

Optimierende Untersuchung von Acetaldehyd- abhängigen Aldolasen und deren Anwendung in der organischen Synthese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Hindges, geb. Bramski

aus Krefeld, Deutschland

Düsseldorf, 2025

Institut für Bioorganische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Apl. Prof. Dr. Thomas Drepper

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2025

„Be less curious about people and more curious about ideas.”

Marie Skłodowska Curie

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in wissenschaftlichen Journalen publiziert oder auf wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert.

Julia Hindges neé Bramski, Johannes Döbber, Marc. R. Hayes, Thomas Classen, Martina Pohl, Jörg Pietruszka, *ChemCatChem*. **2022**, 14 (16), e202200390: 'Covalently Immobilized 2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase (DERA) for Biocatalysis in Flow: Utilization of the 3-Hydroxyaldehyde Intermediate in Reaction Cascades`.

Eigenanteil:

- Planung des Projektes sowohl im Hinblick auf Zusammenstellung als auch Aufbau des Reaktions-Set-Ups umfassend 3D-Druck geeigneter Aufsätze für Spritzenpumpe.
- Entwicklung der geeigneten Enzymvariante: Mutagenese der DERA_{EC}; (systematischer) Austausch der Position C47. Bereitstellung (Klonierung, Expression, Testung hinsichtlich Aktivität, Enantiomerenüberschuss, Acetaldehyd-Toleranz) der optimierten DERA für die Synthese mit Unterstützung von Marc Hayes.
- Entwicklung einer geeigneten Immobilisierungsstrategie in Kooperation mit Johannes Döbber: Immobilisierung mittels HaloTagTM. Optimierung der Konstrukte und Aktivitätsbestimmungen der erstellten Immobilisate. Testung der Langzeitstabilität unter Reaktionsbedingungen.
- Durchführung und Auswertung der Experimente: Planung der Reaktionsoptimierung mittels eines Design of Experiments (Programm DesignExpertPro) in Kooperation mit Dr. Thomas Classen. Durchführung und weitergehende Optimierung; Durchführung der Synthesen im kontinuierlichen und semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus und Isolierung der Produkte.
- Produktanalytik
- Erstellung der Abbildungen und Schemata
- Verfassung des Manuskripts in Kooperation mit Dr. Thomas Classen sowie Verfassen der *Supporting Information*.

Shuhao Zhang, Julia Bramski, Murat Tutus, Jörg Pietruszka, Alexander Böker, Stefan Reinicke, *ACS Appl. Mat. Interfaces*. **2019**, 11, 37, 34441-34453: 'A Biocatalytically Active Membrane obtained from Immobilization of 2-Desoxy-D-ribose-5-phosphate Aldolase on a Porous Support`.

Eigenanteil:

- Der Eigenanteil betrifft den Teil bzgl. der finalen Anwendung der enzymatisch aktiven Membranen in einem Reaktions-Set Up.
- Bereitstellung des Enzyms (Expression, Reinigung, Lyophilisierung) DERA für die synthetische Anwendung. Aktivitätsmessungen der DERA und Auswertung dieser.

- Entwicklung der Synthesemethodik zur Anwendung der DERA-Membranen in einem Membran-Modul.
- Durchführung und Auswertung der Experimente sowie von Acetaldehyd-Toleranz-Experimenten in Kooperation mit Shuhao Zhang.
- Korrektur und Anpassung des Manuskriptes sowie der Supporting Informations.

Stefan Reinicke, Thilo Fischer, Julia Bramski, Jörg Pietruszka, Alexander Böker, *RSC Adv.* **2019**, 9, 28377-28386: 'Biocatalytically active microgels by precipitation polymerization of *N*-isopropyl acrylamide in the presence of an enzyme'.

Eigenanteil:

- Produktion und Reinigung des Enzyms DERA.
- Aktivitätsmessungen der DERA und Auswertung dieser.
- Lyophilisierung und finale Bereitstellung für die weiteren experimentellen Schritte der DERA.
- Korrektur und Anpassung des Manuskriptes sowie der Supporting Informations.

Shuhao Zhang, Carolin Bisterfeld, Julia Bramski, Nane Vanparijs, Bruno de Geest, Jörg Pietruszka, Alexander Böker, Stefan Reinicke, *Biocon. Chem.* **2018**, 29, 104-116, 'Biocatalytically active thin films via self-assembly of 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase/PNIPAm conjugates'.

Eigenanteil:

- Produktion und Reinigung des Enzyms DERA.
- Aktivitätsmessungen der DERA und Auswertung dieser.
- Lyophilisierung und finale Bereitstellung für die weiteren experimentellen Schritte der DERA.
- Korrektur und Anpassung des Manuskriptes sowie der Supporting Informations.

Julia Bramski, Markus Dick, Thomas Classen, Jörg Pietruszka, *J Biotechnol*, **2017**, 258, 56-58, 'Probing the Acetaldehyde-Sensitivity of 2-Deoxy-ribose-5-phosphate Aldolase (DERA) Leads to Resistant Variants'.

Eigenanteil:

- Planung des Projektes in Kooperation mit Dr. Thomas Classen.
- Mutagenetische Erstellung aller DERA-Mutanten, sowie Expression, Reinigung, Charakterisierung (Aktivitätsbestimmungen, Acetaldehyd-Toleranz, Enantiomerenüberschuss) dieser.

- Entwicklung geeigneter Reinigungsprogramme für die DERA-Konstrukte.
- Durchführung der Acetaldehyd-Toleranz-Experimente für alle DERA-Varianten.
- Auswertung der Experimente in Kooperation mit Dr. Thomas Classen.
- Erstellung der Abbildungen und Schemata sowie Verfassung des Manuskripts und der Supporting Information in Kooperation mit Dr. Thomas Classen.

Konferenzteilnahmen

Flow Chemistry Europe 2020, Cambridge, UK, 3.-4. März 2020, Benedikt Baumer, Julia Bramski, Teresa Friedrichs, Martin Wäscher, Thomas Classen, Jörg Pietruszka, 'Towards a Toolbox for Chemoenzymatic Cascade Reactions in continuous Flow'.

9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Deutschland, 26.-30. August 2018, Julia Bramski, Markus Dick, Thomas Classen, Jörg Pietruszka, 'Acetaldehyde-dependent aldolases: understanding and optimization towards an efficient biocatalyst'.

Abschlussarbeiten

Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse der folgenden Bachelorarbeit:

M. Sc. René Maximilian Schmitz (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), 2018, „Optimierung und biochemische Charakterisierung neuer 2-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolasen aus psychrophilen Organismen“

Die oben genannte Bachelorarbeit wurde unter Betreuung des Autors der vorliegenden Arbeit durchgeführt und wurde entsprechend gekennzeichnet.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Zusammenfassung	3
3	Abstract	9
4	Einleitung	16
5	Kenntnisstand	21
5.1	Acetaldehyd abhängige Aldolasen	21
5.2	Acetaldehyd-abhängige Aldolasen in der organischen Synthese	31
5.3	<i>Flow</i> Chemie	45
5.3.1	Einführung in die <i>Flow</i> Chemie	45
5.3.2	Biokatalysatoren in der <i>Flow</i> Chemie	51
5.3.3	DERA in der <i>Flow</i> Chemie	63
6	Eigene Ergebnisse – Optimierung der DERA für die synthetische Anwendung	67
6.1	Untersuchung der Acetaldehyd-Toleranz	67
6.1.1	Erweiterung der DERA-C47-Mutantenbibliothek: Klonierung & Charakterisierung	67
6.1.2	Untersuchung eines alternativen Inaktivierungsmechanismus: Einfluss Thr-18	77
6.2	Charakterisierung neuer psychrophiler DERAs	82
6.2.1	Expression und Proteinreinigung	82
6.2.2	Bestimmung der Enzymaktivität und des Enantiomerenüberschusses	85
7	Eigene Ergebnisse – DERA als Biokatalysator in der <i>Flow</i> Chemie	87
7.1	Immobilisierung der DERA	88
7.1.1	adsorptive Immobilisierung über einen Polyhistidin-Tag	89
7.1.2	kovalente Immobilisierung über das Halotag™-System	93
7.2	Etablierung eines <i>Flow</i> Systems	96
7.2.1	Optimierung der Synthese des Mono-Aldolproduktes als neuer DERA-Baustein	96
7.2.2	Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus	106
7.2.3	Synthese des Aldolkondensationsproduktes im kontinuierlichen Reaktionsmodus	110
7.2.4	Untersuchung der in situ Acetaldehyd-Bereitstellung im kontinuierlichen System	113
8	Zusammenfassung und Ausblick	115
8.1	Acetaldehyd-toleranz der DERA: Einfluss der Positionen Cys-47 und Thr-18	115
8.2	Untersuchung unbekannter psychrophiler DERAs: Zugang zu einem effizienten Biokatalysator?	117
8.3	DERA als Biokatalysator in der organischen <i>Flow</i> Synthese	119
8.4	Ausblick	126
8.4.1	DERA als Biokatalysator – weiterer Optimierungsbedarf?	126
8.1.1	DERA in der synthetischen <i>Flow</i> Chemie	128

9	Experimenteller Teil	135
9.1	Materialien	135
9.1.1	Geräte und Software	135
9.1.2	Chemikalien, Enzyme und Fertigkits	137
9.1.3	Medien und Stammlösungen	137
9.1.4	Mikroorganismen, Plasmide und Oligonukleotide	138
9.2	Molekular- und Mikrobiologische Methoden	140
9.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese mittels Polymerasekettenreaktion	140
9.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	141
9.2.3	Ligation und Restriktionsverdau	142
9.2.4	Plasmidisolierung	142
9.2.5	DNA- Konzentrationsbestimmung	142
9.2.6	DNA-Sequenzierungen	143
9.2.7	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen	143
9.2.8	Lagerung und Kultivierung von Bakterienstämmen	144
9.3	Proteintechniken	145
9.3.1	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	145
9.3.2	Zellaufschluss	145
9.3.3	Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	145
9.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	146
9.3.5	SDS-PAGE	147
9.3.6	DERA-Aktivitätsassay	148
9.3.7	Selektivitätsassay in Aldolrichtung	149
9.3.8	Aktivitätsbasierte Halbwertszeitmessung: Enzymstabilität bezüglich Acetaldehyd und Crotonaldehyd	150
9.3.9	Lyophilisierung von HaloTag-DERA _{EC}	151
9.3.10	Immobilisierung mittels Halotag TM -System	151
9.4	Chemische Methoden	152
9.4.1	Lösungsmittel	152
9.4.2	Chromatographie	152
9.4.3	Spezifischer Drehwert	153
9.4.4	Spektroskopische Methoden	153
9.4.5	Flow-Geräte	154
9.4.6	Response-Faktor Analyse	155
9.4.7	Bestimmung der relativen Umsätze mittels GC	158
9.5	Synthesevorschriften	158
9.5.1	Synthese von (<i>R</i>)-3-Hydroxyoctanal (6): Isolation & Optimierung	158
9.5.2	Synthese von (<i>R</i>)-Hydroxyoctansäure (7)	159

9.5.3	Synthese von (<i>R</i>)-Octan-1,3-diol (8)	161
9.5.4	Synthese von (6 <i>R</i>)-Undec-1-en-4,6-diol (9)	162
9.5.5	Synthese von (<i>R</i>)-1-(Benzylamino)octan-3-ol (10)	163
9.5.6	Synthese von (<i>E</i>)-Oct-3-enal (11)	164
10	Anhang	166
10.1	Gen- und Proteinsequenzen	166
10.1.1	Dera _{EC} (<i>E. coli</i>)	166
10.1.2	HaloTag-DERA _{EC} C47M	167
10.1.3	DERA _{ES} (<i>E. sibiricum</i>) mit HisTag (N-terminal)	168
10.1.4	DERA _{PH} (<i>P. haloplanktis</i>) mit HisTag (N-terminal)	169
10.1.5	DERA _{PI} (<i>P. ingrahamii</i>) mit HisTag (N-terminal)	169
10.2	Optimierung des Konstruktes des Fusionsenzyms Halotag-DERA _{EC} -C47M	171
10.2.1	getestete Spacer-Sequenzen	171
10.2.2	Effekt diverser Spacer-Sequenzen auf die Enzymaktivität	172
10.3	Experimenteller Aufbau der Flow-Apparatur	174
10.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen	175
10.4.1	Factorial Design of Experiments	175
10.4.2	Response-Surface-Design	176
10.4.3	Screening der Flussrate für DERA _{EC} -C47V	179
10.5	GC Chromatogramme	180
10.6	NMR-Spektren	180
10.7	NMR Spektren der Zielverbindungen	183
10.7.1	(<i>R</i>)-Octan-1,3-diol (8)	183
10.7.2	(<i>R</i>)-Hydroxyoctansäure (7)	185
10.7.3	(6 <i>R</i>)-Undec-1-en-4,6-diol (9)	187
10.7.4	(<i>R</i>)-1-(Benzylamino)octan-3-ol 10	189
10.7.5	(<i>E</i>)-Oct-3-enal 11	191
11	Literaturverzeichnis	193
12	Formelregister	207
13	Danksagung	208
14	Erklärung	211

1 ABKÜRZUNGEN

ORGANISMEN

Colwellia psychrerythraea, *C. psychrerythraea*, CP
Escherichia coli, *E. coli*, EC
Exiguobacterium sibiricum, *E. sibiricum*, ES
Pseudoalteromonas haloplanktis, *P. haloplanktis*, PH
Psychromonas ingrahamii, *P. ingrahamii*, PI
Rhodococcus rhodochrous, *R. rhodochrous*
Shewanella halifaxensis, *S. halifaxensis*, SH

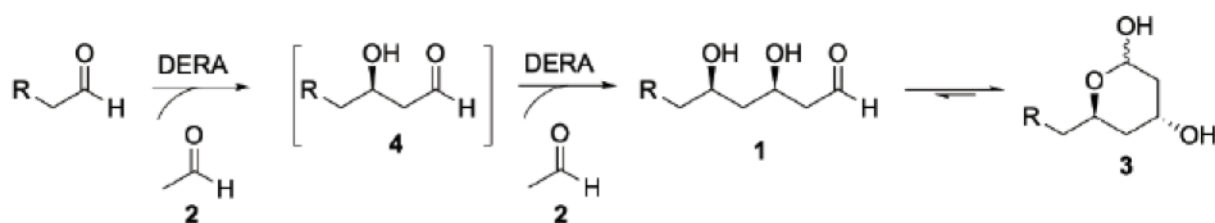
ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

AcA	Acetaldehyd
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
D5P	2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat
DAIB	Diacetoxiodbenzol
DV	Diastereomerenverhältnis
deo _{CEC}	<i>E. coli</i> DERA kodierendes Gen
DERA	2-Desoxy-D-ribose-5-phosphat Aldolase
DERA _{CP}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>C. psychrerythraea</i>
DERA _{EC}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>E. coli</i>
DERA _{ES}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>E. sibiricum</i>
DERA _{PI}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>P. ingrahamii</i>
DERA _{PH}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>P. haloplanktis</i>
DERA _{SH}	2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus <i>S. halifaxensis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
2,4-DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DoE	<i>design of experiments</i>
DpnI	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
DRP	2-Desoxyribose-5-phosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>enzyme commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenverhältnis
FR	Flussrate (engl. <i>flow rate</i>)
G3P	Glyceraldehyd-3-phosphat
GDH/TPI	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Ni-NTA	Nickel- <i>Nitrilotriacetic acid</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PNIPAm	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TEA	Triethanolamin
TB	<i>terrific broth</i>
TIM	Triosephosphatisomerase
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
v/v	<i>volume per volume</i>
U	Unit (Enzymeinheit)
ZFRE	zellfreier Rohextrakt

2 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Optimierung und Anwendung der Acetaldehyd-abhängigen Aldolase (DERA) für und in der organischen Synthese. C–C-bindungsknüpfende Enzyme, wie die 2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase, bilden eine der wichtigsten Enzymklasse in der synthetischen Anwendung von Biokatalysatoren.^[1, 2] Die DERA zeichnet sich besonders durch ihre Fähigkeit der Synthese von chiralen Bausteinen aus. Ihre sequenzielle Aldolreaktion zum doppelten Aldolprodukt **1**, bei der zwei stereogene Zentren aufgebaut werden, wurde bereits erfolgreich in der Industrie zur Synthese von Statin-Seitenketten etabliert.^[3, 4] Das Enzym verwendet Acetaldehyd (**2**) als Nukleophil (Donor) und einen elektrophilen Aldehyd zur Bildung einer Aldolstruktur. Da das gebildete Aldolprodukt wiederum ein elektrophiler Aldehyd ist, kann ein weiteres Molekül Acetaldehyd (**2**) addiert werden und es entsteht das doppelte Aldolprodukt **1**. Durch die anschließende spontane Zyklisierung zum Lactol **3** wird eine weitere Aldoladdition zurückgedrängt (vgl. Schema 1). Das einfache Aldolprodukt **4** („Monoaldolprodukt“) hingegen macht die Isolation aufgrund seiner hohen Reaktivität besonders herausfordernd. Dennoch stellt es ein interessantes Strukturmotiv und reizvoller Baustein für die Naturstoffsynthese dar,^[5-9] weshalb es im Fokus des synthetischen Teils dieser Arbeit steht. Zudem erschwert und limitiert die mangelnde Toleranz der DERA gegenüber ihrem eigenen Substrat Acetaldehyd (**2**) ihren Einsatz in der Synthese stark.



Schema 1: Sequenzielle enantioselektive Aldolreaktion durch DERA-Katalyse.

Die eigenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können in zwei Projekte gegliedert werden, die in den folgenden Kapiteln 6 und 7 separat behandelt werden. Dabei war es das Ziel, durch Kombination beider Projekte die DERA als Biokatalysator zu verbessern. Für ein besseres Verständnis von Aktivität und Substrattoleranz wurden weiterführende strukturbasierte Untersuchungen durchgeführt, um im Idealfall eine optimierte DERA-Variante bereitstellen zu können. Dafür wurde zunächst die Problematik der DERA hinsichtlich ihrer mangelnden Acetaldehyd-Toleranz adressiert. Der Fokus lag zum einen auf weiterführenden mechanistischen Studien der Ergebnisse von Markus Dick^[10] sowie der Ergebnisse der

eigenen Masterarbeit,^[11] welche sich mit dem Einfluss der Aminosäureposition 47 der *E. coli* DERA befassten. Hierzu wurde eine Reihe von DERA-Mutanten mit Aminosäureaustausch des Cys-47 erstellt und charakterisiert (vgl. Tabelle 1). Jedoch zeigten nicht alle Varianten die erwartete Acetaldehyd-Toleranz. Neben der von Markus Dick charakterisierten Acetaldehyd-toleranten Variante DERA_{EC}-C47M wurde schließlich die Variante DERA_{EC}-C47V aufgrund ihrer vielversprechenden Acetaldehyd-Toleranz [$T_{1/2}(300 \text{ mM Acetaldehyd}) = 3.3 \text{ h}$] und nahezu Wildtyp-Aktivität für die weitere synthetische Anwendung ausgewählt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Untersuchung der in dieser Arbeit erstellten DERA-Varianten.

DERA _{EC} - Variante	spez. Akt. [U/mg]	$T_{1/2}$ (300 mM Acetaldehyd)	$T_{1/2}$ (20 mM Crotonaldehyd)	ee [%]
C47F	3.4 ± 0.3	1.4 h	7.5 min	86.4 ± 0.2
C47K	0.5 ± 0.1	1.3 h	16 min	72.4 ± 0.1
C47R	0.6 ± 0.1	1.7 h	19 min	71.1 ± 0.7
C47V	18.4 ± 0.6	3.3 h	1 h	83 ± 0.2
C47G-T18V	0.9 ± 0.1	1 min	16 min	n.b.
C47M	7.9 ± 0.1	n.b.	14 h	85 ± 0.1
wt	20.09 ± 0.7	37.5 min	3.7 min	85 ± 0.1

Neben diesem mutagenetischen Ansatz wurde nach alternativen DERAs aus psychrophilen Organismen gesucht. Psychrophile Enzyme zeichnen sich im Allgemeinen durch eine höhere Enzymaktivität und stärkere Flexibilität aus.^[12-14] Dies könnte sich positiv auf die biokatalytische Anwendung auswirken. Im Zuge dessen wurden drei psychrophile DERAs im Rahmen der Bachelorarbeit von René Schmitz aus den Organismen *Exiguobacterium sibiricum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* und *Psychromonas ingrahamii* näher untersucht. Trotz ihrer herausragenden Enzymaktivität, wiesen alle drei psychrophilen DERAs negative Auswirkungen auf die Enantioselektivität auf, weshalb die drei Aldolasen in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt wurden.

Schließlich befasste sich das zweite Projekt mit der konkreten Anwendung der DERA, nämlich der DERA-Varianten DERA_{EC}-C47M und insbesondere DERA_{EC}-C47V. Der Schwerpunkt lag auf der Etablierung eines kontinuierlichen Reaktionsaufbaus, um die DERA als Biokatalysator in der Flow-Chemie anzuwenden. Besonders in der DERA-katalysierten Aldolreaktion kann der Flow-Modus Zugang zu dem bisher unzugänglichen Monoaldolprodukt **4** ermöglichen. Dazu wurde zunächst eine geeignete Immobilisierungsstrategie für die DERA entwickelt. Für die Immobilisierung wurde in Kooperation mit Johannes Döbber des Instituts für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie) des Forschungszentrums Jülich eine kovalente Methode mithilfe vom

HaloTag™-System gewählt, nachdem ein adsorptiver Ansatz aufgrund von starken *Leaching*-Effekten verworfen wurde. Auf diese Weise konnten Festbettreaktoren mit der immobilisierten DERA für die Synthese im *Flow* bereitgestellt werden.

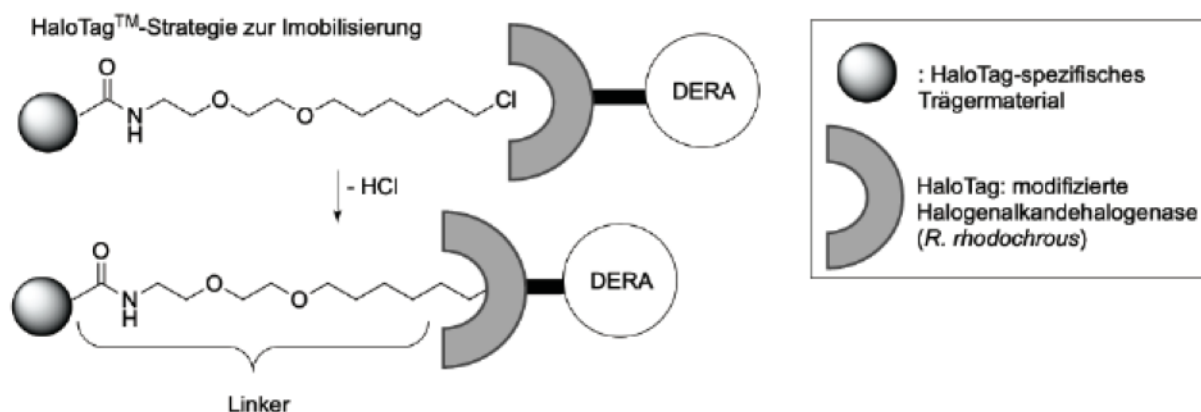
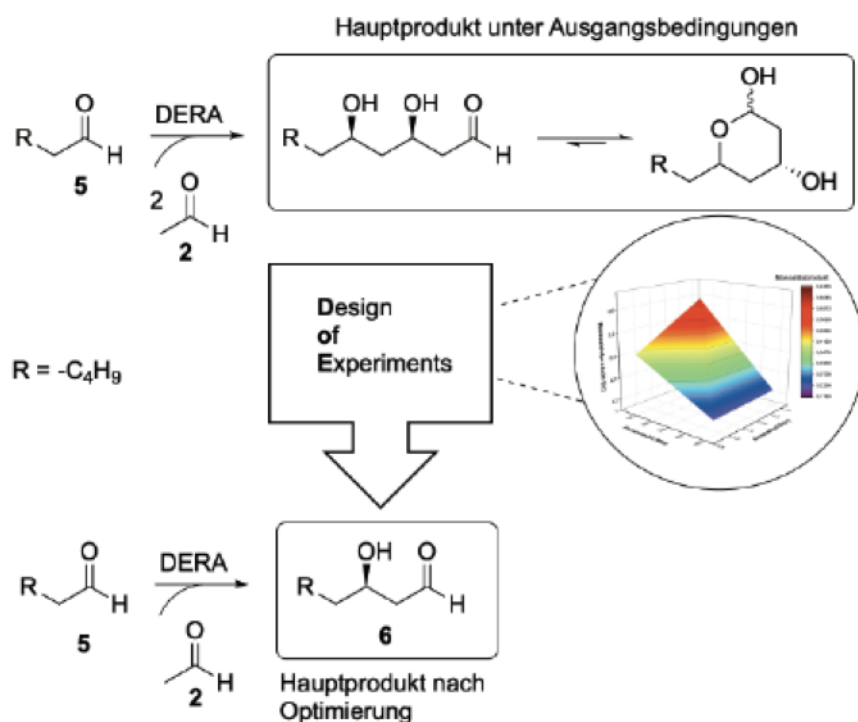


Abbildung 1: Immobilisierungsstrategie der DERA mit dem HaloTag™-System. Zentraler Schritt ist hierbei die Substitution des Chloratoms des Linkers durch eine Aspartat-Funktionalität des HaloTag™ (hier vereinfacht als grauer Halbkreis dargestellt) und die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Linker und HaloTag™.

Anschließend wurde ein *Flow*-System zur Synthese von 3-(*R*)-Hydroxyaldehyden (das Mono-Aldol-Produkt **6** der DERA), also eine Verschiebung des Produktverhältnisses von der Seite des doppelten DERA-Produktes **1** als ursprüngliches Hauptprodukt auf die Seite des Intermediates **6**, entwickelt. Für die Optimierung wurde ein systematischer Ansatz mittels *Design of Experiments* (DoE) gewählt. Hexanal (**5**) diente als Modellsubstrat. Drei essenzielle Parameter wurden betrachtet: die Substratkonzentrationen von Acetaldehyd (**2**) und Hexanal (**5**) sowie die Flussrate und damit die Kontaktzeit (= Reaktionszeit) zwischen Substrat und Enzym.



Schema 2: Grundlegendes Konzept zur Verschiebung des initialen Produktverhältnisses der DERA-Reaktion zur gezielten Synthese des Monoaldolproduktes 6 mittels *Design of Experiments* (DoE).

Nach mehreren Optimierungsrunden wurden die besten Ergebnisse mit der HaloTag-DERA_{EC}-C47V in einem 10 cm langen Festbettreaktor ($\varnothing$ 3 mm, 100 mm) bei einer Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$, 0.2 mol/L Acetaldehyd (2) und 3 Äquivalenten Hexanal (5) erreicht (vgl. Abbildung 2). Dabei konnte ein Umsatz von bis zu 90 % erzielt werden, von dem 73 % das gewünschte Monoaldolprodukt 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) bildete. Die Bildung des Aldolkondensationsprodukt (*E*)-Octenal (11) als Nebenprodukt konnte durch die Verwendung dieses einfachen Durchflusssystems ebenfalls verringert werden.

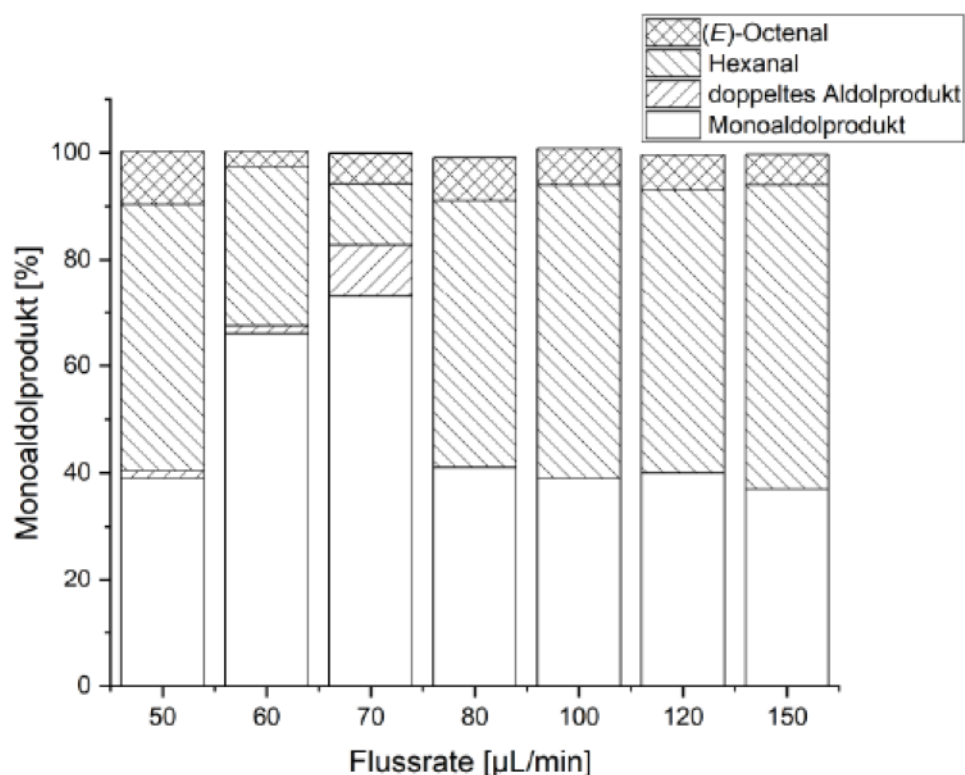
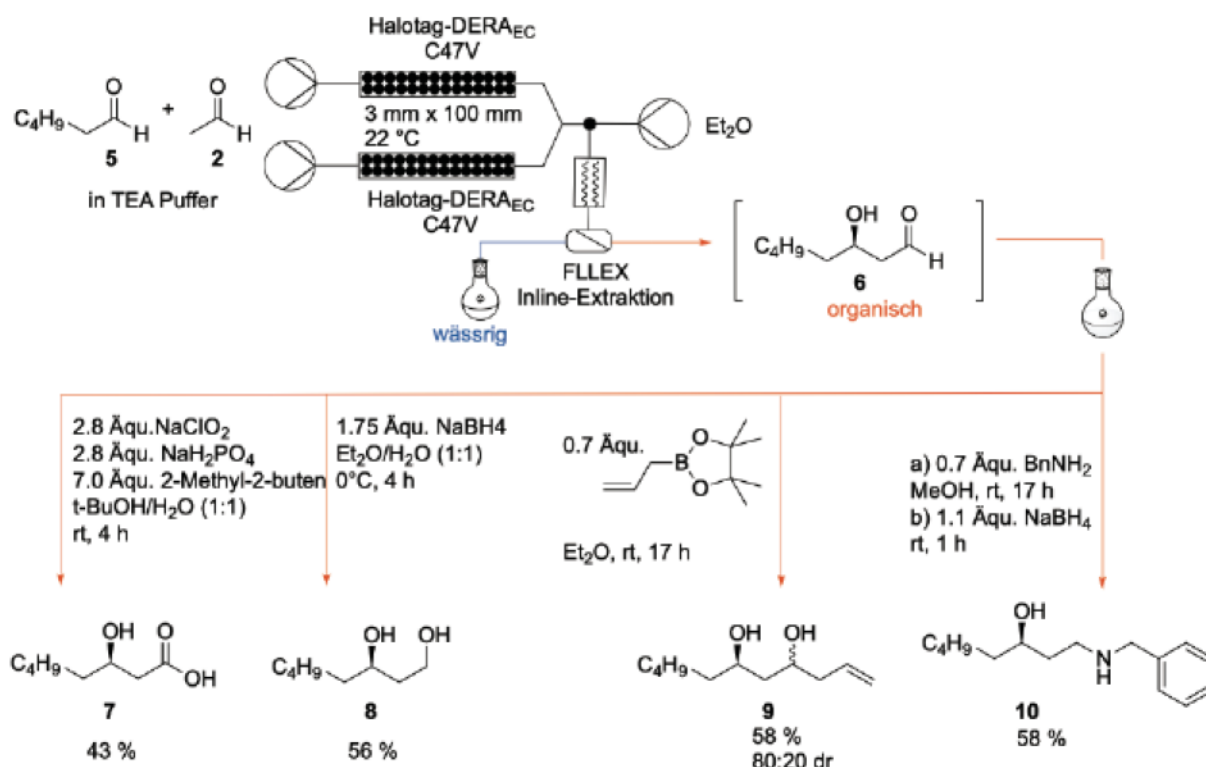


Abbildung 2: relativer Umsatz zum gewünschten Monoaldolprodukt 6 (ohne Muster), Nebenprodukt (*E*-Octenal (gekreuztes Muster) und doppeltem Aldolprodukt (linksgängige Querstreifen) sowie verbliebenes Substrat Hexanal (5) (rechtsgängige Querstreifen), welcher bei dem Screening der Flussrate bei der Verwendung der HaloTag-DERA_{EC}-C47V als Biokatalysator (Ø 3, L 100 mm) erzielt worden ist.

Das etablierte Syntheseprotokoll des Monoaldolproduktes 6 wurde anschließend um insgesamt fünf Reaktionskaskaden in kontinuierlichem und semi-kontinuierlichem Modus erweitert. Um die Menge an Monoaldolprodukt 6 aus dem ersten DERA-Reaktionsschritt zu erhöhen, wurden zwei DERA-Festbettreaktoren parallel verwendet und die Produktgemische anschließend über ein T-Stück vereinigt für die Folgereaktion. Vier Reaktionen, darunter eine *Pinnick*-Oxidation zur Synthese der β -Hydroxyoctansäure (7), eine Reduktion mit NaBH₄ zum entsprechenden 1,3-Diol 8, eine Allylierungsreaktion und eine Aminierung zu den entsprechenden Produkten 9 und 10 wurden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus erfolgreich umgesetzt (vgl. Schema 3).



Schema 3: Experimenteller Aufbau der semi-kontinuierlichen Zwei-Stufen-Synthesen. An die in wässrigem Medium durchgeführte DERA-katalysierte Synthese des Monoaldolproduktes **6** wurde eine Inline-Extraktion angeschlossen. Die organische Phase (rot), wurde in einem Kolben für Konsekutivreaktionen im Batch-Modus gesammelt. Angegeben sind die Ausbeuten der isolierten Produkte nach säulenchromatographischer Reinigung. Bestätigung des Konfiguration mittels Drehwertbestimmung.

Adressiert wurde zudem die gezielte Aldolkondensation zum entsprechenden α,β -ungesättigten Aldehyd **11**, ein Strukturmotiv vieler Aromastoffe. Durch die Kombination mit einer Inline-Extraktion und einem Festbettreaktor mit basischem Ionenaustauschharz A-21 wurde ein eleganter Syntheseweg eröffnet. Da im Fall der HaloTag-DERA_{EC}-C47M-Variante das Produktverhältnis bereits stärker auf der Seite des Aldolkondensationsproduktes **11** lag, wurde im Falle dieser Synthese die Halotag-DERA_{EC}-C47V ausgetauscht.



Schema 4: Experimenteller Aufbau der kontinuierlichen zweistufigen Synthese des α,β -ungesättigten Aldehyds (*E*)-Octenal (11) im Flow-Modus.

Die gezeigten Ergebnisse erweitern den Einsatz der DERA in der organischen Chemie, insbesondere in der *Flow*-Chemie und eröffnen die Möglichkeit eines neuen DERA-Bausteins des Monoaldolproduktes 4. Damit konnte ein Grundstein zur gezielten Synthese von 3-(*R*)-Hydroxyaldehyden als Ausgangspunkt für weitere Reaktionskaskaden gelegt werden.

3 ABSTRACT

This doctoral thesis deals with the optimization and application of acetaldehyde-dependent aldolase (DERA) for and in organic synthesis. C–C bond linking enzymes, such as 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase, are one of the most important enzyme classes in synthesis.^[1, 2] The DERA is particularly characterized by its ability to synthesize chiral building blocks. Its sequential aldol reaction to the double aldol product 1, in which two stereogenic centers are formed in one reaction-cascade, has already been successfully established in industry for the synthesis of statin side chains. The enzyme uses acetaldehyde (2) as a nucleophile (donor) and an electrophilic aldehyde to form an aldol structure. Since the aldol formed is in turn an electrophilic aldehyde, a further acetaldehyde molecule (2) can be added and the double aldol product 1 is formed. The subsequent spontaneous cyclization to lactol 3 pushes back further aldol addition (see Figure 1). The single aldol product 4 ("monoaldol product"), on the other hand, is particularly challenging to isolate due to its high reactivity. Nevertheless, it represents an interesting structural motif and an attractive building block for natural product synthesis,^[3–7] which is why it is the focus of the synthetic part of this work. However, the lack of tolerance of DERA to its own substrate acetaldehyde (2) severely complicates and limits its use in synthesis.

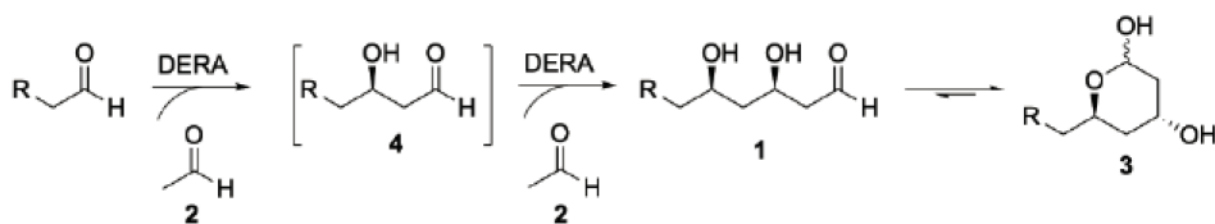


Figure 1: Sequential enantioselective aldol reaction catalyzed by DERA.

The results of the present work can be divided into two projects, which are dealt with separately in the following chapters 6 and 7. The aim of the work was to improve DERA as a biocatalyst by combining both projects. For a better understanding of activity and substrate tolerance, further structure-based investigations were carried out in order to ideally provide an optimized DERA variant. To this end, the problems of DERA with regard to its lack of acetaldehyde tolerance were first addressed. On the one hand, the focus was on further mechanistic studies of the results of *Markus Dick*^[8] and the results of the previous master thesis^[9] which deal with the influence of amino acid position 47 of the *E. coli* DERA. For this purpose, a series of DERA mutants with amino acid replacement of Cys-47 were created and characterized (see Table 1). However, not all variants showed the expected acetaldehyde resistance. In addition to the acetaldehyde-resistant variant DERA_{EC}-C47M characterized by *Markus Dick*, the variant DERA_{EC}-C47V was selected for further synthetic application due to its promising acetaldehyde tolerance ($T_{1/2}$ (300 mM acetaldehyde) = 3.3 h) and almost no loss of enzymatic activity.

Table 1: Results of the study on the DERA variants examined in this work.

DERA _{EC} variant	spec. act. [U/mg]	$T_{1/2}$ (300 mM acetaldehyde)	$T_{1/2}$ (20 mM crotonaldehyde)	ee [%]
C47F	3.4 ± 0.3	1.4 h	7.5 min	86.4 ± 0.2
C47K	0.5 ± 0.1	1.3 h	16 min	72.4 ± 0.1
C47R	0.6 ± 0.1	1.7 h	19 min	71.1 ± 0.7
C47V	18.4 ± 0.6	3.3 h	1 h	83 ± 0.2
C47G-T18V	0.9 ± 0.1	1 min	16 min	n.b.
C47M	7.9 ± 0.1	n.b.	14 h	85 ± 0.1
wt	20.09 ± 0.7	37.5 min	3.7 min	85 ± 0.1

In addition to this mutagenetic approach, alternative DERAs from psychrophilic organisms were sought, as psychrophilic enzymes are generally characterized by higher enzyme activity and greater flexibility.^[12-14] This could have a positive effect on the biocatalytic application. In the course of this, three psychrophilic DERAs from *Exiguobacterium sibiricum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* and *Psychromonas ingrahamii* were investigated in more

detail as part of *René Schmitz's* bachelor thesis. Despite their outstanding enzyme activity, all three psychrophilic DERAs showed significant negative effects on enantioselectivity, which is why these DERAs were not pursued further in this work.

Finally, the second project dealt with the application of DERA in synthesis, namely the application of the DERA variants DERA_{EC}-C47M and in particular DERA_{EC}-C47V. The focus was on establishing a continuous reaction set-up in order to use DERA as a biocatalyst in flow chemistry. Especially in the DERA-catalyzed aldol reaction, the flow mode can provide access to the previously inaccessible monoaldol product **4**. To this end, a suitable immobilization strategy for DERA was first developed. In cooperation with *Johannes Döbber* of the Institute of Bio- and Geosciences (IBG-1: Biotechnology) at Forschungszentrum Jülich, a covalent method using the HaloTagTM system was chosen for immobilization after an adsorptive approach was rejected due to strong leaching effects. In this way, fixed-bed reactors with the immobilized DERA could be used for synthesis in the flow.

