 (w), 1364 (w), 1327 (s), 1298 (w), 1236 (w), 1192 (w), 1161 (s), 1140 (m), 1105 (s), 1070 (s), 1016 (m), 993 (w), 916 (w).



Ausbeute: 22.0 mg (0.08 mmol, 81 %)

Molmasse: $C_{12}H_{12}F_6O_2$, 302.22 g/mol

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (*syn*) = 10.95 min (m/z = 283 ([M-F]), 233 ([M–CF_3])).

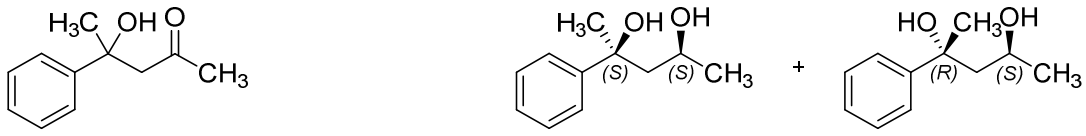
DC: R_f = 0.36 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 7/3).

^{1}H-NMR: (*S*,*S*)-**4g** (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.73 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H, H-2‘/3’), 7.64 (d, ^{3}J = 8.5 Hz, 2H, H-2’/3‘), 6.08 (s, 1H, O*H*), 4.55 (m, 1H, H-4), 2.39 (dd, ^{2}J = 15.3 Hz, ^{3}J = 1.6 Hz, 1H, H-3), 1.91

(ddq, ^{2}J = 15.3 Hz, ^{3}J = 11.0 Hz, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H, H-3), 1.27 (d, ^{3}J = 6.2 Hz, 3H, H-5).

Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[89]

6.2.4 Biokatalytische Synthese der Floropal®-Vorstufen (2*R*,4*S*)-2-Phenylpentan-2,4-diol und (2*S*,4*S*)-2-Phenylpentan-2,4-diol

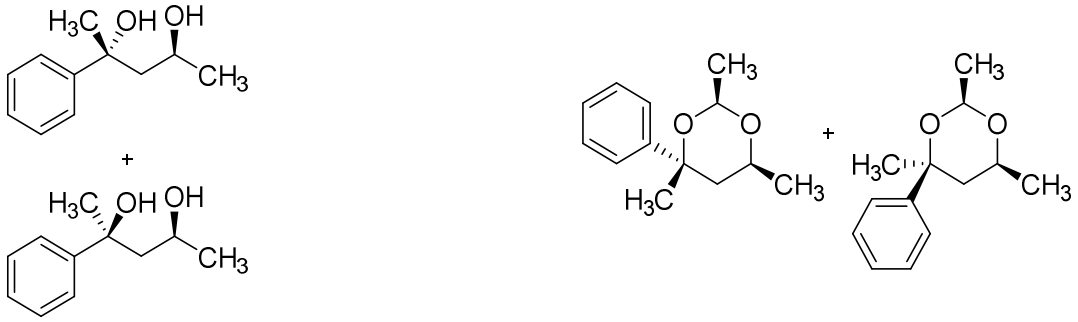




In einem 50 mL-Reaktionsgefäß mit Magnetrührer wurden 360 mg *rac*-CH_3-Aldol (2.00 mmol, 1.00 Äq.) in 2.00 mL Isopropanol gelöst und mit 100 µL NAD^+-Lösung (0.10 M, 0.01 mmol, 0.005 Äq.) und 6.2 mL KPi-Puffer versetzt. Es wurden 1.79 mL RRADH-Rohextrakt (≙1 U) zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden weitere 876 µL einer frischen Charge RRADH-Rohextrakt (≙1 U) zugegeben und für weitere 68 h gerührt. Die wässrige Lösung wurde fünfmal mit jeweils 15 mL Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 309 mg Rohprodukt (maximale Ausbeute: 86 %) isoliert, welches ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung direkt weiter umgesetzt wurde (s. Abs. 6.2.5, MHA 590). Die Zusammensetzung der Mischung wurde erst nach Acetalisierung der erhaltenen 1,3-Diole unter Abschnitt 6.2.5 bestimmt.

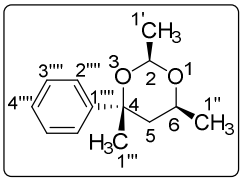
6.2.5 Synthese von (2*S*,4*R*,6*S*)-2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan und (2*S*,4*S*,6*S*)-2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan (Floropal®)[301]

[Von Matthias Hammel in Köln durchgeführt, MHA 590]



(2*R*,4*S*)-,(2*S*,4*S*)-CH_3-Diol	2.7 Äq. Acetaldehyd, 5 mol % *p*TsOH, CH_2Cl_2, RT, 16 h	(2*S*,4*R*,6*S*)-Floropal®, 37 %	(2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal®, 36 %

In einem Rundkolben wurden 309 mg Rohprodukt (aus Abs. 6.2.4; zu gleichen Teilen (2*R*,4*S*)- und (2*S*,4*S*)-CH_3-Diol) und 300 µL (5.34 mmol, 2.67 Äq.) Acetaldehyd in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 15 mg (0.10 mmol, 0.05 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure versetzt. Es wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde in 10 mL Wasser gegossen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromathographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 99.5/0.5) aufgereinigt, wodurch die beiden diastereomeren Produkte getrennt voneinander als farblose Öle isoliert werden konnten. Das Produkt (2*S*,4*R*,6*S*)-Floropal® wies noch Spuren von (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal® auf (dr = 93/7) und hatte einen charakteristischen Citrusschalengeruch. Das Produkt (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal® wies noch Spuren von (2*S*,4*R*,6*S*)-Floropal® auf (dr = 96/4) und kristallisierte im Kühlschrank wodurch es röntgenstrukturanalytisch untersucht werden konnte.[203]



Ausbeute: (2*S*,4*R*,6*S*)-Floropal®: 152 mg
(0.74 mmol, 37 % Ausbeute über 2 Stufen
ausgehend von eingesetzten 2.00 mmol *rac*-CH_3-Aldol)

Molmasse: $C_{13}H_{18}O_2$, 206.28 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: –81.6 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (4,6-*anti*) = 10.47 min (m/z = 206 (M), 191 ([M–Me])).

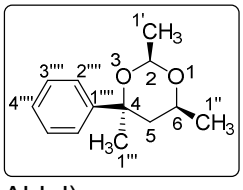
Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm, He, (1 mL/min), Methode: 60 °C (5 min), 15 °C/min, 85 °C (5 min), 2 °C/min, 135 °C (10 min), 15 °C/min, 170 °C (10 min).
t_R (2*S*,4*R*,6*S*)-Dioxan = 26.6 min

DC: R_f = 0.48 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 95/5).

^{1}H-NMR: (2*S*,4*R*,6*S*)-Dioxan (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.40 - 7.33 (m, 4H, H-2''''/3''''), 7.28 - 7.23 (m, 1H, H-4''''), 4.70 (q, ^3J = 5.1 Hz, 1H, H-2), 3.67 (dqd, ^3J = 12.4 Hz/6.2 Hz/1.9 Hz, 1H, H-6), 2.34 (dd, ^2J = 13.9 Hz, ^3J = 2.0 Hz, 1H, H-5), 1.70 (dd, ^2J = 13.9 Hz, ^3J = 11.5 Hz, 1H, H-5), 1.42 (s, 3H, H-1'''), 1.35 (d, ^3J = 5.1 Hz, 3H, H-1''), 1.23 (d, ^3J = 6.2 Hz, 3H, H-1').
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[301]

^{13}C-NMR: (2*S*,4*R*,6*S*)-Dioxan (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 144.6 (s, C-1''''), 128.9 (d, C-3''''), 127.0 (d, C-4''''), 126.1 (d, C-2''''), 93.9 (d, C-2), 76.7 (s, C-4), 69.2 (d, C-6), 41.2 (t, C-5), 34.4 (q, C-1'''), 21.8 (q, C-1''), 21.3 (q, C-1').
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[301]

FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 2974 (w), 2928 (w), 2874 (w), 1493 (w), 1445 (w), 1410 (w), 1379 (w), 1366 (w), 1333 (w), 1275 (w), 1196 (w), 1171 (s), 1152 (s), 1128 (m), 1094 (s), 1074 (w), 1032 (m), 970 (m).



Ausbeute: (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal®: 147 mg (0.71 mmol, 36 %; Ausbeute über 2 Stufen ausgehend von eingesetzten 2.00 mmol *rac*-CH_3-Aldol)

Molmasse: $C_{13}H_{18}O_2$, 206.28 g/mol

$[\alpha]_D^{20}$: –41.8 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

Schmelzpunkt: >7 °C/<20 °C

GC-MS: HP-5 (MS), 30.0 m, 50 °C (5 min), 20 °C/min, 280 °C (10 min); He, (1.2 mL/min).
t_R (4,6-*syn*)= 10.98 min (m/z = 206 (M), 191 ([M–Me])).

Chirale GC: *CP-Chirasil-Dex CB*, 25 m∗0.25 mm∗0.25 µm,
He, (1 mL/min), Methode: 60 °C (5 min), 15 °C/min, 85 °C (5 min), 2 °C/min, 135 °C (10 min), 15 °C/min, 170 °C (10 min).
t_R (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal® = 31.4 min

DC: R_f = 0.50 (SiO_2, Cyclohexan/Ethylacetat, 95/5).

CHN: Berechnet: C: 75.69 %, H: 8.80 %.
Gefunden: C: 75.59 %, H: 8.90 %.

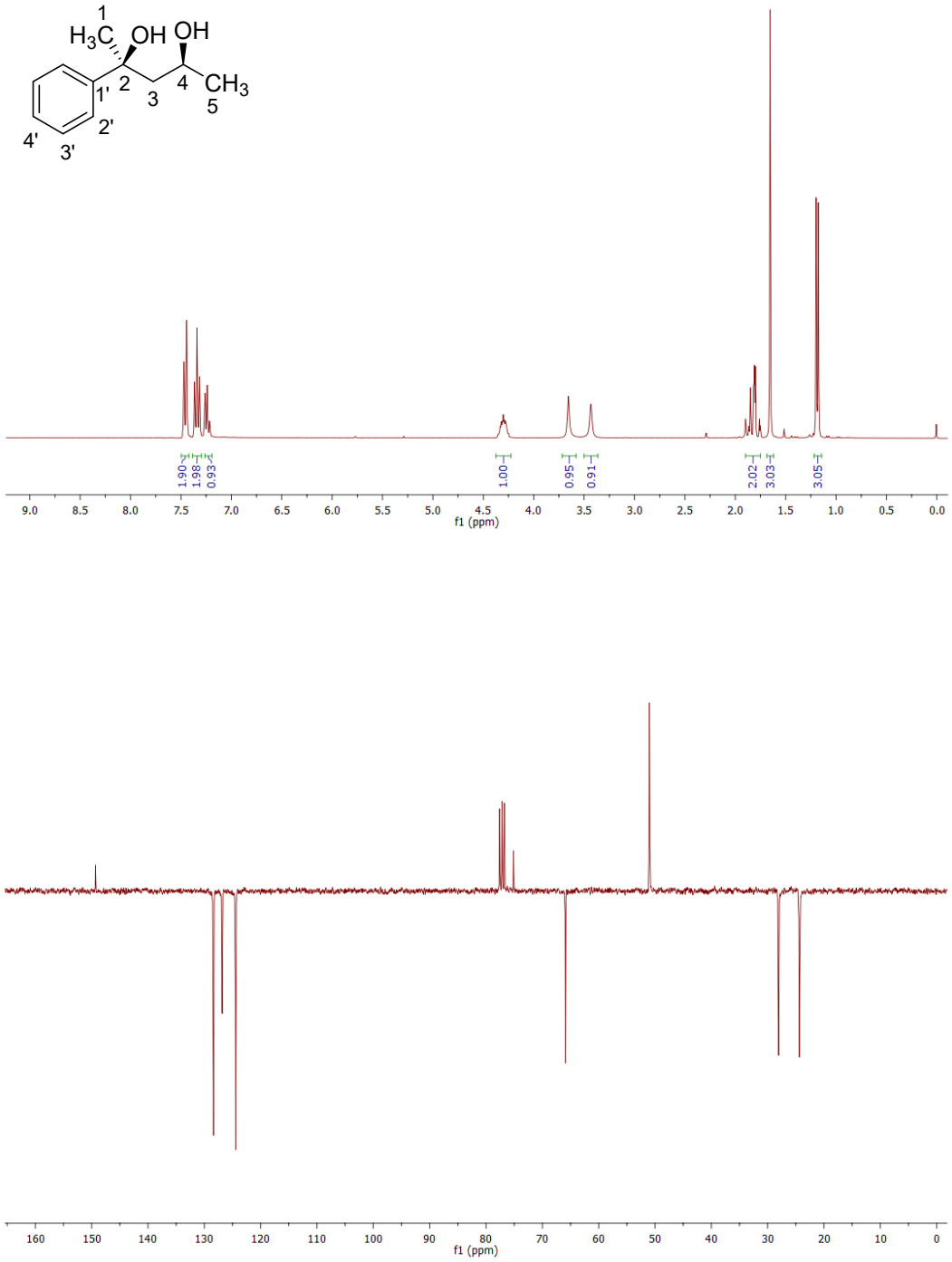
^{1}H-NMR: (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal® (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.47 (d, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-2‘‘‘‘), 7.35 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H-3’’’’), 7.24 (m, 1H, H-4’’’’), 5.20 (q, ^3J = 5.0 Hz, 1H, H-2), 4.02 (dqd, ^3J = 12.2 Hz/6.1 Hz/2.4 Hz, 1H, H-6), 1.81 (dd, ^2J = 13.3 Hz, ^3J = 2.3 Hz, 1H, H-5), 1.62 - 1.58 (m, 1H, H-5), 1.60 (s, 3H, H-1’’’), 1.42 (d, ^3J = 5.0 Hz, 3H, H-1’’), 1.23 (d, ^3J = 6.1 Hz, 3H, H-1’).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[301]