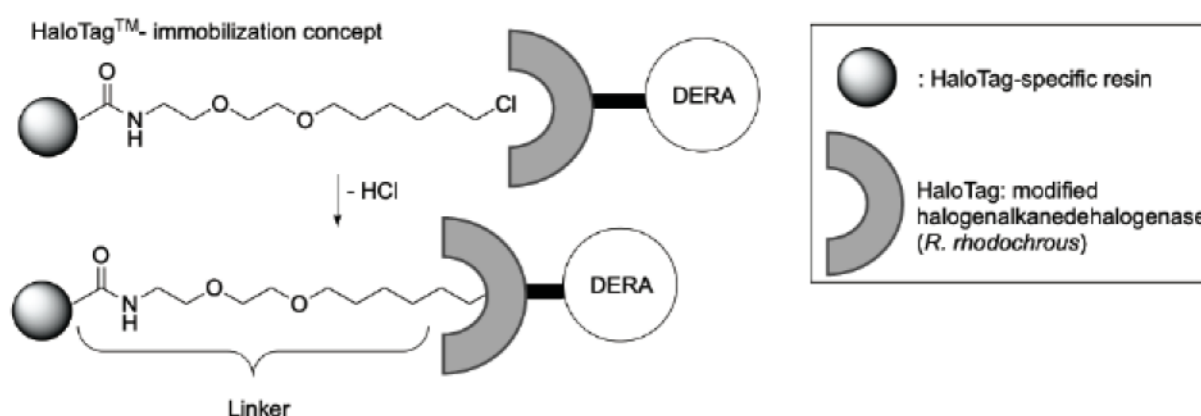


Figure 2: Immobilization strategy with the HaloTag™-system. The central step here is the substitution of the chlorine atom of the linker by an aspartate functionality of the HaloTag™ (shown here simplified as a gray semicircle) and the formation of a covalent bond between the linker and HaloTag™.

Subsequently, a flow system for the selective synthesis of 3-(*R*)-hydroxyaldehydes **4** was developed, i.e. switching the product ratio from the side of the initial main product product **1** to the side of the intermediate **4**. A systematic approach using Design of Experiments (DoE) was chosen for the optimization. Hexanal (**5**) served as a model substrate. Three essential parameters were considered: the substrate concentrations of acetaldehyde (**2**) and hexanal (**5**) as well as the flow rate and thus the contact time (= reaction time) between substrate and enzyme.

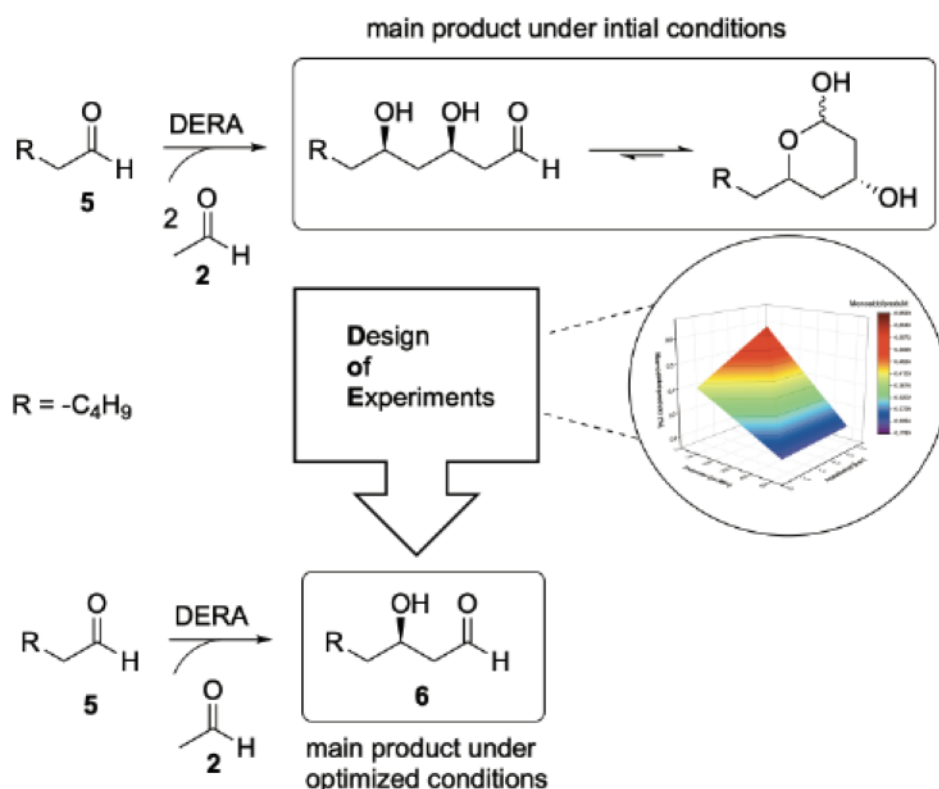


Figure 3: Basic concept for switching the initial product ratio of the DERA reaction for the targeted selective synthesis of the monoaldol product 6 by means of Design of Experiments (DoE).

After several rounds of optimization, the best results were achieved with the HaloTag-DERA_{EC-C47V} in fixed-bed reactor (Ø 3 mm, 100 mm) at a flow rate of 70 µL/min, 0.2 mol/L acetaldehyde (2) and 3 equivalents of hexanal (5) (see Figure 4). A conversion of up to 90 % was achieved, of which 73 % formed the desired monoaldol product 3-(*R*)-hydroxyoctanal (6). The formation of the undesired aldol condensation product (*E*)-octenal (11) was also reduced by using this simple flow system.

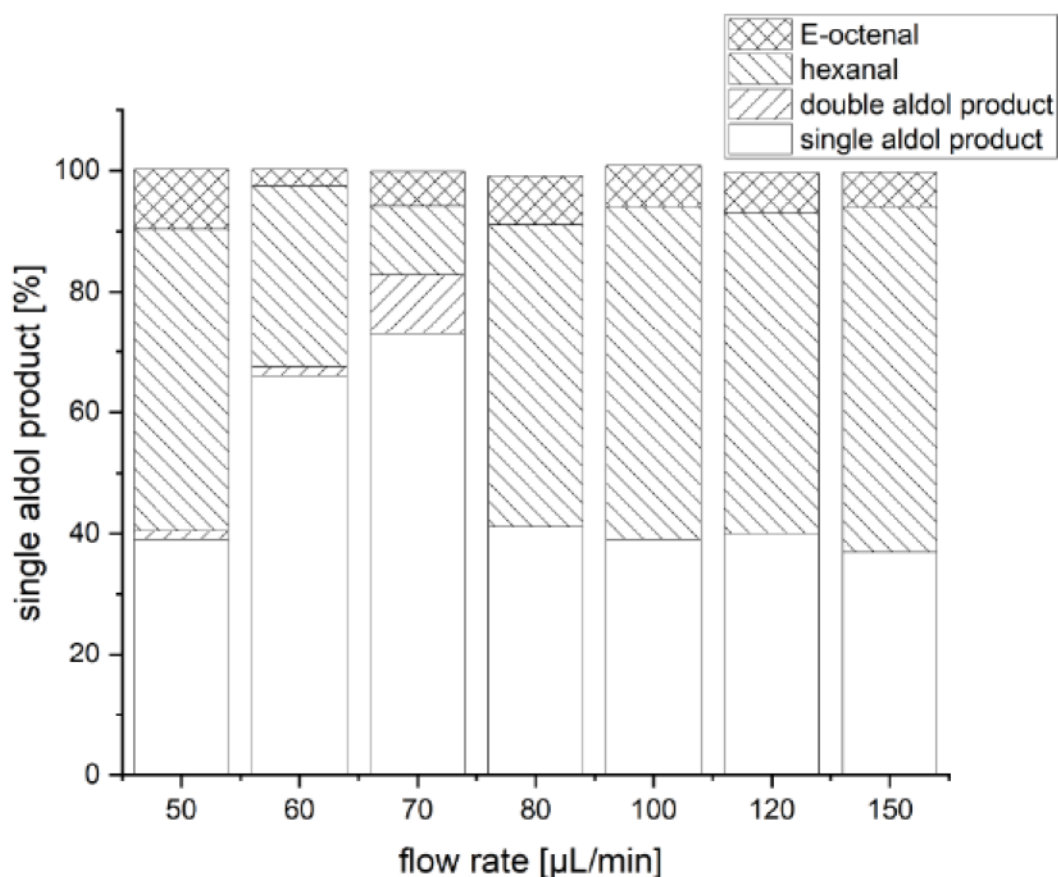


Figure 4: Relative conversions towards the desired mono aldol product **6** (no pattern), the side-product (*E*-octenal **11** (cross pattern) and the double aldol product (left-handed stripes) as well as remaining substrate hexanal (**5**) (right-handed stripes), which are determined in the screening of the flow rate using HaloTag-DERA_{EC}-C47V (Ø 3, L 100 mm).

The established synthesis protocol of the monoaldol product **6** was then extended in the form of five reaction cascades in continuous and semi-continuous mode. In order to increase the amount of monoaldol product **6** from the first reaction step, two DERA fixed-bed reactors were used in parallel and the product mixtures were then combined via a T-piece for the subsequent reaction. Four reactions, including a *Pinnick* oxidation to synthesize the β -hydroxyoctanoic acid (**7**), a reduction with NaBH₄ to the corresponding 1,3-diol **8**, an allylation reaction and an amination resulting in the corresponding products **9** and **10** were successfully carried out in semi-continuous reaction mode.

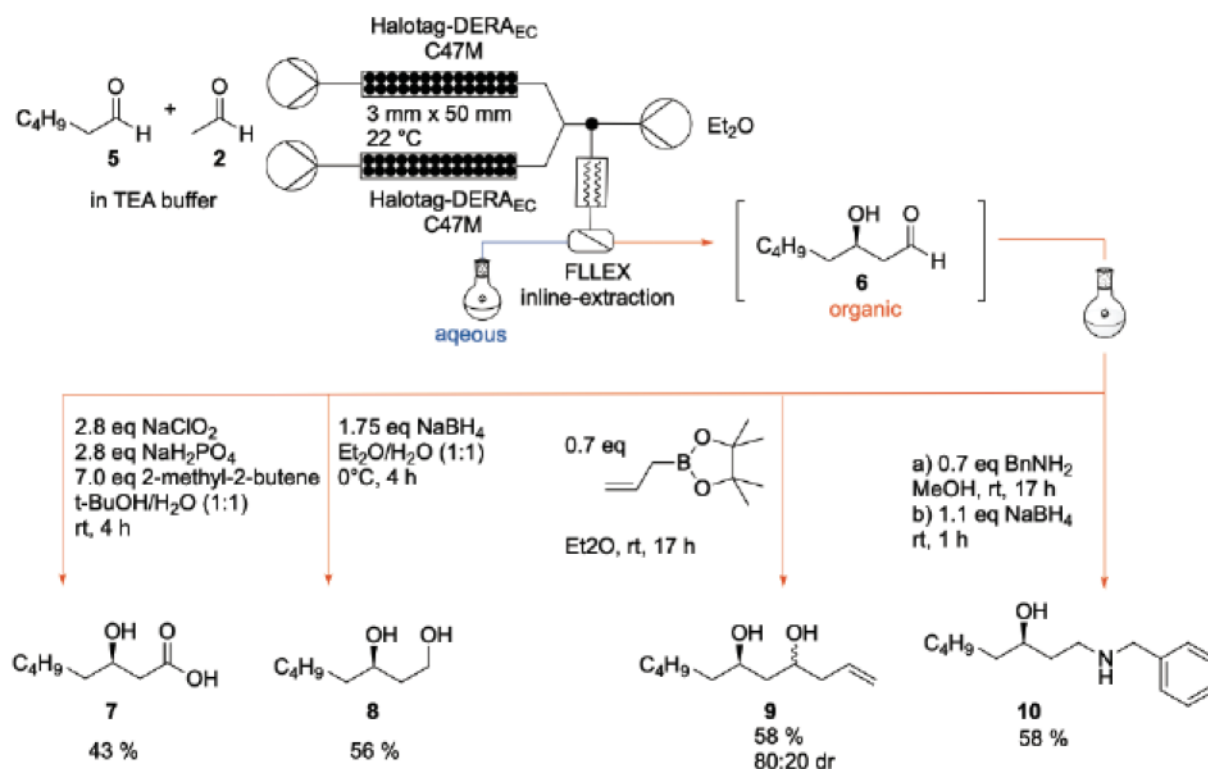


Figure 5: Experimental set-up of the semi-continuous two-step syntheses. The DERA-catalyzed synthesis of the monoaldol product **6** carried out in aqueous medium was followed by an inline extraction using the FLLEX system. The organic phase (red) was collected in a flask for further reaction in batch mode. The isolated yields after column chromatographic purification are shown. The configuration was confirmed by means of rotational value determination.

The targeted aldol condensation to the α,β -unsaturated aldehyde, a structural motif of many aroma compounds, was also addressed. The combination with an inline extraction and a fixed bed reactor with basic ion exchange resin A-21 opened up an elegant synthesis route. Since in the case of the HaloTag-DERA_{EC}-C47M variant the product ratio was already more on the side of the aldol condensation product, the HaloTag-DERA_{EC}-C47V was exchanged in this synthesis.



Figure 6: Experimental set-up of the continuous flow mode two-step synthesis of α,β -unsaturated aldehyde (*E*)-octenal (11).

The results expand the further use of DERA in organic chemistry, especially in flow chemistry, and open up the possibility of a new DERA building block of the monoaldol product. This has laid the foundation for the targeted synthesis of 3-(*R*)-hydroxyaldehydes as a starting point for further reaction cascades.

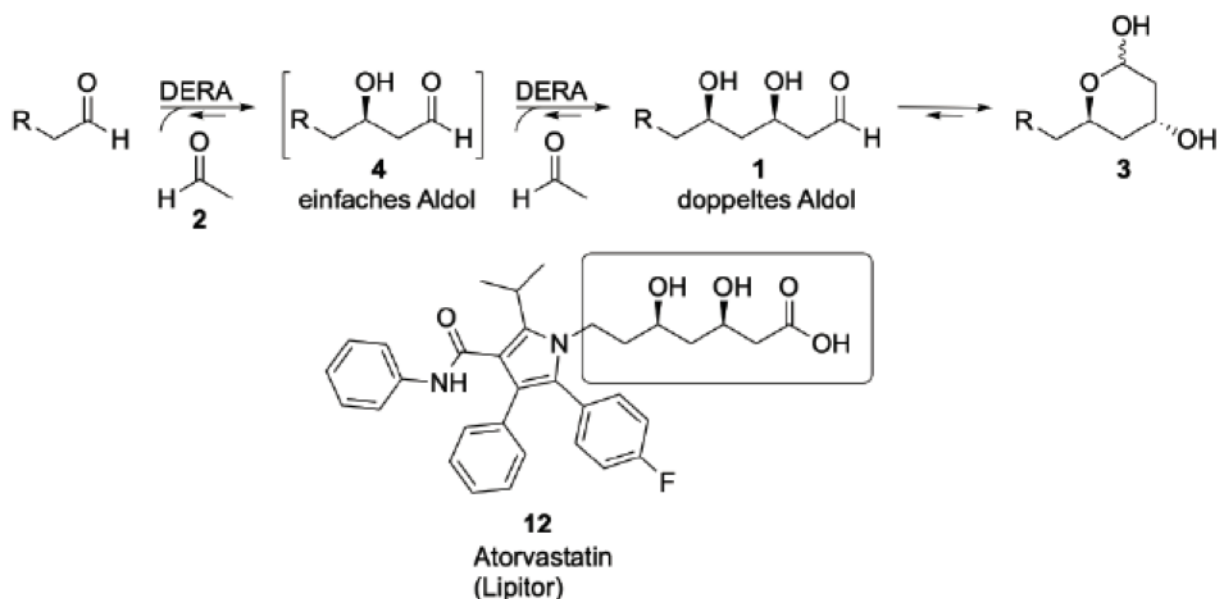
4 EINLEITUNG

„Wer nichts als Chemie versteht, versteht auch die nicht recht“, so Georg Christoph Lichtenberg, ein deutscher Physiker.^[15] Lichtenberg bringt damit zum Ausdruck, was für viele Wissenschaftler heutzutage essentiell ist: Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit. So ist die Physik unerlässlich für das Studium der Chemie, die Biologie nur schwer zu begreifen ohne ein grundlegendes Verständnis der Chemie. Das Potenzial einer solchen interdisziplinären Mehrsprachigkeit diverser naturwissenschaftlicher Disziplinen verdeutlicht sich beispielsweise bei dem neu etablierten Fachgebiet der Bionik, welche bereits in ihrem Wortlaut die Verschmelzung der Biologie („Bio“-) und Technik („-nik“) abbildet. Um Probleme zu lösen und das Leben zu erleichtern wird Inspiration in der Natur gesucht. Ebenso die Natur zum Vorbild nimmt sich das Grenzgebiet zwischen der organischen Chemie und der Biochemie, die Bioorganik. Seien es nützliche „Produkte“ der Natur in Form von Naturstoffen, welche sich als therapeutisch wirksam erweisen oder ein besonders eleganter Syntheseweg, zu welchem die Natur die Wissenschaft inspiriert, beides wird im Bereich der Bioorganik adressiert.

Eine solcher nützlichen Inspirationen sind Enzyme, kleine Wunderwaffen der Natur. Diese faszinierenden Biokatalysatoren zeichnen sich besonders durch ihre eleganten Transformationen mit hohen Selektivitäten aus und ermöglichen Synthesen, welche mit klassischen chemischen Methoden gar nicht oder nur schwer realisierbar wären. Wissenschaftler haben ihr Potenzial erkannt und für ihre synthetischen Zwecke eingesetzt. Gegenüber der chemischen Gegenspieler, wie beispielsweise Metallkatalysatoren, heben sie sich insbesondere durch ihre hohe Stereo- und Regioselektivität sowie in ihrer vergleichsweise leichten und effizienten Bereitstellung hervor. Zudem kann die Verwendung von Enzymen in der organischen Chemie Möglichkeiten eröffnen, Synthesen bei moderateren Reaktionsbedingungen (z.B. im Hinblick auf Temperatur, Druck, Acidität, Lösungsmittel) zu katalysieren, weshalb die Biokatalyse auch zu den Werkzeugen der „grünen Chemie“ gezählt wird.^[16-18] Diese besondere Klasse der Proteine hat sich sogar als neue Katalysatorklasse etablieren können, wodurch die Bedeutung der Enzyme in der modernen Synthesechemie verdeutlicht wird.^[19-24] Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der Enzyme macht sich der Mensch schon lange zu Nutze. Angefangen beim Bierbrauen, der Herstellung von Hefeteig oder Käse bis hin zu unserer heutigen alltäglichen Verwendung in Form von Waschmitteln oder medizinischen und kosmetischen Enzympräparaten, der Herstellung von Pharmazeutika und Agrar- und Grundchemikalien, die vom Menschen

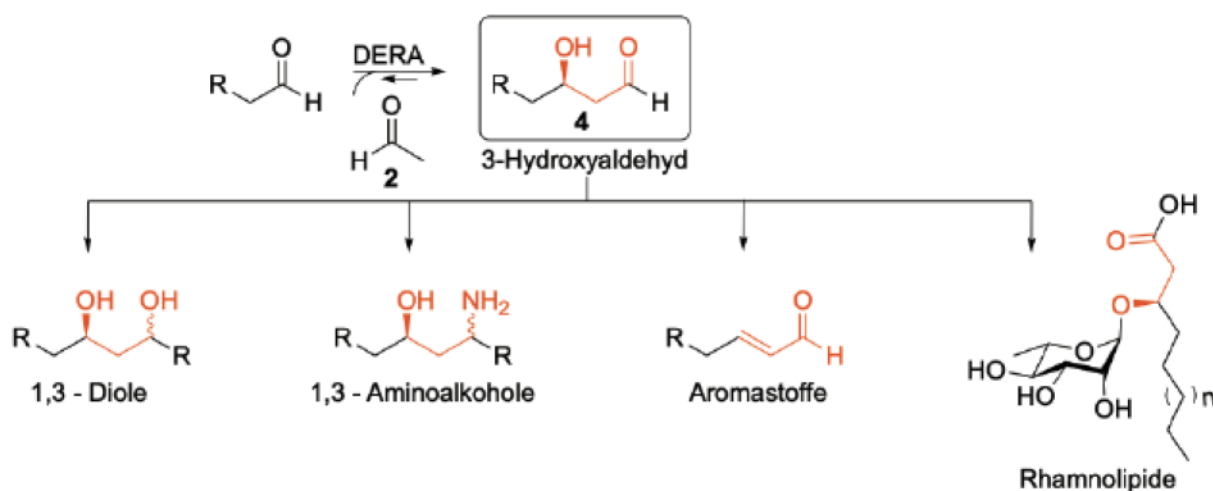
eingesetzte Effektivität und Effizienz der Enzyme ist vielfältig.^[25] Dennoch ist das Potenzial der Enzyme im Einsatz als Biokatalysator in der organischen Synthese noch nicht gänzlich ausgeschöpft. So stellt die Verwendung von Biokatalysatoren die Wissenschaftler auch vor Herausforderungen: Eine eingeschränkte Kompatibilität von Enzymen mit chemischen Substanzen und den in der Regel harschen Reaktionsbedingungen bei Synthesen im Industriemaßstab limitieren ihren Einsatz. Auch ihre hohe Substratspezifität kann das Synthesepportfolio deutlich einschränken.

Eine interessante Enzymklasse, die die Bivalenz zwischen industriellem Potenzial und Herausforderungen bei der Etablierung als Biokatalysator veranschaulicht, ist die Enzymklasse der Aldolasen. Aldolasen gehören zu der Enzymklasse der Lyasen und haben C–C-bindungsknüpfende Eigenschaften. Sie katalysieren Aldolreaktionen und sind damit im Hinblick auf den Aufbau von industriell relevanten Kohlenstoffgerüsten (als häufiger Bestandteil von interessanten Naturstoffen) von Relevanz. Während eine chemische stereogene Kontrolle einer Aldolreaktion über die Verwendung von chiralen Auxiliaren, chiraler Aldehyde als Edukte oder (asymmetrische) Katalyse erzielt werden kann, bieten Aldolasen mit ihrer inhärenten Stereo-, Regio sowie Chemoselektivität eine interessante Alternative zum Aufbau chiraler Aldolverbindungen.^[26-33] Eine industriell bereits verwendete Aldolase ist die Desoxyribose-5-phosphat-aldolase (DERA). Als einziger Vertreter der Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen findet sie Anwendung bei der chemoenzymatischen Synthese des Cholesterinsenkers Atorvastatin (**12**, Lipitor®), welches auf die selektive DERA-katalysierte Synthese von 2,4-Didesoxyhexosen **1** zurückgreift.^[3, 4, 34-39] Diese attraktive Anwendung der DERA in der organischen Synthese beruht auf einer sequenziellen Aldolreaktion, über die zwei neue stereogene Zentren in nur einer Reaktion aufgebaut werden können (vgl. Schema 5). Zu diesem Einsatz hat die Natur die Wissenschaft durch die unter physiologischen Bedingungen ablaufende Aldolspaltung, also eine Retro-Aldolreaktion inspiriert.



Schema 5: Sequenzielle enantioselective Aldolreaktion unter DERA-Katalyse zur Synthese von 2,4-Didesoxyhexosen **1** als Baustein der charakteristischen Statin-Seitenkette, wie sie beispielsweise im Cholesterinsenker Atorvastatin (**12**, Lipitor®) zu finden ist.

Die DERA als Biokatalysator zeigt allerdings Schwächen, welche ihren Einsatz in der organischen Chemie einschränkt. So limitiert ihre natürliche geringe Acetaldehydtoleranz ihren Einsatz in der synthetischen Chemie. Nachdem erste Studien unter Verwendung von molekularbiologischen Optimierungen Erfolge hinsichtlich der mangelnden Toleranz erzielen konnten, zeigt die optimierte DERA-Variante wiederum Schwächen bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität.^[10, 11] Eine ausreichend hohe Enzymaktivität wiederum ist essenziell für eine effiziente biokatalytische Synthese. Darüber hinaus findet bisher lediglich das doppelte Aldolprodukt **1** der DERA synthetische Anwendung, nicht aber das einfache Aldolprodukt **4**. Grund dafür liegt vor allem in der Schwierigkeit der Isolation dieses hochreaktiven Moleküls **4**. Das einfache Aldolprodukt **4**, ein 3-Hydroxyaldehyd, stellt einen häufig in Naturstoffen anzutreffenden und attraktiven Baustein dar (vgl. Schema 6).^[5-9, 40-43]



Schema 6: DERA-katalysiertes einfaches Aldolprodukt (3-Hydroxyaldehyd, 4) als strukturell interessantes Motiv für Aromastoffe basierend auf ungesättigten Aldehyden, Rhamnolipiden oder diversen (biologisch aktiven) Naturstoffen, welche auf Strukturen der 1,3-Diolen oder 1,3-Aminoalkoholen enthalten. Das Strukturelement, welches auf das einfache Aldolprodukt der DERA zurückgeht, ist rot hervorgehoben.

Zudem setzt eine effiziente Nutzung im industriellen Maßstab eine langfristige Stabilität des Biokatalysators, sowie eine Wiederverwendbarkeit voraus, nicht zuletzt auch wegen des wirtschaftlichen Vorteils. Eine mögliche Lösung ist die Immobilisierung des Biokatalysators auf einer Festphase. Die Immobilisierung ermöglicht nicht nur die Anwendung der kontinuierlichen Durchflusschemie („Flow“ Chemie), welche wiederum zahlreiche neue Wege der Reaktionskaskaden im Sinne eines „Baukasten“-Prinzips eröffnen kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Immobilisierung von Enzymen positive Auswirkungen auf die Stabilität des Enzyms haben kann.^[44-46] Die Verwendung der kontinuierlichen Flow Chemie, welche bereits Einzug im Bereich der Massen- und Feinchemie gehalten hat,^[47] bietet einige Vorteile gegenüber der klassischen Batch-Synthese: Eine strenge Kontrolle der Reaktionsparameter kann eine schnellere Reaktionsoptimierung, kürzere Reaktionszeiten, geringere Kosten und Zugang zu neuen Reaktionsprodukten ermöglichen.^[48-53]

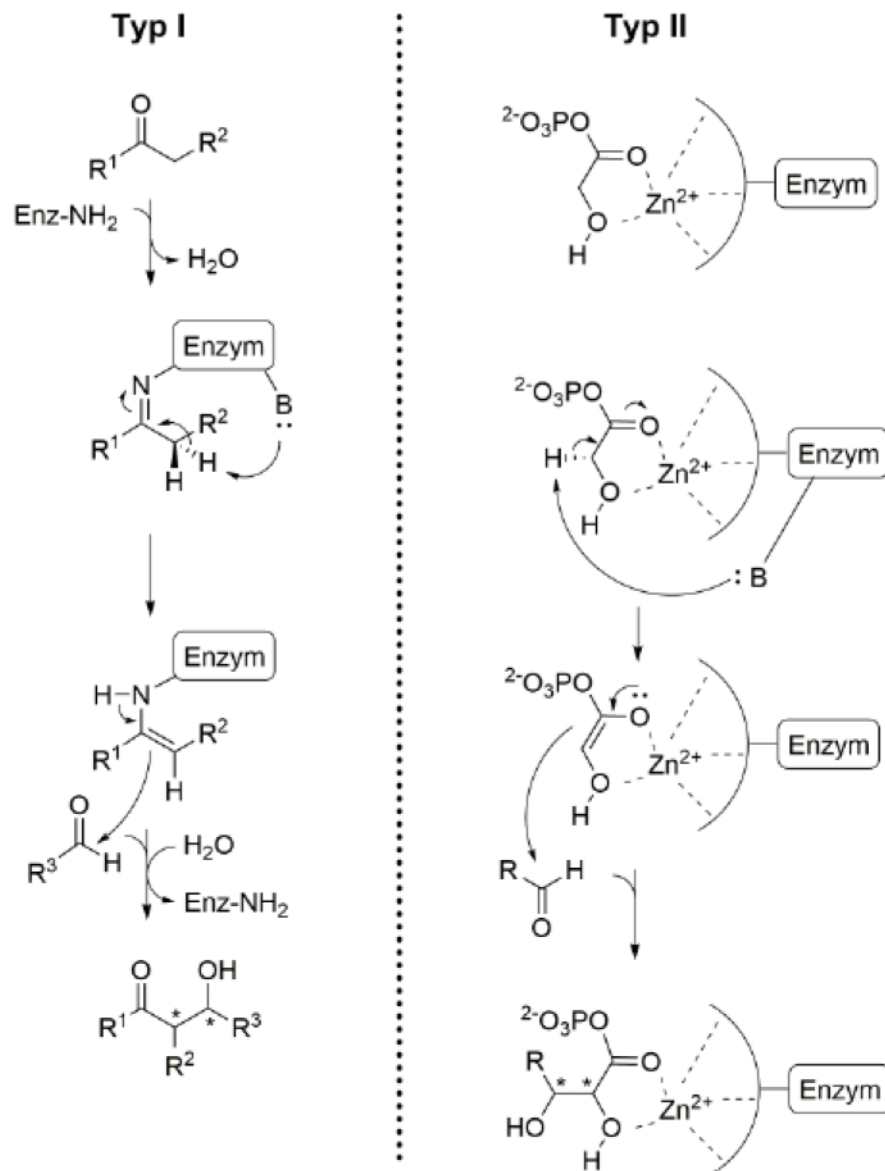
Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Optimierung der DERA sowie ihre Anwendung in der organischen Synthese. Ganz im Sinne eines interdisziplinären Zusammenspiels adressiert das erste Projekt molekularbiologische Ansätze zur weiteren Optimierung der DERA hinsichtlich ihrer Substrattoleranz, wohingegen das zweite Projekt auf die synthetische Anwendung – also die Einbettung des optimierten Enzyms in eine chemische Verwendung – und die Etablierung eines geeigneten Reaktionssystems unter Implementierung von verfahrenstechnischen Methoden in Form der Flow Chemie fokussiert ist. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf der gezielten Synthese des einfachen Aldolproduktes 4 liegen, um so das bisher ungenutzte Potenzial der DERA-Katalyse weiter

auszuschöpfen und neue biokatalytische Synthesewege des attraktiven Strukturmotives der 3-Hydroxyaldehyde **4** als Ausgangssubstanz diverser Naturstoffe zu eröffnen.

5 KENNTNISSTAND

5.1 ACETALDEHYD ABHÄNGIGE ALDOLASEN

Die in dieser Arbeit fokussierten Enzyme sind die Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen. Sie bilden eine der vier Gruppen, welche im Allgemeinen bei Aldolasen zu unterscheiden sind und zählen zu der Enzymklasse der Lyasen (EC 4.1.). Im Rahmen einer (Retro-) Aldolreaktion adressieren sie durch die C-C Bindungsknüpfung (bzw. Bindungsbruch) einer der fundamentalen Reaktionen in der organischen Synthese und der Natur.^[1, 54] Grundlage dieser Aldolreaktion ist die Aktivierung eines nukleophilen Donors in Form eines Aldehyds oder Ketons und die anschließende Verknüpfung mit einem elektrophilen Akzeptor. Mechanistisch werden bei der Aktivierung des Donors zwei Typen von Aldolasen unterschieden. Bei den sogenannten Typ-1 Aldolasen, zu welcher auch die hier verwendete Acetaldehyd-abhängige Aldolase gehört, befindet sich im aktiven Zentrum ein aktives Lysin, welches über die Carbonylfunktionalität des nukleophilen Donors unter Wasserabspaltung ein Imin (Schiff'sche Base) ausbildet. Durch die Ausbildung dieses Intermediates wird die Deprotonierung des zur Carbonylfunktion α -ständigen Kohlenstoffs mit Hilfe einer basischen Aminosäure im Enzym favorisiert. Folglich entsteht ein Enamin, durch dessen erhöhte Elektronendichte am α -ständigen Kohlenstoff Atom der nukleophile Angriff auf das Kohlenstoffatom des Akzeptors erleichtert wird.^[55-58] Den Typ-2 Aldolasen liegt ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Allerdings erfolgt hier die Aktivierung über einen metallischen Cofaktor, welcher Teil des aktiven Zentrums ist und als eine Lewisäure fungiert. Zn^{2+} ist hierbei vorwiegend als Cofaktor zu finden. Es kommt zur Koordination des Cofaktors durch das Donormolekül und folglich zur Reduzierung der Elektronendichte. Die anschließende Deprotonierung erfolgt auch bei den Typ-2 Aldolasen über eine im Enzym vorliegende Base.^[59, 60] Beide beschriebenen Mechanismen sind in Schema 7 gegenübergestellt.



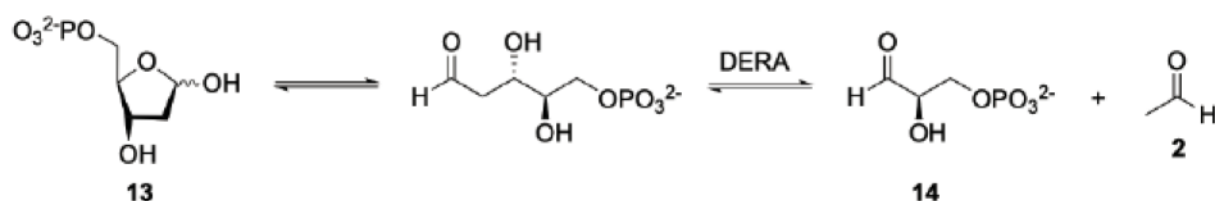
Schema 7: Schematische Darstellung der Reaktionsmechanismen der Typ I und Typ II Aldolasen.

Neben der oben vorgestellten Einteilung lassen sich die Aldolasen darüber hinaus hinsichtlich ihrer Donormoleküle kategorisieren. Während die Aldolasen eine Vielzahl an Akzeptoren umsetzen, sind sie sehr spezifisch bezüglich ihrer Donoren. Man unterscheidet hierbei zwischen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)-, Pyruvat- bzw. Phosphoenolpyruvat-, Acetaldehyd- und Glycin-abhängigen Aldolasen. Diese sind in Tabelle 2 aufgelistet.

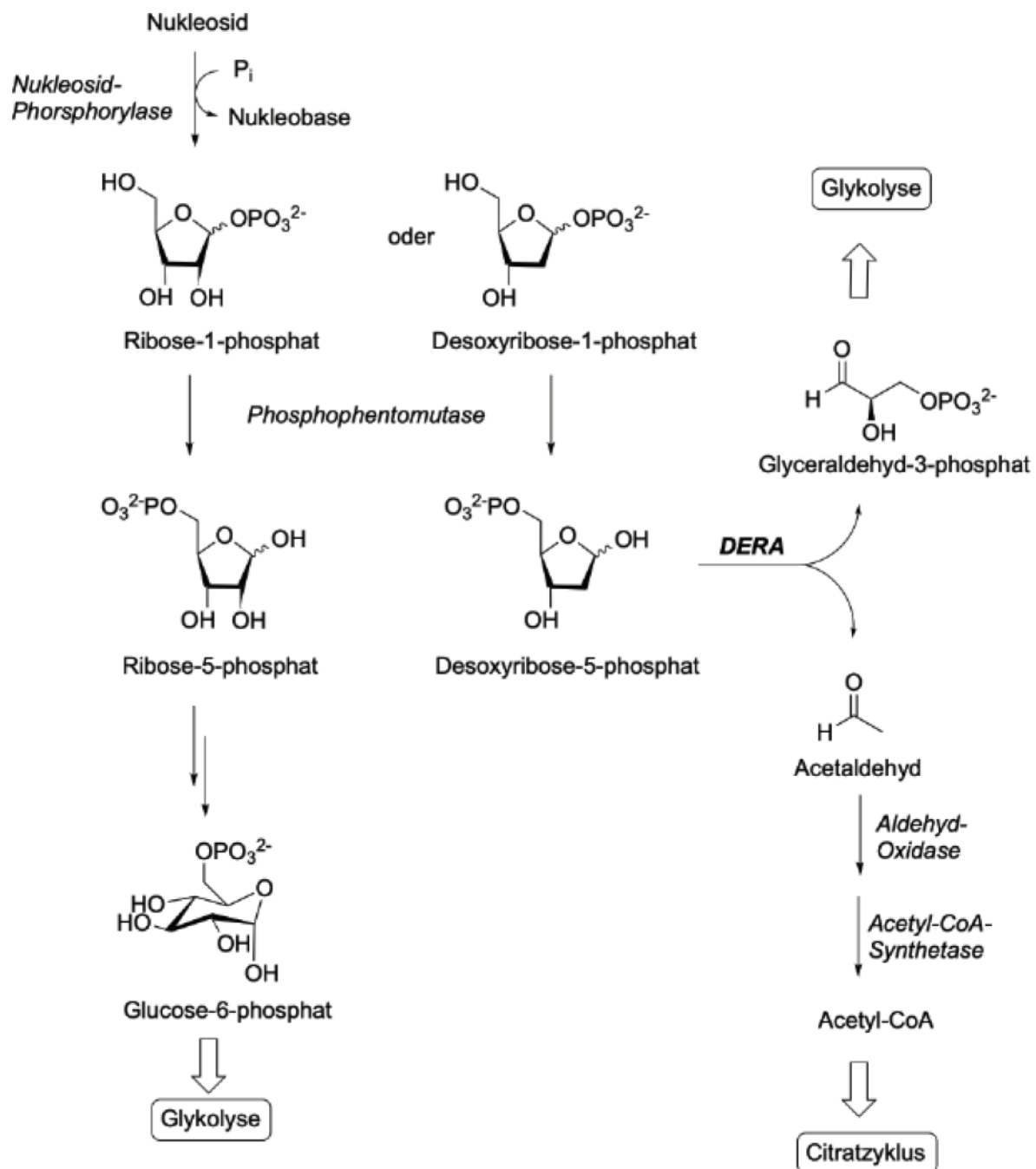
Tabelle 2: Einteilung der Aldolasen in vier Klassen hinsichtlich ihrer Donor-Substrate. Die neu geknüpfte C-C-Bindung wurde fett hervorgehoben und neu gebildete Stereozentrum mit einem Stern gekennzeichnet.

Klasse	Donor	Produkt
1. DHAP Aldolase		
2. Pyruvat- und PEP Aldolase		
3. Acetaldehyd Aldolase		
4. Glycin Aldolase		

Im Folgenden wird das Augenmerk auf die Acetaldehyd-abhängige Aldolasen gelegt, da diese im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen. Diese Klasse wird bisher von nur einer Aldolase repräsentiert, nämlich der 2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase (DERA; EC 4.1.2.4) und wird vom *deoC*-Gen codiert. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie die einzige Aldolase ist, welche eine Aldolreaktion zwischen zwei Aldehyd-Molekülen anstatt eines Aldehyds und eines Ketons katalysiert. *In vivo* katalysiert dieses Enzym die Retroaldolreaktion von 2-Desoxyribose-5-phosphat (DRP, **13**) zu Glyceraldehyd-3-phosphat (G3P, **14**) und Acetaldehyd (**2**) (s. Schema 8). Die DERA übernimmt damit die Schlüsselfunktion im Pentosekatabolismus (s. Schema 9). Die beiden Abbauprodukte G3P (**14**) und Acetaldehyd (**2**) werden anschließend den zentralen Stoffwechselwegen, wie dem Citratzyklus und der Glykolyse zur Verfügung gestellt. Bis heute wurde kein Lebewesen gefunden, welches kein für die DERA codierendes Gen (*deoC*-Gen) aufweist. Konsequenterweise wird davon ausgegangen, dass die DERA ein Enzym ist, welches universell in allen Lebewesen vertreten ist.



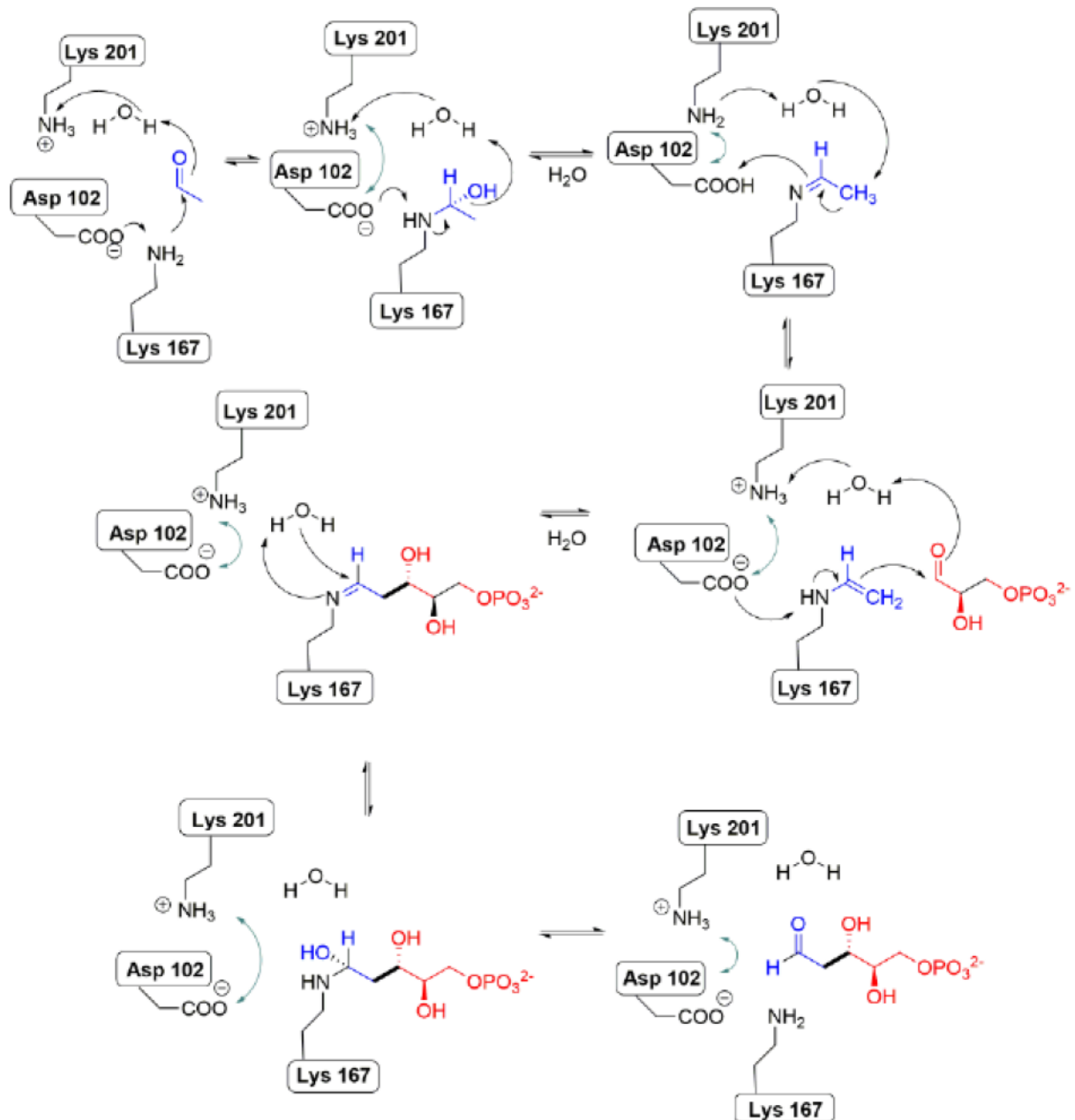
Schema 8: *In vivo* katalysierte Retroaldolreaktion der 2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase (DERA) im Pentosekatabolismus von 2-Desoxyribose-5-phosphat (**3**) zu Glyceraldehyd-3-phosphat (**14**) und Acetaldehyd (**2**).



Schema 9: In vivo Reaktion der DERA im Nukleosidabbau nach Tozzi et al.^[61]

Die erste Isolierung dieses Enzyms geht bereits auf die jungen 1950er Jahre zurück. 1952 beschrieb Racker zum ersten Mal von der DERA katalysierten Reaktion. Hierbei konnte eine Umsetzung der 2-Desoxyribose-5-phosphat Aldolase aus *E. coli* in Form von Rohlysate und isoliertem Enzym gezeigt werden.^[62] Es folgten viele Jahre der Grundlagenforschung, in denen die Aufklärung dieses Enzyms hinsichtlich Größe, Struktur und katalytischem Mechanismus im Fokus standen. Es konnten DERAs aus anderen Organismen beschrieben und isoliert werden, wie beispielsweise von Pricer und Horecker 1960.^[63] Schließlich konnten 1963 von Grazi et al. unter Verwendung von ^{14}C -dotiertem Acetaldehyd erste mechanistische

Einblicke in den katalytischen Zyklus des Enzyms gewonnen werden. Sie erbrachten den Nachweis des Ausbildens einer Schiff'schen Base als Intermediat des katalytischen Mechanismus, wie er auch für andere Aldolasen bereits bekannt war. Durch Reduktion der Schiff'schen Base mit Natriumborhydrid konnten sie das markierte Acetaldehyd-DERA-Derivat nachweisen.^[64] Die Ergebnisse konnten im Folgejahr von *Rosen et al.* bestätigt werden.^[65] Weitere 18 Jahre vergingen bis *Valentin-Hansen* Erkenntnisse über die Anzahl an aktiven Zentren sowie die Aminosäuresequenz veröffentlichte. Demzufolge wurde eine Größe von 259 Aminosäuren und ein exaktes Molekulargewicht von 27.737 kDa bestimmt.^[66] Doch erst *Heine et al.* gelang im Jahre 2001 mit der Aufklärung der Kristallstruktur der DERA aus *E. coli* der ausschlaggebende Durchbruch und ebnete somit den Weg zum mechanistischen und strukturellen Verständnis dieses Enzyms.^[55] So zeigten sie mit einer hervorragenden Auflösung von 0.99 Å die Ausbildung der Schiff'schen Base im katalytischen Mechanismus zwischen dem Substrat 2-Desoxyribose-5-phosphat (5) und dem Lys-167. Dieses konnte nach weiteren *Modeling* und Mutagenesestudien als katalytisch aktives Lysin identifiziert werden. Ebenfalls am katalytischen Mechanismus beteiligt ist ein weiteres Lysin an Position 201, sowie das Asp-102. Es wird vermutet, dass Lys-201 durch seine positive Ladung ausschlaggebend für den verringerten pK_s des katalytisch aktiven Lys-167 ist. Mit Hilfe des Asp-102 und eines weiteren Wassermoleküls wird ein *proton shuffling system* (Protonenverschiebung) aufrecht gehalten, das ausschlaggebend bei der Deprotonierung des C2-Kohlenstoffs des Enzym-Substrat-Derivats sowie bei der Protonierung der C3-Hydroxylgruppe zum Einsatz kommt. Der von *Heine et al.* postulierte Mechanismus ist in Schema 10 dargestellt. Des Weiteren konnten basierend auf der Kristallstruktur Aussagen über die Proteinstruktur gemacht werden. DERA weist demnach das klassische Strukturmotiv des TIM (Triosephosphat-Isomerase) *Barrels* auf. Diese Tertiärstruktur zeichnet sich durch seine charakteristische Anordnung von acht β -Faltblättern im Inneren des Enzyms aus. Diese sind über sogenannte *Loops* oder *Random Coils* mit acht äußeren α -Helices verbunden.^[67] Funktionell handelt es sich bei der DERA um ein Monomer. Es weist allerdings strukturell eine C₂-symmetrische Dimerform auf. Die Tertiärstruktur der DERA ist in Abbildung 3 dargestellt.



Schema 10: Postulierter Mechanismus der DERA-katalysierten Reaktion nach Heine *et al.*^[55]. Farblich hervorgehoben in blau: (ursprünglich in die Reaktion eingegangenes) Acetaldehyd-Molekül; In rot: Glyceraldehyd-3-phosphat-Molekül; Die neu geknüpfte Bindung zwischen dem an das Lys-167 gebundene Acetaldehyd und das Glyceraldehyd-3-phosphat ist schwarz fett kenntlich gemacht.

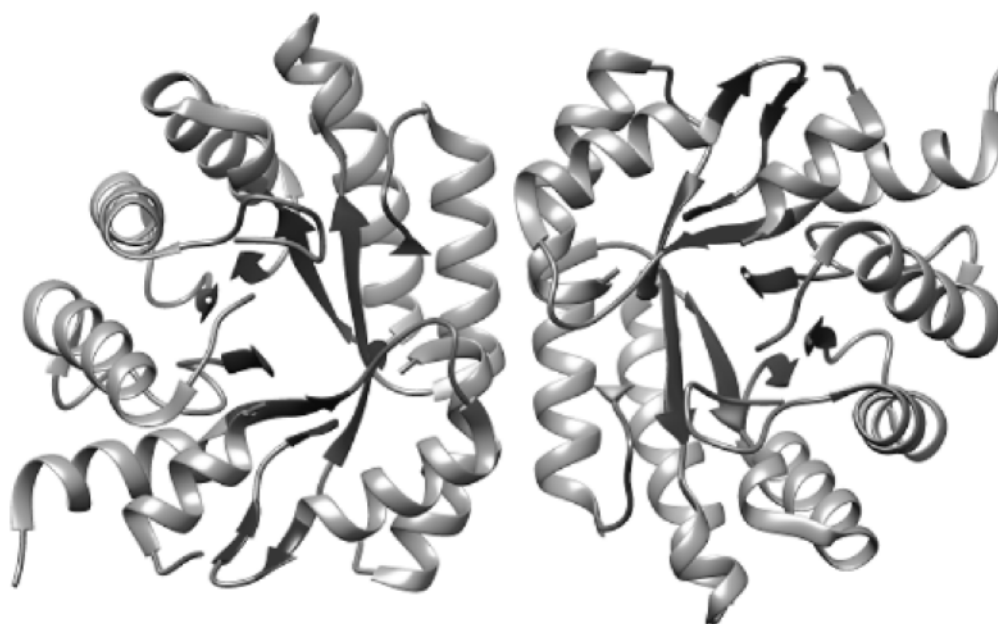


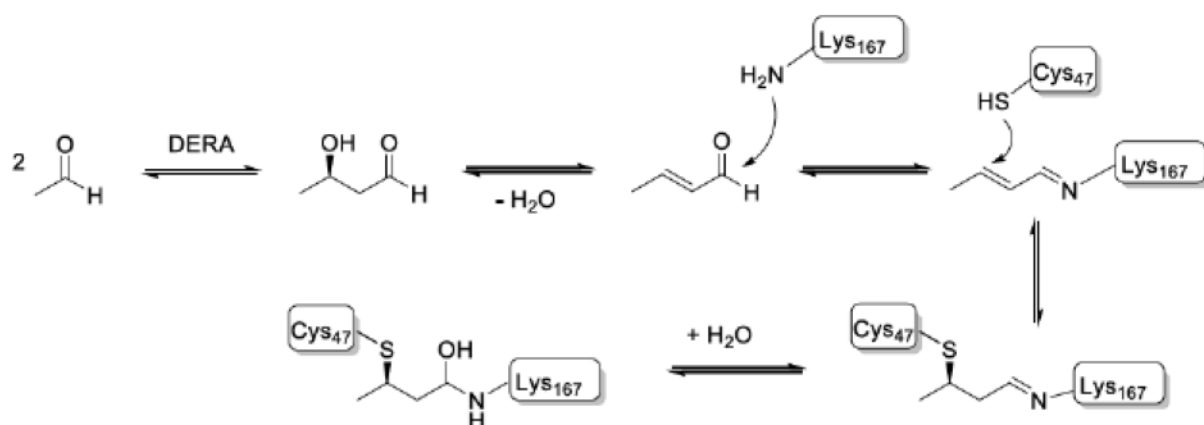
Abbildung 3: TIM *Barrel*/Struktur der DERA aus *E. coli*. Die Darstellung wurde mit *Chimera* (PDB 1JCL) erstellt.

Nachdem das Interesse an der Anwendung des Enzyms als Biokatalysator geweckt war, wurde nach der erfolgreichen Strukturaufklärung verstärkt an der Optimierung der DERA hinsichtlich ihrer Anwendung in der Synthese gearbeitet. Bereits 2003 wurden Versuche zur Ausweitung des Substratspektrums unternommen. Ein Nadelöhr der katalytischen Anwendung stellt die Favorisierung von phosphorylierten Substraten dar. *DeSantis et al.* versuchten deshalb die Akzeptanz der DERA von unphosphorylierten Substraten mittels Methoden des *Protein Engineering* zu verbessern. Sie erzielten durch das Einfügen der Punktmutation S238D eine 2,5-fach höhere Aktivität gegenüber der unphosphorylierten Desoxyribose verglichen mit dem DERA Wildtyp. Diese DERA Variante akzeptierte neben dem natürlichen Substrat auch das sterisch anspruchsvollere 3-Azidopropanal.^[68] Die Arbeitsgruppe *Jennewein et al.* zeigte großes Interesse an der Domino-Aldolreaktion. Sie suchten Wege, um die Produktivität der Reaktion zu erhöhen, indem sie gezielt die Toleranz gegenüber dem verwendeten Substrat Chloracetaldehyd erhöhten.^[4] Dabei nutzten sie das Prinzip der *Directed Evolution* und identifizierten eine Kombination aus drei Punktmutationen (F200I, S238D, Y259T) und einer C-terminalen Verlängerung (KTQLSCTKW), mit der sie eine 10-fach höhere Produktivität zu (3*R*, 5*S*)-6-Chlor-2,4,6-tridesoxyhexapyranosid erzielten. Unter *Directed Evolution* versteht man die Optimierung und Veränderung von Proteinen und Nukleinsäuren durch Nachahmung der natürlichen Selektion in einem beschleunigten Verfahren.^[69] Die Anwendung der DERA für synthetische Zwecke wird im folgenden Kapitel 5.2 noch näher beleuchtet.

Neben den Methoden der Mutagenese zur Optimierung und Weiterentwicklung der DERA in der Synthese, stellt die Suche nach neuen bisher unbekannten DERAs aus anderen Organismen ein alternativer Ansatz zur Überbrückung der synthetischen Limitierungen dar. Auch dieser Ansatz wurde vermehrt von vielen Forschern verfolgt und neue DERAs identifiziert. [70-78] Ein besonderes Augenmerk lag auf der eingeschränkten Toleranz der DERA gegenüber ihrem eigenen Substrat Acetaldehyd (2). Die beobachtete Inhibierung durch ihr Substrat 2 schränkt den Gebrauch der einzigen Acetaldehyd-abhängigen Aldolase erheblich in ihrer Anwendung im synthetischen Bereich ein. Lösungsansätze, um dieses Problem zu umgehen, sind eine der wichtigsten Fragen, mit denen sich Arbeitsgruppen u.a. im Bereich der Biokatalyse beschäftigen. 2007 konnten *Sakuraba et al.* durch Isolierung zweier DERAs aus den hyperthermophilen Organismen *Pyrobaculum aerophilum* und *Thermotoga maritima* zwei Biokatalysatoren mit erhöhter Acetaldehyd-Stabilität gegenüber der DERA aus *E. coli* präsentieren.[70]

Der große Durchbruch hinsichtlich der Acetaldehyd-Toleranz gelang 2016 *Dick et al.* durch die Aufklärung des zugrundeliegenden Inhibierungsmechanismus der DERA durch ihr eigenes Substrat Acetaldehyd (2).[10] In ersten Untersuchungen konnte die Eingangshypothese, nach welcher die Bildung von Schiff'schen Basen der äußeren Lysine mit Acetaldehyd (2) zu einem Anstieg der Hydrophobizität und letztendlich zur Entfaltung des Enzyms führe, als initialen Inhibierungsmechanismus ausgeschlossen werden. Dafür wurde eine DERA aus *Corynebacterium bovis*, welche nur ein einziges äußeres Lysin aufweist, in 300 mM Acetaldehyd (2) inkubiert. Doch auch hier wurde eine Inaktivierung des Enzyms beobachtet. Es folgten weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Inhibierung der DERA durch ihr Substrat Acetaldehyd (2).

Mittels NMR-Spektroskopie der *E. coli* DERA vor und nach Inkubation mit ¹³C-dotiertem Acetaldehyd (2) konnte ein Reaktionsprodukt identifiziert werden, dass das aktive Zentrum zu blockieren scheint. Durch Erhitzen bei 55 °C bei > 6 h konnte bis zu 70 % der Enzymaktivität (für die dimere Form der DERA_{EC} Wildtyp) zurückgewonnen werden. Zur detaillierten Charakterisierung des identifizierten Reaktionsproduktes wurden Kristallstrukturen der DERA_{EC} vor und nach Acetaldehydinkubation sowie nach Erhitzen untersucht. Dabei wurde ein Molekül gefunden, welches kovalent über das Schwefelatom des Cys-47 über Iminbildung an das katalytisch aktive Lys-167 gebunden ist. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde von *Dick et al.* ein Inaktivierungsmechanismus postuliert, der in Schema 11 abgebildet ist.



Schema 11: Der von *Dick et al.* postulierte Inhibierungsmechanismus der DERA, ausgehend von seinem Substrat Acetaldehyd (2).^[10]

Es wird angenommen, dass sich nach Eliminierung ausgehend von dem Aldolprodukt aus zwei Acetaldehydmolekülen (3-Hydroxybutanal) der ungesättigte Aldehyd Crotonaldehyd ausbildet, welcher verantwortlich für die Inaktivierung des Enzyms ist. Inkubation der DERA_{EC} mit reinem Crotonaldehyd resultierte in einer 100-fach stärkeren Inhibierung als mit Acetaldehyd (2), womit diese Annahme bestätigt werden konnte. Bereits 1 mM Crotonaldehyd führten innerhalb von weniger als einer Stunde zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Die ersten Schritte des postulierten Inhibierungsmechanismus gleichen dem katalytischen Mechanismus der DERA: Es kommt zur Iminbildung zwischen der Carbonylfunktionalität des Substrates Acetaldehyd (2) und dem katalytisch aktiven Lys-167. Nach Aldehydaddition bildet sich die Schiff'sche Base des 3-Hydroxybutanals, gebunden an das Lys-167. Nach hydrolytischer Spaltung bildet sich ein konjugiertes π -System aus, ein sogenanntes Michael-System. Dieses entspricht dem über Iminbildung gebundenen Crotonaldehyd an Lys-167. Das räumlich naheliegende Cys-47 greift in Form einer Michael-Addition an. Das Reaktionsprodukt liegt kovalent gebunden zwischen den beiden Aminosäuren Lys-167 und Cys-47. In einem letzten Schritt kommt es zur Hydratation der Doppelbindung und zur Ausbildung einer Hydroxylgruppe. Das final gebildete Produkt entspricht der gefundenen Elektronendichte in der Kristallstruktur der DERA_{EC} nach Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2).

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde das nukleophile Cys-47, welches die Michael-Addition an die gebildete Schiff'sche Base initiiert, mutagenetisch ausgetauscht. Dabei wurde eine weniger nukleophile aber sterisch ähnlich anspruchsvolle Aminosäure, nämlich Methionin, ausgewählt. Die gebildete DERA_{EC}-Variante DERA_{EC}-C47M zeichnet sich durch bis zu 60 % der Wildtyp-Aktivität aus und zeigt auch nach 16 h Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2) keinen Aktivitätsverlust. Somit konnte über einfache Punktmutation einer

einzelnen Aminosäure eine resistente DERA-Variante erstellt werden, welche das große Potenzial der DERA als nutzbaren Biokatalysator für synthetische Zwecke ermöglichen könnte.

2017 wurden basierend auf den Ergebnissen von Dick *et al.* systematische Untersuchungen der kritischen Position Cys-47 der DERA_{EC} veröffentlicht.^[11] Die dazu veröffentlichten Daten waren Teile der Masterarbeit, die der vorliegenden Arbeit vorausging. Ziel war es, durch Variation der ausgetauschten Aminosäure an Position 47 in andere weniger oder gar nicht nukleophilen Aminosäuren abseits der bisher als wirkungsvoll erwiesene Aminosäure Methionin, eine DERA-Variante zu finden, welche hinsichtlich ihrer Aktivität und Stereoselektivität der Variante C47M überlegen ist. Eine Übersicht über die untersuchten DERA-Mutanten und die korrespondierenden Halbwertszeiten der Inaktivierung in Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd sind in Tabelle 3 abgebildet. Widererwartend zeigten allerdings nicht alle der generierten DERA-Varianten eine Toleranz gegen das Substrat Acetaldehyd (2), trotz fehlender nukleophiler Funktionalität. Ein Angriff nach dem von Dick *et al.* postulierten Inaktivierungsmechanismus war demnach nicht möglich. Es konnte geschlussfolgert werden, dass es neben dem bereits bekannten Mechanismus über Position Cys-47 dennoch weitere bisher unbekannte Mechanismen geben muss, welche zur Inaktivierung der DERA führen. Einzig die Variante DERA_{EC}-C47L konnte neben C47M als Acetaldehyd-toleranter aber weniger aktiver Biokatalysator ausgemacht werden.

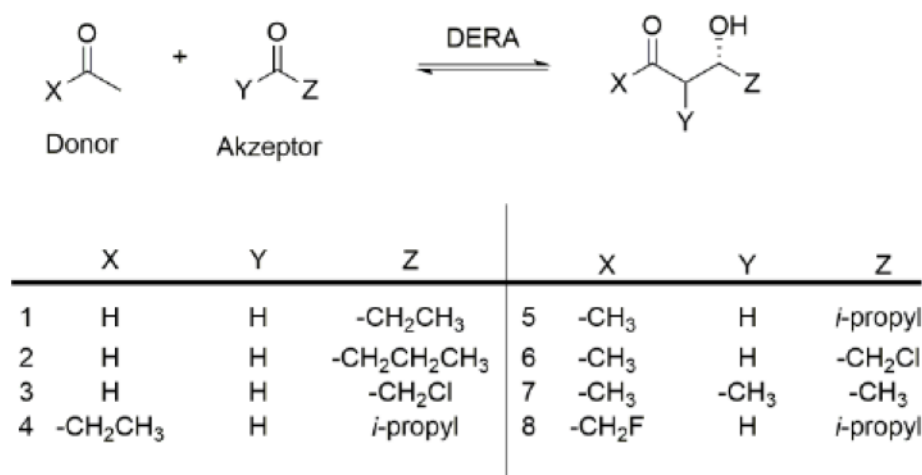
Tabelle 3: Halbwertszeiten der von *Bramski et al.* beschriebenen DERA-Varianten mit Punktmutation der Position C47 nach Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2) und 20 mM Crotonaldehyd.^[11]

	Halbwertszeit $T_{1/2}$ [Minuten]	
	300 mM Acetaldehyd	20 mM Crotonaldehyd
DERA _{EC} -C47A	6.9	26.8
DERA _{EC} -C47G	2.4	18.6
DERA _{EC} -C47I	193.2	66.3
DERA _{EC} -C47L	n.b.	114.5
DERA _{EC} -C47M	n.b.	n.b.
DERA _{EC} -C47S	472.3	110.6
DERA _{EC} -C47T	35.7	34.8
DERA _{EC} -wt	37.5	3.7

5.2 ACETALDEHYD-ABHÄNGIGE ALDOLASEN IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE

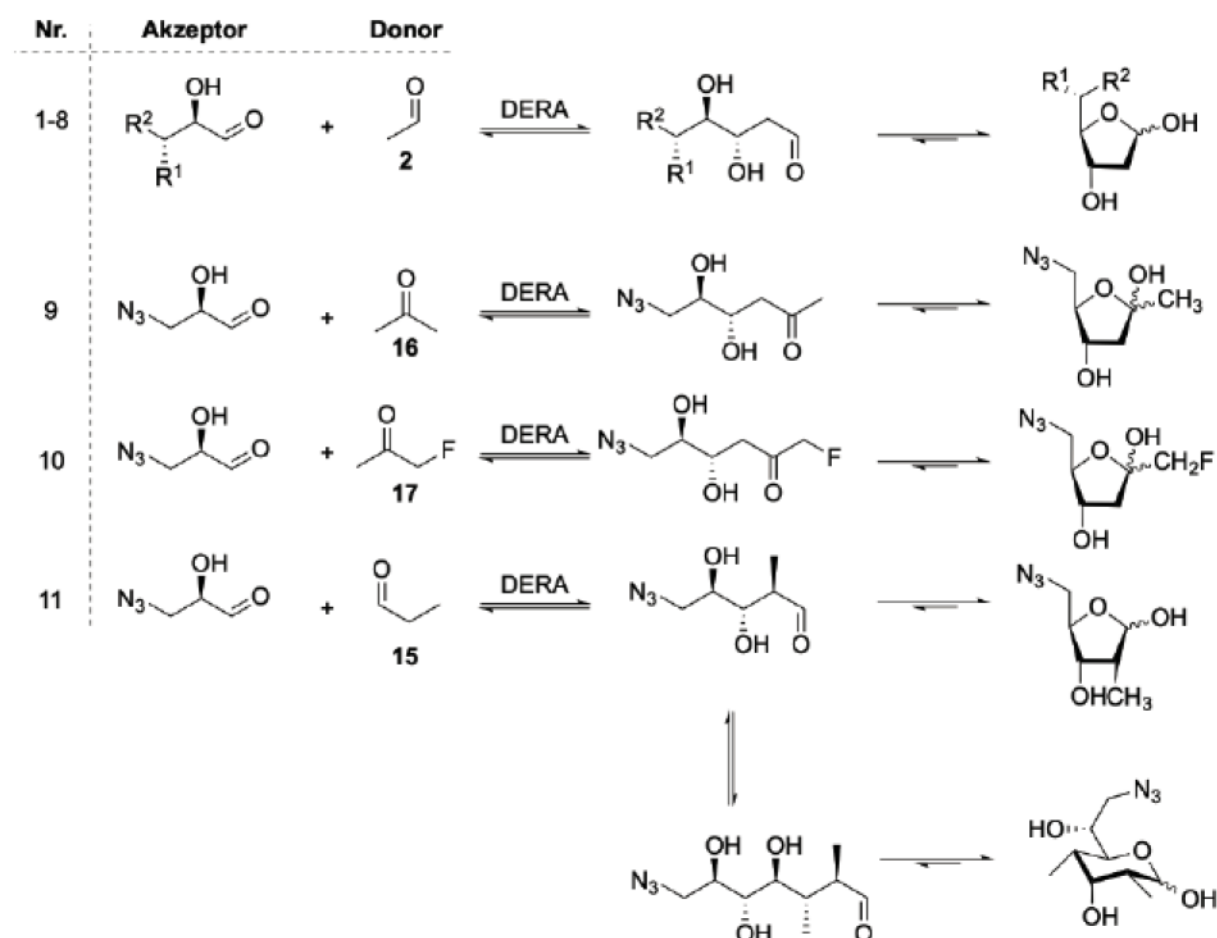
Nachdem im vorangehenden Kapitel bereits ein kurzer Überblick über den bisherigen Werdegang der DERA zum industriell genutzten Biokatalysator gegeben wurde, sollen im Folgenden die Entwicklung und die Anwendung der DERA in der organischen Synthese detaillierter beleuchtet werden. Sie bilden die Grundlage der hier präsentierten Arbeit, welche sich in erster Linie mit der Verwendung einer optimierten DERA hinsichtlich ihrer synthetischen Nutzung befasst.

Durch ihre katalytische Fähigkeit aus einfachen achiralen Verbindungen, chirale Bausteine zu generieren, adressiert die DERA einen wichtigen Grundpfeiler der Naturstoffsynthese, beispielsweise für pharmazeutische Zwecke. Der Aufbau von enantiomerenreinen Verbindungen ist hierbei essenziell. Nachdem der katalytische Mechanismus der DERA aufgeklärt worden war, rückte ihre Substratbreite vermehrt in den Fokus der Wissenschaftler. So konnten in ersten Studien der Arbeitsgruppe von *Wong* im Jahre 1990 wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Substrattoleranz der DERA gewonnen werden. Es zeigte sich, dass neben Acetaldehyd (**2**) auch Propanal (**15**), Aceton (**16**) und Fluoraceton (**17**) als Donormolekül umgesetzt werden, wenn auch bei deutlich geringeren Umsatzraten im Vergleich zum natürlichen Substrat. Für Letzteres wurde eine Regioselektivität hinsichtlich des nicht-fluorierten Kohlenstoffatoms als Bindungspartner beobachtet. Somit zeichnet sich die DERA als einzige bekannte Aldolase aus, die sowohl Aldehyde als auch Ketone als Donor toleriert. In Bezug auf ihre Akzeptoren zeigte die DERA eine deutlich höhere Akzeptanz. Sterisch anspruchsvolle Aldehyde, wie Benzaldehyd, werden allerdings nicht umgesetzt.^[79] Eine Übersicht der tolerierten Donoren und Akzeptoren ist in Schema 12 dargestellt. Es bleibt festzuhalten, dass die Umsetzung von nicht natürlichen Substraten nur in sehr geringem Maß zu beobachten war.



Schema 12: Erste Studien der Arbeitsgruppe Wong (1990) zur Substratbreite der DERA. Gezeigt ist eine Auswahl der getesteten und tolerierten Akzeptoren und Donoren der DERA.^[79]

Zwei Jahre später konnten diese Ergebnisse bestätigt und ausgeweitet werden. *Chen et al.* untersuchten acht Donoren sowie 20 Akzeptoren und isolierten 13 Aldolprodukte, darunter einige Aldosen und Ketosen (vgl. Schema 13).^[80] Auch hier zeigte sich allerdings bei allen nicht natürlichen Substraten eine deutlich geringere Enzymaktivität. So konnte die biokatalytische Reaktion mit Glyceraldehyd-3-phosphat (**14**) als Akzeptor bereits nach 7 h gestoppt werden, wohingegen die Reaktion mit unnatürlichen, nicht-phosphorylierten Substraten ganze 2 Tage gerührt werden musste, um einen Umsatz zu verzeichnen. Die erzielten Ausbeuten sind in Tabelle 4 aufgetragen. Für die Substrate Acetaldehyd (**2**), Aceton (**16**) und Fluoraceton (**17**) wurde jeweils die Bildung des einfachen Aldolproduktes mit spontaner Zyklisierung zum entsprechenden 2-Desoxyribose-5-phosphat Analogon beobachtet (vgl. Schema 13; Einträge 1 bis 10). Die gebildeten Stereozentren zeigten hier die erwartete *S*-Konfiguration. Einzig für das Substrat Propanal (**15**) wurde neben dem einfache Aldolprodukt in zyklisierter Form ebenfalls das doppelte Aldolprodukt mit einer Konfiguration von *2R* und *3S* beobachtet, welches ebenfalls bevorzugt in zyklischer Form vorliegt (vgl. Schema 13 und Tabelle 4).



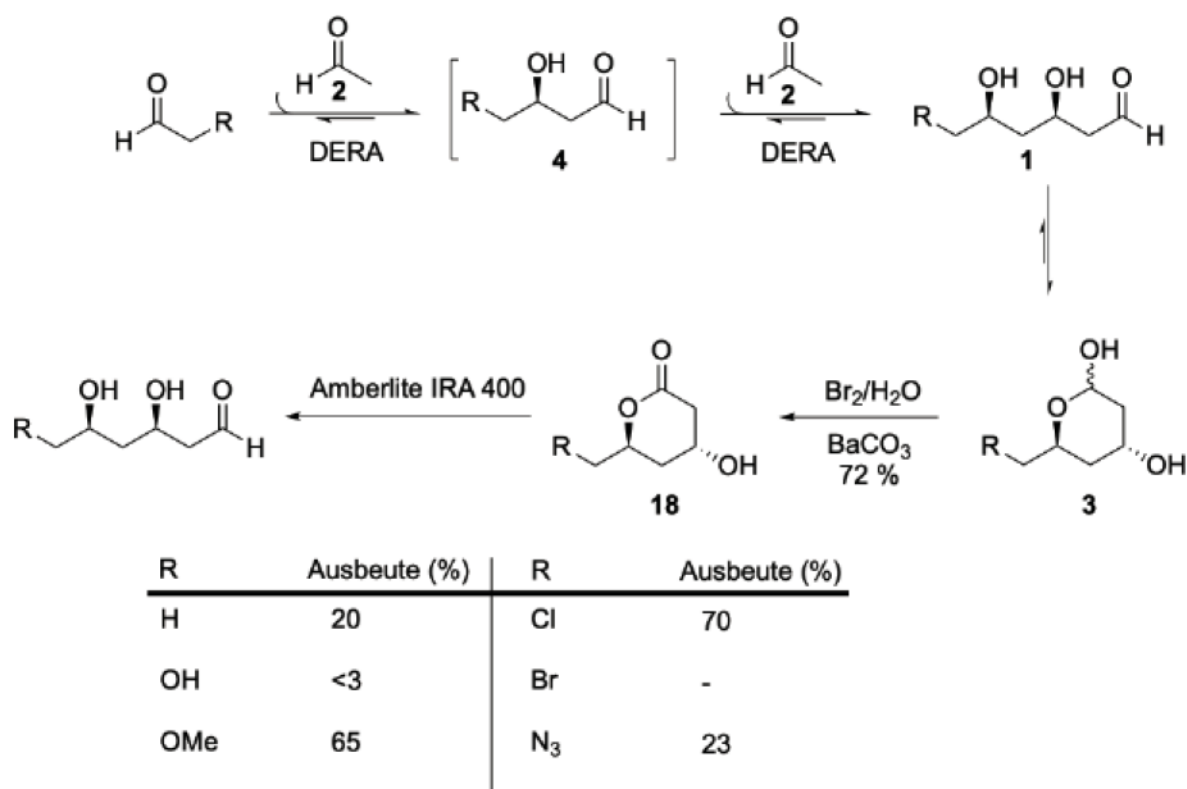
Schema 13: Aldolreaktionen zur Synthese von Kohlenhydraten unter Verwendung der Substrate Acetaldehyd (2), Aceton (16) und Fluoroacetone (17) mittels DERA zur Untersuchung der Substratbreite.^[80] Die Definition der Reste R¹ und R² ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Übersicht der erzielten Ausbeuten der Aldolreaktionen zur Synthese von Kohlenhydraten unter Verwendung der Substrate Acetaldehyd (2), Aceton (16) und Fluoroacetone (17) mittels DERA zur Untersuchung der Substratbreite (vgl. Schema 13).

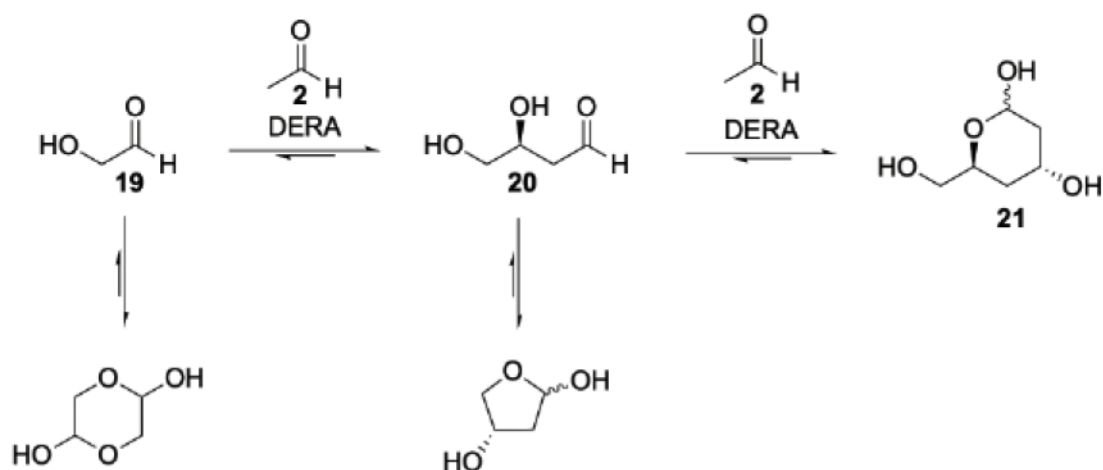
Nummer	R ¹	R ²	Ausbeute [%]
1	OPO ₃ ²⁻	H	78
2	N ₃	H	76
3	F	H	33
4	Cl	H	37
5	H	H	32
6	OH	H	65
7	OH	CH ₂ OH	62
8	CH ₃	H	18
9	H	N ₃	66
10	H	N ₃	70
11	H	N ₃	20

Weitere Synthesestudien der Arbeitsgruppe Wong folgten. Ein großer Durchbruch, welcher das Fundament der heutigen industriellen Nutzung der DERA bildet, wurde 1994 anhand einer Domino-Aldolreaktion zum Aufbau von Polyolen erzielt.^[34] Die Reaktion zeichnete sich

durch die Verwendung von drei achiralen C2-Aldehyden zur Synthese von chiralen Bausteinen mit zwei Stereozentren (vgl. Schema 14) aus, wobei der Akzeptor-Aldehyd variierende Substituenten aufwies. Unter Verwendung von größeren Mengen Enzym wurde die Bildung des doppelten Aldolproduktes **1** beobachtet. Hierbei kann das zunächst aus zwei Molekülen Acetaldehyd (**2**) gebildete einfache Aldolprodukt **4** durch einen folgenden nukleophilen Angriff durch ein weiteres Molekül Acetaldehyd (**2**) zu dem chiralen C6-Baustein umgesetzt werden. Durch anschließende Oxidation mit Brom zu dem entsprechenden Lacton **18** konnte die DERA spezifische Stereoselektivität von 3*R* und 5*R* nachgewiesen werden. Eine folgende Ringöffnung unter basischen Bedingungen mittels Amberlite IRA 400 in Methanol erzielte ein 1,3-Polyolsystem, welches ein weit verbreitetes Strukturmotiv darstellt, beispielsweise in Makroliden. Eine Übersicht über die Ausbeuten ist in Schema 14 zusammengefasst. Die besten Ergebnisse konnten mit Chloracetaldehyd (**30**) als Substrat mit einer Ausbeute von 70 % erzielt werden, gefolgt von Methoxyacetaldehyd. Als problematisch erwies sich jedoch Hydroxyacetaldehyd (**19**). Hier konnten lediglich 3 % des Polyol-Endproduktes isoliert werden. *Gijsen et al.* begründeten dies mit der möglichen Dimerbildung des Hydroxyaldehydes (**19**) und der Bildung eines zyklischen Hemiacetals **21** ausgehend vom einfach Aldolprodukt **20** aus Acetaldehyd (**2**) und Hydroxyacetaldehyd (**19**) (vgl. Schema 15).



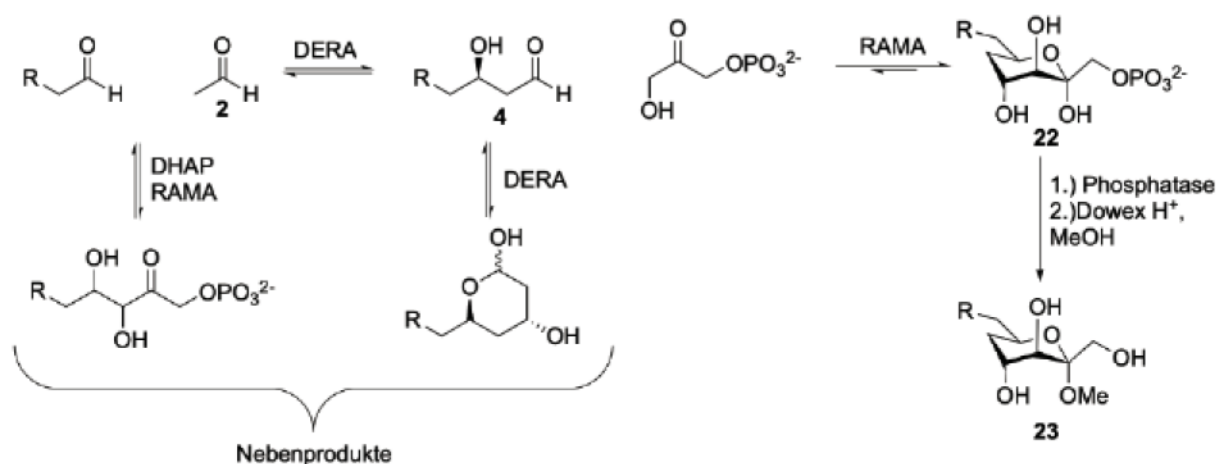
Schema 14: DERA-katalysierte Domino-Aldolreaktion nach *Gijzen et al.* (1994).^[34] Nach sequentieller Acetaldehydaddition folgte eine Oxidation zum entsprechenden Lacton **18** und eine Base-katalysierte Ringöffnung.



Schema 15: Die bei der sequenziellen Aldolreaktion nach *Gijzen et al.* von Hydroxyacetaldehyd (**19**) und Acetaldehyd (**2**) möglichen Nebenprodukte.^[34]

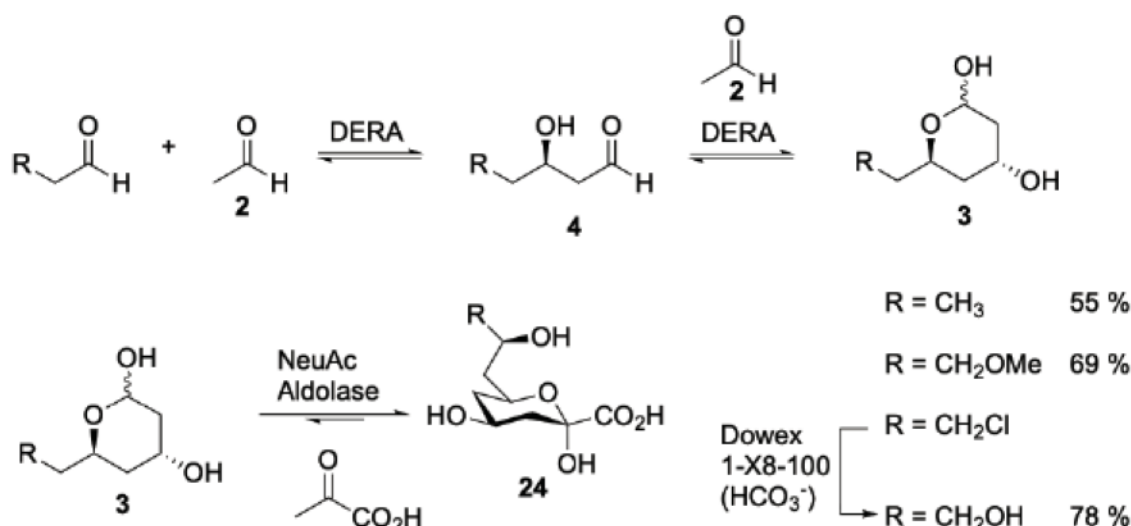
Nur ein Jahr später berichteten *Gijzen et al.* von einer Ein-Topf-Enzymkaskade, in welcher die DERA in einem Folgeschritt mit einer Fructose-1,6-diphosphat Aldolase (RAMA) zum Aufbau von C7-Bausteinen kombiniert worden ist.^[81] Grundidee dieser Reaktion war es, das einfache Aldolprodukt **4** nach erfolgter DERA Reaktion durch nachträgliche Zugabe des RAMA-Substrates Dihydroxyacetophosphat (DHAP) zu 5-Deoxy-Ketose Derivaten umzusetzen. Ausschlaggebend war das optimale Verhältnis der Substrate, welches im

Ergebnis mit Aldehyd:Acetaldehyd:DHAP von 2:3:1 bestimmt wurde. Andernfalls wurde eine Reihe von möglichen Nebenreaktionen beobachtet. Die Menge an Acetaldehyd (2) muss so gewählt sein, dass die doppelte Aldolreaktion nicht forciert wird, sondern auf der Seite des einfachen Adolproduktes (4) liegt. Als ebenfalls ungünstig erwiesen sich Substrate, welche nach Aldolreaktion mit DHAP in der Lage sind, stabile Hemiacetale zu formen. Aus diesem Grund konnten mit Hydroxyacetaldehyd (19) als Substrat erneut nur sehr geringe Umsätze zu dem finalen Endprodukt nachgewiesen werden. Eine Übersicht über das gesamte Reaktionsschema und mögliche Nebenreaktionen ist in Schema 16 gezeigt. In einem finalen Reaktionsschritt wurde das Ketose-Produkt 22 zur besseren Trennung mit Dowex H⁺ in Methanol zu dem entsprechenden Methylglycosid 23 überführt.