^{13}C-NMR: (2*S*,4*S*,6*S*)-Floropal® (75 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 149.1 (s, C-1’’’’), 128.3 (d, C-3’’’’), 126.8 (d, C-4’’’’), 124.0 (d, C-2’’’’), 92.4 (d, C-2), 74.7 (s, C-4), 68.7 (d, C-6), 43.7 (t, C-5), 23.3 (q, C-1’’’), 21.9 (q, C-1’’), 21.8 (q, C-1’).
Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten.[301]

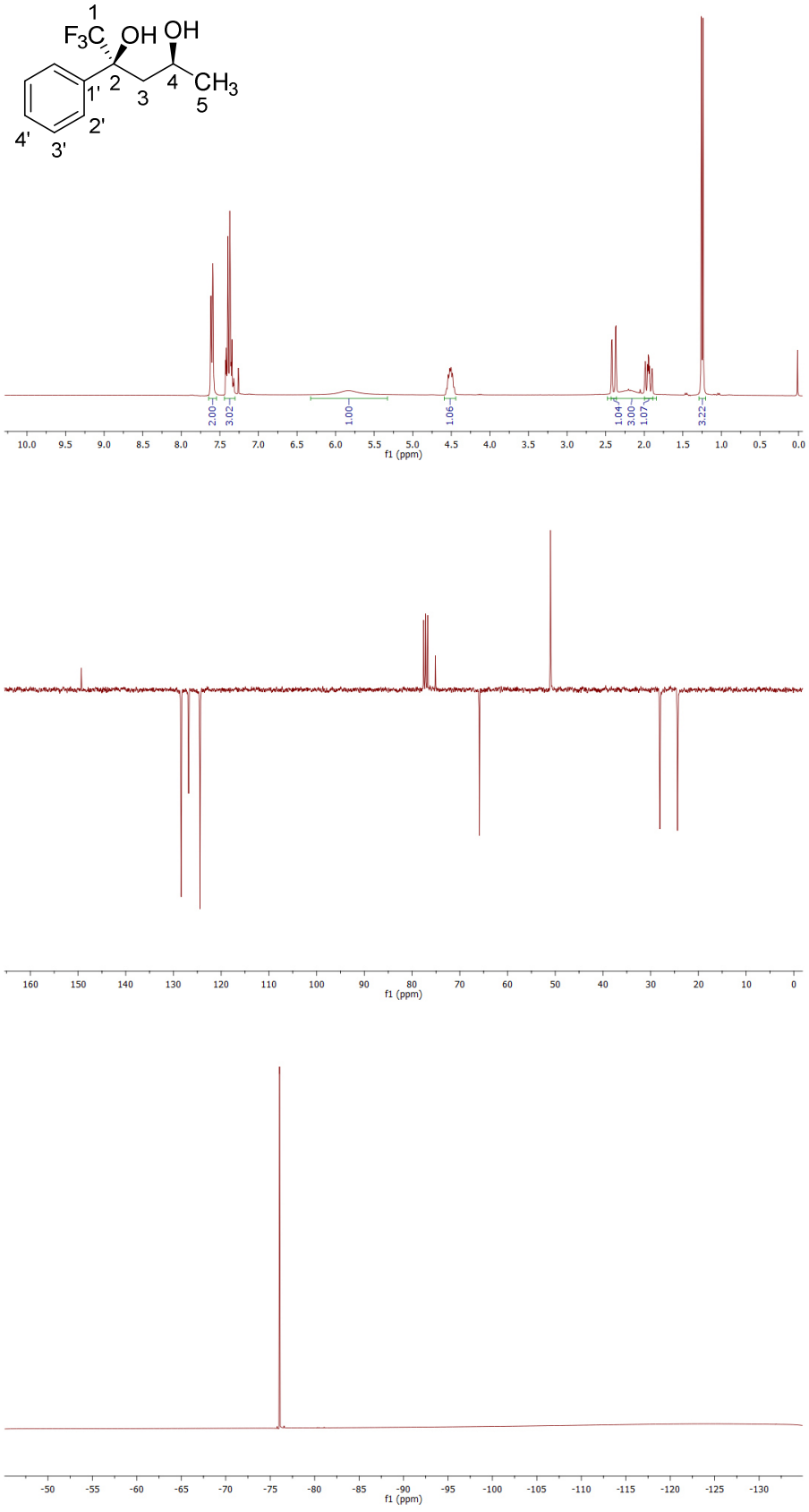
FT-IR: (ATR): ν [cm^{-1}] = 2976 (w), 2938 (w), 2870 (w), 1495 (w), 1447 (w), 1406 (w), 1369 (w), 1325 (w), 1302 (w), 1242 (w), 1177 (s), 1148 (m), 1123 (s), 1096 (s), 1074 (m), 1061 (w), 1030 (m), 997 (m).

6.3 Wichtige NMR-Spektren

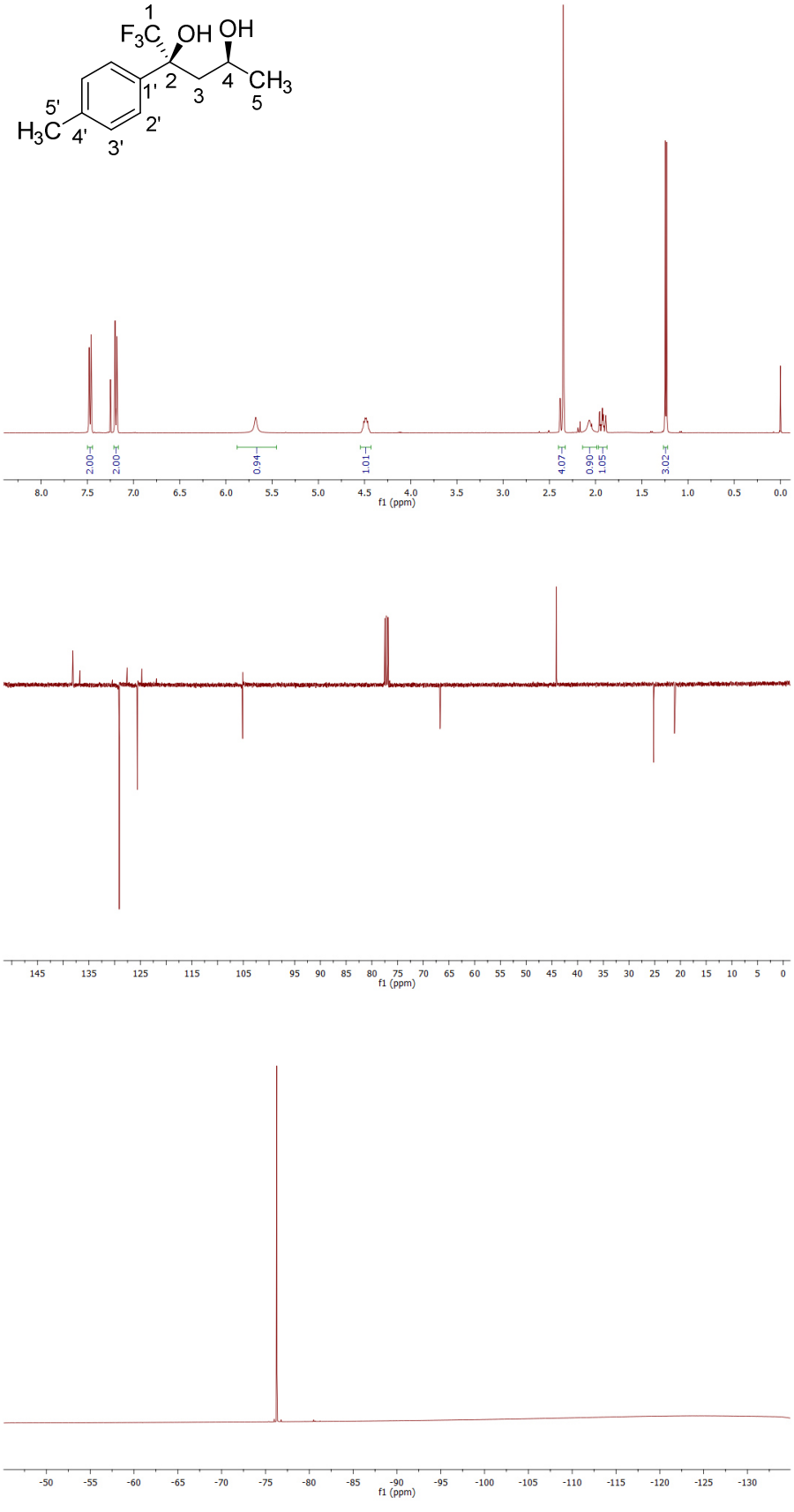
6.3.1 ^{1}H-NMR Spektrum (oben) und ^{13}C-NMR Spektrum (unten) von (*S*,*S*)-CH_3-Diol in $CDCl_3$.



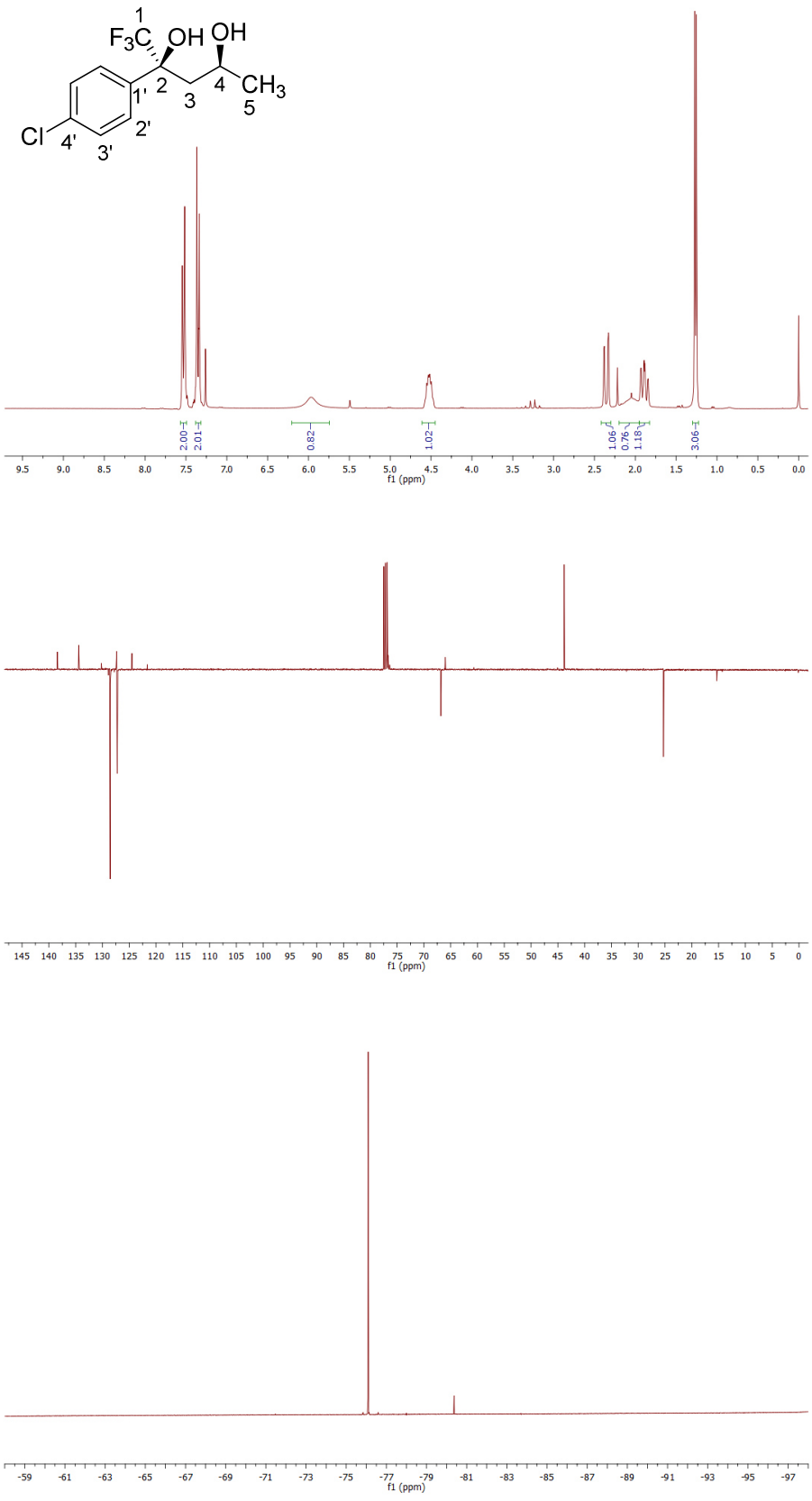
6.3.2 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von (*S*,*S*)-CF_3-Diol **4a** in $CDCl_3$.



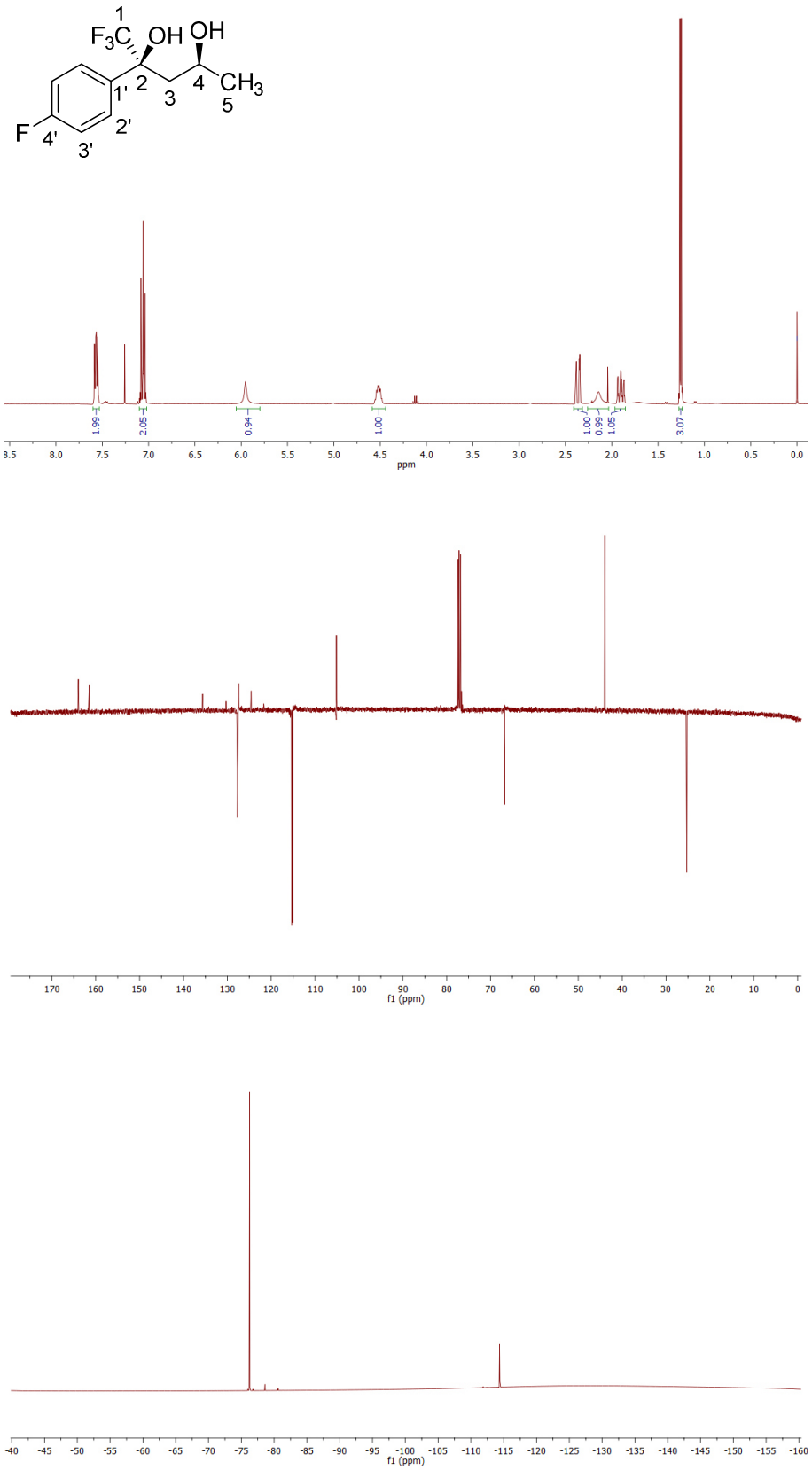
6.3.3 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Me-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4b** in $CDCl_3$.



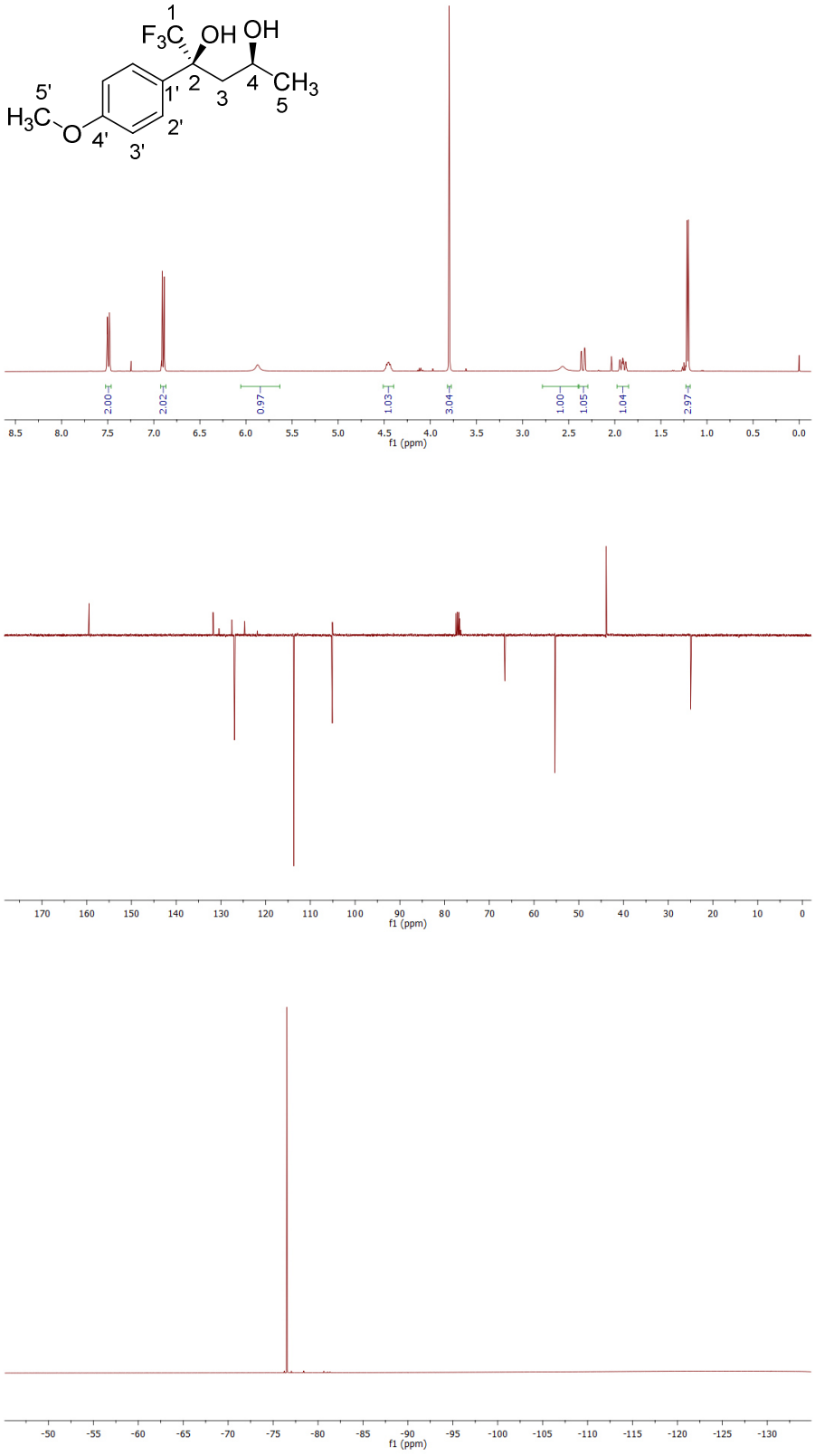
6.3.4 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Cl-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4c** in $CDCl_3$.