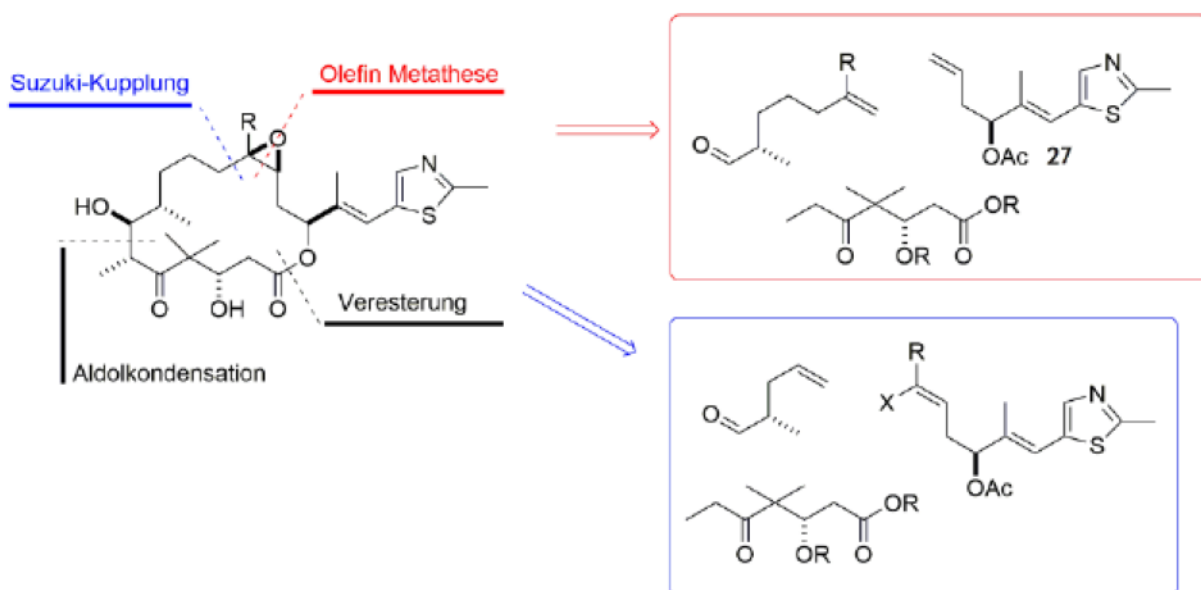
Schema 16: Ein-Topf-Enzymkaskade unter Verwendung von DERA und RAMA zur sequenziellen Aldolreaktion zum Aufbau von Ketose Derivaten.^[81]

Neben der Kombination der DERA mit RAMA, konnten *Wong* und Mitarbeiter noch ein weitere sequenzielle Aldolreaktion zeigen, katalysiert von DERA und einer weiteren Aldolase, der *N*-Acetylneuraminsäure Aldolase (NeuAc Aldolase).^[82] Die Reaktion gelang allerdings nicht in einem Eintopfverfahren, wie für DERA und RAMA gezeigt, sondern erfolgte in zwei Reaktionsschritten aufgrund der abweichenden optimalen Reaktionsbedingungen der beiden Aldolasen. Durch die Akzeptorspezifität der NeuAc Aldolase, welche größere Moleküle (C5 oder größer) präferiert, konnte sichergestellt werden, dass überwiegend das doppelte Aldolprodukt 3 der DERA nachfolgend von der NeuAc Aldolase zum finalen Produkt 24 umgesetzt wird. Nach Inkubation von 4 bis 8 Tagen bei 37°C konnten 55 % bis maximal 78 % Produkt 24 erzielt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit Chloracetaldehyd (30) erhalten, wobei das Produkt anschließend noch mittels Ionenaustauschchromatographie hydrolysiert worden ist (Schema 17).

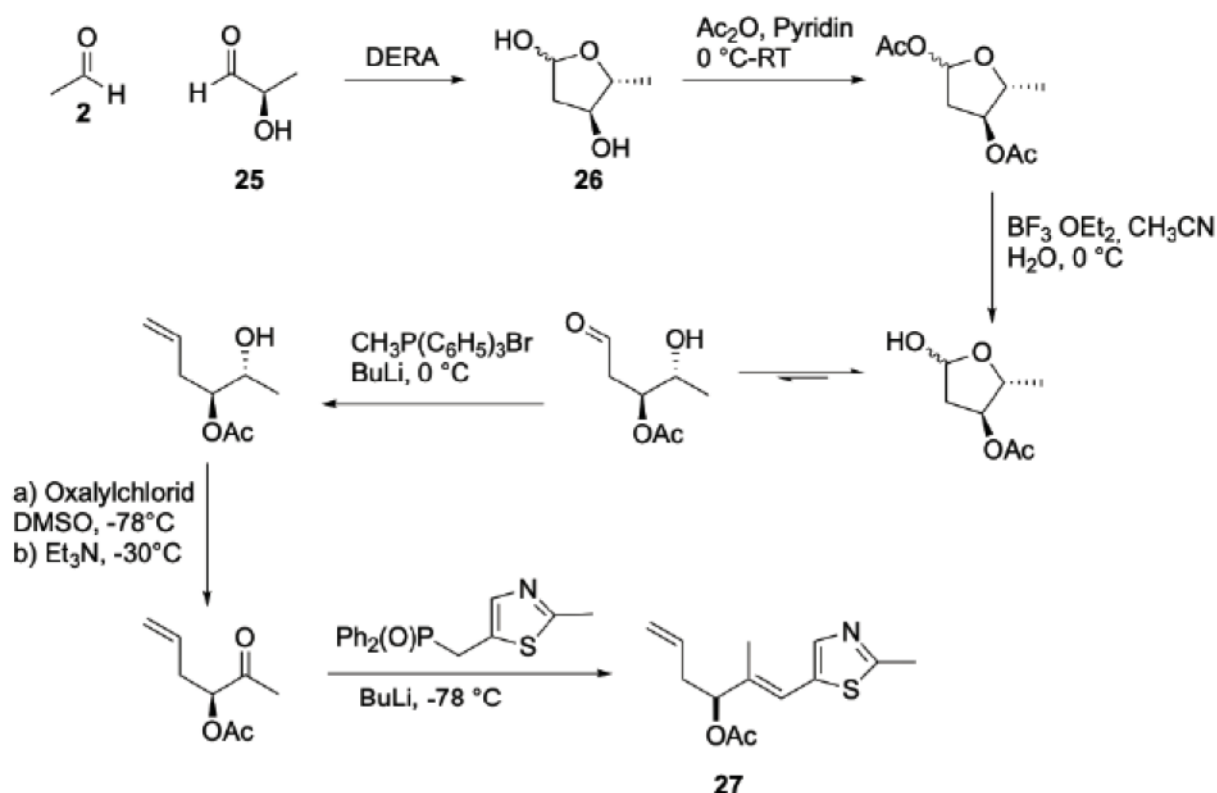


Schema 17: Sequenzielle Aldolreaktion unter Verwendung der DERA und einer NeuAc Aldolase in zwei Reaktionsschritten.^[82]

Es folgten weitere biokatalytische Studien der DERA.^[34, 80, 83, 84] Im Jahr 1999 zeigten *Machajewski* und *Wong* eine interessante Anwendung der DERA-katalysierten sequenziellen Aldolreaktion.^[85] Sie ermöglichten einen chemoenzymatischen Zugang über sieben Stufen zu einem Schlüsselbaustein der Epothilone A und B. Diese repräsentieren eine zu der Zeit neue Klasse an zytotoxischen Naturstoffen mit ausgeprägten anti-Tumor Eigenschaften. Es werden zwei möglich Ansätze einer retrosynthetischen Betrachtung vorgestellt: ein Suzuki-Kupplung/Makrolactonisierung sowie eine Olefin-Metathese Strategie (vgl. Schema 18). Im Folgenden wird der Olefin-Metathese Ansatz detaillierter beleuchtet. Die DERA-katalysierte sequenzielle Aldolreaktion ausgehend von Acetaldehyd (2) und 2-Hydroxypropanal (25) wurde im ersten Reaktionsschritt zum Aufbau des entsprechenden Lactols **26** angewendet. Bei einem Einsatz von 3500 U Enzym, 10 mM des 2-Hydroxypropanals (25) und 30 mM des Acetaldehyds (2) konnten nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen 34 % des enantiomerenreinen Lactols **26** erhalten werden. Nach Acetylierung und selektiver Entschützung, folgte die Umsetzung zum Olefin, mit einer Ausbeute von 75 %. Schließlich, nach Oxidation und Wittig-Reaktion, konnte das gewünschte Epothilon-Fragment **27** erhalten werden (Schema 19). Drei Jahre später beschrieben *Liu* und *Wong* eine abermals verbesserte Synthesestrategie.^[86] Ausgehend von nur zwei Bausteinen wurden hier beide Fragmente DERA-katalysiert aufgebaut.



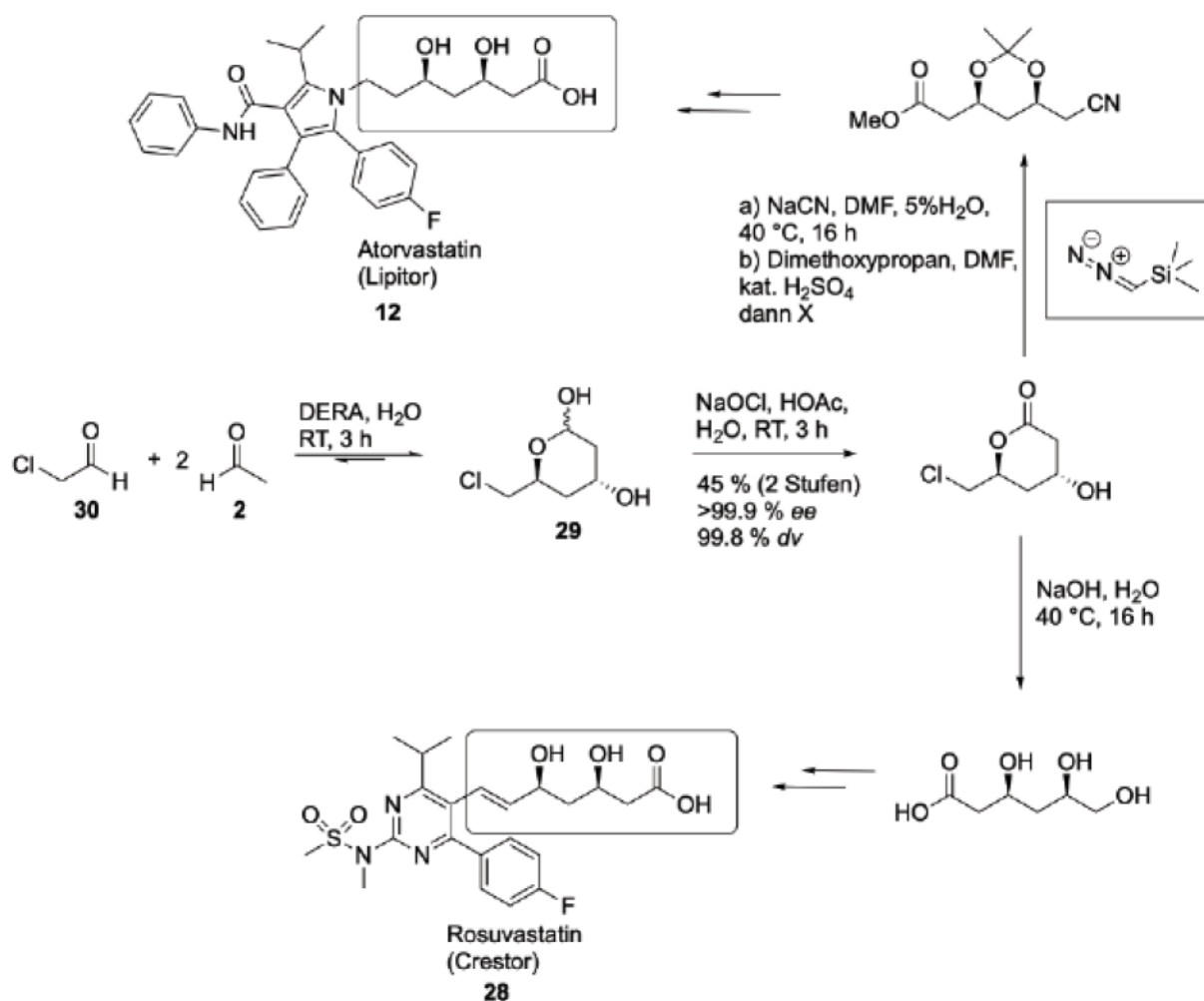
Schema 18: Zwei retrosynthetische Ansätze von Epothilon A von *Machajewski* und *Wong*.^[85] Beiden Ansätzen sind eine Aldolkondensation sowie eine Veresterung gemeinsam. Sie unterscheiden sich im Aufbau des Lactonrings entweder durch eine Suzuki-Kupplung (blau) oder eine Olefinmetathese (rot).



Schema 19: Chemoenzymatische Synthese eines Bausteins des Epothilons A und B.^[85]

Eine der wohl bis heute vielversprechendsten Anwendungen der DERA ist die sequenzielle Aldolreaktion zum Aufbau von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren, die so genannten Statine. Diese bilden eine wichtige Wirkstoffklasse zur Cholesterinsenkung. Bekannte Beispiele sind das Atorvastatin® (12), Simvastatin® und das Rosuvastatin® (28). Allen Statinen gemeinsam

ist eine 3,5-Dihydroxysäure Seitenkette sowie ein (hetero-)zyklischer Baustein.^[35] Über eine doppelte Aldolreaktion der DERA ist das 3,5-Dihydroxysäure-Motiv der Seitenkette auf elegante Weise über die Verwendung der DERA zugänglich. Seit der ersten Beschreibung dieser DERA-Reaktion 1994^[34] verfolgten zahlreiche Arbeitsgruppen die Synthese der Statin-Seitenketten unter Verwendung der DERA. Dabei war das große Ziel, eine verbesserte Enzymvariante mit höherer Substrattoleranz, höheren Aktivität und schlussendlich optimierte Reaktionsbedingungen mit Zugang zu höheren Produktausbeuten zu finden. Wissenschaftler von *Diversa* (*Greenberg et al.*) befassten sich mit der DERA-Aktivität und der Produktivität hinsichtlich des gewünschten DERA-Fragmentes **29**.^[3] Dabei suchten sie in genomischen Bibliotheken nach DERA-Varianten, welche bezüglich der Substrate Choracetaldehyd (**30**) und Acetaldehyd (**2**) höhere Aktivitäten zeigten. Sie fanden eine DERA aus einem unbekannten Organismus mit < 30 % Sequenzidentität zur DERA aus *E. coli*, welche sich durch ihre erhöhte Aktivität und Substrattoleranz auszeichnete. Unter Verwendung dieses hoch effizienten Biokatalysators in einem *fed-batch* Ansatz erzielten sie eine Produktivität von 93 g/L bei einer Katalysatorbeladung von 2 Gew-% und herausragenden Stereoselektivitäten von > 99.5 % *ee* und 96.6 % *de*.^[35] Das verwendete Reaktionsschema der *Diversa*-Forscher ist in Schema 20 abgebildet.

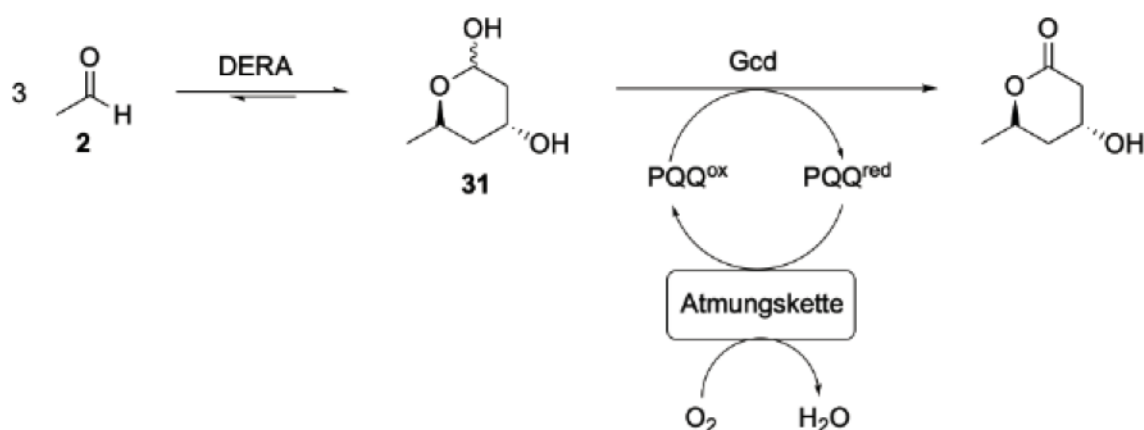


Schema 20: Chemoenzymatische Statin-Synthese am Beispiel Atorvastatin® (12) und Rosuvastatin® (28) nach *Greenberg et al.*^[3]

Auch Forscher der *DSM* etablierten die DERA-katalysierte Synthese der Statin-Seitenkette in industriellem Maßstab, ebenfalls ausgehend von den kostengünstigen Substraten Chloracetaldehyd (30) und Acetaldehyd (2). Ihr Verfahren, dass sich insbesondere durch eine hohe Produktivität von >100 g/L auszeichnete, meldeten Sie 2003 zum Patent (WO 2003006656) an.^[87]

Nachdem 1994 die Arbeitsgruppe von *Wong* den Grundstein dieser DERA-Anwendung legte, berichteten nun auch sie von einer biokatalytischen Synthese der Statin-Seitenkette. Dazu befassten sie sich mit der geringen Substrattoleranz der DERA gegenüber unphosphorylierten Substraten und präsentierten eine DERA-Variante mit einer Punktmutation S238D.^[88] Durch den Austausch in der Phosphatbindetasche des Enzyms akzeptierte die DERA nun 3-Azidopropionaldehyd als Substrat. Dieses ließ sich nun mit zwei Molekülen Acetaldehyd (2) in einem chemoenzymatischen fünf Schritte umfassenden Prozess zu dem finalen Baustein der Statin-Seitenkette umsetzen. *Sakuraba et al.* berichteten

kurze Zeit später von zwei hyperthermophilen DERAs aus den Organismen *Pyrobaculum aerophilum* und *Thermotoga maritima*, welche einen deutlich höheren Umsatz bei der sequenziellen Aldolreaktion mit Acetaldehyd (2) zeigten als die mesophile DERA aus *E. coli*.^[70, 89] Zurückzuführen war dies auf ihre größere Acetaldehydresistenz, wenn auch ihre enzymatische Aktivität unterhalb jener der DERA_{EC} lag. Nach 20 h Inkubation der hyperthermophilen Enzyme in 300 mM Acetaldehyd (2) zeigten beide eine Restaktivität von überzeugenden 50 %. Auf Basis dieser Beobachtungen konnten die beiden DERA-Varianten als potenzielle Kandidaten für den Einsatz in der Biokatalyse gezählt werden. Viele weitere Studien dieser DERA-Reaktion mit dem Ziel einer effizienteren biokatalytischen Synthese der Statin-Seitenkette folgten,^[36, 90] darunter ein chemoenzymatischer Ansatz mittels Ganzzell-Katalyse.^[38] Unter Verwendung einer *E. coli* DERA konnte eine Produktivität von bis zu 50 g/L/h mit einer Ausbeute von >80 % und einer exzellenten Stereoselektivität von >99.9 % erzielt werden. Ausgehend von Chloracetaldehyd (30) oder Acetyloxyacetaldehyd konnte ein kosteneffizienter und umweltfreundlicher Prozess zur Synthese der chiralen Lactol-Intermediate beschrieben werden. Kurz darauf beschrieb die gleiche Arbeitsgruppe um *Mrak* die Weiterentwicklung der Ganzzell-Katalyse durch Kopplung mit einer Pyrroloquinolin-quinon(PQQ)-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (Gcd) für die regioselektive Oxidation des DERA-katalysierten Lactol-Intermediates **31** (Schema 21).^[91]



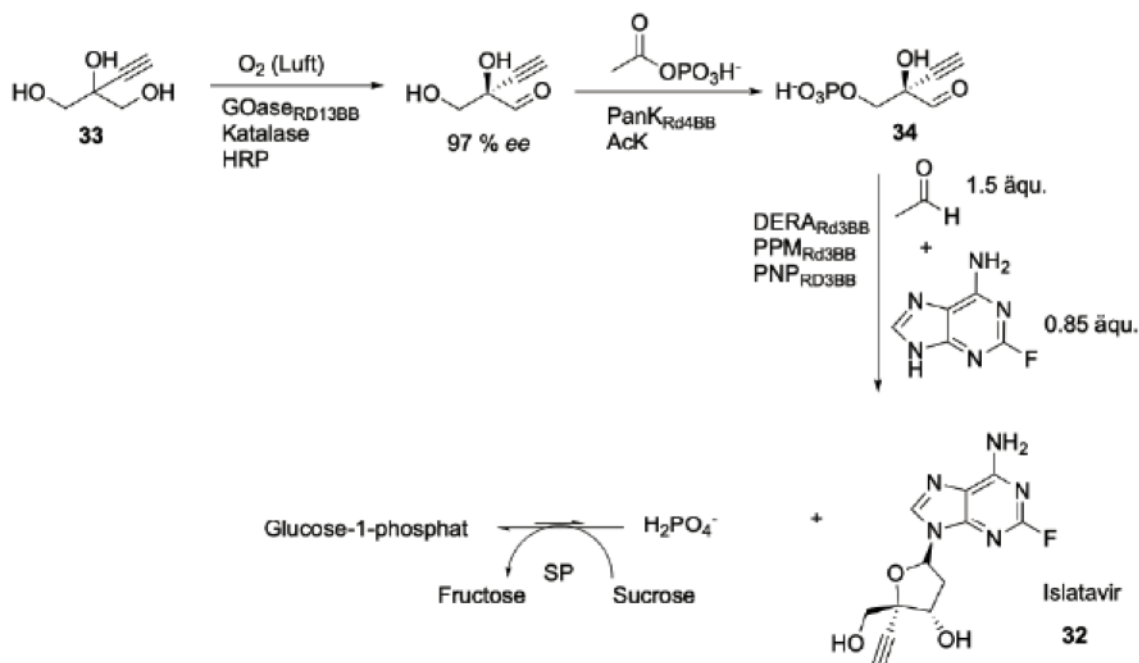
Schema 21: Ganzzell-Katalyse zur Synthese der Lactol-Intermediate als Bausteine der Statine nach *Vajdic et al.*^[91] durch Kombination der DERA und einer PQQ-abhängigen Glucose-Dehydrogenase (Gcd).

Bis heute ist das Interesse an der Synthese dieser kommerziell wichtigen Statine ungebrochen und die Nachfrage an optimierten Synthesebedingungen wächst stetig. So wurde erst kürzlich von *Grabner et al.* von einer DERA-katalysierten Synthese der Intermediate der Statin-Seitenkette unter Verwendung der *Flow* Chemie berichtet.^[39] Dafür immobilisierten sie eine *E. coli* DERA in einer Alginat-Luffa-Matrix. Luffa ist eine Gattung von Kürbisgewächsen, welche sich durch ihre schwammartige Struktur auszeichnet. Für eine

effizientere Katalyse verwendeten sie die von *Dick et al.* zuvor beschriebene Acetaldehyd-tolerante DERA-Variante DERA_{EC}-C47M.^[10] Als Substrat wurde Acetaldehyd (2) und Chloracetaldehyd (30) verwendet, nachdem bei der Verwendung der aromatischen Aldehyde Benzaldehyd und Zimtaldehyd sowie Acrolein kein Umsatz beobachtet wurde. Durch systematische Prozessoptimierung mittels *Design of Experiment* erwiesen sich die Reaktionsbedingungen bei einem pH von 7.5 und eine Temperatur von 32.5 °C als optimal. So konnte bei einer Flussrate von 0.1 mL/min, einer Konzentration von Chloracetaldehyd (30) von 0.25 M und 0.5 M Acetaldehyd (2) eine Produktivität von bis zu 4.5 g pro Tag erreicht werden.

Neben den Wirkstoffen der Statine, gibt es weitere interessante Struktur motive, welche durch DERA-Katalyse erschlossen werden können. So wurde 2019 von Forschern von *Merck Sharp & Dohme* eine biokatalytische Kaskade zur stereoselektiven Synthese des HIV-Medikamentes Islatavir® (32) beschrieben.^[92] Diese *in vitro* Multienzym-Kaskade kombiniert insgesamt fünf mutagenetisch optimierte Enzyme sowie vier weitere Hilfsenzyme (vgl. Schema 22). Ausgehend von einfachen achiralen Bausteinen kann über drei biokatalytische Reaktionsschritte eine Gesamtausbeute von 51 % erzielt werden. Bei der verwendeten DERA handelt es sich um eine Variante aus dem psychrophilen Organismus *Shewanella halifaxensis*, welche 2016 bereits von *Dick et al.* beschrieben worden ist.^[93] Bei dieser wurde aus Gründen einer höheren Acetaldehydresistenz der Aminosäureaustausch C47V durchgeführt, basierend auf den Erkenntnissen von *Dick et al.*^[10] In Schema 22 ist der finale biokatalytische Pfad ausgehend von 2-Ethynylglycerol (33) dargestellt. Nach oxidativer Desymmetrisierung durch eine immobilisierte Galactoseoxidase (und Hilfsenzymen) und einer Phosphorylierung mittels einer ebenfalls immobilisierten Pantothenatkinase (co-immobilisiert mit Hilfsenzym), folgte der DERA-katalytische Prozessschritt mit 2-Ethynylglyceraldehyd-3-phosphat (34) als Analogon zur ihrem natürlichen Substrat Glyceraldehyd-3-phosphat (14) und 1.5 Äquivalente Acetaldehyd (2). Kombiniert mit einer Phosphopentomutase und einer Purinnucleosidphosphorylase konnte das gewünschte Islatavir® (32) synthetisiert werden. Besonders spannend an dieser biokatalytischen Sequenz ist hierbei der experimentelle Aufbau. Kompatible pH- und Temperaturbereiche sowie die Sucrosephosphorolyse zum Abfangen des Phosphats im letzten Reaktionsschritt als thermodynamische Triebkraft, welches ein Absenken der notwendigen Acetaldehydkonzentration begünstigt, ermöglichen eine gleichzeitige Durchführung dieser multienzymatischen Kaskade in einer wässrigen Reaktionslösung. Das finale Produkt

Islatavir® (32) konnte nach Kristallisation direkt aus der Reaktionslösung nach Filtration mit einer Reinheit von >95 % isoliert werden.



mutagenetisch angepasste Enzyme

GOase_{RD13BB}: Galactose Oxidase (*Fusarium graminearum*)
 PanK_{Rd4BB}: Pantothenat Kinase (*E. coli*)
 DERA_{Rd3BB}: DERA (*Shewanella halifaxensis*)
 PPM_{Rd3BB}: Phosphopentomutase (*E. coli*)
 PNP_{Rd3BB}: Purine Nukleoside Phosphorylase (*E. coli*)

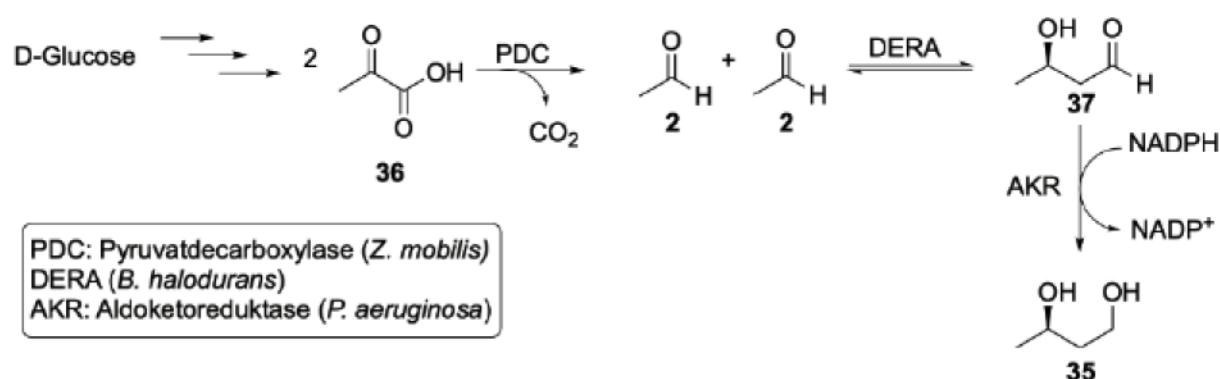
Hilfsenzyme

Katalase (*Bos taurus*)
 HRP: Meerrettichperoxidase (*Amoricia rusticana*)
 AcK: Acetat Kinase (*Thermotoga maritima*)
 SP: Sucrose Phosphorylase (*Alloscradovia omnicoles*)

Schema 22: Biokatalytische Kaskade zur Synthese des Medikamentes Islatavir®.^[92]

Eine weitere Anwendung der DERA-katalytischen Anwendung wurde 2018 von *Nemr et al.* beschrieben.^[94] Die biosynthetische Produktion von (*R*)-1,3-Butandiol ((*R*)-1,3-BDO) (35) in *E. coli* mit DERA als Schlüsselenzym der Synthese stand hier im Fokus der Forschung. Als Baustein für die Produktion von synthetischen Polymeren, diversen Pheromonen, Kosmetika und Pharmazeutika ist das Zielmolekül (*R*)-1,3-Butandiol (35), das bisher vor allem auf Wegen der Petrolchemie hergestellt wurde, von großem Interesse.^[95] Besonders die Entwicklung von umweltfreundlicheren Methoden steht im Mittelpunkt der Forschung.^[96] In einem ersten Schritt wurde ein heterologes Expressionssystem ausgehend von Pyruvat (36) zur Produktion von (*R*)-1,3-BDO (35) in einem *E. coli* Stamm K12 MG1655 entwickelt. Auf diese Weise konnten bereits 0.3 g/L (*R*)-1,3-BDO (35) erzielt werden. Zur Optimierung wurden folgend die Nebenprodukte Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol reduziert und anschließend eine Erhöhung der DERA-Aktivität des Systems forciert, um die Menge an dem für *E. coli* toxischen Acetaldehyd (2) zu minimieren. Abschließend wurde ein Zwei-Stufen-Fermentationsprozess in einem *E. coli* Stamm BD24 entwickelt, welcher in

einem 8-fach höheren Umsatz zu (*R*)-1,3-BDO (35) von 2.4 g/L resultierte. Dieser Prozess beinhaltete einen modularen Aufbau, indem ein Modul zur Acetaldehyd-Produktion entwickelt wurde und ein zweites Aldolase-basiertes Modul zur Umsetzung zum Zielmolekül (*R*)-1,3-BDO (35). Als Aldolase wurde eine DERA aus *Bacillus halodurans* gewählt, welche sich unter *in vivo* Bedingungen als effektivste Variante in der Produktion des (*R*)-1,3-BDO (35) herausstellte. Zur Acetaldehydproduktion wurde eine Pyruvatdecarboxylase (PDC) verwendet. Eine Aldoketoreduktase (AKR) setzte schließlich selektiv das einfache DERA-Produkt 3-Hydroxybutanal (37) zu dem Zielprodukt 35 um. Schema 23 veranschaulicht die final entwickelte biosynthetische Produktion des (*R*)-1,3-BDO (35). Ein Jahr später konnte die gleiche Arbeitsgruppe ihr beschriebenes Produktionssystem auf eine 5–6-fache Produktionsrate hinsichtlich des (*R*)-1,3-BDO (35) verbessern.^[97] Zielführend war hier die Kristallisierung und anschließende mutagenetische Studie der verwendeten DERA aus *Bacillus halodurans*. Die Einführung von hydrophoben Resten nahe des katalytischen Lys-155 führte die Wissenschaftler zu zwei verbesserten Mutanten F160Y und F160Y/M173I mit verbesserter Aktivität und Produktivität hinsichtlich (*R*)-1,3-BDO (35).



Schema 23: Biosynthetischer Prozess ausgehend von D-Glucose zur Produktion von 1,3-(*R*)-Butandiol (35) mit DERA als Schlüsselenzym.^[94, 97]

5.3 *FLOW*CHEMIE

5.3.1 EINFÜHRUNG IN DIE *FLOW*CHEMIE

Wie in Kapitel 5.2 veranschaulicht, ist das Interesse an biokatalytischen Anwendungen sowohl im Labor- als auch im industriellen Maßstab ungebrochen. So ist es kaum verwunderlich, dass unentwegt an besseren Methoden einer effizienten Synthese geforscht wird. Um das ganze Potenzial von Biokatalysatoren für synthetische Zwecke nutzen zu können, wird in den vergangenen Jahren immer öfter auf das Konzept der kontinuierlichen Reaktionsführung mittels Flow Chemie zurückgegriffen. Dieses in der Industrie schon länger etablierte System,^[98-100] findet innerhalb der letzten 20 Jahre immer größeren Zuwachs. Grund dafür liegt vor allem in der technischen Entwicklung von labortauglichen kontinuierlichen Reaktionssystemen.^[101-103] Doch was zeichnet die *Flow* Chemie aus und macht sie für die Forschung so attraktiv?

Das grundlegende Konzept der *Flow* Chemie ist vergleichsweise simpel. In einer kontinuierlichen Reaktion wird eine Flüssigkeit in einen Reaktor gepumpt, in welchem die gewünschte Reaktion stattfindet. Anschließend verlässt das fertige Produkt den Reaktor und steht für weitere Umsetzungen, Reinigungsschritte oder zur Analyse bereit. Ein solches beispielhaftes Set-Up eines klassischen *Flow*-Prozesses ist in Abbildung 4 abgebildet. Je nach Anforderungen der gewünschten Reaktion ist der experimentelle Aufbau spezifisch anzupassen. Abhängig von der Größe und der Komplexität der Reaktion richtet sich der technische und zeitliche Aufwand, um ein passendes *Flow*-System zu entwickeln. Nach *Plutschak et al.* besteht ein klassisches *Flow*-System aus acht grundlegenden Modulen: Ein geeignetes Pumpsystem zur Zufuhr der Reagenzien, einem Mischmodul, dem Reaktor, einem *Quenching*-Modul, einer Druckregulation, einem Modul zum Sammeln der Proben, einem Analytik- sowie einem Reinigungsmodul (vgl. Abbildung 4).^[101] Alle Module sind dabei sowohl austauschbar, als auch mehrfach wiederholbar, woraus sich Möglichkeiten für komplexe Reaktionskaskaden mit diversen Modifikationen bieten.

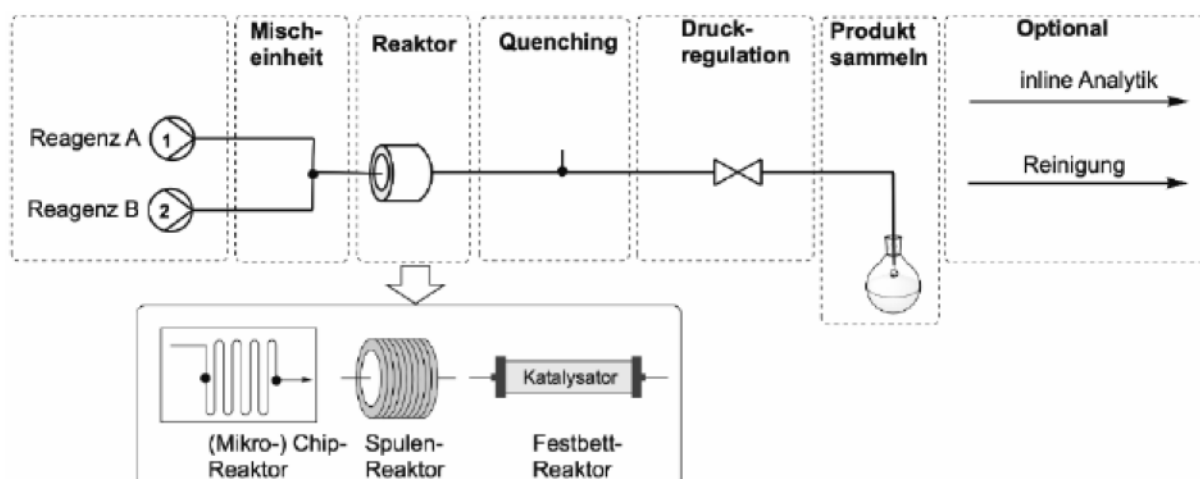
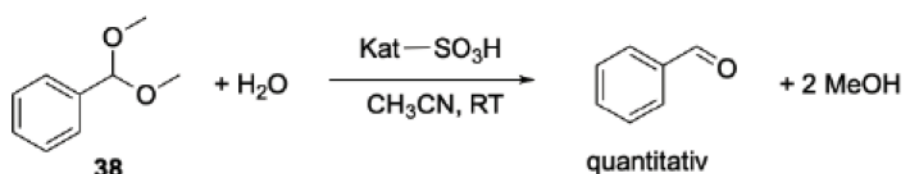


Abbildung 4: Aufbau eines klassischen kontinuierlichen Flow-Setups bestehend aus (mindestens) acht Modulen, betrieben über zwei Pumpen.^[101]

Das Herzstück jedes *Flow*-Systems bildet der Reaktor. Er ist der Ort, an dem die beabsichtigte Reaktion stattfindet. Im Allgemeinen werden drei verschiedene Reaktortypen unterschieden: (Mikro-)Chipreaktoren, Spulenreaktoren oder Festbettreaktoren (vgl. Abbildung 4).^[101, 102] Welcher Reaktortyp der geeignetste ist, hängt vor allem von der gewünschten chemischen Reaktion ab. Durch ständige technische Weiterentwicklung von passenden Katalysatoren für *Flow*-Systeme ist heutzutage eine große Vielfalt durch die verschiedensten Reaktoren möglich. (Mikro-)Chipreaktoren zeichnen sich durch ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis aus, wodurch ein effizienter Wärmetransfer gewährleistet ist. Je nach Natur der chemischen Transformation, können die Chipreaktoren aus Glas, Keramik, Silikon oder rostfreiem Stahl bestehen. Neben der klassischen flüssig-flüssig-Katalyse, können durch Funktionalisierung der Reaktoroberfläche weitere Reaktionen adressiert werden. *Ricciardi et al.* berichteten von der Oberflächenfunktionalisierung der Innenwände eines Glaschip-Mikroreaktors zur heterogenen sauren Katalyse.^[104] In einem Einschrittverfahren funktionalisierten sie die freien Hydroxygruppen der Glasoberfläche mit einer starken Perfluoroalkylsulfonsäure. Die erfolgreiche Funktionalisierung verifizierten sie anschließend anhand einer Hydrolyse von Benzaldehyd-Dimethylacetal (**38**) in Acetonitril bei Raumtemperatur (vgl. Schema 24). Bei einer Verweilzeit der Reaktionslösung innerhalb des funktionalisierten Katalysatorreaktors von 60 s konnten sie so einen quantitativen Umsatz erzielen. Die Reaktivität des funktionalisierten Chips konnte für 6 h bis 2 d abhängig vom Lösungsmittel genutzt werden.

a)

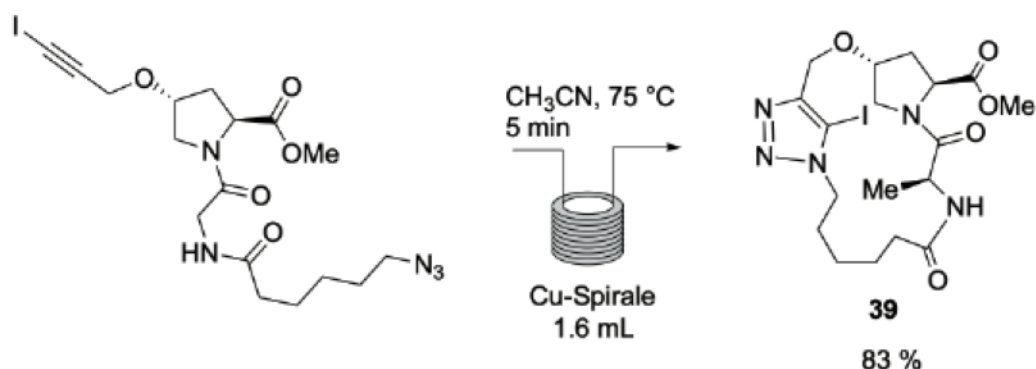


b)



Schema 24: a) Verwendung eines Chipreaktors zur quantitativen Entschützung von Benzaldehyddimethylacetat (**38**) und b) Oberflächenfunktionalisierung der Glaschipreaktors mittels einer starken Perfluoroalkylsulfonsäure in Toluol.^[104]

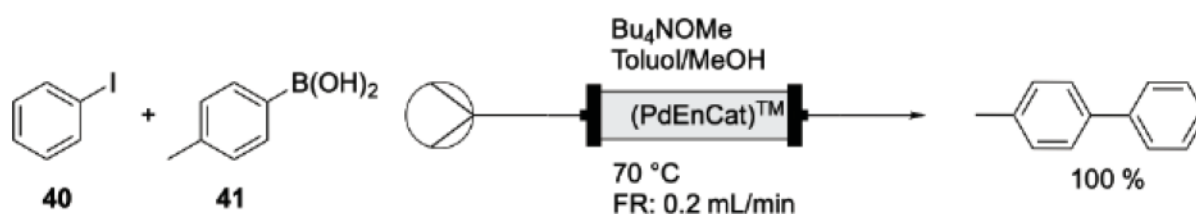
Die meist aus einfachen inerten Polymeren (z.B. Polytetrafluorethylen, Polyfluoralkoxy oder Polyvinylidenfluorid) bestehenden kostengünstigen Spulenreaktoren etablierten sich als attraktive Alternative zu den Chipreaktoren. Ihr Material eignet sich hervorragend für Reaktionen, welche unter UV/Vis-Bestrahlung katalysiert werden. Durch das Aufwickeln um eine entsprechende Lichtquelle können so auf effizientem Weg photochemische Reaktion initiiert werden.^[101] Durch die spiralförmige Aufwicklung des Reaktorschlauches können sehr lange Reaktionszeiten (mit entsprechend angepassten Flussraten) erreicht werden. Eine Vielfalt kann auch bei diesem Reaktortyp durch das Material gewonnen werden. So berichteten erstmals *Bogdan* und *James* (2011) von Katalyse mittels Kupferrohrreaktoren.^[105, 106] In einer kupferkatalysierten *Huisgen* 1,3-dipolaren Cycloaddition synthetisierten sie 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole **39** ausgehend von Alkylhalogeniden, Natriumazid und Acetylen mit Ausbeuten bis zu 83 % in einem kontinuierlichen *Flow*-Prozess (vgl. Schema 25).