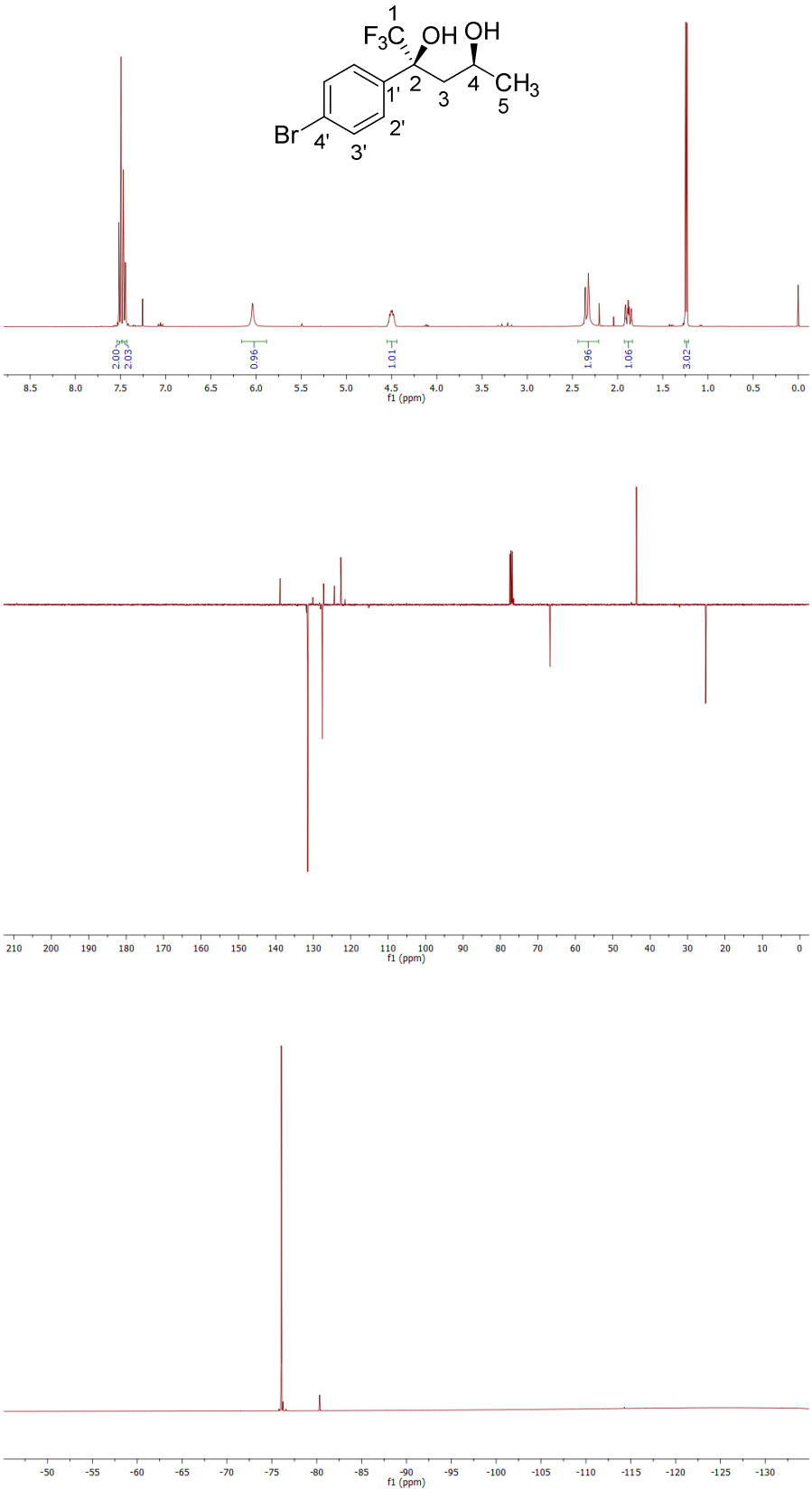
6.3.5 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-F-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4d** in $CDCl_3$.



6.3.6 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-OMe-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4e** in $CDCl_3$.



6.3.7 ^{1}H-NMR (oben), ^{13}C-NMR (Mitte), ^{19}F-NMR (unten) Spektrum von *p*-Br-(*S*,*S*)-CF_3-Diol **4h** in $CDCl_3$.



7. LITERATURVERZEICHNIS

[1] **Ulber R, Soyez K.** (2004). 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. *Chem unserer Zeit*, **38**, 172–180.

[2] **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).** Broschüre: Weiße Biotechnologie: Chancen für eine biobasierte Wirtschaft. Silber Druck oHG, Niestetal, 2015, verfügbar unter: https://www.bmbf.de/pub/Weisse_Biotechnologie.pdf; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[3] **Bachmann R, Budde F, Riese J.** (2004). Die dritte Welle–Die Biotechnologie erobert die Chemieindustrie. *Chemie Ing Tech*, **76**, 1155–1158.

[4] **BIOCOM AG**. Borschüre: The German Biotechnology Sector: Facts & Figures, 2016. Heenemann GmbH & Co. KG, Berlin, 2016, verfügbar unter: https://www.biotechnologie.de/BIO/Redaktion/PDF/en/2016-umfrage,property=pdf,bereich=bio,sprache=en,rwb=true.pdf; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[5] **Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B.** (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, **409**, 258–268.

[6] **Pollard DJ, Woodley JM.** (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol*, **25**, 66–73.

[7] **Wohlgemuth R.** (2010). Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Curr Opin Biotechnol*, **21**, 713–724.

[8] **Osterath B, Rao N, Lütz S, Liese A.** (2007). Technische Anwendung von Enzymen: Weiße Wäsche und Grüne Chemie. *Chem unserer Zeit*, **41**, 324–333.

[9] **James J, Simpson BK, Marshall DMR.** (1996). Application of enzymes in food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **36**, 437–463.

[10] **Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC.** (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 345–351.

[11] **Torres CE, Negro C, Fuente E, Blanco A.** (2012). Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl Microbiol Biotechnol*, **96**, 327–344.

[12] **Vellard M.** (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 444–450.

[13] **Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ.** (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul Toxicol Pharmacol*, **45**, 144–158.

[14] **Patel RN.** (2008). Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord Chem Rev*, **252**, 659–701.

[15] **Sheldon RA, Arends I, Hanefeld U.** *Green chemistry and catalysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2007.

[16] **Anastas PT, Warner JC.** *Green chemistry: theory and practice*. New York: Oxford University Press; 1998.

[17] **Anastas PT, Williamson TC.** *Green chemistry: designing chemistry for the environment*. Washington DC: American Chemical Society; 1996.

[18] **Anastas PT, Zimmerman JB.** (2003). Design through the 12 principles of green engineering. *Env Sci Technol*, **37**, 94A–101A.

[19] **Anastas PT, Kirchhoff MM.** (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc Chem Res*, **35**, 686–694.

[20] **Anastas P, Eghbali N.** (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev*, **39**, 301–312.

[21] **Stahmann K-P, Revuelta JL, Seulberger H.** (2000). Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 509–516.

[22] **Tao J, Xu J-H.** (2009). Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr Opin Chem Biol*, **13**, 43–50.

[23] **Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, Moore JC, Tam S, Jarvis WR, Colbeck JC, Krebber A, Fleitz FJ, Brands J, Devine PN, Huisman GW, Hughes GJ.** (2010). Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science*, **329**, 305–309.

[24] **United States Environmental Protection Agency.** Presidential Green Chemistry Challenge: 2010 Greener Reaction Conditions Award, verfügbar unter: https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2010-greener-reaction-conditions-award; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[25] **United States Environmental Protection Agency.** Presidential Green Chemistry Challenge: 2012 Greener Synthetic Pathways Award, verfügbar unter: https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2012-greener-synthetic-pathways-award; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[26] **Hilterhaus L, Liese A.** (2007). Building blocks. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **105**, 133–173.

[27] **Faber K, Kroutil W.** (2005). New enzymes for biotransformations. *Curr Opin Chem Biol*, **9**, 181–187.

[28] **Clapés P, Garrabou X.** (2011). Current trends in asymmetric synthesis with aldolases. *Adv Synth Catal*, **353**, 2263–2283.

[29] **Brovetto M, Gamenara D, Mendez PS, Seoane GA.** (2011). C-C bond-forming lyases in organic synthesis. *Chem Rev*, **111**, 4346–4403.

[30] **Hummel W, Gröger H.** *Enzyme-catalyzed reductive amination of keto acids*. In: Drauz K, Gröger H, May O, *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2012, 1165–1203.

[31] **Gröger H, Hummel W, Metzner R.** *Reduction: asymmetric biocatalytic reduction of ketones*. In: Carreira EM, Yamamoto H, *Comprehensive chirality*. Amsterdam: Elsevier; 2012, 181–215.

[32] **Gröger H, Borchert S, Kraußer M, Hummel W.** *Enzyme-catalyzed asymmetric reduction of ketones*. In: Drauz K, Gröger H, May O, *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2012, 1037–1110.

[33] **Patel RN.** (2011). Biocatalysis: synthesis of key intermediates for development of pharmaceuticals. *ACS Catal*, **1**, 1056–1074.

[34] **Blaschke G, Kraft HP, Fickentscher K, Köhler F.** (1979). Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere. *Arzneim-Forsch/Drug Des,* **29**, 1640–1642.

[35] **Kenyon BM, Browne F, D'Amato RJ.** (1997). Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp Eye Res*, **64**, 971–978.

[36] **Eriksson T, Björkman S, Roth B, Fyge Å, Höuglund P.** (1995). Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, **7**, 44–52.

[37] **Nguyen LA, He H, Pham-Huy C.** (2006). Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci*, **2**, 85–100.

[38] **Totah RA, Allen KE, Sheffels P, Whittington D, Kharasch ED.** (2007). Enantiomeric metabolic interactions and stereoselective human methadone metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 389–399.

[39] **Eap CB, Buclin T, Baumann P.** (2002). Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone. *Clin Pharmacokinet*, **41**, 1153–1193.

[40] **Kristensen K, Blemmer T, Angelo HR, Christrup LL, Drenck NE, Rasmussen SN, Sjøgren P.** (1996). Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients. *Ther Drug Monit*, **18**, 221–227.

[41] **Olsen GD, Wendel HA, Livermore JD, Leger RM, Lynn RK, Gerber N.** (1977). Clinical effects and pharmacokinetics of racemic methadone and its optical isomers. *Clin Pharmacol Ther*, **21**, 147–157.

[42] **O'Reilly RA.** (1974). Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*, **16**, 348–354.

[43] **Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R.** (1974). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*, **15**, 424–430.

[44] **Maddison J, Somogyi AA, Jensen BP, James HM, Gentgall M, Rolan PE.** (2013). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of single dose (*R*)- and (*S*)-warfarin administered separately and together: relationship to VKORC1 genotype. *Br J Clin Pharmacol*, **75**, 208–216.

[45] **Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T.** (2004). Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angew Chem*, **116**, 806–843.

[46] **Carey JS, Laffan D, Thomson C, Williams MT.** (2006). Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org Biomol Chem*, **4**, 2337–2347.

[47] **Daußmann T, Hennemann H-G, Rosen TC, Dünkelmann P.** (2006). Enzymatische Technologien zur Synthese chiraler Alkohol-Derivate. *Chem Ing Tech*, **78**, 249–255.

[48] **Ni Y.** (2012). Biocatalytic ketone reduction: a green and efficient access to enantiopure alcohols. *Biotechnol Adv*, **30**, 1279–1288.

[49] **Sigma-Aldrich.** Übersicht der Produktpalette “Organic Building Blocks“ unter: http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16273952; zuletzt überprüft am 30.06.2016.

[50] **Kleemann A, Engel J, Kutscher B, Reichert D.** *Pharmaceutical substances: syntheses, patents, applications*. 4. Edition. Stuttgart: Thieme; 2001.

[51] **Dutcher JD.** (1968). The discovery and development of amphotericin B. *Dis Chest*, **54**, Suppl 1:296-298.

[52] **Hazen EL, Brown R.** (1950). Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science*, **112**, 423.

[53] **Lancelin J-M, Beau J-M.** (1989). Complete stereostructure of nystatin A1: A proton NMR study. *Tetrahedron Lett*, **30**, 4521–4524.

[54] **Schreiber SL, Goulet MT.** (2002). Application of the two-directional chain synthesis strategy to the first stereochemical assignment of structure to members of the skipped-polyol polyene macrolide class: mycoticin A and B. *J Am Chem Soc*, **109**, 8120–8122.

[55] **Poss CS, Rychnovsky SD, Schreiber SL.** (1993). Two-directional chain synthesis: an application to the synthesis of (+)-mycoticin A. *J Am Chem Soc*, **115**, 3360–3361.

[56] **Wasserman HH, Van Verth JE, McCaustland DJ, Borowitz IJ, Kamber B.** (1967). The mycoticins, polyene macrolides from *Streptomyces ruber*. *J Am Chem Soc*, **89**, 1535–1536.