Schema 25: Synthese von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen **39** mittels eines Kupfer-katalysierten *Flow*-Prozesses.^[105]

Für klassische heterogene Katalyse unter Verwendung eines *Flow*-Systems wird am häufigsten der Festbettreaktor verwendet.^[101, 107] Unter diesem versteht man eine meist säulenförmige Apparatur, welche mit einem festen katalytisch aktivem Material, häufig immobilisierte Katalysatoren, befüllt ist. Verschluss durch zwei filterartige Membranen wird so die Reaktionslösung durch den Reaktor gepumpt. Die katalytische Aktivität wird bestimmt durch die Menge an Material, abhängig von der Länge und dem Durchmesser des Reaktors. Neben Glas sind diverse Polymere sowie rostfreier Stahl beliebte Materialien. Im Allgemeinen handelt es sich bei den katalytischen Substanzen um Polymerperlen, welche mit verschiedenen Liganden oder koordinierten Metallionen versehen sind. Eine weit verbreitete Anwendung dieser Art der *Flow*-Chemie sind Hydrierungen.^[101, 107] Der Festbettkatalysator besteht beispielsweise aus klassischen heterogenen Katalysatoren wie Pd/C, Pt/C oder Raney-Nickel. Der häufig *in situ* mittels Elektrolyse gebildete Wasserstoff wird mit den Substraten vermischt und über den Reaktor geleitet, wo die Hydrierungsreaktion stattfindet. Labortaugliche kommerziell erhältliche Geräte dieser Art werden bekanntermaßen unter dem Namen *H-Cube*® vertrieben und finden bereits in vielen organischen Syntheselaboren Anwendung.^[108] So auch von *Steven V. Ley* und Mitarbeitern, die unter Verwendung eines *H-Cube*® die Hydrierung von Iminen zu ihren korrespondierenden Aminen beschrieben haben.^[109] Sie erzielten für eine Reihe von aliphatischen und aromatischen Iminen gute bis exzellente Ausbeuten (>80 %) mit exzellenten Reinheiten (>95 %). Als Reaktor wurde eine 10 % Pd/C-Kartusche verwendet. Aber auch in weiteren organischen Reaktionen fand die Methodik der Festbettreaktoren bereits erfolgreich Einzug, wie z.B. bei Kreuzkupplungen oder Metathese-Reaktionen.^[110-114] In einer kontinuierlichen Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion verwendete ebenfalls die Arbeitsgruppe von *Steven V. Ley* in einen mit Polyharnstoff eingeschlossenes Palladium(II)-acetat ([PdEnCat]TM) gefüllten Reaktor in Kombination mit *n*-Butylammoniumsalzen.^[110] Als Substrate dienten Iodbenzol (**40**) und *p*-

Toluolboronsäure (**41**). Diverse Butylammoniumsalze wurden getestet. Die besten Resultate konnten mit Bu₄NOMe (1 mmol) in Toluol:MeOH (9:1) bei 70 °C nach einmaligem Durchlauf durch den Reaktor (5 cm x 0.45 cm) bei einer Flussrate von 0.2 mL/min erzielt werden (vgl. Schema 26). Eine homogene Reaktionslösung stellte sich während der Reaktionsoptimierung für eine optimale Wechselwirkung von Substraten und Katalysator als essenziell heraus.



Schema 26: Suzuki-Kupplung unter Verwendung der kontinuierlichen *Flow*-Chemie mit [PdEnCat]TM als Katalysator im Festbettreaktor.^[110]

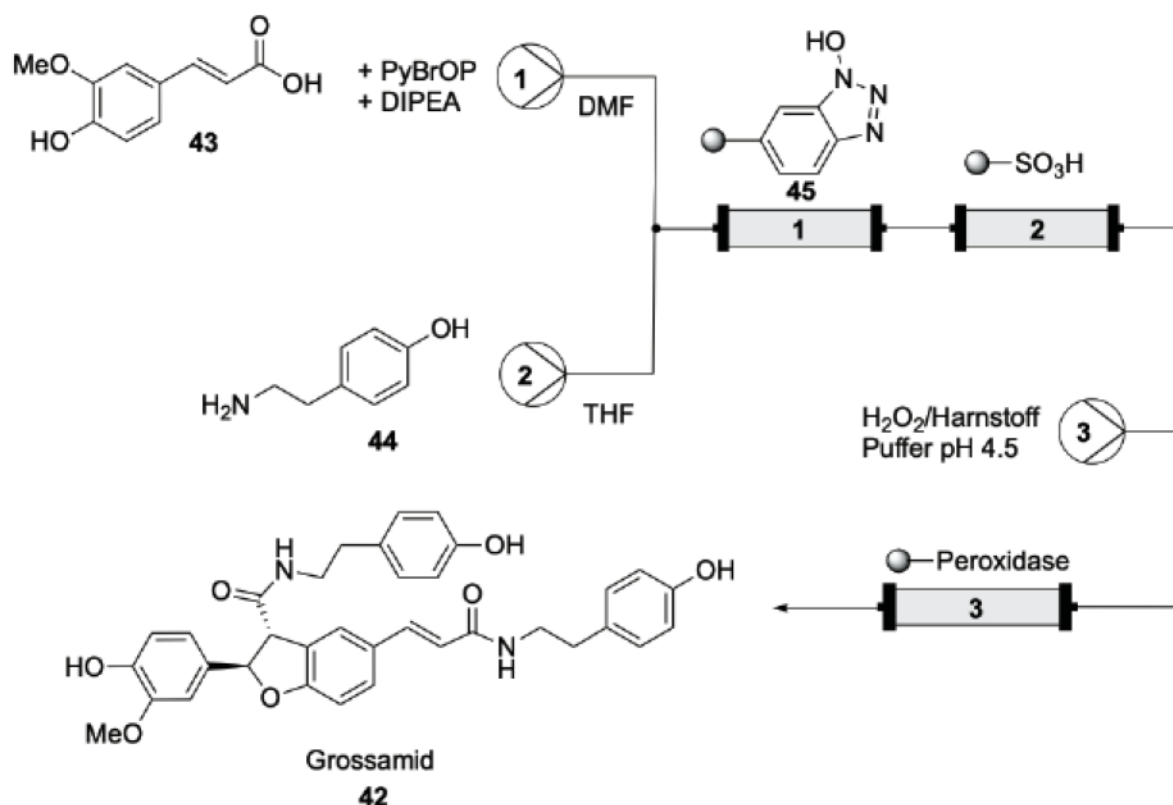
Neben der Umsetzung der klassischen chemischen Katalysatoren in der *Flow* Chemie, eröffnet die Nutzung der Festbettreaktoren auch die Verwendung von Biokatalysatoren. Voraussetzung ist dafür eine erfolgreiche und effiziente Immobilisierung des gewünschten Enzyms. Da die Verwendung von Biokatalysatoren in *Flow*-Prozessen im Fokus der vorliegenden Arbeit steht, soll diese Thematik im folgenden Kapitel 5.3.2 im Detail beleuchtet werden und an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt sein.

Im Gegensatz zur klassischen Synthese im Batch, weist die *Flow* Chemie in der Nutzung mit chemischen oder biologischen Katalysatoren einige Vorteile auf: Ein kontrollierter und effizienterer Wärmetransfer, eine bessere Durchmischung der Reagenzien und damit kürzere Reaktionszeiten, ein einfacheres Skalieren, eine Reduzierung der Kosten, mehr Nachhaltigkeit sowie die Möglichkeit des sicheren Umgangs mit toxischen Substanzen zeichnen die Methodik aus. Durch eine bessere Kontrollmöglichkeit der einzelnen Reaktionsparameter wird ein gezielteres Eingreifen in die Reaktion möglich. Dies kann neue Reaktionen und die Isolierung von bisher ungreifbaren Reaktionsprodukten ermöglichen. Ebenso bieten sich Möglichkeiten der Automatisierung.^[101, 102, 115-120]

In der Fülle an Möglichkeiten, die die *Flow* Chemie bietet, liegt auch der Nachteil dieses Konzeptes versteckt. Zum einen ist die Anschaffung des geeigneten Equipments teuer, zum anderen kann der Aufbau und die Entwicklung eines effizienten Reaktionssystems sehr zeitintensiv sein. Die Methodik der *Flow* Chemie ist keine universelle Lösung, die ihren Vorteilen für jede denkbare Reaktion gerecht werden kann. Daher bleibt es für jede Reaktion und jeden synthetischen Zweck abzuwägen, ob eine Realisierung und Entwicklung eines kontinuierlichen *Flow*-Prozesses sinnvoll sind. Die Kombinationsmöglichkeit verschiedener

Katalysatoren in Multistep-Kaskaden ist für den organischen Chemiker in erster Linie ein attraktives Werkzeug, andererseits ist die Umsetzung an zahlreiche Bedingungen geknüpft. So müssen Reaktionsbedingungen gefunden werden, unter welchen alle verwendeten Katalysatoren effizient genutzt werden können. Besonders in der Kombination der chemischen und Biokatalysatoren stellt die Wahl eines geeigneten Reaktionsmediums eine Herausforderung dar, da letztere bekanntermaßen die klassischen organischen Lösungsmittel weniger gut tolerieren. Es müssen Verdünnungseffekte durch Zugabe weiterer Reagenzien über weitere Pumpen in das Reaktionssystem bedacht werden, sowie die Auswirkungen auf die Flussgeschwindigkeit und den davon abhängigen Umsätzen jedes einzelnen Katalysators. Verschiedene Reaktionskinetiken der einzelnen Katalysatoren müssen durch die Wahl geeigneter Reaktionsparameter in Einklang gebracht werden.^[107] Ein gutes synthetisches Verständnis und Expertise der gewünschten Reaktion sowie ein Verständnis für verfahrenstechnische Zusammenhänge sind für die erfolgreiche Umsetzung eines *Flow*-Prozesses essentiell.^[118, 119]

Gelingt die Entwicklung eines geeigneten Systems, bietet die Wahl des *Flow*-Systems eine elegante und effiziente Möglichkeit der Reaktionsführung dort, wo sie sinnvoll eingesetzt werden kann. Beispiele dafür sind vor allem in der Naturstoffsynthese und der Synthese von APIs (englisch: *active pharmaceutical ingredients*) zu finden, wo viele Katalysatoren in einem kontinuierlichen *Flow*-Prozess kombiniert werden.^[101, 121, 122] Bereits im Jahr 2005 beschrieben *Baxendale et al.* die erste voll automatisierte Naturstoffsynthese von Neolignin Grossamid (**42**) unter kontinuierlicher Reaktionsführung.^[123, 124] Hier konnten erfolgreich drei verschiedene Reaktoren, darunter zwei klassisch chemische und ein enzymatischer Katalysator, miteinander kombiniert werden. Ein vereinfachtes Reaktionsschema ist in Schema 27 dargestellt. Ausgehend von Ferulasäure (**43**) und Tyramin (**44**) wurde die Substratlösung in Gegenwart von Bromtripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBrOP) und Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Amidsynthese zunächst über einen Reaktor geführt, welcher mit immobilisierten Hydroxybenzotriazol (**45**) gefüllt war. Es folgte ein weiterer Festbettreaktor. Zur Entfernung von überschüssigem Amin aus dem Eluent der ersten Katalysatorsäule wurde die Reaktionslösung über immobilisierte Sulfonsäure geleitet. Mittels einer letzten Katalysatorsäule, in der sich eine an Kieselgel immobilisierte Peroxidase befand, konnte das finale Grossamid (**42**) durch diesen kontinuierlichen Reaktionsprozess in hoher Ausbeute isoliert werden.



Schema 27: Voll automatisierte Synthese von Grossamid 42 mittels kontinuierlicher *Flow* Chemie. Kombiniert werden drei heterogene immobilisierte Katalysatoren in Festbettreaktoren, zwei chemische sowie ein enzymatischer Katalysator.^[124]

Weitere teils komplexere kontinuierliche Reaktionskaskaden konnten in den letzten Jahren erfolgreich realisiert werden.^[121] Das Interesse an dieser attraktiven aber auch herausfordernden Reaktionsführung wächst stetig und die Möglichkeiten der Katalysatorentwicklung scheint noch nicht erschöpft zu sein.

5.3.2 BIOKATALYSATOREN IN DER *FLOW*CHEMIE

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln thematisiert, stellen Enzyme bei der Anwendung in der organischen Synthese attraktive Alternativen zu klassisch chemischen Katalysatoren dar, deren Vorteile bereits in vielen organischen Laboren als auch in der Industrie Anklang gefunden haben.^[23, 125-129] Ihre herausragenden Regio-, Stereo- und Chemoselektivität zeichnet sie besonders aus. Durch die bevorzugt milden Reaktionsbedingungen der Enzyme können sie eine interessante Lösung bieten, um dem allgegenwärtigen Bestreben nach umweltfreundlicheren Reaktionsprozessen zu begegnen. Durch die heutzutage effizienten Möglichkeiten der Enzymoptimierung durch *Protein Engineering* Strategien, werden stetig neue Reaktionspfade ermöglicht und die enzymkatalysierte Produktpalette erweitert.^[69, 130, 131]

So liegt es nahe, dass es von Interesse ist, die Vorteile der Biokatalysatoren mit den dargelegten Vorteilen der kontinuierlichen *Flow* Chemie zu kombinieren. Die Menge an Veröffentlichungen Jahre 2015 bis 2021 belegen einen stetig wachsenden Trend in dem Gebiet der kontinuierlichen Biokatalyse (Datenerhebung mit *google scholar* unter dem Stichwort „continuous flow biocatalysis“). Diese Entwicklung der Veröffentlichungen von Manuskripten und Patenten zur „kontinuierlichen Biokatalyse“ von 2015 bis 2021 ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt. Mit über 5000 Veröffentlichungen im Jahr 2020 kann ein Zuwachs von rund 60 % seit 2015 verzeichnet werden. Diese Zahlen zeigen eindrucksvoll das Potenzial, dass sich durch die Kombination dieser beiden Reaktionssysteme auszeichnet und neue Möglichkeiten der Reaktionsführung ermöglicht.^[52, 132]

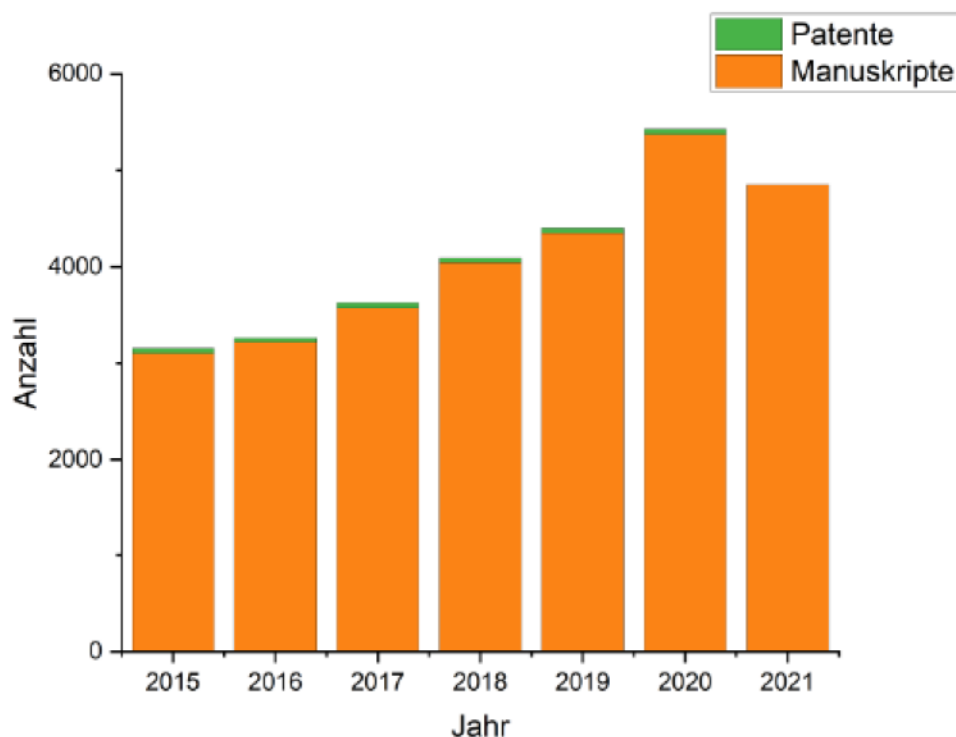


Abbildung 5: Anzahl der veröffentlichten Manuskripte und Patente zum Schlagwort „continuous flow biocatalysis“ seit 2015. Der Graph wurde anhand von Daten von *google scholar* erstellt. Berücksichtigt wurden Daten bis zum 06.09.2021.

Die Verwendung von Biokatalysatoren in einem kontinuierlichen Reaktionsprozess setzt voraus, dass Enzyme der *Flow* Chemie in einer Form zugänglich gemacht werden, um sie dort effizient nutzen zu können. Die Lösung dafür bildet neben der Ganzzell-Katalyse in erster Linie die Immobilisierung.^[52, 107, 132] Diese soll als Teil der vorliegenden Arbeit im Folgenden näher erläutert werden, während die Ganzzell-Katalyse der Vollständigkeit halber nur kurz erwähnt bleibt. Die Immobilisierung von Enzymen kann neben dem gewünschten Ziel,

nämlich den Biokatalysator in einer geeigneten Form zur Verfügung zu stellen, zusätzlich positive Effekte auf die Enzymeigenschaften haben. Häufig als problematisch erweist sich eine mangelnde oder nicht ausreichende Stabilität des Enzyms in organischen Lösungsmitteln, gegenüber chemischen Substraten oder der Reaktionstemperatur.^[128, 133, 134] In solchen Fällen können durch Immobilisierung des Enzyms positive Effekte hinsichtlich einer erhöhten (Thermo-)Stabilität erzielt werden. Ebenfalls können Verbesserungen der Enzymaktivität beobachtet werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen geben *Rodrigues et al.* in einem Review.^[135] Demnach wird das Enzym durch die Immobilisierung vollständig auf dem Trägermaterial dispergiert, wodurch Inaktivierungsmechanismen z.B. durch Agglomeration verhindert werden. Weitere Vorteile der Immobilisierung sind die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators sowie eine einfache Abtrennung des Biokatalysators vom Reaktionsmedium, die aufwändige Reinigungsverfahren des Produktgemisches überflüssig machen. Die dadurch längerfristige Nutzung des immobilisierten Biokatalysators durch einfaches Recycling ermöglicht einen umweltfreundlicheren Reaktionsprozess.^[44, 134, 136, 137]

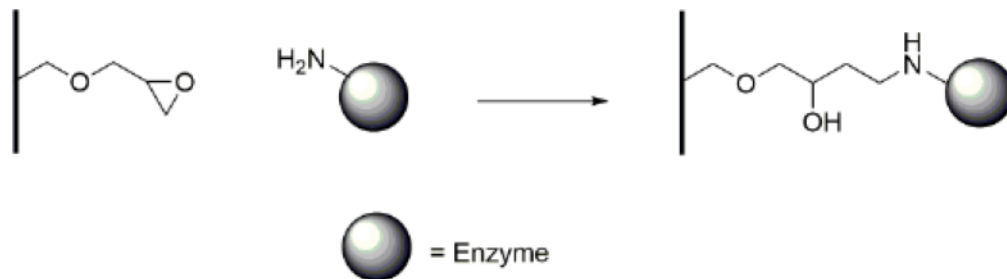
Grundsätzlich kann man drei Kategorien der Immobilisierungsmethoden unterscheiden, wobei nicht unerwähnt bleiben soll, dass Immobilisierungsmethoden nach diversen Gruppierungsprinzipien eingeordnet werden können:

1. Bindung an ein geeignetes Trägermaterial
2. Einschluss
3. *Cross-Linking*

Ein alternativer Ansatz wäre z.B. die Unterscheidung von Träger-basierten und Träger-freien Immobilisierungsmethoden, wie ihn Ölcüü *et al.* veranschaulichen.^[138]

Die Bindung des Proteins an ein Trägermaterial kann kovalent oder über nicht kovalente Wechselwirkungen (Adsorption, *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen, ionische Bindung) erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass bei nicht kovalenter Bindung (vor allem bei adsorptiven Methoden) mit zunehmender Verwendung häufig ein Ablösen des Enzyms zu beobachten ist. Stärkere Bindung erzielt man durch ionische Wechselwirkung. Möchte man ein Ablösen des Biokatalysators vermeiden, ist die Methode der Wahl die kovalente Bindung. Dieser liegt eine Reaktion zwischen einem funktionalisierten Trägermaterial und den Aminosäureresten der Proteinoberfläche zu Grunde (vgl. Schema 28). Nachteil dieser Strategie ist allerdings eine mögliche Deaktivierung oder der teilweise Verlust der Enzymaktivität. Ob derartige Effekte

für das Enzym der Wahl zu erwarten sind, muss von Enzym zu Enzym spezifisch getestet werden. Typische Trägermaterialien sind synthetische Harze, Biopolymere (z.B. Polysaccharide) oder anorganische Feststoffe, wie mesoporöses Silica oder Zeolithe.^[44, 134]



Schema 28: Schematische Darstellung einer kovalenten Immobilisierungsstrategie eines Enzyms an ein funktionalisiertes Trägermaterial.^[44]

Unter dem Begriff des „Einschlusses“ zur Immobilisierung von Enzymen verbergen sich genau genommen zwei verschiedene Mechanismen, welche fälschlicherweise in der Literatur häufig synonym verwendet werden. Zum einen handelt es sich um den Einschluss eines Proteins in eine Polymermatrix, wie Polyacrylamid oder Sol-Gele. Zum anderen beschreibt die sogenannte Verkapselung von Biokatalysatoren den Einschluss des Enzyms in kapselähnlichen Strukturen, dessen abgrenzende Membran durchlässig für Substrat und Produkt sind. Bei der Einschlussmethodik in Polymerstrukturen wird während des Immobilisierungsprozesses eine Polymermatrix um den Biokatalysator gebildet und das Enzym eingeschlossen. Die Polymerisation kann dabei abhängig vom System entweder chemisch (z.B. die Zugabe eines Radikalstarters)^[139, 140] oder physikalisch (z.B. Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke)^[141, 142] gestartet werden. Als gut etablierte Systeme sind hier die Verwendung von Siloxanen (Sol-Gele) oder Alginaten zu nennen. Vorteil dieser Methode ist der geringe Einfluss der Immobilisierungsmethode auf die Enzymstruktur, was einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität mit sich bringen kann.

Unter der dritten Methode der Immobilisierung versteht man das *cross-linking* von Proteinmolekülen mittels eines beigefügten bifunktionellen Reagenzes. Bei dieser Trägermaterial-freien Methode sind zwei Endprodukte zu unterscheiden, die *cross-linked* Enzymkristalle (CLECs®; englisch: *cross-linked enzyme crystals*)^[143] und die *cross-linked* Enzymaggregate (CLEAs®; englisch: *cross-linked enzyme aggregates*)^[144]. Der bifunktionelle *Cross-Linker*, meist Glutaraldehyd, reagiert dabei mit Aminogruppe auf der Proteinoberfläche und führt so zur Vernetzung der Enzymmoleküle. Voraussetzung für die Bildung von CLECs® ist die Kristallisierung des gewünschten Enzyms. Da die Kristallisation von Proteinen bekanntermaßen für zahlreiche Proteine einen langwierigen Prozess mit sich

zieht, ist diese Methode nur eingeschränkt durchführbar. Ist die Ausbildung von CLECs® für den gewünschten Biokatalysatoren möglich, zeichnen sich CLECs® durch ihre hohe Thermostabilität, ihre Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln und ihren meist hohen katalytischen Aktivitäten aus. Alternativ zum Kristallisationsansatz ist die gezielte Bildung von Enzymaggregaten durch die Zugabe von Salzen oder mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln zu einer wässrigen Proteinlösung möglich. Die zeitgleiche Zugabe eines bifunktionellen *Cross-Linker*, wie bereits bei den CLECs® meist Glutaraldehyd, führt zu der Bildung von CLEAs®. Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Einfachheit und damit verbunden dem geringen Kostenaufwand. Die Immobilisierung kann direkt aus dem Rohextrakt des Enzyms vorgenommen werden, was aufwändige Proteinreinigungsschritte überflüssig macht.^[44]

Letztendlich bleibt die Wahl der Immobilisierungsmethode in Abhängigkeit des gewünschten Enzyms gut abzuwägen, um die katalytische Funktion des Enzyms möglichst wenig einzuschränken und muss den Anforderungen des Reaktionssystems passend gewählt sein.

Eine Übersicht aller beschriebenen Immobilisierungsstrategien ist in Abbildung 6 abgebildet.

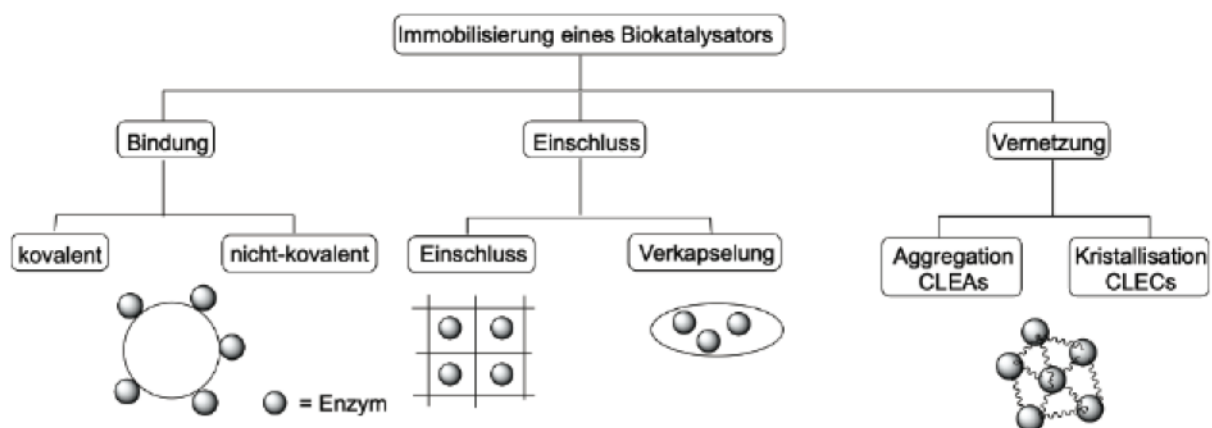
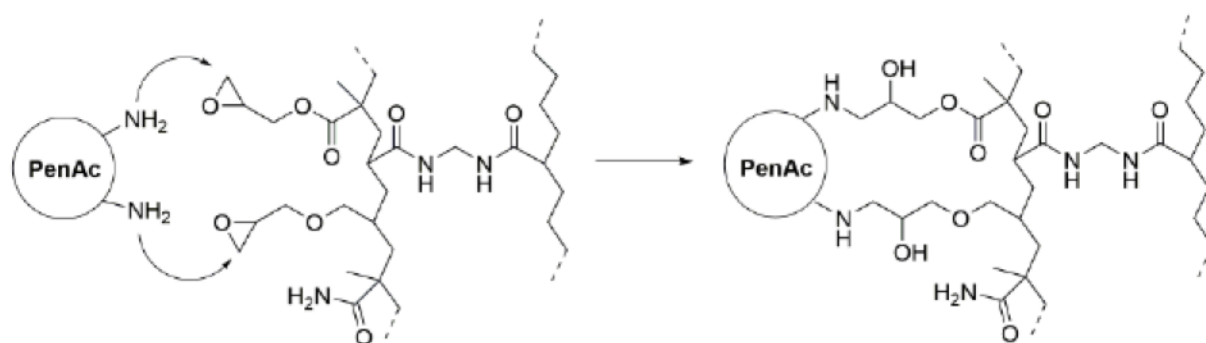


Abbildung 6: Übersicht der allgemeinen Immobilisierungsstrategien.^[44, 145]

Das einfachste Konzept der Umsetzung eines immobilisierten Biokatalysators in einer kontinuierlichen Reaktionsführung ist die Verwendung der in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Festbettreaktoren. Die für diesen Zweck geeignetste und weit verbreitete Immobilisierungsstrategie ist die der Bindung des Enzyms an ein geeignetes Trägermaterial. Wie oben bereits beschrieben, besteht die Möglichkeit der kovalenten und nicht kovalenten Anbringung des Enzyms an das Trägermaterial. Die Immobilisierung über eine kovalente Bindung des Enzyms an ein Trägermaterial ist dabei die weitverbreitetste Methode um

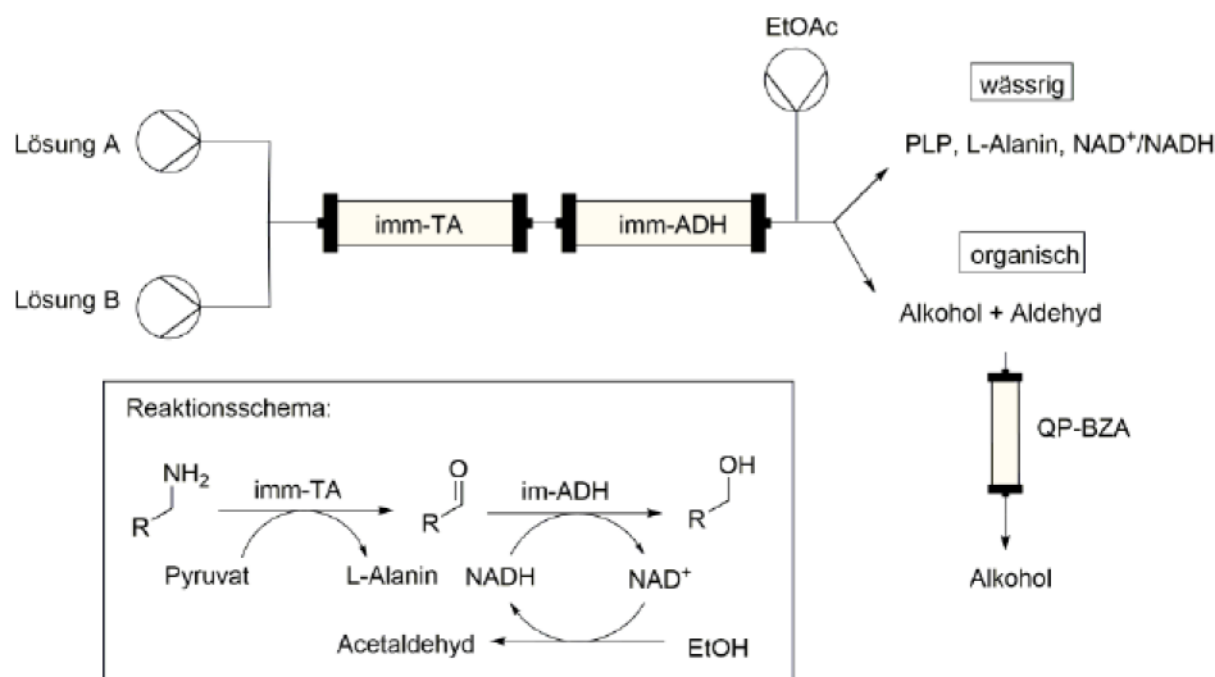
Biokatalysatoren an ein festes Trägermaterial zu knüpfen.^[132] Ein sowohl im Labor- als auch im Industriemaßstab weit verbreitetes Trägermaterial ist Eupergit® C.^[44, 146] Dabei handelt es sich um makroporöse Co-Polymerperlen bestehend aus *N,N'*-Methyl-di-(methacrylamid), Glycidylmethacrylat, Allylglycidylether und Methacrylamid. Eupergit® C zeichnet sich vor allem durch seine hohe Hydrophilie und hohe chemische und mechanische Stabilität aus. Dem Immobilisierungsprozess liegt die Bindungsknüpfung zwischen den Oxiran-Einheiten des Eupergit® C und der Aminofunktionalitäten des Enzyms bei neutralem bis alkalischem pH-Werten zu Grunde (vgl. Schema 29). Durch die hohe Dichte an Oxiran-Funktionen des Trägermaterials wird das Enzym über eine sogenannte Mehrpunktbefestigung (aus dem englischen: *multi-point-attachement*) gebunden, worin die hohe Stabilität dieser Immobilisate begründet ist. Epoxy-Funktionen, welche nicht mit Enzym gesättigt werden, können anschließend mit Reagenzien wie Mercaptoethanol oder Ethanolamin abreagiert werden. Ein industrielles Anwendungsbeispiel dieser Methode ist die Immobilisierung der Penicillin Acylase an Eupergit® C zur Produktion des Penicillin-Intermediates 6-Aminopenicillansäure.^[147] Bei >800 Zyklen konnte bis zu 60 % der Startaktivität der immobilisierten Penicillin Acylase erhalten bleiben. Zahlreiche weitere erfolgreiche Anwendungen der Immobilisierung von Biokatalysatoren an Eupergit® C sind in der Literatur beschrieben.^[146, 148-150]



Schema 29: Immobilisierungsmechanismus eines Enzyms an Eupergit® C am Beispiel der Penicillin Acylase.^[147]

Ein eindrucksvolles Beispiel der Anwendung von kovalent immobilisierten Biokatalysatoren beschreiben 2018 *Paradisi* und Mitarbeiter.^[151] In einer selbst erhaltenden Multienzym-Reaktionsschleife kombinieren sie eine Transaminase (aus *Halomonas elongata*) mit einer Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber) zur kontinuierlichen Umwandlung von Aminen zu Alkoholen. Immobilisiert wurden die beiden Enzyme dafür *in situ* an Epoxidharz-Perlen mit einer Restaktivität von >35%. Das voll automatisierte System beinhaltet ein Cofaktor-Recycling-System und einen Inline-Reinigungsschritt mittels QuadraPure™ BZA

(Benzylamin) zum Abfangen von nicht umgesetztem Substrat. Durch das separate Reaktordesign der beiden Enzyme konnte jeweils unter den optimalen Reaktionstemperaturen gearbeitet werden. Auf diese Weise wurden anhand einer Auswahl von aromatischen Aminen Ausbeuten von 86–97 % mit hervorragenden Stereoselektivitäten (>99 %) erzielt. Das zugrunde liegende Reaktionsschema ist in Schema 30 abgebildet. Beide immobilisierten Biokatalysatoren konnten über 20-mal ohne Aktivitätsverlust wiederverwendet werden.

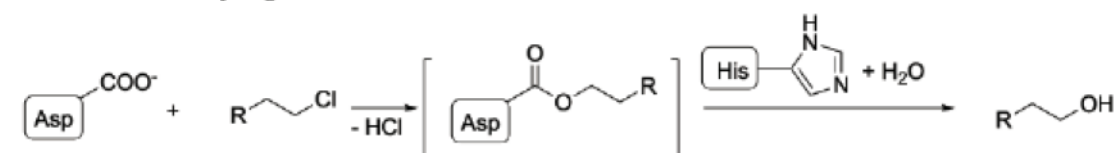


Schema 30: Enzymkaskade im *Flow*-Modus zur biokatalytischen Synthese von primären Alkoholen unter Verwendung einer immobilisierten Transaminase (*Halomonas elongata*; imm-TA) und einer immobilisierten ADH (Pferdeleber; imm-ADH) in zwei separaten Festbettreaktoren.^[151] Lösung A: 10 mM Amin in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 8), 2 M EtOH, 0.02 mM NADH. Lösung B: 10–20 mM Pyruvat in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 8), 0.2 mM PLP.

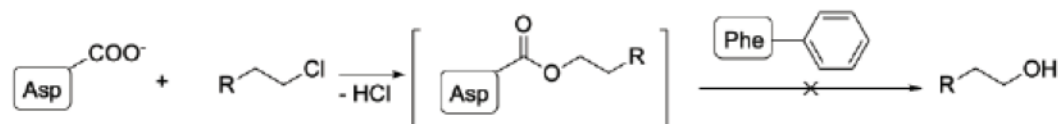
Eine besondere Ausführung der Immobilisierung von Biokatalysatoren ist die Verwendung von *Fusiontags*. Diese basieren auf der Fusion eines Proteins oder Peptids an den N- oder C-Terminus des gewünschten Biokatalysators. Wie alle auf Mutagenese basierende Veränderungen eines Enzyms kann auch diese Auswirkungen auf die katalytische Aktivität des Enzyms nehmen. Ob und welchen Einfluss eine Fusion am N- oder C-terminalen Ende des Biokatalysators hat, bleibt von Enzym zu Enzym zu untersuchen. Der auf diesem Weg fusionierte Biokatalysator kann anschließend über kovalente Bindung an ein spezifisches Trägermaterial oder über adsorptive Wechselwirkungen über Metall-Chelat-Komplexe immobilisiert werden.^[152] Bereits eine Vielzahl von spezifisch entwickelten Fusiontags sind heutzutage bekannt. Die Möglichkeiten reichen von einfachen ionischen Tags, wie

beispielsweise der weit verbreitete Polyhistidin-Tag (kurz: His-Tag) zur Chelatkomplexierung von zweiwertigen Metallionen bis hin zu komplexeren Systemen wie der HaloTagTM, der im Folgenden noch näher erläutert wird. Nachteile der Affinitätstags, wie der His-Tag, sind ihre unspezifische Bindung von Proteinen und daraus resultierend Verunreinigungen durch andere Proteine sowie ein frühzeitiges Ablösen des Biokatalysators vom Trägermaterial.^[153, 154] Bei dem HaloTagTM-System hingegen wird ein 33 kDa HaloTagTM genetisch an den gewünschten Biokatalysator gebunden. Anschließend wird das fusionierte HaloTag-Protein an ein synthetisches HaloTag-spezifisches Trägermaterial durch einfaches Mischen der beiden Komponenten schnell und irreversibel gebunden. *Leaching*-Effekte, wie sie bei vielen Affinitätstags beobachtet werden können, können auf diese Weise vermieden werden.^[153] Grundlage des molekularen Mechanismus dieses Systems bildet eine entwickelte Mutante einer Haloalkandehalogenase aus *Rhodococcus rhodochrous*. Die katalytische Funktion der Haloalkandehalogenase ist die (nukleophile) Substitution von Halogenalkanen zu ihren korrespondierenden Alkoholen. Während des katalytischen Zyklus kommt es zur Bildung einer kovalenten Esterbindung zwischen einem katalytisch aktiven Aspartat und dem Substrat. Über Basen-katalysierte Hydrolyse, vermittelt über ein hoch konserviertes Histidin des Enzyms, wird der entsprechende Alkohol freigesetzt und das katalytische Aspartat für den nächsten Zyklus wiederhergestellt (vgl. Schema 31). Durch gezielte Mutation dieses konservierten Histidins in ein Phenylalanin gelang es die stabile kovalente Bindung des Intermediates aufrecht zu erhalten, die die Grundlage der kovalenten Immobilisierungstechnik mittels HaloTagTM bildet.^[153, 155-157]

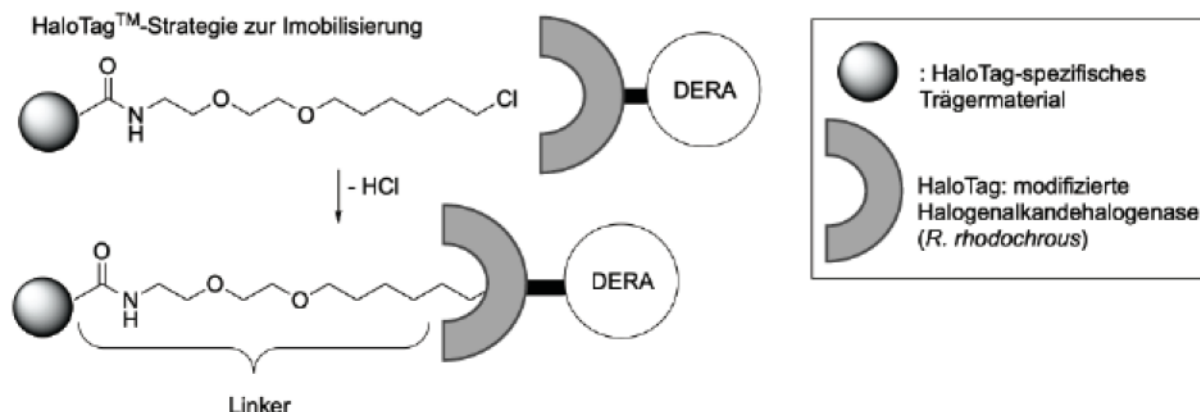
Native Haloalkandehydrogenase:



HaloTag™



HaloTag™-Strategie zur Immobilisierung

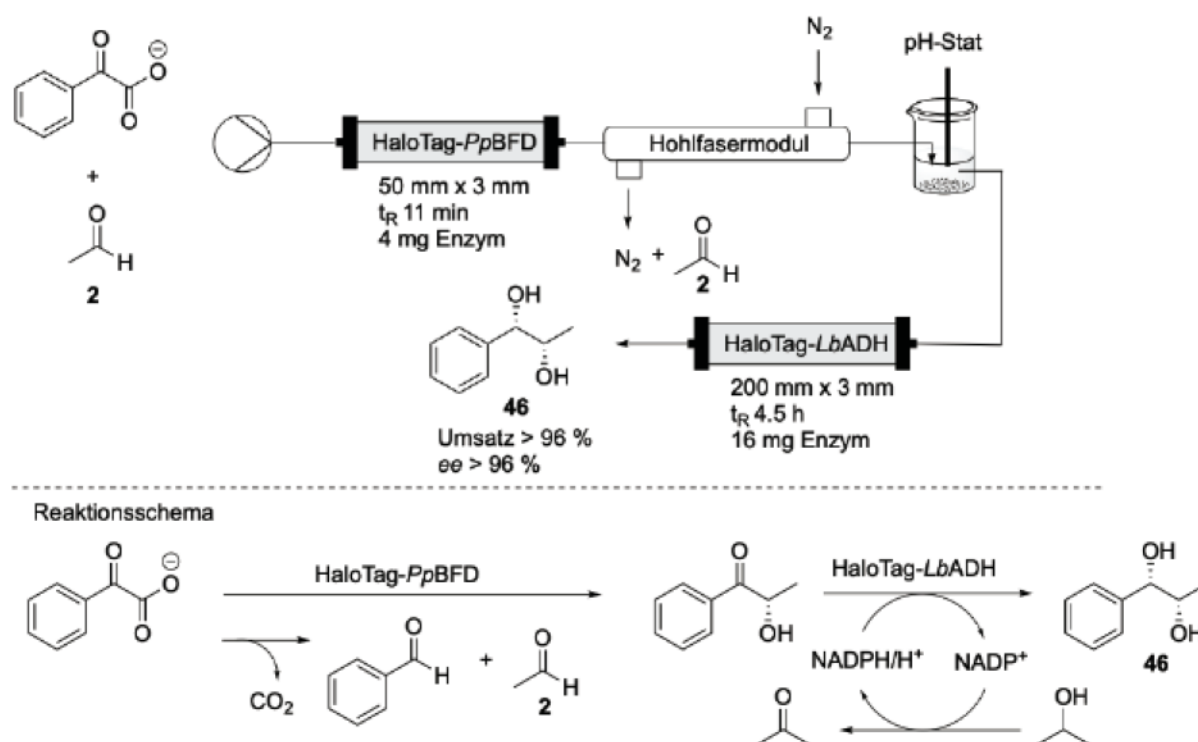


Schema 31: Zugrunde liegender molekularer Mechanismus des HaloTag™-Systems sowie die daraus entwickelte Strategie zur kovalenten Immobilisierung von Enzymen an eine HaloTag-spezifische Festphase.^[156, 158] Zentraler Schritt ist die Substitution eines Chloratoms des Linkers durch eine Aspartat-Funktionalität des HaloTags™ (vereinfacht dargestellt als grauer Halbkreis) unter Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Linker und HaloTag™.