[57] **Burke RC, Swartz JH, Chapman SS, Huang W-Y.** (1954). Mycoticin, a new antifungal antibiotic. *J Invest Dermatol*, **23**, 163–168.

[58] **Roth BD, Blankley CJ, Chucholowski AW, Ferguson E, Hoefle ML, Ortwine DF, Newton RS, Sekerke CS, Sliskovic DR, Wilson M.** (1991). Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 3. Tetrahydro-4-hydroxy-6-[2-(1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-2H-pyran 2-one inhibitors of HMG-CoA reductase. 2. Effects of introducing substituents at positions three and four of the pyrrole nucleus. *J Med Chem*, **34**, 357–366.

[59] **Roth BD.** (2002). The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent. *Prog Med Chem*, **40**, 1–22.

[60] **McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, Smith G, Warwick M.** (2001). Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol*, **87**, 28–32.

[61] **Olsson AG.** (2001). Statin therapy and reductions in low-density lipoprotein cholesterol: initial clinical data on the potent new statin rosuvastatin. *Am J Cardiol*, **87**, 33–36.

[62] **Andrushko N, Andrushko V, König G, Spannenberg A, Börner A.** (2008). A new approach to the total synthesis of rosuvastatin. *Eur J Org Chem*, **2008**, 847–853.

[63] **Casar Z.** (2010). Historic overview and recent advances in the synthesis of super-statins. *Curr Org Chem*, **14**, 816–845.

[64] **Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K.** (1977). Inhibition of cholesterol synthesis *in vitro* and *in vivo* by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem*, **77**, 31–36.

[65] **Endo A, Kuroda M, Tsujita Y.** (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot*, **29**, 1346–1348.

[66] **Bode SE, Wolberg M, Müller M.** *Stereoselective synthesis of 1,3-diols*. In: *Synthesis*. 4. Edition. New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2006, 557–588.

[67] **Kitamura M, Ohkuma T, Inoue S, Sayo N, Kumobayashi H, Akutagawa S, Ohta T, Takaya H, Noyori R.** (1988). Homogeneous asymmetric hydrogenation of functionalized ketones. *J Am Chem Soc*, **110**, 629–631.

[68] **Kawano H, Ishii Y, Saburi M, Uchida Y.** (1988). Ruthenium(II)–BINAP catalysed stereoselective homogeneous hydrogenation of 1,3-diketones. *J Chem Soc, Chem Commun*, 87–88.

[69] **Blandin V, Carpentier J-F, Mortreux A.** (1999). One-pot and sequential asymmetric hydrogenation of β,δ-diketoesters into functionalized 1,3-diols: from *anti*- to *syn*-stereoselectivity. *Eur J Org Chem*, **1999**, 3421–3427.

[70] **Shao L, Seki T, Kawano H, Saburi M.** (1991). Asymmetric hydrogenation of methyl 3,5-dioxohexanoate catalyzed by Ru-BINAP complex: a short step asymmetric synthesis of dihydro-6-methyl-2*H*-pyran-2-one. *Tetrahedron Lett*, **32**, 7699–7702.

[71] **Evans DA, Chapman KT, Carreira EM.** (1988). Directed reduction of β-hydroxy ketones employing tetramethylammonium triacetoxyborohydride. *J Am Chem Soc*, **110**, 3560–3578.

[72] **Evans DA, Chapman KT.** (1986). The directed reduction of β-hydroxy ketones employing Me4NHB(OAc)3. *Tetrahedron Lett*, **27**, 5939–5942.

[73] **Narasaka K, Pai HC.** (1980). Stereoselective synthesis of *meso* (or *erythro*) 1,3-diols from β-hydroxyketones. *Chem Lett*, **9**, 1415–1418.

[74] **Narasaka K, Pai F-C.** (1984). Stereoselective reduction of β-hydroxyketones to 1,3-diols highly selective 1,3-asymmetric induction via boron chelates. *Tetrahedron*, **40**, 2233–2238.

[75] **Ohta H, Ozaki K, Tsuchihashi G.** (1986). Regio- and enantio-selective reduction of α,γ-diketones by fermenting bakers' yeast. *Agric Biol Chem*, **50**, 2499–2502.

[76] **Ohta H, Ozaki K, Tsuchihashi G.** (1987). Asymmetric hydrogenation of 2-aryl-1-nitropropenes by fermenting bakers' yeast. *Chem Lett*, **16**, 191–192.

[77] **Dauphin G, Fauve A, Veschambre H.** (1989). Use of biological systems for the preparation of chiral molecules. 6. Preparation of stereoisomeric 2,4-diols: synthesis and conformational study of bicyclo derivatives, isomeric components of a pheromone of *Trypodendron lineatum*. *J Org Chem*, **54**, 2238–2242.

[78] **Fauve A, Veschambre H.** (1988). Use of biological systems for the synthesis of chiral molecules. 5. Microbiological reduction of acyclic β-diketones. *J Org Chem*, **53**, 5215–5219.

[79] **Fauve A, Veschambre H.** (1990). Regiospecificity and enantiospecificity in microbiological reduction of acyclic β-diketones. *Biocatalysis*, **3**, 95–109.

[80] **Ikeda H, Sato E, Sugai T, Ohta H.** (1996). Yeast-mediated synthesis of optically active diols with C2-symmetry and (*R*)-4-pentanolide. *Tetrahedron*, **52**, 8113–8122.

[81] **Patel RN, Banerjee A, McNamee CG, Brzozowski D, Hanson RL, Szarka LJ.** (1993). Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl ester. *Enzym Microb Technol*, **15**, 1014–1021.

[82] **Wolberg M.** *Dissertation*: Chemoenzymatische Synthese optisch aktiver β,δ-Dihydroxyester. Universität Oldenburg, 2002.

[83] **Müller M.** *Dissertation*: Exploiting alcohol dehydrogenases in the asymmetric synthesis of hydroxy compounds: an easy, highly efficient and sustainable access to chiral building blocks. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2015.

[84] **Ahmad K, Koul S, Taneja SC, Singh AP, Kapoor M, Riyaz-ul-Hassan, Verma V, Qazi GN.** (2004). Enzyme directed diastereoselectivity in chemical reductions: studies towards the preparation of all four isomers of 1-phenyl-1,3-butanediol. *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 1685–1692.

[85] **Baer K, Krausser M, Burda E, Hummel W, Berkessel A, Gröger H.** (2009). Sequential and modular synthesis of chiral 1,3-diols with two stereogenic centers: access to all four stereoisomers by combination of organo- and biocatalysis. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**, 9355–9358.

[86] **Rulli G, Duangdee N, Baer K, Hummel W, Berkessel A, Gröger H.** (2011). Direction of kinetically versus thermodynamically controlled organocatalysis and its application in chemoenzymatic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 7944–7947.

[87] **Greenberg WA, Varvak A, Hanson SR, Wong K, Huang H, Chen P, Burk MJ.** (2004). Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 5788–5793.

[88] **Verho O, Bäckvall J-E.** (2015). Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: a powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines. *J Am Chem Soc*, **137**, 3996–4009.

[89] **Duangdee N, Harnying W, Rulli G, Neudörfl J-M, Gröger H, Berkessel A.** (2012). Highly enantioselective organocatalytic trifluoromethyl carbinol synthesis--a caveat on reaction times and product isolation. *J Am Chem Soc*, **134**, 11196–11205.

[90] **Maya V, Raj M, Singh VK.** (2007). Highly enantioselective organocatalytic direct aldol reaction in an aqueous medium. *Org Lett*, **9**, 2593–2595.

[91] **Rulli G, Fredriksen KA, Duangdee N, Bonge-Hansen T, Berkessel A, Gröger H.** (2013). Asymmetric organocatalytic aldol reaction in water: mechanistic insights and development of a semi-continuously operating process. *Synthesis*, **45**, 2512–2519.

[92] **List B, Lerner RA, Barbas III CF.** (2000). Proline-catalyzed direct asymmetric aldol reactions. *J Am Chem Soc*, **122**, 2395–2396.

[93] **Berkessel A, Gröger H.** *Asymmetric organocatalysis: from biomimetic concepts to applications in asymmetric synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.

[94] **MacMillan DWC.** (2008). The advent and development of organocatalysis. *Nature*, **455**, 304–308.

[95] **Marigo M, Wabnitz TC, Fielenbach D, Jørgensen KA.** (2005). Enantioselective organocatalyzed α sulfenylation of aldehydes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **117**, 804–807.

[96] **Raj M, Vishnumaya V, Ginotra SK, Singh VK.** (2006). Highly enantioselective direct aldol reaction catalyzed by organic molecules. *Org Lett*, **8**, 4097–4099.

[97] **Hayashi Y, Gotoh H, Hayashi T, Shoji M.** (2005). Diphenylprolinol silyl ethers as efficient organocatalysts for the asymmetric Michael reaction of aldehydes and nitroalkenes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 4212–4215.

[98] **Ahrendt KA, Borths CJ, Macmillan DWC.** (2000). New strategies for organic catalysis: the first highly enantioselective organocatalytic Diels-Alder reaction. *J Am Chem Soc*, **122**, 4243–4244.

[99] **Tu Y, Wang Z-X, Shi Y.** (1996). An efficient asymmetric epoxidation method for trans-olefins mediated by a fructose-derived ketone. *J Am Chem Soc*, **118**, 9806–9807.

[100] **Vakulya B, Varga S, Csámpai A, Soós T.** (2005). Highly enantioselective conjugate addition of nitromethane to chalcones using bifunctional cinchona organocatalysts. *Org Lett*, **7**, 1967–1969.

[101] **Seebach D, Beck AK, Heckel A.** (2001). TADDOLs, their derivatives, and TADDOL analogues: versatile chiral auxiliaries. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 92–138.

[102] **Eder U, Sauer G, Wiechert R.** (1971). Neuartige asymmetrische Cyclisierung zu optisch aktiven Steroid-CD-Teilstücken. *Angew Chem*, **83**, 492–493.

[103] **Tang Z, Yang Z-H, Chen X-H, Cun L-F, Mi A-Q, Jiang Y-Z, Gong L-Z.** (2005). A highly efficient organocatalyst for direct aldol reactions of ketones with aldedydes. *J Am Chem Soc*, **127**, 9285–9289.

[104] **Saito S, Yamamoto H.** (2004). Design of acid−base catalysis for the asymmetric direct aldol reaction. *Acc Chem Res*, **37**, 570–579.

[105] **Heine A, DeSantis G, Luz JG, Mitchell M, Wong CH, Wilson IA.** (2001). Observation of covalent intermediates in an enzyme mechanism at atomic resolution. *Science*, **294**, 369–374.

[106] **Machajewski, Wong.** (2000). The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angew Chem Int Ed Engl*, **39**, 1352–1375.

[107] **Gröger H, Wilken J.** (2001). The application of L-proline as an enzyme mimic and further new asymmetric syntheses using small organic molecules as chiral catalysts. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 529–532.

[108] **Bahmanyar S, Houk KN.** (2001). Transition states of amine-catalyzed aldol reactions involving enamine intermediates: theoretical studies of mechanism, reactivity, and stereoselectivity. *J Am Chem Soc*, **123**, 11273–11283.

[109] **Zotova N, Broadbelt LJ, Armstrong A, Blackmond DG.** (2009). Kinetic and mechanistic studies of proline-mediated direct intermolecular aldol reactions. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, 3934–3937.

[110] **Mase N, Nakai Y, Ohara N, Yoda H, Takabe K, Tanaka F, Barbas III CF.** (2006). Organocatalytic direct asymmetric aldol reactions in water. *J Am Chem Soc*, **128**, 734–735.

[111] **Hayashi Y, Sumiya T, Takahashi J, Gotoh H, Urushima T, Shoji M.** (2006). Highly diastereo- and enantioselective direct aldol reactions in water. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 958–961.

[112] **Hayashi Y, Aratake S, Okano T, Takahashi J, Sumiya T, Shoji M.** (2006). Combined proline–surfactant organocatalyst for the highly diastereo- and enantioselective aqueous direct cross-aldol reaction of aldehydes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 5527–5529.