Ursprünglich entwickelt zur Anwendung in der Zellbildgebung und Proteinlokalisierung,^[153, 156] fand das HaloTag™-System seinen Weg in die biokatalytische Anwendung. Eindrucksvoll wurde das Potenzial von Döbber *et al.* anhand einer HaloTag™-fusionierten Benzaldehydlyase (*Pseudomonas fluorescens*)^[158], einer HaloTag™-fusionierten Alkoholdehydrogenase (*Lactobacillus brevis*, kurz: HaloTag-LbADH)^[159] sowie anhand einer Enzymkaskade, bestehend aus zwei HaloTag™-fusionierten Enzymen gezeigt. Bei Letzterer handelt es sich um eine HaloTag™-fusionierte Benzylformiatdecarboxylase (*Pseudomonas putida*, kurz: HaloTag-PpBAL) sowie der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*, welche unter Verwendung von zwei separaten Festbettreaktoren im kontinuierlichen *Flow*-Modus miteinander zur Synthese von vicinalen chiralen Diolen kombiniert worden sind.^[160] Ein großer Vorteil der Immobilisierungsmethode mittels HaloTag™ sowie die Kombination mit der kontinuierlichen *Flow*-Reaktionsführung, ist die Möglichkeit der Immobilisierung direkt aus dem Rohextrakt des gewünschten Biokatalysators. Somit wird ein vorheriger aufwändiger Reinigungsschritt des Enzyms überflüssig und durch die hohe Spezifität des HaloTag™-Systems Verunreinigungen durch

Fremdproteine ausgeschlossen. Nach einer zweistufigen Reaktionsoptimierung der Enzymkaskade konnte eine Produktion von (1*S*,2*S*)-1-Phenylpropan-1,2-diol (**46**) mit einem Umsatz von bis zu 99 % und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1850 g L⁻¹ d⁻¹ mit einer Stereoselektivität >96 % erzielt werden. Nach Fusionierung der beiden Enzyme an das HaloTagTM-Protein zeigte die HaloTag-*PpBAL* eine Restaktivität von 60 % und die HaloTag-*LbADH* eine Restaktivität von 35 %, verglichen mit ihren entsprechenden freien Enzymaktivitäten. Wie auch bei anderen gängigen kovalenten Immobilisierungsmethoden wird von *Döbbber et al.* eine geringere Flexibilität durch das Anbringen des sterisch anspruchsvollen HaloTagsTM und die Bindung an das Trägermaterial als Grund für die teilweise Inaktivierung der Biokatalysatoren genannt. Da für den ersten HaloTag-*PpBAL*-katalysierten Reaktionsschritt zur Carboligierung ein Überschuss an Acetaldehyd (**2**) eingesetzt werden muss und somit im Durchfluss für die Folgereaktion, katalysiert von der HaloTag-*LbADH*, nicht umgesetzter Acetaldehyd (**2**) enthalten ist, wurde ein Hohlfaser-Modul zwischen die beiden Biokatalysatorreaktoren gesetzt. Auf diese Weise konnte effizient und schonend überschüssiger Acetaldehyd (**2**) aus der Reaktionslösung entfernt werden, welcher andernfalls anstelle des gewünschten Substrates (*S*)-Hydroxy-1-Phenylpropan-1-on (kurz: (*S*)-HPP) präferiert von der HaloTag-*LbADH* umgesetzt worden wäre. Zur Konstanthaltung eines neutralen pH-Wertes (pH 7.0), wurde ein pH-Stat-Modul angeschlossen, da eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich aufgrund der Decarboxylierung beobachtet wurde. Es folgte der zweite biokatalytische Reaktor der HaloTag-*LbADH* zur finalen Synthese des chiralen Diols **46**. Der gesamte experimentelle Aufbau ist in Schema 32 abgebildet.

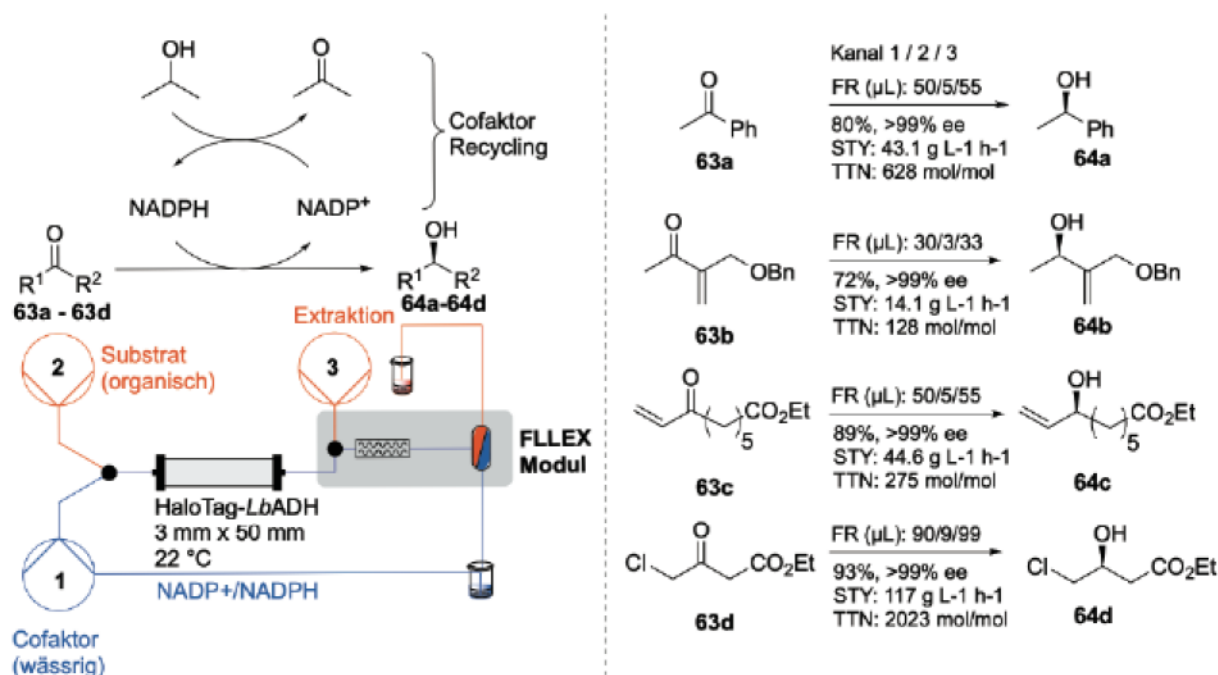
Experimentelles Set-Up



Schema 32: Kontinuierliche Enzymkaskade unter Verwendung von immobilisierter Benzylformiatdecarboxylase (HaloTag-PpBFD) und einer Alkoholdehydrogenase (HaloTag-LbADH) mittels des HaloTagTM-Systems zur Synthese von vicinalen chiralen Diolen.^[160]

Eine weitere innovative Anwendung in kontinuierlicher Reaktionsführung der HaloTagTM-fusionierten ADH aus *L. brevis* beschreibt 2020 Baumer *et al.*^[161] Fokus dieser Studie bildete die Entwicklung eines Cofaktor-Recyclingsystems im geschlossenen System des kontinuierlichen Flow-Prozesses und adressiert damit eine der besonderen Herausforderungen, die sich bei der Umsetzung biokatalytischer Redox-Systeme in der Flow-Katalyse darstellt. Sofern nicht (co-)immobilisiert, werden zugesetzte Cofaktoren im Laufe eines kontinuierlichen Reaktionsprozesses bekanntlich ausgewaschen, was einen erhöhten Einsatz der teuren Substanzen zur Konsequenz hat. Das von Baumer entwickelte quasi-stationäre Zwei-Phasen-Flow-System erlaubt ein effizientes Cofaktor-Recycling für Cofaktoren, sodass diese lediglich in katalytischen Mengen eingesetzt werden müssen. Zusätzlich wurde ein einfacher Austausch von Substraten ermöglicht. Gezeigt wird dies am Beispiel der HaloTag-LbADH und vier Modells substraten in NADPH-Abhängigkeit unter Verwendung einer kontinuierlichen biokatalytischen Vorrichtung (vgl. Schema 33). Neben dem biokatalytischen Festbettreaktor bildet ein Phasenseparations-Modul (*Asia FLLEX* Modul) das Herz dieses Systems, da es für die effiziente Separation des gebildeten Produktes und des Cofaktors verantwortlich ist. Der experimentelle Aufbau besteht aus einem zwei-Kanal-System. Das Substrat, gelöst in organischem Lösungsmittel, wird mittels eines T-

Stücks mit der Cofaktor-enthaltenden wässrigen Phase gemischt und über den biokatalytischen Festbettreaktor geführt. Anschließend wird der Durchfluss, welcher nun ein organisch-wässriges Produkt-Cofaktor-Gemisch ist, nach weiterer Zugabe eines Extraktionsmediums über einen dritten Kanal mittels des *FLLEX*-Moduls wieder getrennt. Ohne Verunreinigungen konnten so vier verschiedene Ketone **63a** bis **63d** mittels derselben Cofaktorklösung in allen Fällen nahezu vollständig zu dem entsprechenden chiralen Alkohol **64a** bis **64d** unter exzellenter Enantioselektivität (>99 %) umgesetzt werden.



Schema 33: Geschlossenes Cofaktor-Recyclingsystem eines kontinuierlichen *Flow*-Reaktionsprozesses unter Verwendung einer HaloTag-ADH (*L. brevis*). Durch effiziente Phasenseparation mittels *Asia FLLEX* Modul kann das Produkt ohne Verunreinigungen durch Cofaktor isoliert werden und der Cofaktor kontinuierlich in katalytischem Maßstab wiederverwendet werden.^[161]

Die hier thematisierten Anwendungen verdeutlichen die Möglichkeiten, die sich heutzutage in der Realisierung von biokatalytischen Reaktionen im kontinuierlichen *Flow*-Prozess bieten. Nichtsdestotrotz bleibt die Entwicklung eines geeigneten Biokatalysators und seine Immobilisierung zur Überführung in die *Flow*-Chemie ein arbeits- und zeitintensiver Prozess. Die Entwicklung einfacher, schnell durchführbarer und universeller Lösungsansätze wird die Forschung weiterhin antreiben, um die Verwendung der Biokatalysatoren in der *Flow*-Synthese auch künftig interessant zu halten und das Potenzial als attraktive Alternative zur klassisch organischen Chemie auszuweiten.

5.3.3 DERA IN DER *FLOW*CHEMIE

Als Zentrum dieser Arbeit soll im Folgenden die DERA im Zusammenhang mit der biokatalytischen Anwendung in der *Flow* Chemie gesondert und im Detail beleuchtet werden. Während einige Immobilisierungsstrategien für die DERA in der Literatur zu finden sind, ist die konkrete Anwendung in kontinuierlichen Reaktionsprozessen von immobilisierter DERA hingegen bis heute wenig beschrieben. Ursächlich dafür sind voraussichtlich die in Kapitel 5.1 beschriebenen Problematiken der DERA, welche ihren Einsatz in der synthetischen Chemie stark einschränkt. Wie in den beiden vorhergehenden Kapiteln erläutert, kann die Immobilisierung von Enzymen neben der Wiederverwendbarkeit positive Effekte auf die Enzymeigenschaften erzielen. Besonders der Einfluss auf die Enzymstabilität ist einer der Aspekte, welcher durch den Parameter der Immobilisierung adressiert werden kann.^[135] Der wohl am meisten einschränkende Faktor der DERA ist die geringe Toleranz gegen ihr eigenes Substrat Acetaldehyd (**2**), welche das Enzym letztendlich vollständig inaktiviert. Immobilisierung über Aminosäurefunktionalitäten auf der Enzymoberfläche können hier eine Lösung darstellen. Der Ansatz der kovalenten oder nicht kovalenten Bindung an eine Festphase wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen an der DERA durchgeführt.^[162] In fast allen Studien konnten Verbesserungen hinsichtlich der Enzymstabilität beobachtet werden, womit die Grundlagen zur Nutzung der DERA in kontinuierlichen *Flow*-Prozessen gelegt worden sind.

Von *Subrizi et al.* wurde die ionische Immobilisierung der DERA (*E. coli*) an mehrwandigen Kohlenstoff-Nanoröhren (ox-MWCNTs) beschrieben.^[163] Die Lysinreste der DERA-Oberfläche wirkten hier als Gegenionen für die anionische Kohlenstoff-Nanoröhre, was durch Abschirmung des Acetaldehyds (**2**) zu einer hohen Acetaldehydtoleranz bis zu zwei Wochen führte. Es wurde vermutet, dass die beobachtete erhöhte Toleranz durch die Wechselwirkungen der positiv geladenen Lysine der DERA mit den anionischen Kohlenstoff-Nanoröhren zu Stande kommt, wodurch nukleophile Angriffspunkte zum Teil abgeschirmt wurden. Es konnte eine Wiederverwendbarkeit der immobilisierten DERA von bis zu fünf Mal unter Erhalt der Ausgangsaktivität erzielt werden. Die synthetische Anwendung der Immobilisate wurde lediglich im *Batch* untersucht. Die Aldolreaktion aus Acetaldehyd (**2**) (500 mM) und Chloracetaldehyd (**30**) (500 mM) über 24 h resultierte in Ausbeuten des doppelten Aldolproduktes von bis zu 90 %. Ein ähnlich erfolgreicher Abschirmeffekte wurde bei der adsorptiven Immobilisierung einer DERA aus *Klebsiella pneumonia* an mesoporösem Silica beobachtet.^[164] Da beide Ansätze nicht in einem kontinuierlichem Reaktionsdesign getestet worden sind, können keine Aussagen bezüglich etwaiger Ablösungseffekte, wie sie

üblicherweise für nicht kovalente Immobilisierungsmethoden beschrieben werden, getroffen werden.

Die erfolgversprechendsten Strategien, von denen bis heute für die DERA berichtet worden sind, basieren auf kovalenten Bindungen des Enzyms an Trägermaterialien. Sowohl Mehrpunktsbindungen an mesozellulären Silica-Schaum,^[165] als auch die Immobilisierung an magnetischen Nanopartikeln (GA-APTES-NSM: Glutaraldehyd-(3-aminopropyl)-triethoxysilan nanomagnetisches Material)^[166] und die kovalente Immobilisierung der DERA in einem dünnen Polymerfilm zur Bildung von biokatalytischen aktiven Membranen^[167], ermöglichen eine höhere Acetaldehydtoleranz von bis zu 600 mM der DERA über Abschirmungseffekte durch Bindung an Lysinreste der Enzymoberfläche.

2018 veröffentlichte *Zhang* in Kooperation mit unserem Institutes eine alternative Herstellung von DERA-enhaltenen Polymerkonjugaten in Membranform.^[168] Die Entwicklung von katalytisch aktiven Membranen zielte explizit auf die künftige Anwendung der DERA-Membranen in kontinuierlichen Reaktionsprozessen ab. Im Gegensatz zu dem oben erwähnten Immobilisierungsansatz über Lysinreste, der einen starken Verlust der Enzymaktivität zur Folge hatte,^[167] werden Thiolgruppen der vier Cysteine, welche sich auf der Oberfläche der DERA befinden, zur Bindungsknüpfung an eine Festphase genutzt. Ausbildung von Konjugaten bestehend aus der *E. coli* DERA und Poly(*N*-isopropylacrylamid) (kurz: PNIPAm) resultierte in katalytisch aktiven Membranen mit einer Restaktivität von 50 %. Des Weiteren konnte eine erhöhte Stabilität der Immobilisate hinsichtlich Acetaldehyd (2) (300 mM) über 3 h beobachtet werden. Eine schematische Darstellung des zugrundeliegenden Mechanismus der Membranbildung zeigt Abbildung 7.

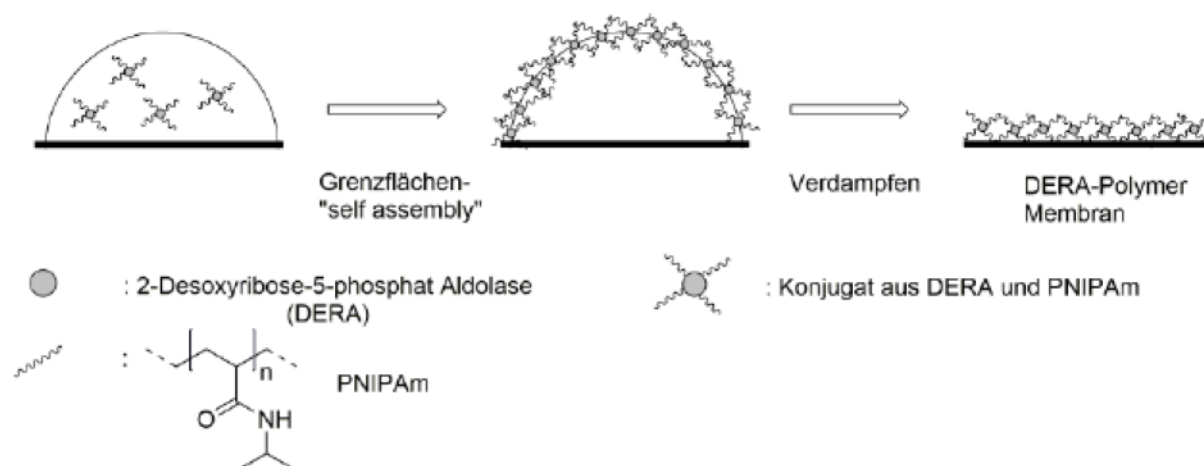
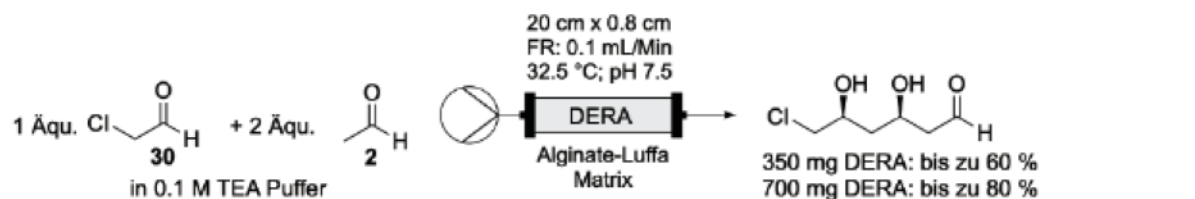


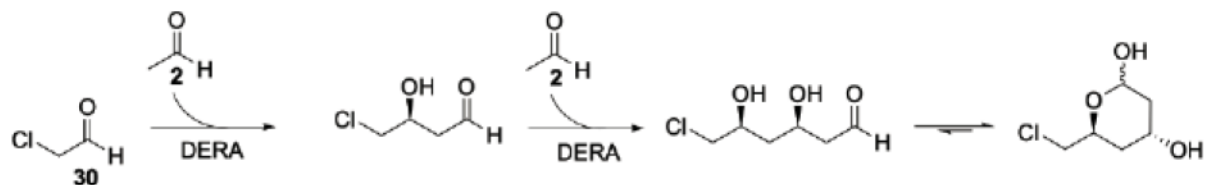
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mechanismus der Bildung der katalytisch aktiven Membranen aus DERA-PNIPAm-Konjugaten.^[168]

Eine der wenigen Anwendungen eines DERA-Immobilisates in einem kontinuierlichen *Flow*-Prozess wurde 2020 von *Grabner et al.* beschrieben.^[39] Die Arbeitsgruppe adaptierte den gut bekannten und industriell angewendeten Prozess der Statin-Seitenkettesynthese in eine kontinuierliche *Flow*-Synthese der DERA-katalysierten Vorstufe der Statin-Seitenkette. Als Biokatalysator wurde die Variante der *E. coli* DERA-C47M in eine Alginat-Gel-Matrix auf einem Luffaschwamm immobilisiert und zur Katalyse ein Festbettreaktor aus rostfreiem Stahl mit dem Immobilisat befüllt. Bei der gewählten Immobilisierungsstrategie handelt es sich um eine nicht kovalente Einschlußmethode des Enzyms in eine Alginat-Luffa-Matrix, bei welcher der Luffaschwamm mit einer mit DERA versetzte Alginate-Lösung getränkt wird und anschließend ein Reagenz zum *cross-linking* zugesetzt wird. Während bei mit CaCl_2 vernetzten Immobilisaten starkes Enzymleaching zu verzeichnen war, konnte mit BaCl_2 eine ausreichend starke Vernetzung und damit ein ausreichend starker Einschluss der DERA in die Matrix gewährleistet werden. Anhand eines ersten Substratscreenings, unter Berücksichtigung von aromatischen Aldehyden, wie Zimtaldehyd und Benzaldehyd und dem ungesättigten Aldehyd Acrolein, wurde Chloracetaldehyd (**30**) als Modelsubstrat ausgewählt. Acrolein führte trotz Verwendung der optimierten DERA-Variante DERA_{EC}-C47M zur vollständigen Inaktivierung des Biokatalysators. Zur weiteren Reaktionsoptimierung wurde ein systematischer Ansatz über *Design of Experiment* gewählt. Dabei konnten die besten Ausbeuten bei einer Flussrate von 0.1 mL/Min, 32.5 °C und einem pH-Wert von 7.5 erzielt werden unter Verwendung von 0.25 M Chloracetaldehyd (**30**) und 0.5 M Acetaldehyd (**2**). Die Aufarbeitung und Isolierung des Produktes erfolgten händisch. Das entwickelte DERA-katalysierte System lieferte über einen Zeitraum von bis zu 4 h stabile Umsätze ohne Aktivitätsverlust.

experimentelles Flow-Set-Up:



Reaktionsschema:



Schema 34: Kontinuierliche Synthese von Statin-Seitenketten Vorstufen mittels einer immobilisierten DERA-Variante (DERA_{EC}-C47M).^[39]

6 EIGENE ERGEBNISSE – OPTIMIERUNG DER DERA FÜR DIE SYNTHETISCHE ANWENDUNG

6.1 UNTERSUCHUNG DER ACETALDEHYD-TOLERANZ

6.1.1 ERWEITERUNG DER DERA-C47-MUTANTENBIBLIOTHEK: KLONIERUNG & CHARAKTERISIERUNG

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse weiterführender mechanistischer Untersuchungen zur Acetaldehyd-Toleranz der *E. coli* DERA beschrieben werden. Grundlage der hier gezeigten Studie bilden der von *Markus Dick* postulierte Inhibierungsmechanismus der DERA über das Cys-47,^[10] sowie die fortführende Masterarbeit, welche dieser Doktorarbeit voran ging^[11] (vgl. Kapitel 5.1). Durch Eliminierung der nukleophilen Position 47 der DERA aus *E. coli* durch Aminosäureaustausch konnte von *Markus Dick* eine Acetaldehyd-resistente DERA-Variante DERA_{EC}-C47M erstellt werden. Nachteilig hinsichtlich der weiteren Verwendung in der organischen Synthese ist allerdings die verringerte Enzymaktivität von 60 % Restaktivität im Vergleich zum DERA_{EC} Wildtyp. Im Rahmen der dieser Arbeit vorhergehenden Masterarbeit (vgl. *Bramski et al.*)^[11] wurden durch Aminosäureaustausch des Cys-47 zu weniger nukleophilen Aminosäuren sechs Varianten der DERA_{EC}-C47 untersucht. Die erstellten DERA-Mutanten wurden unter Berücksichtigung des sterischen Anspruchs der ausgetauschten Aminosäure ausgewählt. Stark polarisierte sowie ionische Aminosäuren wurden zur Vermeidung von negativen Wechselwirkungen mit Funktionalitäten des aktiven Zentrums ausgeschlossen. Die erstellten Varianten sind in Abbildung 8 dargestellt, von denen keine hinsichtlich ihrer Substrattoleranz sowie Enzymaktivität die DERA_{EC}-C47M eine Verbesserung erzielen konnte. Basierend auf den erhaltenen Daten wurde ein Zusammenhang zwischen der Größe der ausgetauschten Aminosäure bzw. des davon abhängigen freien Raumes im aktiven Zentrum und der Acetaldehydtoleranz vermutet. Je kleiner die Aminosäure, die an Position 47 für das Cystein eingesetzt wurde, desto weniger stabil war die resultierende DERA-Variante, womit gezeigt werden konnte, dass der postulierte Inhibierungsmechanismus nicht der Einzige sein kann, welcher für die geringe Acetaldehyd-Toleranz der DERA verantwortlich ist. Lediglich die DERA-Variante DERA_{EC}-C47M verblieb als sinnvolle DERA-Variante zum Einsatz als Biokatalysator. Diese Ergebnisse wurden als Startpunkt der Studie der hier vorliegenden Arbeit genutzt und basierend darauf wurden vier weitere bisher aufgrund der

Auswahlkriterien nicht untersuchte DERA-Varianten erstellt. Hierbei handelte es sich um einen Austausch des Cys-47 in Phenylalanin, Valin und in die beiden basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (Abbildung 9).

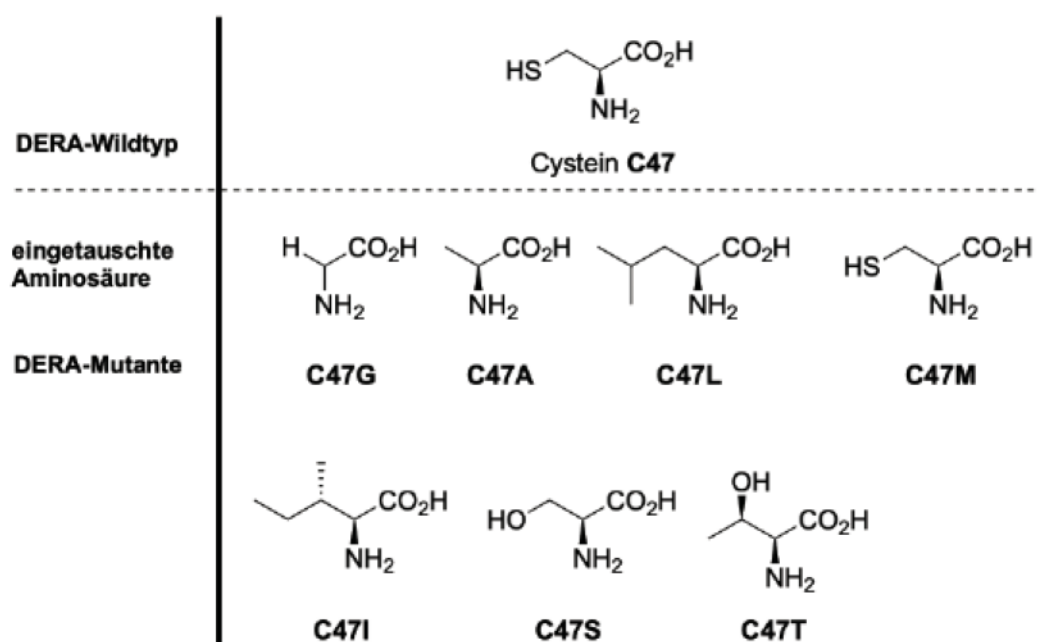


Abbildung 8: Die bisher hinsichtlich ihrer Acetaldehyd-Stabilität untersuchten *E. coli* DERA-Varianten.^[11, 169]

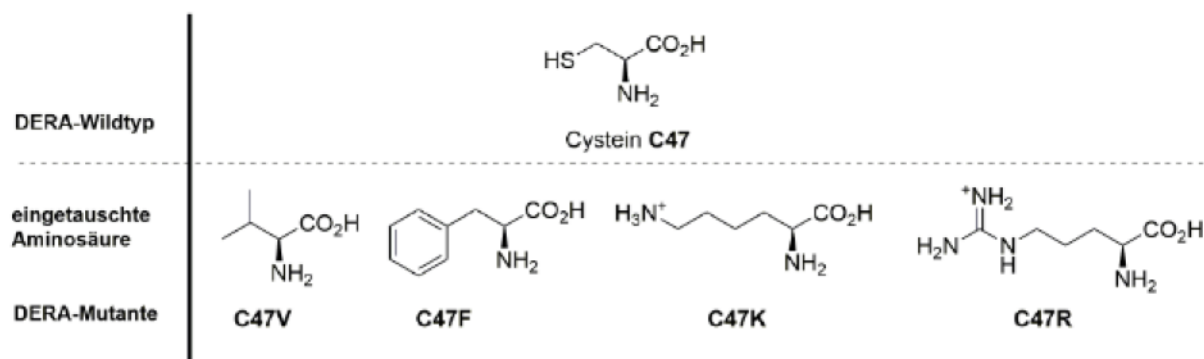


Abbildung 9: Die in vorliegender Arbeit erstellten und hinsichtlich ihrer Acetaldehyd- und Crotonaldehydtoleranz, Aktivität und Enantioselektivität untersuchten *E. coli* DERA-Varianten.

Zum Erstellen der fehlenden DERA-Mutanten wurde auf das etablierte Klonierungsprotokoll der Masterarbeit zurückgegriffen.^[169] Die PCR-Methode der Wahl war die *Round-the-Horn* PCR (s. 9.2.1). Als Template-DNA diente das DERA-Genkonstrukt deoCEC ohne einen Polyhistidintag, nachdem sich dieser als nachteilig für die Enzymaktivität erwies.^[169] Das zur Überprüfung der durchgeführten Amplifikation erstellte Agarosegel bestätigte ihren Erfolg. Es zeigte eindeutige Banden bei etwa 6000 bp (vgl. Abbildung 10). Es folgte ein Restriktionsverdau durch Zugabe von DpnI zur Entfernung von methylierter Template-DNA. Die PCR-Produkte wurden ligiert, woran sich die Transformation der kompetenten Zellen

DH5 α Mach1 sowie das Ausplattieren anschloss. Alle Ampicillin-resistenten Platten wiesen eine erfolgreiche Kolonienbildung auf, sodass Übernachtskulturen angesetzt und die Plasmidisolierung nach dem unter 9.2.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt werden konnte. Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Bildung aller vier erstellten DERA-Konstrukte. In allen vier Fällen ließ sich erfolgreich Protein exprimieren (*E. Coli* BL21(DE3); vgl. Kapitel 9.2.8 für Details). Das in Abbildung 10 dargestellte SDS-Gel zeigt deutlich vier Überexpressionsbanden bei etwa 28 kDa von vergleichbarem Expressionslevel.

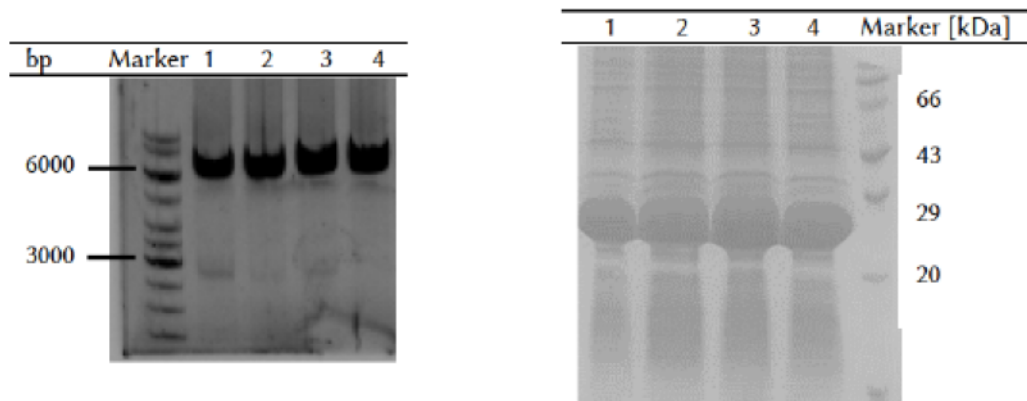


Abbildung 10: Links: 0.8 %-iges Agarosegel zur Überprüfung der Amplifikation des DERA-Konstruktes ohne Polyhistidintag DERA_{EC}-notag mit den entsprechenden Varianten C47F (1), C47K (2), C47R (3) und C47V (4). SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression (*E. Coli* BL21(DE3); vgl. Kapitel 9.2.8). der erstellten DERA-Konstrukte. Standard: Roti®Mark (Fermentas).

Nach erfolgreicher Expression folgte die Charakterisierung hinsichtlich der Enzymaktivität und ihrer Aldehydstabilität der erstellten DERA-Konstrukte DERA_{EC}-C47F, DERA_{EC}-C47K, DERA_{EC}-C47R und DERA_{EC}-C47V. Da für die spätere synthetische Anwendung Rohextrakte und keine gereinigten Enzyme verwendet werden sollen, wurde auf einen Reinigungsschritt verzichtet und alle folgenden Messungen mit zellfreiem Rohextrakt durchgeführt. Dafür wurden die aufgeschlossenen und zentrifugierten Rohextrakte zusätzlich zur Entfernung von niedermolekularen Komponenten über PD-10 Säulen gereinigt. Zudem wurde mittels der *Bradford*-Methode jeweils die Proteinkonzentration bestimmt. Dies stellt eine vergleichbare Proteinkonzentration der Proben sicher und ermöglicht darüber hinaus die Berechnung von spezifischen Aktivitäten (vgl. Tabelle 5). Aus Vergleichsgründen wurde der entsprechende zellfreie Rohextrakt des DERA_{EC}-Wildtyp immer mit vermessen.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird, konnte bei allen erstellten DERA-Mutanten Enzymaktivität gemessen werden. Es sind allerdings deutliche Unterschiede zu erkennen. Alle folgenden Ausführungen zu den vermessenen DERA-Konstrukten beziehen sich auf den zellfreien Rohextrakt (wie im obigen Abschnitt erläutert). Die beiden DERA-Konstrukte mit den eingetauschten ionischen Aminosäuren Lysin und Arginin zeigen die geringsten

Aktivitäten mit rund 0.5 U/mg und somit einen Aktivitätsverlust von rund 98 % im Vergleich zum DERA-Wildtyp. Damit sind die beiden Konstrukte DERA_{EC}-C47K und DERA_{EC}-C47R diejenigen, mit dem größten Aktivitätsverlust, welche im Rahmen dieser sowie im Vergleich zu den Vorarbeiten der Masterarbeit untersucht worden sind. Eine graphische Übersicht der Gesamtheit aller erstellten DERA-Konstrukte hinsichtlich ihrer Aktivitäten relativ zueinander kann in Abbildung 11 eingesehen werden. Grund für die beobachteten negativen Auswirkungen auf die Enzymaktivität in den Fällen des Austausches gegen Lysin und Arginin finden sich voraussichtlich in der ionischen Natur der beiden Aminosäuren, wodurch Wechselwirkungen mit Funktionalitäten des aktiven Zentrums möglich sind. Die DERA-Mutante DERA_{EC}-C47F mit der sterisch sehr anspruchsvollen Aminosäure Phenylalanin weist eine Aktivität von 3.4 U/mg auf. Sie liegt mit einem Aktivitätsverlust von 85 % unterhalb der erzielten Aktivität der DERA-Konstrukte DERA_{EC}-C47G und DERA_{EC}-C47A mit den kleinsten eingetauschten Aminosäuren aus den Vorarbeiten und verdeutlicht abermals den starken Einfluss des räumlichen Anspruchs der Aminosäure auf die Enzymaktivität an besagter Position 47. Das beste Ergebnis hinsichtlich der DERA-Aktivität zeigt die Variante DERA_{EC}-C47V. Mit einer Aktivität von 18.4 U/mg weist sie nahezu Wildtyp-Aktivität (20.9 U/mg) auf, womit eine Verbesserung von rund 50 % im Vergleich zu der bisherigen besten Variante DERA_{EC}-C47M (7.9 U/mg) hinsichtlich der Enzymaktivität erzielt werden konnte.

Tabelle 5: Die ermittelten spezifischen Enzymaktivitäten der erstellten DERA-Mutanten aus *E. coli* sowie des DERA-Wildtyps. Bei den vermessenen Proben handelt es sich um über PD-10 Säulen gereinigten zellfreien Rohextrakt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde mittels Bradford-Methode die Proteinkonzentration bestimmt. Alle Messungen wurden als Triplikat durchgeführt.

DERA-Variante	spez. Aktivität [U/mg]
DERA _{EC} -wt	20.9 ± 0.7
DERA _{EC} -C47F	3.4 ± 0.3
DERA _{EC} -C47K	0.5 ± 0.1
DERA _{EC} -C47R	0.6 ± 0.1
DERA _{EC} -C47V	18.4 ± 0.6

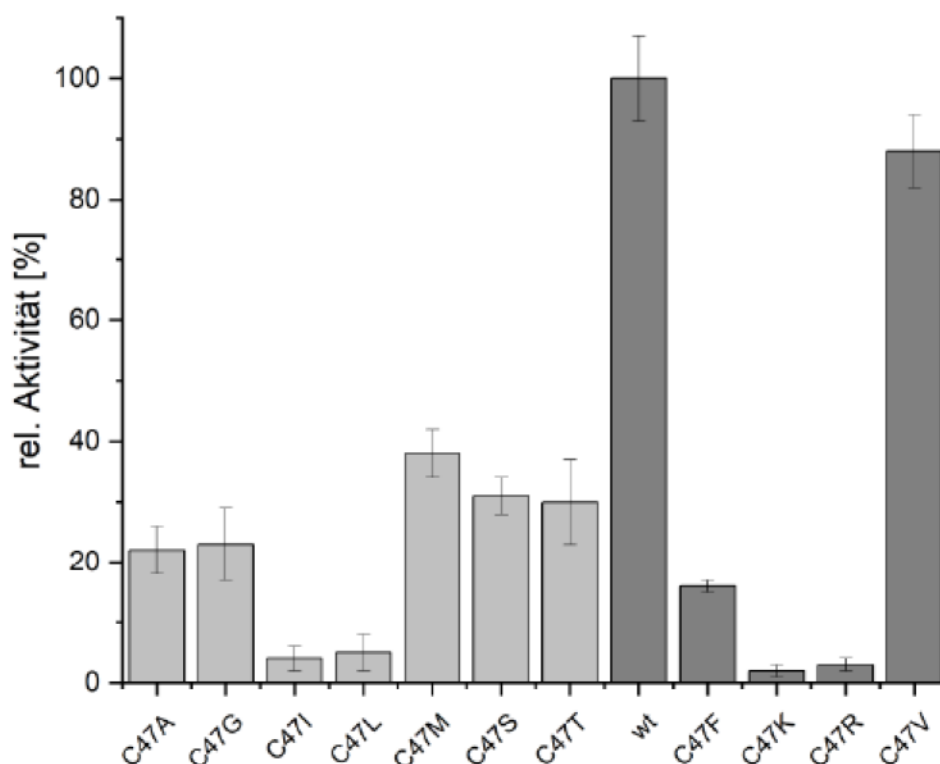


Abbildung 11: Vergleichende Übersicht der Enzymaktivitäten der neu erstellten DERA_{EC}-Varianten (dunkelgrau), des DERA-Wildtyps (dunkelgrau; gesetzt als 100 %) sowie der in Vorarbeiten im Rahmen der Masterarbeit erhaltenen DERA-Varianten^[169] (hellgrau) relativ zueinander. In allen Fällen wurden zellfreie Rohextrakte verwendet und vermessen.

Neben der Aktivität der DERA, ist ihre Stabilität hinsichtlich ihres Substrates Acetaldehyd (2) für ihre Verwendung als effizienter Biokatalysator entscheidend. Auch die Toleranz gegen Crotonaldehyd wird untersucht, welches, dem von *Markus Dick* postulierten Inhibierungsmechanismus folgend,^[10] als Aldolkondensationsprodukt zweier Moleküle Acetaldehyd (2) zu einer 100-fach stärkeren Inhibierung des DERA-Wildtyps im Vergleich zur Inaktivierung durch Acetaldehyd (2) führt. Daher folgten Stabilitätsuntersuchungen aller vier DERA-Konstrukte hinsichtlich ihrer Toleranz von Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd. Die Stabilitätstests wurden basierend auf dem bekannten DERA-Aktivitätsassay durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden DERA-Proben in den jeweiligen Aldehydlösungen bei 25 °C inkubiert. Die Konzentrationen an Aldehyden wurden so gewählt, dass sie den maximal üblichen verwendeten Konzentrationen in der synthetischen Anwendung an Acetaldehyd (2) bzw. Crotonaldehyd entsprechen, welchen die DERA bestenfalls standhalten sollte. Diese entsprechen einer Endkonzentration an Acetaldehyd (2) von 300 mM und an Crotonaldehyd von 20 mM. Anschließend wurde in regelmäßigen

Zeitabständen photometrisch die DERA-Aktivität bestimmt. Zur Kontrolle wurde neben den in Aldehyd inkubierten Enzymen jeweils auch eine Probe gänzlich ohne Aldehydzugabe vermessen. Die gemessenen Daten sind in unten Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die erhaltenen Aktivitätskurven wurden zur Berechnung der entsprechenden Halbwertszeiten in den Aldehydlösungen verwendet. Mittels Anpassung einer exponentiellen Zerfallsfunktion ersten Grades an die jeweiligen Aktivitätskurven, konnte anhand der in Kapitel 9.3.8 beschriebenen Formeln die Halbwertszeit berechnet werden. Die errechneten Halbwertszeiten für die vier untersuchten DERA-Varianten können in Tabelle 6 eingesehen werden. Aus Vergleichsgründen wurden ebenfalls der DERA-Wildtyp und die bekannte Acetaldehyd-resistente DERA-C47M vermessen. Die erhaltenen Graphen sind zum Vergleich in Abbildung 12 dargestellt. Während beim DERA-Wildtyp bereits nach kürzester Zeit eine vollständige Inaktivierung des Enzyms zu beobachten ist, zeigt die DERA-C47M bei Acetaldehyd-Inkubation keine Aktivitätsverluste. Der Aktivitätsverlust gegen 20 mM Crotonaldehyd allerdings deutet darauf hin, dass auch die gegen Acetaldehyd-resistente DERA-Variante weitere, bisher unbekannte Inaktivierungsmechanismen zulässt. Diese Kurvenverläufe und Ergebnisse bestätigen die zuvor gewonnenen Erkenntnissen von Marcus Dick.^[170]

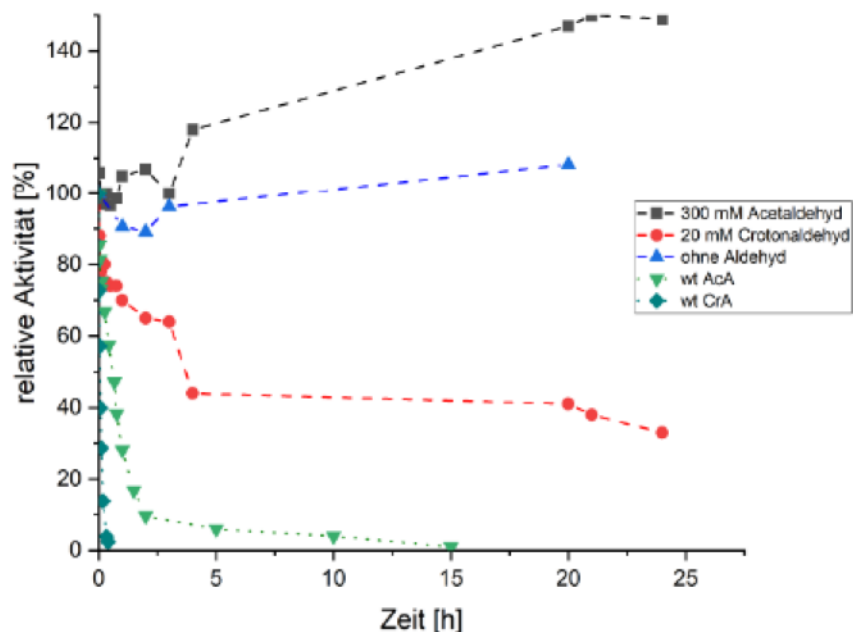


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der relativen Aktivität nach Aldehydinkubation des DERA-Wildtyps und der DERA_{EC}-C47M. Dargestellt sind die Messergebnisse nach Inkubation mit 300 mM Acetaldehyd (2) (C47M:

Viereck, schwarz; WT: hellgrünes Dreieck), 20 mM Crotonaldehyd (C47M: Kreis, rot; WT: dunkelgrüne Raute) und ohne Aldehyd (Dreieck, blau). Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt.

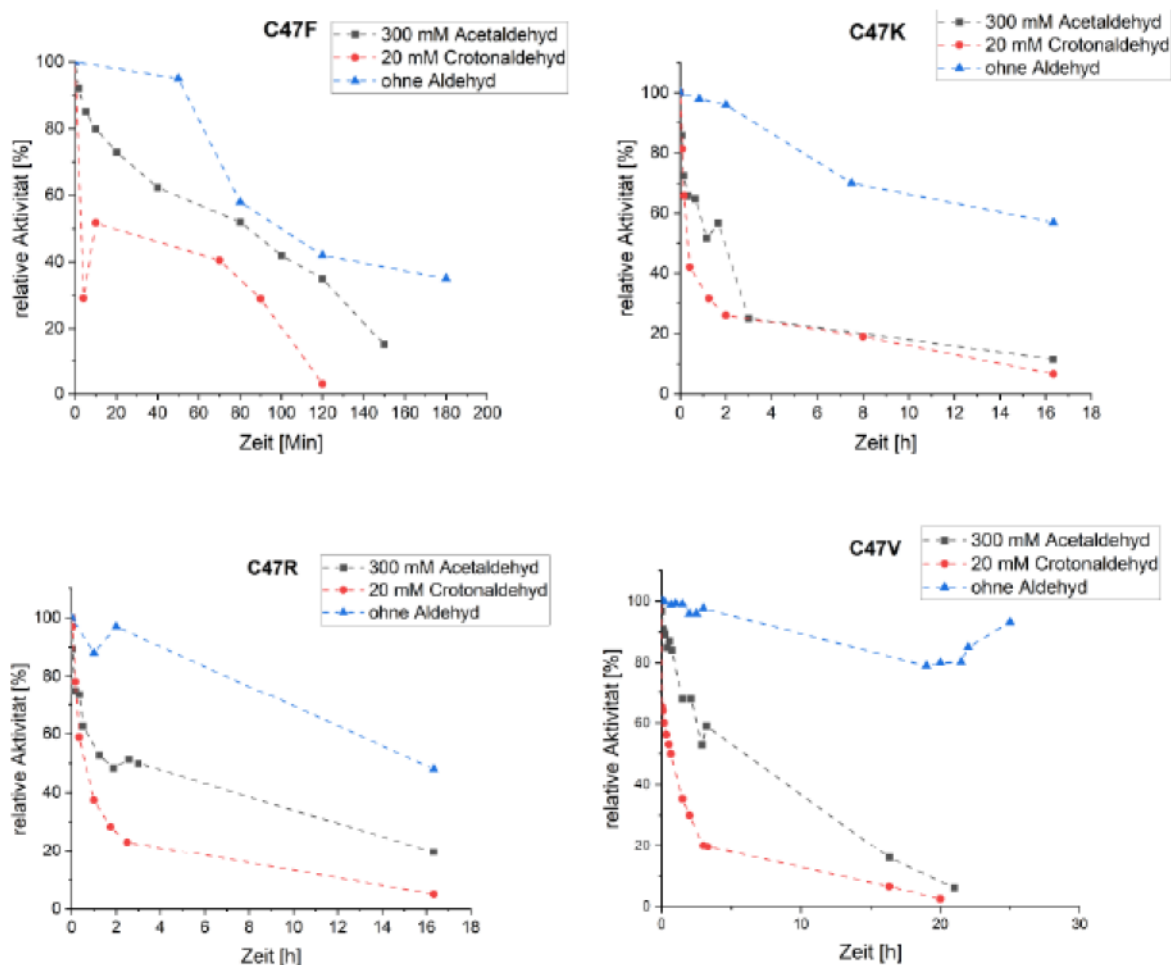


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der relativen Aktivität nach Aldehydinkubation der erstellten DERA_{EC}-Mutanten. Dargestellt sind die Messergebnisse nach Inkubation mit 300 mM Acetaldehyd (2) (Viereck, schwarz), 20 mM Crotonaldehyd (Kreis, rot) und ohne Aldehyd (Dreieck, blau) für die vier DERA-Varianten C47F, C47K, C47R und C47V aus *E. coli*. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt.

Tabelle 6: Übersicht der berechneten Halbwertszeiten der untersuchten DERA-Varianten C47F, C47K, C47R und C47V vergleichend zu der DERA-C47M und dem DERA Wildtyp (zellfreie Rohextrakte) nach Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2) und 20 mM Crotonaldehyd. Die zugrundeliegende Berechnung der Halbwertszeiten sind dem Kapitel 9.3.8 zu entnehmen.

	C47F	C47K	C47R	C47V	C47M	WT
$T_{1/2}$ (300 mM Acetaldehyd)	1.4 h	1.3 h	1.7 h	3.3 h	n.b.	37.5 min
$T_{1/2}$ (20 mM Crotonaldehyd)	7.5 min	16 min	19 min	1 h	14 h	3.7 min

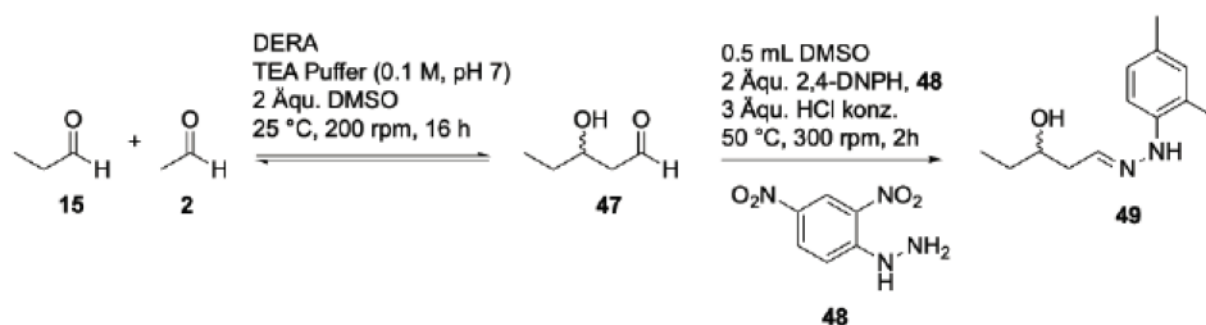
Keine der vier erstellten DERA-Varianten zeigte eine vollständige Stabilität gegen die beiden untersuchten Aldehyde, wie die der bekannten DERA-Mutante C47M. Dennoch sind in allen Fällen Verbesserungen vergleichend zum DERA-Wildtyp festzustellen. Dabei fallen die Unterschiede zwischen den Varianten weniger gravierend aus, wie die Untersuchungen der Enzymaktivität.

Die schwächste Toleranz gegen Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd zeigt die DERA-Variante DERA_{EC}-C47F. Nach Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2) ist bei dieser Mutante eine Halbierung der Enzymaktivität bereits nach knapp 90 Minuten zu verzeichnen, in 20 mM Crotonaldehyd sogar bereits nach 7.5 Minuten. Der starke sterische Anspruch der eingetauschten aromatischen Aminosäure Phenylalanin wirkt sich somit nicht nur negativ auf die Enzymaktivität, sondern auch auf die Stabilität der Enzymvariante bezüglich Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd aus.

Die beiden DERA-Mutanten mit den eingetauschten ionischen Aminosäuren DERA_{EC}-C47K und DERA_{EC}-C47R weisen ähnliche Werte auf. Mit Halbwertszeiten von 1.3 h (DERA_{EC}-C47K) und 1.7 h (DERA_{EC}-C47R) nach Inkubation in Acetaldehyd (2) bzw. 16 Minuten (DERA_{EC}-C47K) und 19 Minuten (DERA_{EC}-C47R) in Crotonaldehyd halten auch diese DERA-Varianten biokatalytisch notwendigen Bedingungen nicht stand. Als die stabilste Variante erwies sich die DERA-Mutante DERA_{EC}-C47V. Erst nach knapp 3.5 h Stunden ist nach Inkubation in 300 mM Acetaldehyd (2) ein Aktivitätsverlust von 50 % zu erkennen, wohingegen die Halbwertszeit in 20 mM Crotonaldehyd bei einer Stunde liegt. Durch das Einbringen des Valins in Position 47 konnte also eine etwa 5-6-fach stärkere Toleranz gegenüber Acetaldehyds (2) im Vergleich zum Wildtyp erzielt werden. Wie eingangs allerdings bereits angesprochen, bleibt die Variante der DERA_{EC}-C47M hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber den untersuchten Aldehyden der vielversprechendste Kandidat. Zudem stützen diese Ergebnisse die in den Vorarbeiten geäußerte Vermutung, dass es weitere Inaktivierungsmechanismen der DERA durch ihr Substrat Acetaldehyd (2) geben muss. Weitergehende Untersuchungen dazu werden im folgenden Kapitel 6.1.2 thematisiert und näher beleuchtet.

Als weiterer entscheidender Parameter für die biokatalytische Anwendung der DERA erfolgte die Untersuchung der Enantioselektivität der erstellten DERA-Konstrukte, um etwaige negative Einflüsse auf diese auszuschließen. Als eines der Hauptargumente für den Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese wäre ein Verlust der Enantioselektivität nach dem hier durchgeführten mutagenetischen Eingriff für die weitere biokatalytische Anwendung ein Ausschlusskriterium. Für die Selektivitätsbestimmung wurde ein von *Carolin Bisterfeld* etablierter Assay verwendet (Schema 35).^[171] Dieser basiert auf der Derivatisierung des DERA-katalysierten instabilen Aldolproduktes 47 durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH) (48). Nach Inkubation von Acetaldehyd (2) und Propanal (15) für 16 h bei 25 °C in Anwesenheit der jeweiligen DERA-Variante zur Bildung des Aldolproduktes 47, folgte für

weitere 2 h Reaktionszeit der Derivatisierungsschritt mittels 2,4-DNPH (**48**). Nach Aufarbeitung konnte anschließend das erhaltende Derivat **49** über HPLC-Analyse ausgewertet werden.



Schema 35: Reaktionsschema des Selektivitätsassays der DERA über Derivatisierung mit 2,4-DNPH nach *Bisterfeld*.^[171]

Die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Aus Vergleichsgründen wurde der DERA-Wildtyp ebenfalls untersucht, welcher einen *ee* von etwa 86 % aufwies. Während die untersuchten Aminosäurenaustausche, wie oben bereits gezeigt, starken Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen, ist ihr Einfluss auf die Enantioselektivität hingegen weniger gravierend, wenn auch nicht gänzlich zu vernachlässigen. Für die beiden DERA-Mutanten DERA_{EC}-C47R und DERA_{EC}-C47V konnten Enantiomerenüberschüsse ähnlich dem Wildtyp bestimmt werden. Die Werte der Konstrukte DERA_{EC}-C47F und DERA_{EC}-C47K lagen mit ca. 72 % etwas darunter. Sie liegen damit im Rahmen der Schwankungen, welche ebenfalls in den vorhergehenden Studien beobachtet worden sind.

Tabelle 7: Übersicht über die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse aller erhaltenen DERA_{EC}-Mutanten sowie des DERA-Wildtyps und der bekannten DERA_{EC}-C47M.

DERA _{EC} -Variante	<i>ee</i> [%]
DERA _{EC} -wt	86.4 ± 0.2
DERA _{EC} -C47M	85.4 ± 0.1
DERA _{EC} -C47F	72.4 ± 0.1
DERA _{EC} -C47K	71.1 ± 0.7
DERA _{EC} -C47R	83.0 ± 0.2
DERA _{EC} -C47V	85.0 ± 0.1

Im Hinblick auf eine folgende biokatalytische Anwendung eines DERA-Konstruktes lässt sich nach der erstellten Übersicht der untersuchten DERA-Varianten der Position C47 – dies bezieht sowohl die DERA-Varianten der Vorarbeiten als auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Konstrukte mit ein – folgendes schlussfolgern:

Ein effizienter Biokatalysator zeichnet sich vor allem durch eine ausreichend hohe Umsatzrate (Aktivität), Lebensdauer und Stereoselektivität aus. Da der Einfluss auf die Enantioselektivität auf die untersuchten DERA-Varianten im Vergleich mit den Auswirkungen auf die Aktivität und Stabilität weniger gravierend ist, kann dieser Aspekt in der abschließenden Betrachtung bezüglich der weiteren biokatalytischen Verwendung außer Acht gelassen werden. Das bereits bekannte DERA-Konstrukt DERA_{EC}-C47M hebt sich besonders durch seine vollständige Stabilität gegenüber dem Substrat Acetaldehyd (2) hervor und ist somit das einzige DERA-Konstrukt der hier untersuchten Varianten, das diesen Vorzug bietet. Trotz seines Aktivitätsverlustes von rund 40 % soll im Weiteren diese DERA-Variante ein vielversprechender Kandidat für die Anwendung in der organischen Synthese sein und weiterverfolgt werden. Neben dieser, kristallisiert sich ein weiteres DERA-Konstrukt als erfolgsversprechend heraus. Die DERA-Variante C47V zeichnet sich besonders durch ihre Enzymaktivität aus, die nahezu der des DERA-Wildtyps entspricht. Hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber Acetaldehyd (2) liegt sie mit einer Halbwertszeit von 3.3 h zwar unterhalb der Toleranz der DERA_{EC}-C47M. Aufgrund ihrer vergleichsweise außerordentlich hohen Enzymaktivität könnte diese DERA-Variante dennoch lange genug stabil bleiben, um in kürzerer Zeit, verglichen mit der DERA_{EC}-C47M, höhere Umsätze zu erzielen. Besonders mit Blick auf eine biokatalytische Anwendung im Bereich der *Flow* Chemie, welche durch ihren experimentellen Aufbau kurze Kontaktzeiten zwischen Substrat und Enzym ermöglicht, wodurch das Enzym dem schädigenden Acetaldehyd (2) möglichst kurz ausgesetzt wird, erscheint die Variante der DERA_{EC}-C47V als ein interessanter Kandidat als Biokatalysator.

Aus den gezeigten mutagenetischen Untersuchungen resultieren somit zwei vielversprechende DERA-Konstrukte, nämlich die DERA_{EC}-C47M und DERA_{EC}-C47V, zur Anwendung des Potenzials der DERA als Biokatalysator in der (bio-)organischen Chemie.

6.1.2 UNTERSUCHUNG EINES ALTERNATIVEN INAKTIVIERUNGSMECHANISMUS:

EINFLUSS THR-18

Nachdem bereits in den Vorarbeiten vermutet wurde, dass die Inaktivierung über die Position 47 kein *on-off-Tool* ist, und die hier in Kapitel 6.1.1 erläuterten Untersuchungen dies ebenfalls bestätigen, muss davon ausgegangen werden, dass es weitere Mechanismen gibt, welche zur Inaktivierung der DERA durch ihr eigenes Substrat führen. Um Antworten auf die Frage zu finden, warum trotz Aminosäureaustausch der nukleophilen Position Cys-47 eine Inaktivierung des Enzyms in der Mehrheit der untersuchten DERA-Varianten zu beobachten ist, wurden Strukturmodelle des aktiven Zentrums der DERA aus *E. coli* hinzugezogen. Da der postulierte Inhibierungsmechanismus von *Markus Dick* einen nukleophilen Angriff des Cys-47 voraussetzt, wurde gezielt nach weiteren nukleophilen Aminosäuren im aktiven Zentrum nahe des katalytisch aktiven Lys-167 geschaut, welche einen analogen Angriff auf das an Lys-167 gebundene Addukt vornehmen könnten und so die Blockierung des aktiven Zentrums herbeiführen. Abbildung 14 zeigt das aktive Zentrum der DERA-Mutante DERA_{EC}-C47G, bei welcher, wie von *Bramski et al.* beschrieben,^[11] das nukleophile Cys-47 durch eine sterisch nicht sehr anspruchsvolle Aminosäure Glycin ausgetauscht worden ist. Hervorgehoben ist ebenfalls das räumlich nahegelegene und nukleophile Thr-18 (wenn auch weniger stark nukleophil als das Cystein). Da durch das weniger Raum beanspruchende Glycin in Position 47 mehr Platz im aktiven Zentrum zur Verfügung steht, wäre durch das Wegfallen des nukleophilen Cysteins an Position 47 nun ein nukleophiler Angriff durch die Hydroxylfunktion des Threonins auf das gebundene Addukt denkbar und würde so zur Inaktivierung des Enzyms führen. Dies könnte ein möglicher Erklärungsversuch für die substratabhängige Inaktivierung der DERA-Variante DERA_{EC}-C47G sowie der anderen unter 6.1.1 untersuchten Mutanten sein.

Zur Prüfung dieser Hypothese soll der Ansatz verfolgt werden, erneut den nukleophilen Angriff durch Eliminierung dieser Aminosäure zu verhindern. Dafür wurde das Thr-18 in ein nicht nukleophiles, aber räumlich ähnlich stark beanspruchendes Valin ausgetauscht. Ausgegangen wurde von der DERA-Variante DERA_{EC}-C47G. Da der Fokus an dieser Stelle lediglich darauf liegen sollte, den beobachteten Aktivitätsverlust aufgrund des Austausches in Position C47 möglicherweise aufgrund eines weiteren nukleophilen Angriffs erklären zu wollen, wurde auf die Erstellung einer DERA_{EC}-T18V verzichtet.

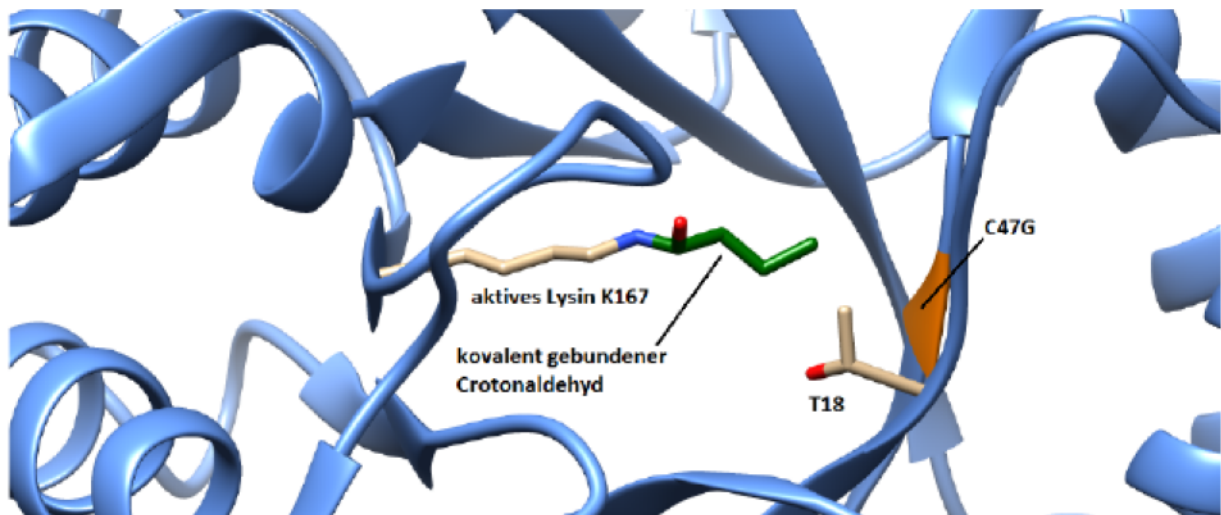


Abbildung 14: Aktives Zentrum der *E. coli* DERA-Mutante DERA_{EC}-C47G. Gezeigt sind das aktive Lys-167, an welches kovalent ein Molekül Crotonaldehyd (grün) als Folge einer Aldolkondensation im Rahmen des katalytischen Zyklus gebunden ist sowie das nahe gelegene Thr-18 und Position 47 (orange). Die Abbildung wurde anhand der pdb-Datei 5el1 mit *Chimera* erstellt.

Wie bereits für die in dieser Arbeit erstellten DERA-Mutanten aus Kapitel 6.1.1, wurde zur Erstellung der Doppelmutante DERA_{EC}-C47G-T18V das bereits etablierte Klonierungsprotokoll einer *Round-the-Horn* PCR verfolgt. Die Überprüfung der PCR erfolgte wiederum über ein Agarosegel (vgl.

Abbildung 15). Nach einem Restriktionsverdau durch DpnI wurde das erhaltene PCR-Produkt ligiert und anschließend ausplattiert. Es folgten das Ansetzen von Übernachtskulturen und die Isolation des Plasmids. Durch Sequenzierung konnte der erfolgreiche Einbau der gewünschten Punktmutation bestätigt werden. Wie die Banden von etwa 28 kDa des SDS-Gels in Abbildung 15 zeigen, konnte das Protein problemlos überexprimiert werden.

Analog zu der Vorgehensweise des Kapitels 6.1.1, wurde die erstellte Doppelmutante hinsichtlich ihrer Enzymaktivität, ihrer Resistenz gegenüber Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd sowie der Enantioselektivität charakterisiert.

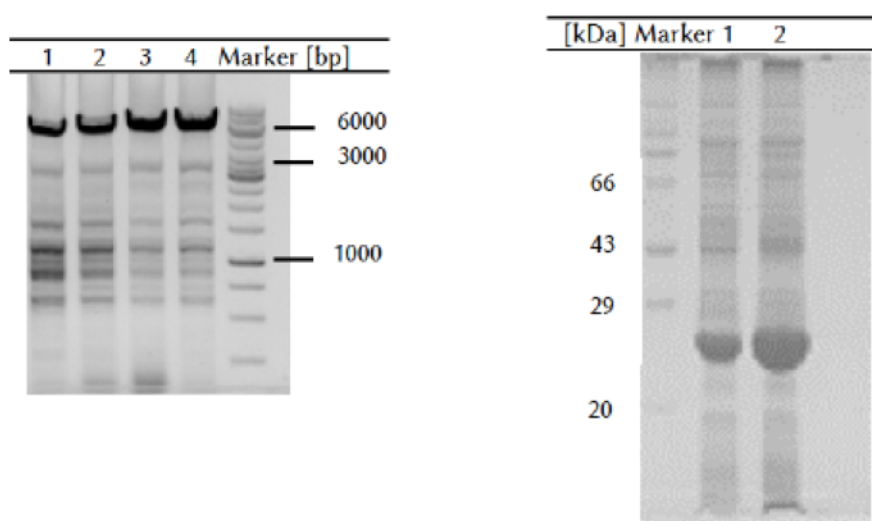


Abbildung 15: Links: 0.8 %-iges Agarosegel zur Überprüfung der Amplifikation des DERA-Konstruktes DERA_{EC}-C47G-T18V (1-4). Rechts: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression des erstellten DERA-Konstruktes DERA_{EC}-C47G-T18V (1-2). Standard: Roti®Mark (Fermentas).

Die bestimmte Aktivität der DERA-Variante DERA_{EC}-C47G-T18V ist in Tabelle 8 dem DERA-Wildtypen sowie der Einfach-Mutante DERA_{EC}-C47G gegenübergestellt. Mit einer Aktivität von 0.9 U/mg wirkt sich der weitere Aminosäureaustausch ebenfalls negativ auf die Enzymaktivität aus. Verglichen mit dem Ausgangsprotein DERA_{EC}-C47G mit einer Aktivität von 4.8 U/mg ist durch die Punktmutation T18V ein weiterer Aktivitätsverlust von rund 80 % zu verzeichnen.

Auffälligkeiten zeigte die Untersuchung des Enantiomerenüberschusses. Bestimmt wurde dieser analog zur beschriebenen Vorgehensweise in Kapitel 6.1.1. Die untersuchte DERA-Doppelmutante wies einen deutlichen Abfall des Enantiomerenüberschusses auf. Mit 69 % fiel dieser erneut im Vergleich zu den im Rahmen der Studien der Position Cys-47 untersuchten DERA-Konstrukten. Dieses Ergebnis ist auf Grundlage der Dissertation von *Carolin Bisterfeld* zu erklären. Im Rahmen von Studien zur Selektivitätsumkehr der DERA konnte von *Carolin Bisterfeld* ein deutlicher Einfluss besagter Position Thr-18 auf die Enantioselektivität ausgemacht werden.^[172] Die hier erzielten Messergebnisse unterstützen somit die von *Carolin Bisterfeld* veröffentlichten Daten.

Tabelle 8: Die ermittelte spezifische Enzymaktivität der erstellten DERA-Doppelmutanten aus *E. coli*. Aus Vergleichsgründen sind sowohl die Aktivitäten des DERA-Wildtyps als auch der Mutante DERA_{EC}-C47G gelistet. Bei den Proben handelt es sich um über PD-10 Säulen gereinigten ZFRE. Alle Messungen wurden als Triplikat durchgeführt.

DERA-Variante	spez. Aktivität [U/mg]
DERA _{EC} -wt	20.9 ± 0.7
DERA _{EC} -C47G	4.8 ± 0.6
DERA _{EC} -C47G-T18V	0.9 ± 0.1

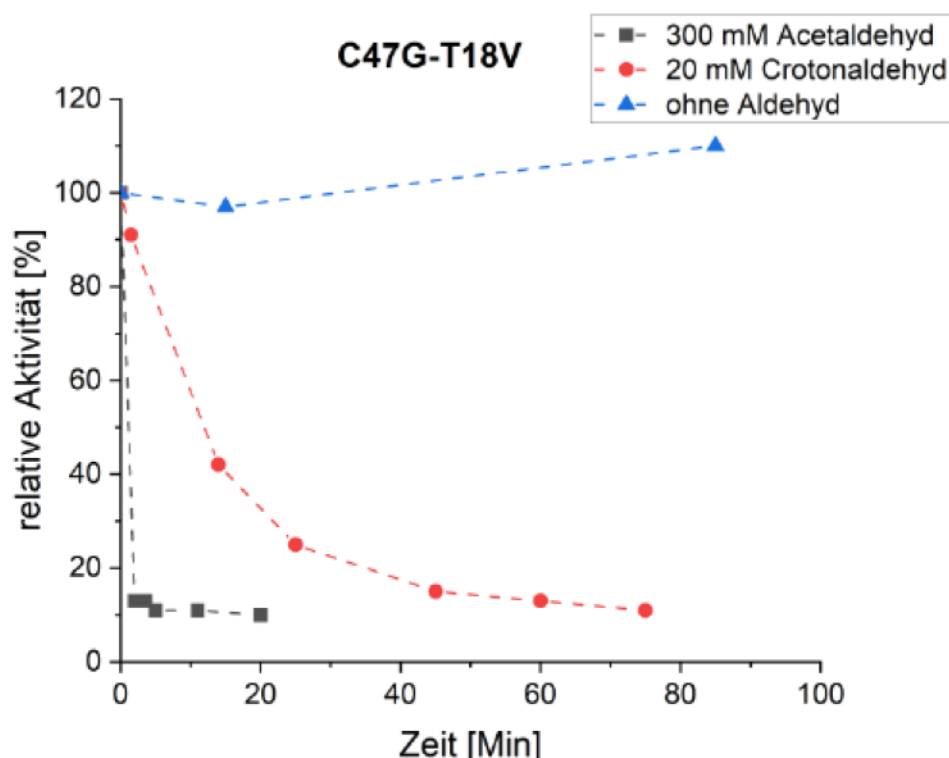


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der relativen Aktivität nach Aldehydinkubation der erstellten DERA_{EC}-Mutante DERA-C47G-T18V. Dargestellt sind die Messergebnisse nach Inkubation mit 300 mM Acetaldehyd (2) (Viereck, schwarz), 20 mM Crotonaldehyd (Kreis, rot) und ohne Aldehyd (Dreieck, blau) für die DERA-Doppelmutante C47G-T18V aus *E. coli*.

Da diese DERA-Doppelmutante im Hinblick auf Klärung etwaiger weiterer Inaktivierungsmechanismen des Enzyms erstellt worden ist, sind die Ergebnisse bezüglich der Stabilität gegenüber Acetaldehyd (2) und Crotonaldehyd von besonders großem Interesse. Eine graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Enzymaktivität bei Aldehydinkubation ist in Abbildung 16 gezeigt. Wie auf den ersten Blick zu erkennen ist, konnte durch den Austausch des nukleophilen Threonins an Position 18 durch ein nicht nukleophiles Valin keine Toleranz sowohl gegen Acetaldehyd (2) als auch gegen Crotonaldehyd erreicht werden. Besonders auffällig ist, dass die Inaktivierung der Doppelmutante DERA-C47G-T18V durch 300 mM Acetaldehyd (2) deutlich schneller eintritt als bei Inkubation durch das eigentlich 100-fach stärker inaktivierende Crotonaldehyd.

Bereits nach weniger als einer Minute halbiert sich die Enzymaktivität der DERA-Variante nach Inkubation in Acetaldehyd (2), während es bei Crotonaldehyd erst nach rund 16 Minuten zu einem 50 %-igen Aktivitätsverlust kommt. Messfehler, beispielsweise durch ein Verwechseln der Aldehydlösungen wurden durch mehrfache Wiederholung sowie Überprüfung der Aldehydlösungen mittels ^1H -NMR ausgeschlossen. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Festzuhalten bleibt, dass auch die Eliminierung einer weiteren nukleophilen Position, nämlich der Position 18, im aktiven Zentrum, von welcher aus ein Angriff auf das an Cys-47 gebundene Reaktionsaddukt denkbar gewesen wäre, eine Inaktivierung der DERA nicht verhindern konnte. Es bleibt also weiterhin fraglich, welche weiteren, weiteren Mechanismen zur Inaktivierung der DERA durch ihr eigenes Substrat Acetaldehyd (2) führen.

6.2 CHARAKTERISIERUNG NEUER PSYCHROPHILER DERAS

Das verfolgte Ziel, nämlich eine optimierte DERA-Variante für eine *effiziente* biokatalytische Anwendung in der organischen Synthese zu finden, wurde neben dem im Kapitel 6.1 beschriebenen mutagenetischen Ansatz im Folgenden über die Untersuchung von bisher unbekannten DERAs aus anderen Organismen adressiert. Dabei lag der Fokus auf Enzymen aus psychrophilen Organismen. Enzyme dieser kälteliebenden Organismen zeichnen sich im Allgemeinen durch eine erhöhte katalytische Aktivität sowie erhöhte Flexibilität ihres aktiven Zentrums aus.^[12-14, 173] Es könnte somit von großem Interesse sein das Spektrum bekannter DERAs um womöglich biokatalytisch effizientere Acetaldehyd-abhängige Aldolasen aus psychrophilen Organismen zu erweitern.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von *René Schmitz*, welche als Teil der vorliegenden Arbeit betreut worden ist, wurden drei psychrophile DERAs aus den Bakterien *Exiguobacterium sibiricum* (ES), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (PH) und *Psychromonas ingrahamii* (PI) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse und Erkenntnisse sind folgend zusammengetragen. Die beschriebenen Experimente dieses Kapitels wurden vornehmlich von *René Schmitz* durchgeführt.

6.2.1 EXPRESSION UND PROTEINREINIGUNG

Alle drei Plasmide der psychrophilen DERAs DERA_{ES}, DERA_{PH} und DERA_{PI} wurden kommerziell erhalten. Die entsprechenden Proteinsequenzen sind in Kapitel 10.1 gezeigt. Zur Erleichterung einer späteren Proteinreinigung wurden die Plasmide mit einem 6-fachen N-terminalen Histidin-Tag versehen. Da in institutsinternen Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass die Position des Histidin-Tags Einfluss auf die Enzymaktivität hat, wobei die negativen Auswirkungen auf die Aktivität bei den entsprechenden N-terminalen His-Tag-Konstrukten deutlich geringer sind als bei dem entsprechenden Konstrukt mit einem C-terminalen His-Tag,^[169] wurde für die drei untersuchten psychrophilen DERAs ein N-terminaler His-Tag gewählt.

Zunächst mussten die drei psychrophilen DERAs exprimiert werden. Dazu erfolgte zunächst die Transformation kompetenter Zellen nach dem unter 9.2.7 beschriebenen Protokoll. Zur Expression wurde auf ein bereits etabliertes Expressionsprotokoll für psychrophile DERAs zurückgegriffen. Bei diesem wird die Temperatur nach der Inokulation auf 18 °C herabgesetzt (vgl. 9.2.8). Auf diese Weise konnten alle drei psychrophilen DERAs erfolgreich exprimiert werden. Eine SDS-PAGE in Abbildung 17 bestätigt den Erfolg.

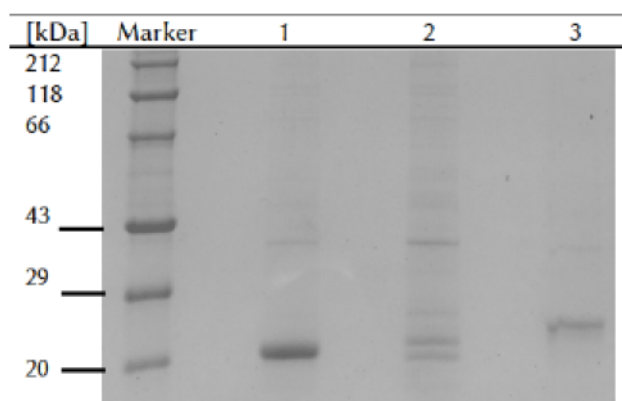


Abbildung 17: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression der drei psychrophilen Aldolasen DERA_{ES} (1), DERA_{PH} (2) und DERA_{PI} (3). Banden bei den jeweiligen Molekulargewichten von 23 kDa (DERA_{ES}), 26 kDa (DERA_{PH}) bzw. 26 kDa (DERA_{PI}) bestätigen eine erfolgreiche Proteinexpression. Standard: Roti®Mark (Fermentas). Die Molekulargewichte wurde mittels *Chimera* berechnet.

Mit 11.0 ± 2.0 g/L bzw. 9.2 ± 1.7 g/L erzielten die DERA_{PH} und DERA_{ES} die besten Expressionsraten. Mit einer Expressionsausbeute von 6.3 ± 1.5 g/L der DERA_{PI} wurde die geringste Expressionsrate erzielt, dennoch genügten diese Mengen für eine weitere biochemische Charakterisierung.

Um spezifische und aussagekräftige Daten bezüglich biochemischer Eigenschaften der drei psychrophilen DERAs machen zu können, wurden die Enzyme anschließend gereinigt. Durch die gezielte Einführung eines N-terminalen His-Tags konnte eine automatisierte affinitätschromatographische Reinigung mittels eines *Äcta*-Systems durchgeführt werden. Weiterhin konnte auf ein bereits etaliertes Reinigungsprotokoll zurückgegriffen werden.^[169] Einzelheiten können in Kapitel 9.3.1 eingesehen werden. Um Aussagen zur Reinigungseffizienz treffen zu können wurden Proben jedes einzelnen Reinigungsschrittes entnommen und anschließend anhand einer SDS-PAGE überprüft. Die Reinigungsfractionen aller drei Enzyme wiesen eine hohe Reinheit auf. Die entsprechenden Reinigungsfractionen zeigten im SDS-Gel keine signifikanten Verunreinigungen durch Fremdproteine. Starke DERA-spezifische Proteinbanden in der Fraktion des Durchflusses, also der die Proteinlösung aufgefangen nach dem Beladen der NiNTA-Reinigungssäule, deuten auf eine nicht ideale Bindung des N-terminalen His-Tags an das Säulenmaterial hin. In allen Fällen konnte aber genügend gereinigtes Protein erhalten werden, um mit der biochemischen Charakterisierung fortzufahren.