[113] **Guthrie JP, Wang XP.** (1992). The aldol condensation of acetone with acetophenone. *Can J Chem*, **70**, 1055–1068.

[114] **Yoshida Y, Hayashi R, Sumihara H, Tanabe Y.** (1997). $TiCl_4/Bu_3N$/(catalytic TMSOTf): efficient agent for direct aldol addition and Claisen condensation. *Tetrahedron Lett*, **38**, 8727–8730.

[115] **Aoki S, Kotani S, Sugiura M, Nakajima M.** (2012). Trichlorosilyl triflate-mediated enantioselective directed cross-aldol reaction between ketones using a chiral phosphine oxide as an organocatalyst. *Chem Commun*, **48**, 5524–5526.

[116] **Adachi S, Harada T.** (2009). Catalytic enantioselective aldol additions to ketones. *Eur J Org Chem*, **2009**, 3661–3671.

[117] **Qiu L-H, Shen Z-X, Shi C-Q, Liu Y-H, Zhang Y-W.** (2005). Proline catalyzed asymmetric aldol reaction between methyl ketones and 1-aryl-2,2,2-trifluoroethanones. *Chin J Chem*, **23**, 584–588.

[118] **Hara N, Tamura R, Funahashi Y, Nakamura S.** (2011). N-(heteroarenesulfonyl)prolinamides-catalyzed aldol reaction between acetone and aryl trihalomethyl ketones. *Org Lett*, **13**, 1662–1665.

[119] **Kokotos CG.** (2012). Construction of tertiary alcohols bearing perfluoroalkyl chains catalyzed by prolinamide-thioureas. *J Org Chem*, **77**, 1131–1135.

[120] **Zong H, Huang H, Bian G, Song L.** (2014). Fine-tuning the structures of chiral diamine ligands in the catalytic asymmetric aldol reactions of trifluoromethyl aromatic ketones with linear aliphatic ketones. *J Org Chem*, **79**, 11768–11773.

[121] **Berkessel A, Harnying W, Duangdee N, Neudörfl JM, Gröger H.** (2012). Large-scale synthesis of Singh's catalyst in a one-pot procedure starting from proline. *Org Process Res Dev*, **16**, 123–128.

[122] **Hollmann F, E. AIWC, Holtmann D.** (2011). Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem*, **13**, 2285–2314.

[123] **De Wildeman SM a, Sonke T, Schoemaker HE, May O.** (2007). Biocatalytic reductions: from lab curiosity to “first choice”. *Acc Chem Res*, **40**, 1260–1266.

[124] **Nakamura K, Yamanaka R, Matsuda T, Harada T.** (2003). Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry*, **14**, 2659–2681.

[125] **Bradshaw CW, Shen G-J, Wong C-H.** (1991). A new alcohol dehydrogenase with unique stereospecificity from *Pseudomonas* sp. *Bioorg Chem*, **19**, 398–417.

[126] **Prelog V.** (1964). Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl Chem*, **9**, 119–130.

[127] **Bradshaw CW, Hummel W, Wong CH.** (1992). *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase: a useful catalyst for synthesis. *J Org Chem*, **57**, 1532–1536.

[128] **Dutler H, Van der Baan JL, Hochuli E, Kis Z, Taylor KE, Prelog V.** (1977). Dihydroxyacetone reductase from *Mucor javanicus*. 1. Isolation and properties. *Eur J Biochem*, **75**, 423–432.

[129] **Nakamura K, Yoneda T, Miyai T, Ushio K, Oka S, Ohno A.** (1988). Asymmetric reduction of ketones by glycerol dehydrogenase from *Geotricum*. *Tetrahedron Lett*, **29**, 2453–2454.

[130] **Nakamura K, Takano S, Terada K, Ohno A.** (1992). Asymmetric reduction of butyl pyruvate catalyzed by immobilized glycerol dehydrogenase in organic-aqueous biphasic media. *Chem Lett*, **21**, 951–954.

[131] **Nakamura K, Shiraga T, Miyai T, Ohno A.** (1990). Stereochemistry of NAD(P)-coenzyme in the reaction catalyzed by glycerol dehydrogenase. *Bull Chem Soc Jpn*, **63**, 1735–1737.

[132] **Jones JB.** (1986). Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron*, **42**, 3351–3403.

[133] **Jones JB, Beck JF.** *Asymmetric syntheses and resolutions using enzymes*. In: Jones JB, Sih CJ, Perlman D, *Application of biochemical systems in organic chemistry*. New York: Wiley; 1976. 107–401.

[134] **Davies J, Jones JB.** (1979). Enzymes in organic synthesis. 16. Heterocyclic ketones as substrates of horse liver alcohol dehydrogenase. Stereospecific reductions of 2-substituted tetrahydrothiopyran-4-ones. *J Am Chem Soc*, **101**, 5405–5410.

[135] **Lam LKP, Gair IA, Jones JB.** (1988). Enzymes in organic synthesis. 42. Stereoselective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed reductions of heterocyclic bicyclic ketones. *J Org Chem*, **53**, 1611–1615.

[136] **Velonia K, Tsigos I, Bouriotis V, Smonou I.** (1999). Stereospecificity of hydrogen transfer by the NAD+-linked alcohol dehydrogenase from the antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123. *Bioorg Med Chem Lett*, **9**, 65–68.

[137] **Liu W, Wang P.** (2007). Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol Adv*, **25**, 369–384.

[138] **Weckbecker A, Gröger H, Hummel W.** (2010). Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **120**, 195–242.

[139] **Hummel W, Gröger H.** (2014). Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J Biotechnol*, **191**, 22–31.

[140] **Wichmann R, Vasic-Racki D.** (2005). Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **92**, 225–260.

[141] **Kara S, Schrittwieser JH, Hollmann F, Ansorge-Schumacher MB.** (2014). Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**, 1517–1529.

[142] **Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A.** (2007). Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**, 237–248.

[143] **Keinan E, Seth KK, Lamed R.** (1987). Synthetic applications of alcohol-dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *Ann N Y Acad Sci*, **501**, 130–149.

[144] **Bastos F de M, dos Santos AG, Jones Jr J, Oestreicher EG, Pinto GF, Paiva LMC.** (1999). Three different coupled enzymatic systems for *in situ* regeneration of NADPH. *Biotechnol Tech*, **13**, 661–664.

[145] **Kosjek B, Stampfer W, Pogorevc M, Goessler W, Faber K, Kroutil W.** (2004). Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions. *Biotechnol Bioeng*, **86**, 55–62.

[146] **Edegger K, Gruber CC, Poessl TM, Wallner SR, Lavandera I, Faber K, Niehaus F, Eck J, Oehrlein R, Hafner A, Kroutil W.** (2006). Biocatalytic deuterium- and hydrogen-transfer using over-expressed ADH-“A”: enhanced stereoselectivity and 2H-labeled chiral alcohols. *Chem Commun*, **5**, 2402–2404.

[147] **Edegger K, Mang H, Faber K, Gross J, Kroutil W.** (2006). Biocatalytic oxidation of *sec*-alcohols via hydrogen transfer. *J Mol Catal A Chem*, **251**, 66–70.

[148] **Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, Wada M, Kataoka M, Shimizu S.** (2001). Synthesis of optically pure ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**, 590–595.

[149] **Wong C, Drueckhammer DG, Sweers HM.** (1985). Enzymatic vs. fermentative synthesis: thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis. *J Am Chem Soc*, **107**, 4028–4031.

[150] **Hilt W, Pfleiderer G, Fortnagel P.** (1991). Glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis* expressed in *Escherichia coli* I: purification, characterization and comparison with glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochim Biophys Acta*, **1076**, 298–304.

[151] **Hummel W, Kula M-R.** (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem*, **184**, 1–13.

[152] **Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula M-R, Tishkov VI, Egorov AM, Wandrey C, Kragl U.** (1996). A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett*, **37**, 1377–1380.

[153] **Tishkov VI, Galkin AG, Fedorchuk V V, Savitsky PA, Rojkova AM, Gieren H, Kula MR.** (1999). Pilot scale production and isolation of recombinant NAD^+- and $NADP^+$-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol Bioeng*, **64**, 187–193.

[154] **Tishkov V, Popov V.** (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochem*, **69**, 1252–1267.

[155] **Tishkov VI, Popov VO.** (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol Eng*, **23**, 89–110.

[156] **Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, Weuster-Botz D.** (2013). Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 2473–2481.

[157] **Wolberg M, Filho MV, Bode S, Geilenkirchen P, Feldmann R, Liese A, Hummel W, Müller M.** (2008). Chemoenzymatic synthesis of the chiral side-chain of statins: application of an alcohol dehydrogenase catalysed ketone reduction on a large scale. *Bioprocess Biosyst Eng*, **31**, 183–191.

[158] **Pollard D, Truppo M, Pollard J, Chen C, Moore J.** (2006). Effective synthesis of (*S*)-3,5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron Asymmetry*, **17**, 554–559.

[159] **Liang J, Lalonde J, Borup B, Mitchell V, Mundorff E, Trinh N, Kochrekar DA, Cherat RN, Pai GG.** (2010). Development of a biocatalytic process as an alternative to the (−)-DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. *Org Process Res Dev*, **14**, 193–198.

[160] **Abokitse K, Hummel W.** (2003). Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (*S*)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biotechnol*, **62**, 380–386.

[161] **Weckbecker A, Hummel W.** (2009). Cloning, expression, and characterization of an (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatal Biotransform*, **24**, 380–389.

[162] **Niefind K, Müller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D.** (2003). The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J Mol Biol*, **327**, 317–328.

[163] **Hummel W.** (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **58**, 145–184.

[164] **Keinan E, Hafeli EK, Seth KK, Lamed R.** (1986). Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *J Am Chem Soc*, **108**, 162–169.

[165] **Rodríguez S, Kayser MM, Stewart JD.** (2001). Highly stereoselective reagents for β-keto ester reductions by genetic engineering of baker's yeast. *J Am Chem Soc*, **123**, 1547–1555.

[166] **Müller M, Katzberg M, Bertau M, Hummel W.** (2010). Highly efficient and stereoselective biosynthesis of (2*S*,5*S*)-hexanediol with a dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Org Biomol Chem*, **8**, 1540–1550.

[167] **Lavandera I, Kern A, Ferreira-silva B, Glieder A, Wildeman S De, Kroutil W, Products P, Box PO.** (2008). Stereoselective bioreduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia* sp. *J Org Chem*, **73**, 6003–6005.

[168] **Zhu D, Hua L.** (2006). Enantioselective enzymatic reductions of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase. *J Org Chem*, **71**, 9484–9486.

[169] **Reetz MT.** (2013). Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *J Am Chem Soc*, **135**, 12480–12496.

[170] **Edin M, Steinreiber J, Bäckvall J-E.** (2004). One-pot synthesis of enantiopure *syn*-1,3-diacetates from racemic *syn*/*anti* mixtures of 1,3-diols by dynamic kinetic asymmetric transformation. *PNAS*, **101**, 5761–5766.

[171] **Gröger H, Hummel W.** (2014). Combining the “two worlds” of chemocatalysis and biocatalysis towards multi-step one-pot processes in aqueous media. *Curr Opin Chem Biol*, **19**, 171–179.

[172] **Burda E, Hummel W, Gröger H.** (2008). Modular chemoenzymatic one-pot syntheses in aqueous media: combination of a palladium-catalyzed cross-coupling with an asymmetric biotransformation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 9551–9554.

[173] **Schnapperelle I, Hummel W, Gröger H.** (2012). Formal asymmetric hydration of non-activated alkenes in aqueous medium through a “chemoenzymatic catalytic system”. *Chem Eur J*, **18**, 1073–1076.

[174] **Kraußer M, Hummel W, Gröger H.** (2007). Enantioselective one-pot two-step synthesis of hydrophobic allylic alcohols in aqueous medium through the combination of a Wittig reaction and an enzymatic ketone reduction. *Eur J Org Chem*, **2007**, 5175–5179.

[175] **Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557–580.

[176] **Studier FW, Moffatt BA.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113–130.

[177] **De Schutter K, Lin Y-C, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N.** (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, **27**, 561–566.

[178] **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

[179] **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491.

[180] **Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.

[181] **Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

[182] **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350–4354.

[183] **Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598–599.

[184] **Peterson GL.** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346–356.

[185] **Boivin S, Kozak S, Meijers R.** (2013). Optimization of protein purification and characterization using thermofluor screens. *Protein Expr Purif*, **91**, 192–206.

[186] **Faber K, Kroutil W, Thallinger G.** Software-Tool Enantioselectivity: Calculation of E-value, verfügbar unter: http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/cgi-bin/enantio.pl; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[187] **Faber K, Kroutil W.** (2012). A Computer Program for the Determination of the Enantioselectivity (E-Value) in the Kinetic Resolution of Enantiomers, verfügbar unter: http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/DataFiles/Selectivity-Help.pdf; zuletzt überprüft am 15.10.2016.

[188] **Duangdee N.** *Dissertation*: Organocatalytic asymmetric aldol reactions with ketone acceptors. Universität zu Köln, 2013.

[189] **Panek A, Pietrow O, Filipkowski P, Synowiecki J.** (2013). Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochim Pol*, **60**, 163–166.

[190] **Freydank A-C, Brandt W, Dräger B.** (2008) .Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins*, **72**, 173–183.

[191] **Sabaty M, Grosse S, Adryanczyk G, Boiry S, Biaso F, Arnoux P, Pignol D.** (2013). Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis. *BMC Biochem*, **14**, 28.

[192] **Song H, Park EJ, Shin YH, Kim HS, Na DH.** (2012). Effect of polyhistidine-tagging site on the stability of recombinant alginate lyase from *Streptomyces* sp. ALG-5. *J Pharm Investig*, **42**, 15–19.

[193] **Majorek KA, Kuhn ML, Chruszcz M, Anderson WF, Minor W.** (2014). Double trouble-buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Sci*, **23**, 1359–1368.

[194] **Halliwell CM, Morgan G, Ou CP, Cass AE.** (2001). Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Anal Biochem*, **295**, 257–261.

[195] **He J, Sakaguchi K, Suzuki T.** (2012). Determination of the ribosome-binding sequence and spacer length between binding site and initiation codon for efficient protein expression in *Bifidobacterium longum* 105-A. *J Biosci Bioeng*, **113**, 442–444.

[196] **Chen H, Bjerknes M, Kumar R, Jay E.** (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4953–4957.

[197] **Berwal SK, Sreejith RK, Pal JK.** (2010). Distance between RBS and AUG plays an important role in overexpression of recombinant proteins. *Anal Biochem*, **405**, 275–277.

[198] **Chaib AO.** *Bachelorarbeit*: Zielgerichtete Mutagenese und biochemische Charakterisierung einer Alkohol-Dehydrogenase aus *Pichia pastoris*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2015.

[199] **Schrödinger LLC.** The PyMOL molecular graphics system, Version 1.8, verfügbar unter: http://www.pymol.org.

[200] **Krissinel E, Henrick K.** (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*, **372**, 774–797.

[201] **Tanaka N, Nonaka T, Nakamura K, Hara A.** (2001). SDR structure, mechanism of action, and substrate recognition. *Curr Org Chem*, **5**, 89–111.

[202] **Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jörnvall H, Oppermann U.** (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, **277**, 25677–25684.

[203] **Hammel M.** *Dissertation*: Neue Eisen-Cyclopentadienon-Tricarbonyl Komplexe & Synthese chiraler 1,3-Diole durch kombinierte Organo- und Biokatalyse. Universität zu Köln, 2016.

[204] **Abate A, Brenna E, Fuganti C, Serra S.** (2004). Enzyme-mediated synthesis of new 1,3-dioxane odorants related to Floropal®. *Flavour Fragr J*, **19**, 382–393.

[205] **Kappey C-H, Hölscher B, Pickenhagen W.** (1998). 2,4,6-Trimethyl-4-phenyl-1,3-dioxan. Patent DE19822232A1.

[206] **Bulut D, Duangdee N, Gröger H, Berkessel A, Hummel W.** (2016). Screening, molecular cloning, and biochemical characterization of an alcohol dehydrogenase from *Pichia pastoris* useful for the kinetic resolution of a racemic β-hydroxy-β-trifluoromethyl ketone. *ChemBioChem*, **17**, 1349–1358.

[207] **Kobayashi Y, Matsuumi M.** (2000). First total synthesis of grahamimycin A. *J Org Chem*, **65**, 7221–7224.

[208] **American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America.** (2003). Treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **167**, 603–662.

[209] **Müller M.** (2005). Chemoenzymatic synthesis of building blocks for statin side chains. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 362–365.

[210] **Gupta P, Mahajan N, Taneja SC.** (2013). Recent advances in the stereoselective synthesis of 1,3-diols using biocatalysts. *Catal Sci Technol*, **3**, 2462–2480.

[211] **Drepper T, Eggert T, Hummel W, Leggewie C, Pohl M, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger K-E.** (2006). Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnol J*, **1**, 777–786.

[212] **Baneyx F, Mujacic M.** (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, **22**, 1399–1408.

[213] **Baneyx F.** (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 411–421.

[214] **Waegeman H, Soetaert W.** (2011). Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **38**, 1891–1910.

[215] **Katz M, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund MF.** (2003). Screening of two complementary collections of *Saccharomyces cerevisiae* to identify enzymes involved in stereo-selective reductions of specific carbonyl compounds: an alternative to protein purification. *Enzym Microb Technol*, **33**, 163–172.

[216] **Parkot J, Gröger H, Hummel W.** (2010). Purification, cloning, and overexpression of an alcohol dehydrogenase from *Nocardia globerula* reducing aliphatic ketones and bulky ketoesters. *Appl Microbiol Biotechnol*, **86**, 1813–1820.

[217] **Soni P, Kansal H, Banerjee UC.** (2007). Purification and characterization of an enantioselective carbonyl reductase from *Candida viswanathii* MTCC 5158. *Process Biochem*, **42**, 1632–1640.

[218] **Perrone MG, Santandrea E, Scilimati A, Syldatk C.** (2007). Stereoselective prostereogenic 3-oxo ester reduction mediated by a novel yeast alcohol dehydrogenase derived from *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Adv Synth Catal*, **349**, 1111–1118.

[219] **Chen X-H, Wei P, Wang X-T, Zong M-H, Lou W-Y.** (2014). A novel carbonyl reductase with *anti*-Prelog stereospecificity from *Acetobacter* sp. CCTCC M209061: purification and characterization. *PLoS One*, **9**, e94543.

[220] **Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair S V, Cregg JM.** (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, **186**, 37–44.

[221] **Chen D, Texada DE.** (2006). Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Ther Mol Biol*, **10**, 1–12.

[222] **Chen G-FT, Inouye M.** (1994). Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **8**, 2641–2652.

[223] **Kane JF.** (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, **6**, 494–500.

[224] **Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peirú S, Menzella HG.** (2014). Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Front Microbiol*, **5**, 21.

[225] **Kurland C, Gallant J.** (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 489–493.

[226] **Sørensen HP, Mortensen KK.** (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, **115**, 113–128.

[227] **Leroux F.** (2004). Atropisomerism, biphenyls, and fluorine: a comparison of rotational barriers and twist angles. *ChemBioChem*, **5**, 644–649.

[228] **Jagodzinska M, Huguenot F, Candiani G, Zanda M.** (2009). Assessing the bioisosterism of the trifluoromethyl group with a protease probe. *ChemMedChem*, **4**, 49–51.

[229] **Hardegger LA, Kuhn B, Spinnler B, Anselm L, Ecabert R, Stihle M, Gsell B, Thoma R, Diez J, Benz J, Plancher J-M, Hartmann G, Isshiki Y, Morikami K, Shimma N, Haap W, Banner DW, Diederich F.** (2011). Halogen bonding at the active sites of human cathepsin L and MEK1 kinase: efficient interactions in different environments. *ChemMedChem*, **6**, 2048–2054.

[230] **Pflaum J, Bracco G, Schreiber F, Colorado R, Shmakova OE, Lee TR, Scoles G, Kahn A.** (2002). Structure and electronic properties of CH_3- and CF_3-terminated alkanethiol monolayers on Au(111): a scanning tunneling microscopy, surface X-ray and helium scattering study. *Surf Sci*, **498**, 89–104.

[231] **Chen C-N, Porubleva L, Shearer G, Svrakic M, Holden LG, Dover JL, Johnston M, Chitnis PR, Kohl DH.** (2003). Associating protein activities with their genes: rapid identification of a gene encoding a methylglyoxal reductase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **20**, 545–554.

[232] **Hauser M, Horn P, Tournu H, Hauser NC, Hoheisel JD, Brown AJP, Dickinson JR.** (2007). A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res*, **7**, 84–92.

[233] **Katzberg M, Skorupa-Parachin N, Gorwa-Grauslund M-F, Bertau M.** (2010). Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: A mutagenesis study on a γ-diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example. *Int J Mol Sci*, **11**, 1735–1758.

[234] **Choi YH, Choi HJ, Kim D, Uhm K-N, Kim H-K.** (2010). Asymmetric synthesis of (*S*)-3-chloro-1-phenyl-1-propanol using *Saccharomyces cerevisiae* reductase with high enantioselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**, 185–193.

[235] **Guo P-C, Bao Z-Z, Ma X-X, Xia Q, Li W-F.** (2014). Structural insights into the cofactor-assisted substrate recognition of yeast methylglyoxal/isovaleraldehyde reductase Gre2. *Biochim Biophys Acta*, **1844**, 1486–1492.

[236] **Kamitori S, Iguchi A, Ohtaki A, Yamada M, Kita K.** (2005). X-ray structures of NADPH-dependent carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor* provide insights into stereoselective reductions of carbonyl compounds. *J Mol Biol*, **352**, 551–558.

[237] **Zhu D, Yang Y, Buynak JD, Hua L.** (2006). Stereoselective ketone reduction by a carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor*. Substrate specificity, enantioselectivity and enzyme-substrate docking studies. *Org Biomol Chem*, **4**, 2690–2695.

[238] **Kita K, Nakase K, Yanase H, Kataoka M, Shimizu S.** (1999). Purification and characterization of new aldehyde reductases from *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429. *J Mol Catal B Enzym*, **6**, 305–313.

[239] **Kita K, Fukura T, Nakase K-Il, Okamoto K, Yanase H, Kataoka M, Shimizu S.** (1999). Cloning, overexpression, and mutagenesis of the *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429 gene encoding a new aldehyde reductase, which catalyzes the stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoa. *Appl Env Microbiol*, **65**, 5207–5211.

[240] **Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE.** (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinform*, **7**, 339.

[241] **Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.** (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605–1612.

[242] **Rep M, Proft M, Remize F, Tamas M, Serrano R, Thevelein JM, Hohmann S.** (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol*, **40**, 1067–1083.

[243] **Lewis Liu Z, Moon J, Andersh BJ, Slininger PJ, Weber S.** (2008). Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **81**, 743–753.

[244] **Krantz M, Nordlander B, Valadi H, Johansson M, Gustafsson L, Hohmann S.** (2004). Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryot Cell*, **3**, 1381–1390.

[245] **Garay-Arroyo A, Covarrubias AA.** (1999). Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 879–892.

[246] **Reed MC, Lieb A, Nijhout HF.** (2010). The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *BioEssays*, **32**, 422–429.

[247] **Kratzer R, Woodley JM, Nidetzky B.** (2015). Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions. *Biotechnol Adv*, **33**, 1641–1652.

[248] **Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM.** (2011). Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org Process Res Dev*, **15**, 266–274.

[249] **Gröger H, May O, Werner H, Menzel A, Altenbuchner J.** (2006). A “second generation process” for the synthesis of L-neopentylglycine: asymmetric reductive amination using a recombinant whole cell catalyst. *Org Process Res Dev*, **10**, 666–669.

[250] **Menzel A, Werner H, Altenbuchner J, Gröger H.** (2004). From enzymes to “designer bugs” in reductive amination: a new process for the synthesis of L-*tert*-leucine using a whole cell-catalyst. *Eng Life Sci*, **4**, 573–576.

[251] **Richter N, Neumann M, Liese A, Wohlgemuth R, Weckbecker A, Eggert T, Hummel W.** (2010). Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing glycerol dehydrogenase and glucose dehydrogenase and its application in the synthesis of L-glyceraldehyde. *Biotechnol Bioeng*, **106**, 541–552.

[252] **Novagen.** pET System Manual. 11. Edition, User Protocol TB055 Rev. C 0611JN, verfügbar unter: http://www.merckmillipore.com.

[253] **Held D, Yaeger K, Novy R.** (2003). New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. *Innovations*, **18**, 4–6.

[254] **Weckbecker A.** *Dissertation*: Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2005.

[255] **Shokri A, Sandén AM, Larsson G.** (2002). Growth rate-dependent changes in *Escherichia coli* membrane structure and protein leakage. *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 386–392.

[256] **Sokolovská I, Rozenberg R, Riez C, Rouxhet PG, Agathos SN, Wattiau P.** (2003). Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl Env Microbiol*, **69**, 7019–7027.

[257] **McGarrity JT, Armstrong JB.** (1975). The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta*, **398**, 258–264.

[258] **McGarrity JT, Armstrong JB.** (1981). The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, **27**, 835–840.

[259] **Arneborg N, Salskov-Iversen A, Mathiasen T.** (1993). The effect of growth rate and other growth conditions on the lipid composition of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **39**, 353–357.

[260] **Rundbäck F, Fidanoska M, Adlercreutz P.** (2012). Coupling of permeabilized cells of *Gluconobacter oxydans* and *Ralstonia eutropha* for asymmetric ketone reduction using H_2 as reductant. *J Biotechnol*, **157**, 154–158.

[261] **Gruber C, Krahulec S, Nidetzky B, Kratzer R**. (2013). Harnessing *Candida tenuis* and *Pichia stipitis* in whole-cell bioreductions of *o*-chloroacetophenone: Stereoselectivity, cell activity, *in situ* substrate supply and product removal. *Biotechnol J*, **8**, 699–708.

[262] **Alphand V, Carrea G, Wohlgemuth R, Furstoss R, Woodley JM.** (2003). Towards large-scale synthetic applications of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Trends Biotechnol*, **21**, 318–323.

[263] **Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M**. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sunderland, MA.: Sinauer Associates; 1990.

[264] **Chen RR.** (2007). Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, **74**, 730–738.

[265] **Wiener MC, Horanyi PS.** (2011). How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 10929–10930.

[266] **van den Berg B.** (2005). The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 401–407.

[267] **Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A.** (2007). Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**, 249–255.

[268] **Ishige T, Honda K, Shimizu S.** (2005). Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol*, **9**, 174–180.

[269] **Schroer K, Zelic B, Oldiges M, Lütz S.** (2009). Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes. *Biotechnol Bioeng*, **104**, 251–260.

[270] **Vishnumaya MR, Singh VK.** (2009). Highly efficient small organic molecules for enantioselective direct aldol reaction in organic and aqueous media. *J Org Chem*, **74**, 4289–4297.

[271] **Raj M, Singh VK.** (2009). Organocatalytic reactions in water. *Chem Commun*, **44**, 6687–6703.

[272] **Mase N, Barbas III CF.** (2010). In water, on water, and by water: mimicking nature's aldolases with organocatalysis and water. *Org Biomol Chem*, **8**, 4043–4050.

[273] **Baer K.** *Dissertation*: Die stereoselektive Aldolreaktion in Biotransformationen und chemoenzymatischen Eintopfsynthesen. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2011.

[274] **Rulli G.** *Dissertation*: Die asymmetrische organokatalytische Aldolreaktion und deren Einsatz in chemoenzymatischen Mehrstufensynthesen. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2014.

[275] **Zhu M-K, Xu X-Y, Gong L-Z.** (2008). Organocatalytic asymmetric *syn*-aldol reactions of aldehydes with long-chain aliphatic ketones on water and with dihydroxyacetone in organic solvents. *Adv Synth Catal*, **350**, 1390–1396.

[276] **Faber K**. *Biotransformations in organic chemistry. A textbook*. 6. Edition. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2011.

[277] **Dai-Huan L, Dong-Zhi W, Jin-Ping L.** (2014). Kinetic resolution of racemic 1-phenyl-1,2-ethanediol via *Gluconobacter oxydans*-catalyzed asymmetric bio-oxidation. *J Pure Appl Microbio*, **8**, 1183–1189.

[278] **Silva CR, Souza JC, Araújo LS, Kagohara E, Garcia TP, Pelizzari VH, Andrade LH.** (2012). Exploiting the enzymatic machinery of *Arthrobacter atrocyaneus* for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols. *J Mol Catal B Enzym*, **83**, 23–28.

[279] **Matsumoto K, Hashimoto K, Sakuragi M, Kusunoki A, Nogawa M.** (2011). Microbial oxidation of 1,2-diols bearing a substituent with an oxyfunctional group: preparation of optically active 1,2-diols and α-hydroxy ketones. *Lett Org Chem*, **8**, 536–539.

[280] **Miyamoto K, Fujimori K, Hirano J-I, Ohta H.** (2009). Microbial kinetic resolution of 2-substituted-1-propanol. *Biocatal Biotransform*, **27**, 66–70.

[281] **Hummel W, Kuzu M, Geueke B.** (2003). An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-*tert*-Leucine. *Org Lett*, **5**, 3649–3650.

[282] **Kuzu M.** *Dissertation*: Molekulargenetische, biochemische, strukturelle und mechanistische Charakterisierung mikrobieller Oxidasen. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2005.

[283] **Carlquist M, Wallentin C-J, Wärnmark K, Gorwa-Grauslund MF.** (2008). Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for kinetic resolution of racemic bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione. *Tetrahedron Asymmetry*, **19**, 2293–2295.

[284] **Heidlindemann M, Hammel M, Scheffler U, Mahrwald R, Hummel W, Berkessel A, Gröger H.** (2015). Chemoenzymatic synthesis of vitamin B5-intermediate (*R*)-pantolactone via combined asymmetric organo- and biocatalysis. *J Org Chem*, **80**, 3387–3396.

[285] **Richter N, Breicha K, Hummel W, Niefind K.** (2010). The three-dimensional structure of AKR11B4, a glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*, reveals a tryptophan residue as an accelerator of reaction turnover. *J Mol Biol*, **404**, 353–362.

[286] **Richter N, Neumann M, Liese A, Wohlgemuth R, Eggert T, Hummel W.** (2009). Characterisation of a recombinant NADP-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and its application in the production of L-glyceraldehyde. *ChemBioChem*, **10**, 1888–1896.

[287] **Sanfilippo C, Nicolosi G, Patti A.** (2014). Milnacipran as a challenging example of aminomethyl substrate for lipase-catalyzed kinetic resolution. *J Mol Catal B Enzym*, **104**, 82–86.

[288] **Zhang Y, Schaufelberger F, Sakulsombat M, Liu C, Ramström O.** (2014). Asymmetric synthesis of 1,3-oxathiolan-5-one derivatives through dynamic covalent kinetic resolution. *Tetrahedron*, **70**, 3826–3831.

[289] **Devendran S, Yadav GD.** (2014). Lipase-catalyzed kinetic resolution of (±)-1-(2-furyl) ethanol in nonaqueous media. *Chirality*, **26**, 286–292.

[290] **Vlasyuk AL, Voblikova VA, Gamalevich GD, Serebryakov EP.** (2014). Enantioselective transesterification of (±)-1-phenylundecan-3-ol catalyzed by the lipase from *Burkholderia cepacia*. *Russ Chem B+*, **62**, 2041–2045.

[291] **Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K.** (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, **485**, 185–194.

[292] **Yousefi M, Mohammadi M, Habibi Z.** (2014). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *J Mol Catal B Enzym*, **104**, 87–94.

[293] **Applegate GA, Berkowitz DB.** (2015). Exploiting enzymatic dynamic reductive kinetic resolution (DYRKR) in stereocontrolled synthesis. *Adv Synth Catal*, **357**, 1619–1632.

[294] **Musa MM, Phillips RS.** (2011). Recent advances in alcohol dehydrogenase-catalyzed asymmetric production of hydrophobic alcohols. *Catal Sci Technol*, **1**, 1311–1323.

[295] **Méndez-Sánchez D, Mangas-Sánchez J, Busto E, Gotor V, Gotor-Fernández V.** (2016). Dynamic reductive kinetic resolution of benzyl ketones using alcohol dehydrogenases and anion exchange resins. *Adv Synth Catal*, **358**, 122–131.

[296] **Giacomini D, Galletti P, Quintavalla A, Gucciardo G, Paradisi F.** (2007). Highly efficient asymmetric reduction of arylpropionic aldehydes by horse liver alcohol dehydrogenase through dynamic kinetic resolution. *Chem Commun*, **59**, 4038–4040.

[297] **Galletti P, Emer E, Gucciardo G, Quintavalla A, Pori M, Giacomini D.** (2010). Chemoenzymatic synthesis of (2*S*)-2-arylpropanols through a dynamic kinetic resolution of 2-arylpropanals with alcohol dehydrogenases. *Org Biomol Chem*, **8**, 4117–4123.

[298] **Mangas-Sánchez J, Busto E, Gotor V, Gotor-Fernández V.** (2013). One-pot synthesis of enantiopure 3,4-dihydroisocoumarins through dynamic reductive kinetic resolution processes. *Org Lett*, **15**, 3872–3875.

[299] **Sonoike S, Itakura T, Kitamura M, Aoki S.** (2012). One-pot chemoenzymatic synthesis of chiral 1,3-diols using an enantioselective aldol reaction with chiral Zn^{2+} complex catalysts and enzymatic reduction using oxidoreductases with cofactor regeneration. *Chem Asian J*, **7**, 64–74.

[300] **Itoh S, Sonoike S, Kitamura M, Aoki S.** (2014). Design and synthesis of chiral Zn^{2+} complexes mimicking natural aldolases for catalytic C–C bond forming reactions in aqueous solution. *Int J Mol Sci*, **15**, 2087–2118.

[301] **Abate A, Brenna E, Fronza G, Fuganti C, Ronzani S, Serra S.** (2003). Enzyme-mediated preparation of chiral 1,3-dioxane odorants. *Helv Chim Acta*, **86**, 592–606.

LEBENSLAUF/VITA

Persönliche Daten

Name	Dalia Bulut geb. Al-Sultani
Geburtsdatum	22.10.1988 in Bagdad-Yarmouk (Irak)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

02/2000–06/2008	Geschwister-Scholl Gymnasium Aachen Allgemeine Hochschulreife

Akademische Laufbahn

12/2012–12/2016	Fast-Track Promotion Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2011–09/2013	Masterstudium Biologie (Major in Mikrobiolgie und Biotechnologie) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Titel der Masterarbeit: *Entwichlung eines wachstumsabhängigen Selektionssystems zur Identifizierung von Threonin-Aldolasen.*
10/2008–09/2011	Bachelorstudium Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Titel der Bachelorarbeit: *Identifizierung und biochemische Charakterisierung neuer Threonin-Aldolasen.*

Berufserfahrung

12/2012–03/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bis 03/2016: Lehrstuhl Organische Chemie I (Universität Bielefeld) bis 02/2014: Institut für Molekulare Enzymtechnologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen

Mönchengladbach, 18. Oktober 2016

Dalia Bulut