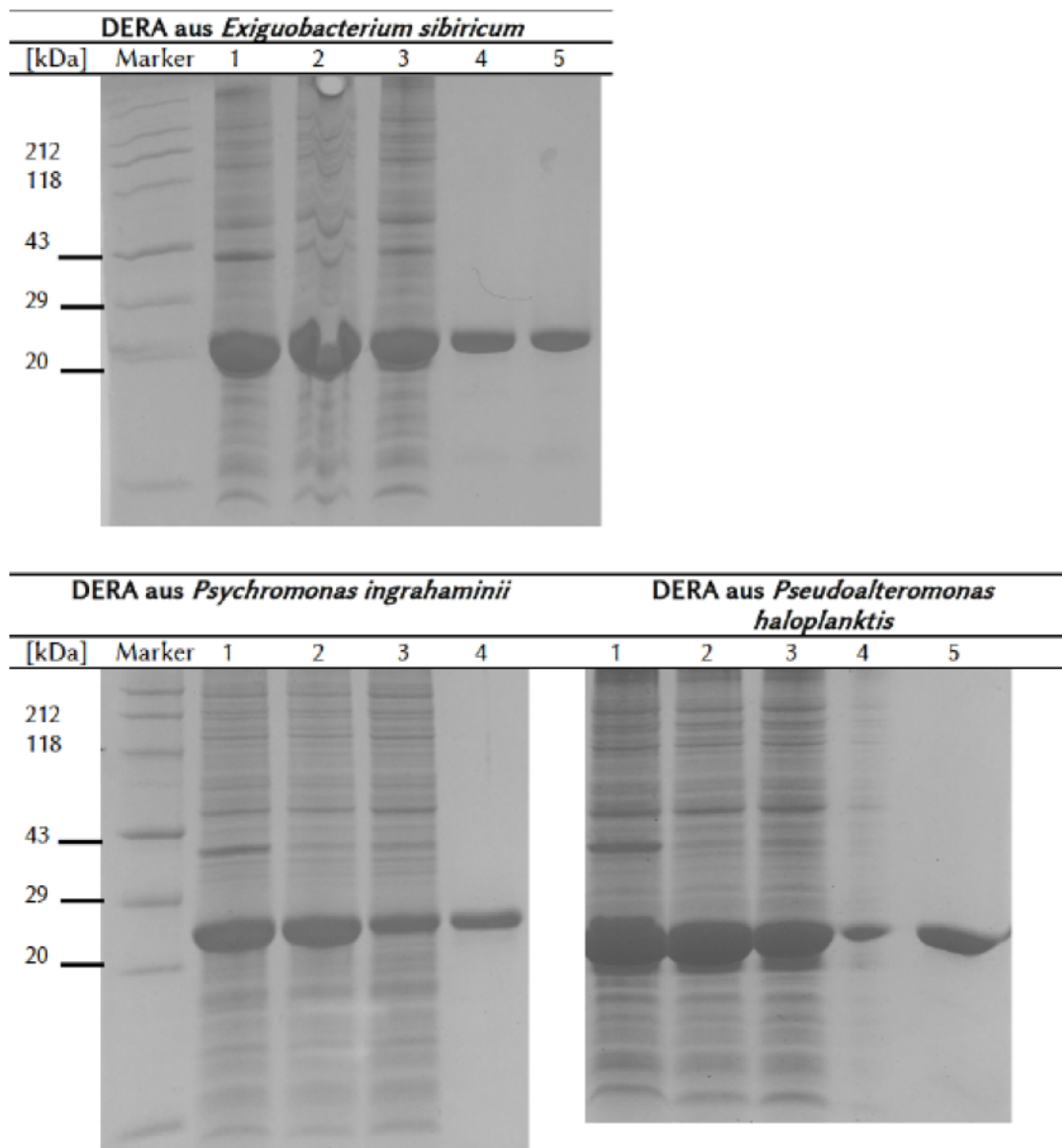


Abbildung 18: SDS-PAGE der Proteinreinigungen der psychrophilen DERAs mittels Affinitätschromatographie. Links: Standard Roti®Mark (Fermentas). Spalten 1: Rohextrakt; Spalten 2: Zellfreier Rohextrakt; Spalten 3: Durchfluss nach Beladen der NiNTA-Säule; Spalten 4+5: Protein-Elutionsfraktionen.

6.2.2 BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT UND DES ENANTIOMERENÜBERSCHUSSES

Nach erfolgreicher Reinigung aller drei psychrophilen DERAs wurden Aktivitätsmessungen der gereinigten Proteine nach bekanntem Aktivitätsassay durchgeführt (vgl. 9.3.6). Dabei konnten erhebliche Unterschiede der errechneten spezifischen Aktivitäten der drei Enzyme beobachtet werden. Die Werte sind vergleichend mit den bereits bekannten Aktivitätswerten der DERAs aus den psychrophilen Organismen *Colwellia psychrerythraea* und *Shewanella halifaxensis* in Tabelle 9 gelistet.^[170]

Tabelle 9: Berechnete Werte der spezifischen Aktivitäten der drei untersuchten psychrophilen DERAs vergleichend zu den bekannten Aktivitätswerten der DERAs aus *C. psychrerythraea* und *S. halifaxensis* sowie der mesophilen DERA aus *E. coli*.^[170]

DERA	Organismus	spez. Aktivität [U/mg]
DERA-wt	<i>E. sibiricum</i>	53.9 ± 7.0
DERA-wt	<i>P. haloplanktis</i>	28.3 ± 1.8
DERA-wt	<i>P. ingrahamii</i>	12.6 ± 0.2
DERA-wt	<i>C. psychrerythraea</i>	12.0 ± 0.7
DERA-wt	<i>S. halifaxensis</i>	14.0 ± 0.4
DERA-wt	<i>E. coli</i>	9.0

Die DERA aus *E. sibiricum* ist mit einer spezifischen Aktivität von rund 54 U/mg die deutlich aktivste untersuchte Aldolase und damit doppelt so aktiv, wie die DERA aus *P. haloplanktis* mit rund 28 U/mg und etwa 6-mal so aktiv wie die mesophile DERA. Mit rund 12 U/mg weist die DERA aus *P. ingrahamii* einen ähnlichen Wert auf, wie die bereits bekannten psychrophilen DERAs aus *C. psychrerythraea* und *S. halifaxensis*. Es bleibt also festzuhalten, dass alle drei untersuchten psychrophilen Aldolasen höhere Enzymaktivitäten aufweisen als der mesophile Gegenspieler und somit die allgemein bekannten Beobachtungen der Aktivitätsüberlegenheit von psychrophilen Enzymen an dieser Stelle bestätigt werden können.

Da das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die Verwendung der DERA in der organischen Synthese ist, ist der Faktor der Enantioselektivität – im Allgemeinen einer der großen Vorteile von Enzymen – von großem Interesse. Wie bereits bei der Untersuchung Enantioselektivität der erstellten DERA-Mutanten in Kapitel 6.1.1, wurde auch hier auf das von *Carolin Bisterfeld* etablierte Protokoll zurückgegriffen (vgl. 9.3.7). Die erhaltenen Werte des Enantiomerenüberschusses sind in Tabelle 10 dargestellt. Auffällig ist, dass die drei untersuchten psychrophilen DERAs deutlich schlechtere Enantiomerenüberschüsse aufweisen als die in diesem Arbeitskreis bereits bekannten psychrophilen DERAs DERA_{CP} und DERA_{SH}. Mit Werten von 75 % für die DERA_{ES}, 74 % für die DERA_{PH} und 68 % für die

DERA_{PI} sind die hier neu beschriebenen Aldolasen deutlich unselektiver als die mesophile DERA aus *E. coli*.

Tabelle 10: Enantiomerenüberschüsse der psychophilen DERAs aus *E. sibiricum*, *P. haloplanktis* und *P. ingrahamii*. Durchführung und Messung gemäß des etablierten Assays in Dreifachbestimmung.^[174] Aus Vergleichsgründen sind die im Arbeitskreis bekannten Werte der psychophilen DERAs aus *C. psychrerythraea* und *S. halifaxensis* sowie der mesophilen DERA aus *E. coli*.

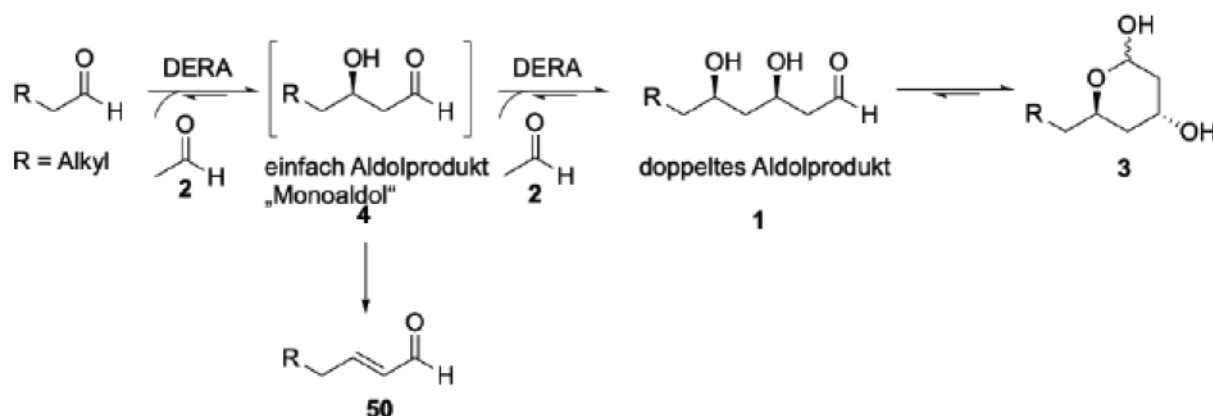
DERA	Organismus	Enantiomerenüberschuss ee [%]
DERA-wt	<i>E. sibiricum</i>	75.0 ± 2.6
DERA-wt	<i>P. haloplanktis</i>	74.0 ± 1.0
DERA-wt	<i>P. ingrahamii</i>	68.0 ± 1.1
DERA-wt	<i>C. psychrerythraea</i>	95 ^[171]
DERA-wt	<i>S. halifaxensis</i>	97 ^[171]
DERA-wt	<i>E. coli</i>	85 ^[171]

Diese im Vergleich zu den bekannten psychophilen DERAs erstaunlich niedrigen Werte der Enantiomerenüberschüsse können an dieser Stelle ohne weitere Investigationen nicht erklärt werden. Messfehler wurden durch mehrmaliges Wiederholen der Messungen und Überprüfung aller eingesetzten Chemikalien und Lösungen ausgeschlossen.

Als eines der Hauptargumente für den Einsatz von Biokatalysatoren in der organischen Synthese, erweist sich die Enantioselektivität in allen drei Fällen der hier untersuchten psychophilen DERAs als Flaschenhals ihrer weiteren Nutzung in einem synthetischen Zusammenhang. Da Sinn und Zweck der Verwendung der DERA in der Synthese die enantiomerenreine Herstellung von Aldol-(Zwischen-)Produkten ist, wurde an diesem Punkt entschieden, dass die drei DERAs aus *E. sibiricum*, *P. haloplanktis*, *P. ingrahamii* trotz ihrer zum Teil herausragenden Enzymaktivitäten für die vorliegende Arbeit nicht zielführend sind und weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Enzyme zum derzeitigen Zeitpunkt nicht vorgenommen werden.

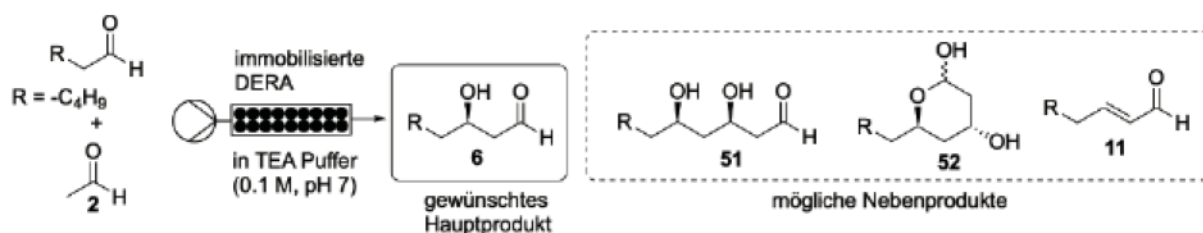
7 EIGENE ERGEBNISSE – DERA ALS BIOKATALYSATOR IN DER FLOWCHEMIE

Das folgende Kapitel 7 befasst sich mit dem Projekt der konkreten Anwendung der DERA in der organischen Synthese. Ziel dieses Projektes war es, ein geeignetes und effizientes Reaktions-Set-Up zu entwickeln. Das synthetische Potenzial der beiden vielversprechenden DERA-Varianten aus den beschriebenen Untersuchungen aus Kapitel 6, nämlich die mesophilen DERA-Mutanten DERA_{EC}-C47M und DERA_{EC}-C47V, wurde untersucht. Als C-C-bindungsknüpfendes Enzym wird die DERA bereits in industriellem Maßstab zur Produktion von Statin-Seitenketten verwendet.^[3] Die zugrundeliegende Reaktion der sequenziellen Aldoladdition zum Aufbau zwei neuer stereogener Zentren ist literaturbekannt und war, wie bereits in Kapitel 5.2 diskutiert, Gegenstand intensiver Forschung.



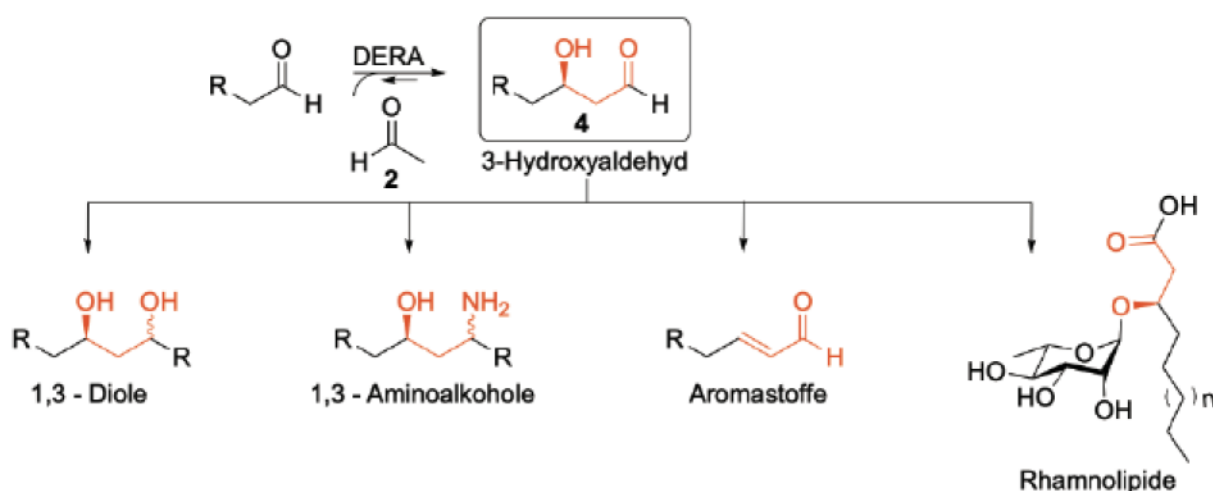
Schema 36: Grundlegendes Reaktionsschema der DERA-katalysierten Reaktion. Ohne gezielte Reaktionsführung ist das doppelte Aldolprodukt **1**, vorwiegend vorliegend in zyklisierter Form **3**, das Hauptprodukt der Aldoladdition. Das einfache (instabile) Aldolprodukt **4** neigt zur Eliminierungsreaktion, wobei es zur Bildung des entsprechenden ungesättigten Aldehydes **50** kommt.

Deshalb lag der Fokus dieses Projektes vor allem auf der selektiven Synthese des einfachen Aldol-Produktes **4** („Monoaldolprodukt“). Bekanntermaßen erschwert die Instabilität und insbesondere die hohe Reaktivität solcher 3-Hydroxyaldehyde die Synthese und Isolation.^[175] Das Konzept der *Flow* Chemie sollte durch die Möglichkeit einer präzisen Reaktionskontrolle diesem Problem entgegentreten und eine gezielte Isolation des einfachen Aldolproduktes **4**, ermöglichen. Zudem soll so die Bildung möglicher Nebenprodukte vermieden werden (s. Schema 37). So wurde das Monoaldolprodukt **4**, ursprünglich Intermediat der DERA-katalysierten Aldolreaktion, gezielt als Hauptprodukt adressiert.



Schema 37: Schema der gezielten Synthese des Monoaldolproduktes 4 als gewünschtes Hauptprodukt unter Verwendung eines Durchflusssystems (*Flow*) und einer immobilisierten DERA (Festbettreaktor). Mögliche Nebenprodukte sind das Eliminierungs- bzw. Aldolkondensationsprodukt 11, das doppelte Aldolprodukt 1 (in zyklisierter 3 und offenkettiger 1 Form).

Als interessantes Strukturmotiv und Baustein diverser Naturstoffe, wie beispielsweise für Aromastoffe^[6], Rhamnolipide^[5], 1,3-Diole^[7-9, 40, 176] oder 1,3-Aminoalkohole^[41-43, 177] (vgl. Schema 38), wurde das Monoaldolprodukt 4 nach Etablierung einer geeigneten Synthesemethodik in Folgereaktionen abgefangen. Die weitere Umsetzung wurde im kontinuierlichen und im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus durchgeführt.



Schema 38: DERA-katalysierter 3-Hydroxyaldehyd 4 als interessantes Strukturmotiv für Aromastoffe auf Basis von ungesättigten Aldehyden, Rhamnolipiden, und einer Vielzahl von (biologisch aktiven) Naturstoffen. In Letzteren findet sich das Motiv des 3-Hydroxyaldehydes beispielsweise in Form eines 1,3-Diols oder 1,3-Aminoalkohols wieder.

7.1 IMMOBILISIERUNG DER DERA

Um die optimierte DERA in einem kontinuierlichen Reaktionsaufbau nutzen zu können, wurde diese in einem ersten Schritt immobilisiert.

Wie in Kapitel 5.3.2 ausgeführt, ist die Immobilisierung von Enzymen eine gängige Methode Biokatalysatoren auf einer Festphase anzubringen, um diese anschließend möglichst effizient z.B. in Durchflusssynthesen zu verwenden.

Um eine geeignete Immobilisierungsmethode zu finden, wurden zwei Immobilisierungskonzepte für die DERA getestet:

1. eine Immobilisierung über adsorptive Wechselwirkungen (Metall-Chelat-Komplexierung)
2. die kovalente Anbringung der DERA an eine Festphase (unter Verwendung des HaloTag®-Systems)

Parameter bei der Bewertung der Immobilisierung waren besonders die verbliebene Enzymaktivität des Immobilisates, der Aufwand des Herstellungsprozesses und die Praktikabilität.

Die Studien und Ergebnisse zu den Immobilisierungsstrategien werden nachstehend diskutiert. Als Modellenzym diente zunächst die optimierte DERA-Variante DERA_{EC}-C47M.

7.1.1 ADSORPTIVE IMMOBILISIERUNG ÜBER EINEN POLYHISTIDIN-TAG

Zu den einfachsten Verfahren der Enzymimmobilisierung zählt die Adsorption, weshalb vorliegend diese Methode zuerst getestet worden ist. Zudem lagen zu dieser Immobilisierungsmethode der DERA institutsintern bereits initiale Vorversuche vor.^[171] Ausschlaggebend für eine effiziente Immobilisierung über adsorptive Wechselwirkungen ist eine ausreichend hohe Affinität der Trägersubstanz und des Substrates zueinander. Um diese für die DERA zu gewährleisten, wurde ein 6-facher Polyhistidin-Tag (C-terminal) verwendet und mit einer Nickel-NTA Säule kombiniert, welche gewöhnlich für die Proteinreinigung verwendet wird. Hier macht man sich die Affinität der Histidinreste des Protein-Tags und der zweiwertigen Nickelionen zur Chelat-Komplexierung zu Nutze (vgl. Abbildung 19). Als Trägermaterial für den Nickel-NTA-Komplex diente vorliegend Agarose.

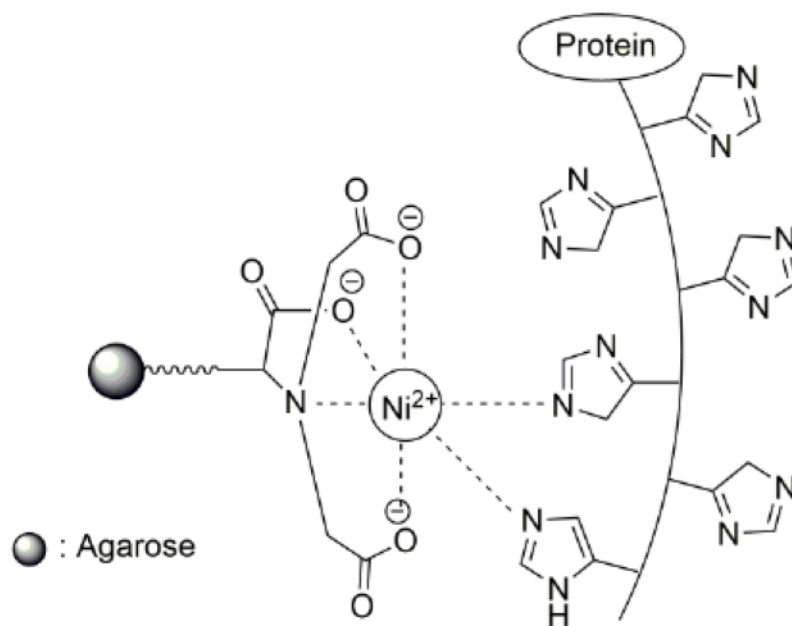
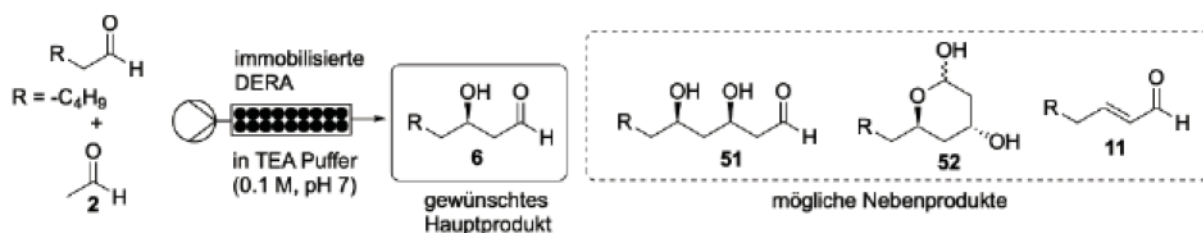


Abbildung 19: Schematische Struktur des Chelatkomplexes zwischen einem 6-fachen Histidin-Tag eines Proteins und dem zweiwertigen NTA-Nickel-Ion. Der NTA-Nickel-Komplex ist über einen Linker an eine Festphase aus Agarose gebunden.

Zur adsorptiven Immobilisierung wurden 1 g Zellen der optimierten DERA-Variante DERA_{EC}-C47M aufgeschlossen und der zellfreie Rohextrakt (ZFRE) anschließend für 30 Minuten zirkulierend mit einer Flussgeschwindigkeit von 2.4 mL/min über die Nickel-NTA-Säule gepumpt. Zur Bestimmung der theoretischen Enzymaktivität, die sich nach der Immobilisierung auf der Säule befanden, wurde die Enzymaktivität des gelösten Rohextraktes vor der Immobilisierung, sowie von der Enzymlösung, nachdem diese die Nickel-NTA-Säule mit Trägermaterial durchlaufen hat, photometrisch bestimmt. Die Differenz der beiden Aktivitäten bildet die theoretische Enzymaktivität der immobilisierten DERA und somit die Enzymaktivität, die theoretisch für die Durchflusssynthese zur Verfügung steht. Mit einer Enzymaktivität des ZFRE von 9.0 ± 0.5 U und einer Enzymaktivität von 4.8 ± 0.2 U des Durchflusses, ergibt sich somit eine theoretisch immobilisierte Enzymaktivität von rund 4.2 U.



Schema 39: Schema der Testreaktion von Hexanal (5) und Acetaldehyd (2) zur gezielten Synthese des Monoaldolproduktes 6 mit der adsorptiv immobilisierten DERA_{EC}-C47M.

Um die Effektivität des Systems zu testen, wurde eine einfache enzymatische Testreaktion (vgl. Schema 39) durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsparameter, welche von *Carolin Bisterfeld* in initialen Versuchen für den DERA Wildtyp optimiert worden waren, übernommen. Hexanal (5) diente als Modellsubstrat. Ein Substratgemisch bestehend aus Acetaldehyd (2) und Hexanal (5) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7) wurde in einem Zweihals-Kolben vorgelegt und die Enzym-Agarose-Säule an einem Kolbenhals befestigt. Durch den zweiten Kolbenhals wurde der Schlauch der Peristaltikpumpe geführt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Reaktionsapparatur möglichst dicht war (Abdichtung mit Parafilm), um ein etwaiges Verflüchtigen der Substrate zu vermeiden. Unter starkem Rühren wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe das Reaktionsgemisch bei einer Flussgeschwindigkeit von 4.3 mL/min aus dem Kolben über die DERA-Säule gepumpt. Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurden in 10-minütigen Intervallen Proben der Reaktionslösung genommen und so die Produktverteilung in Abhängigkeit der Zeit verfolgt. Nach Extraktion und Trocknung der Proben wurden diese gaschromatographisch analysiert. Die Flächen der entsprechenden Produktpeaks im GC-Chromatogramm wurden auf einen internen Standard bezogen. Abbildung 20 veranschaulicht die Reaktionskontrolle zur Analyse der Produktverteilung. Die Auswertung der erhaltenen Daten zeigt, dass grundsätzlich Substrat zu Produkt umgesetzt worden ist, entsprechend ist Enzymaktivität vorhanden ist. Bereits nach den ersten 10 Minuten ist ein Abfall der Konzentration des Substrats Hexanal (5) zu verzeichnen, während die Menge an Produkt(en) zunimmt. Zudem kann festgestellt werden, dass innerhalb der ersten 30 Minuten das gewünschte Monoaldolprodukt 6 das Hauptprodukt ist. Allerdings sind weiterhin deutliche Mengen an Hexanal (5) vorhanden, welche für einen schlechten Umsatz sprechen. Die Menge des Aldolkondensationsproduktes Octenal (11) bleibt über die gesamte Reaktionsdauer gering. Ab etwa 35 Minuten wechselt das Produktverhältnis: Während die Menge an Monoaldolprodukt 6 fällt, kommt es zu einem Anstieg der Menge an doppeltem Aldolprodukt 51. Dieser beobachtete Umsatz des Monoaldolproduktes 6 zum doppelten Aldolprodukt 51 ist allerdings mit dem in diesem Fall geschlossenen zyklisierenden Reaktions-Set-Ups zu erklären. Denn das Produktgemisch

wurde nach erstmaligem Durchlaufen der Enzym-Säule nicht abgeführt, sondern wiederholt über die immobilisierte DERA gepumpt, um so eine ausreichende Produktanreicherung zu erzielen. Den Daten folgend, wäre ein Abbruch der Reaktion nach rund 30 Minuten notwendig, um das Monoaldolprodukt **6** als Hauptprodukt zu generieren. Nichtsdestotrotz spricht die große Menge an Hexanal (**5**) für ein äußerst ineffizientes System bei (zu) geringem Umsatz, d.h. die eingesetzte Menge an Enzymaktivität ist zu gering oder aber es kommt zu einem Verlust an Enzymaktivität während der Reaktion. Das Experiment deutet auf Letzteres hin: Bereits innerhalb der ersten Minuten nach Reaktionsstart deutet eine weißliche Trübung des Reaktionsansatzes auf ein Ablösen der Festphase und anschließende Ausfällung des Enzyms hin (*Leaching*), womit der Reaktion wichtige Enzymaktivität aus dem Reaktionssystem verloren geht. Neben dem offensichtlichen Nachteil eines geringeren Umsatzes zum Produkt, stellt das Enzym-*Leaching* ebenfalls ein Problem bzgl. der weiteren Produkt-Aufarbeitung dar (eigentlich ein Vorteil der Nutzung von immobilisiertem Enzym), da ein zusätzlicher Schritt der Trennung von Produktgemisch und Enzym notwendig ist. Es wären also weitere Optimierungen des Immobilisierungssystems hinsichtlich einer stärkeren Bindung zwischen Enzym und Festphase notwendig. Mögliche Ansätze könnte die Verwendung anderer Metallionen-Komplexe bieten, um die notwendige Effizienz zu erzielen. Trotz der vorteilhaften Aspekte dieser Methode – eine schnelle und unkomplizierte Herstellung des Immobilisates sowie günstige Ausgangsmaterialien – wurde an dieser Stelle im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschlossen aufgrund des starken *Leaching*-Effektes keine weiteren Optimierungen durchzuführen.

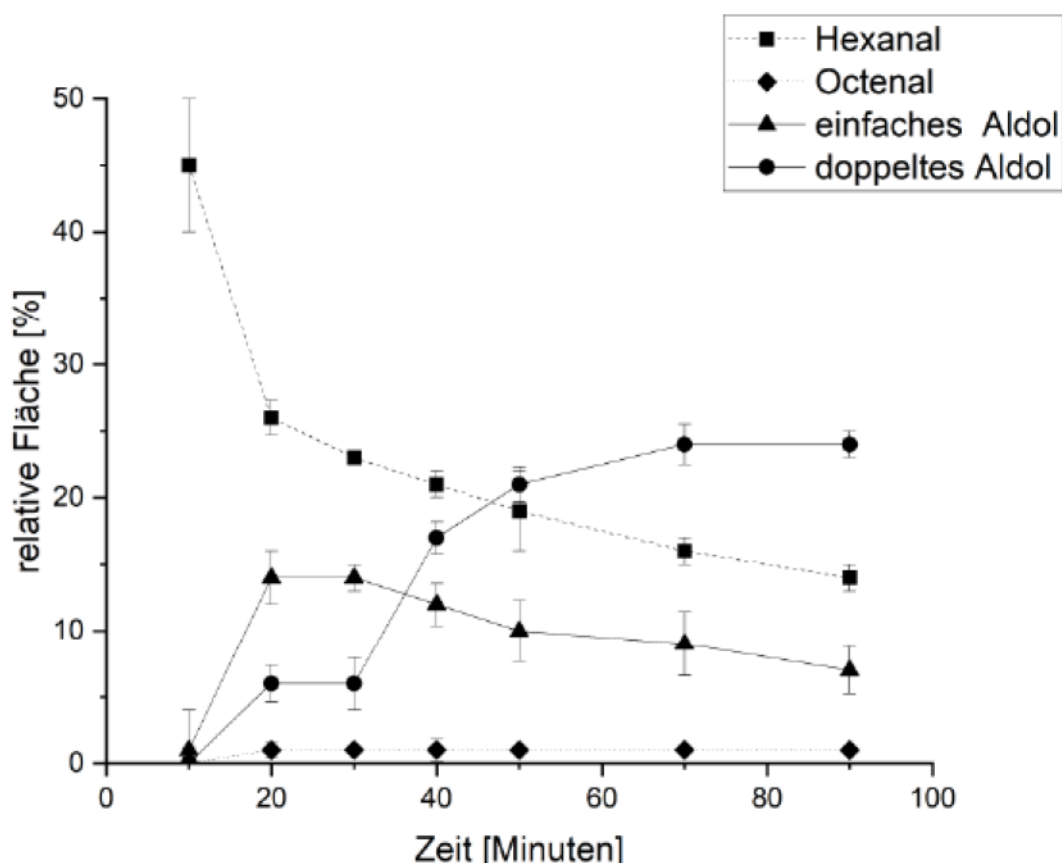


Abbildung 20: Reaktionskontrolle einer DERA-katalysierten Aldolreaktion von Hexanal (5) und Acetaldehyd (2) unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule als Träger der immobilisierten DERA. Die Standardabweichungen beziehen sich auf eine Dreifach-Bestimmung. Die gezeigten Ergebnisse stellen relative Werte dar, bezogen auf einen internen Standar.

7.1.2 KOVALENTE IMMOBILISIERUNG ÜBER DAS HALOTAGTM-SYSTEM

Neben dem Ansatz einer adsorptiven Immobilisierung, welche sich besonders aufgrund ihres starken *Leaching*-Effekts als ungeeignet erwies, wurde eine kovalente Methode mittels eines Fusiontags zur Immobilisierung der DERA getestet, welche bekanntermaßen solche *Leaching*-Effekte unterbindet. In Zusammenarbeit mit *Johannes Döbber* aus dem Instituts für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Biotechnologie) des Forschungszentrums Jülich wurde das HaloTagTM-System zur Immobilisierung der DERA untersucht. Wie bereits im Kapitel 5.3.2 erläutert, erfordert die Anwendung eines solchen Fusiontags eine vorherige genetische Modifikation des gewünschten Biokatalysators, nämlich eine genetische Fusionierung der DERA mit dem HaloTagTM (vgl. Abbildung 21). Auch hier wurde zunächst die optimierte DERA_{EC}-Variante DERA_{EC}-C47M getestet. Die Erstellung des genetischen Enzymkonstrukts aus HaloTagTM und DERA-Variante wurde von *Johannes Döbber* – das entsprechende DERA_{EC}-C47M Plasmides (ohne His-Tag) wurden ihm dazu zur Verfügung

gestellt – durchgeführt. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse des Klonierungsprozesses und der Optimierung des genetischen Konstruktes an dieser Stelle der Vollständigkeit halber und nach freundlicher Genehmigung von *Johannes Döbber* lediglich zusammenfassend dargestellt.

Bekanntermaßen können sich genetische Modifikationen jeglicher Art von Biokatalysatoren auf die katalytische Aktivität auswirken, sowohl im positiven als auch im negativen Sinne.^[178-180] Die vergleichsweise massiven Eingriffe in die Proteinstruktur, wie die Anbringung eines 34 kDa schweren HaloTagTM an die lediglich 28 kDa „leichte“ DERA, führten zu großen Verlusten der enzymatischen Aktivität, möglicherweise begründet durch eine durch die Fusionierung unvorteilhafte Orientierung des HaloTagsTM in dem entstandenen Fusionsenzym trotz Anbringung des HaloTagsTM an den hinsichtlich der Auswirkungen auf die Aktivität favorisierten N-Terminus der DERA (vgl. Ausführungen oben). Strategien zur Optimierung der Konstrukte wurden verfolgt: So wurden verschiedene Spacer (vgl. Abbildung 21, Linker 2), also eine kurze Aminosäuresequenz, die die DERA mit dem HaloTagTM verbindet, verschiedener Rigidität, Flexibilität und Länge getestet. Insgesamt wurden neun verschiedene Konstrukte mit unterschiedlichen Spacer-Designs getestet. Details zu den jeweiligen Spacer-Sequenzen können im Anhang (Kapitel 10.2) eingesehen werden. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der verbliebenen Enzymaktivität von bis zu 15 % Restaktivität im Vergleich mit der Aktivität der freien (also nicht immobilisierten) DERA_{EC}-C47M ergaben sich unter Verwendung des Konstrukts, welches einen langen rigiden Spacer umfasste.^[181] Die Experimente bestätigen, dass sich ein möglichst großer Abstand zwischen den beiden Fusionspartnern HaloTagTM und DERA_{EC}-Variante (N-Terminus) als besonders vorteilhaft auswirkt. Dies spricht für eine mögliche sterische Hinderung durch den angebrachten HaloTagTM an die DERA.

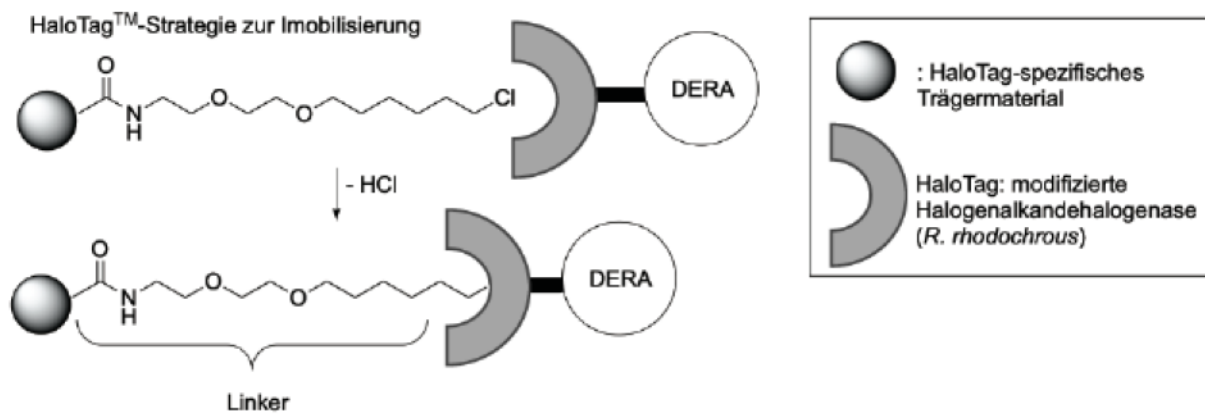


Abbildung 21: Grundlegendes Konzept der Immobilisierungsstrategie der DERA mit dem HaloTag™-System.

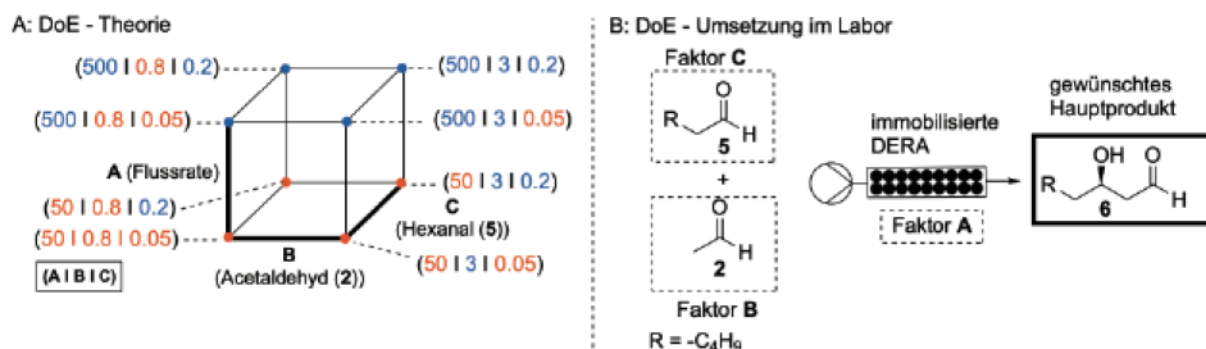
Dieses optimierte Konstrukt des Fusionsenzym *HaloTag-DEAEC-C47M* wurde schließlich für die ersten Immobilisierungen im Labormaßstab verwendet. Zur Immobilisierung wurde lyophilisierter Rohextrakt verwendet. Die Verwendung von Lyophilisat ermöglicht eine Vorbereitung von sofort einsatzfähigem Enzym zur Immobilisierung in größeren Maßstäben, die die Praktikabilität dieser Immobilisierungsmethode begünstigt: Nach erfolgreicher Überexpression des Fusionsenzym erfolgtem Zellaufschluss unter Verwendung von Ultraschall, anschließender Zentrifugation und Lyophilisierung, braucht zur Immobilisierung lediglich das lyophilisierte Rohextraktpulver wieder gelöst werden. So konnte direkt aus dem Rohextrakt und ohne einen aufwändigen Proteinreinigungsschritt mit der Immobilisierung begonnen werden. Für die initialen Immobilisierungsversuche wurde dazu mit einem 5 cm langen Festbettreaktor aus Glas von *Omnifit* ($\varnothing$ 3 mm, L 50 mm) gearbeitet, welche zuvor mit dem Trägermaterial, *HaloLink™ Resin*, befüllt worden ist. Nach Equilibrierung der gepackten Glassäule wurden 5 mL des gelösten Rohextraktes (entsprechend 125 mg Lyophilisat) bei 30 μ L/min mit einer Spritzenpumpe über die Säule gepumpt und die Enzymlösung nach Durchlaufen der Glassäule wieder gekühlt aufgefangen. Analog zum Vorgehen bei der adsorptiven Immobilisierung, wurde die theoretische Enzymaktivität bestimmt, die sich nach der Immobilisierung auf der Säule befanden, d.h. es wurde die Enzymaktivität des gelösten Rohextraktes vor der Immobilisierung, sowie von der Enzymlösung nach einmaligem Durchlaufen der Glassäule mit Trägermaterial gemessen und die Differenz gebildet. Mit einer Enzymaktivität der Lösung vor der Immobilisierung von 137 ± 3 U und 99 ± 1 U nach der Immobilisierung ergibt sich eine theoretisch immobilisierte Enzymaktivität von 38 U in der verwendeten Glassäule und damit rund 10-mal mehr als bei der getesteten adsorptiven Methode. Im Hinblick auf die geplante biokatalytische Anwendung in der Synthese spielt der Parameter der Enzymaktivität eine zentrale Rolle bei

der Wahl einer geeigneten Immobilisierungsmethode. Die vergleichsweise hohe (theoretische) enzymatische Aktivität des Immobilisats sowie die unkomplizierte und schnelle Immobilisierung, wenn auch nach aufwändiger (aber einmalig notwendiger) Erstellung des Enzymkonstrukts, waren vielversprechend. Die kovalente Immobilisierung unter Verwendung des HaloTagTM-Systems wurde aufgrund dessen für die weitere Entwicklung einer möglichst effizienten Synthese des Monoaldol-Produktes **6** der DERA zur Immobilisierungsmethode der Wahl.

7.2 ETABLIERUNG EINES *FLOW* SYSTEMS

7.2.1 OPTIMIERUNGSPROZESS DER SYNTHESE DES MONO-ALDOLPRODUKTES ALS NEUER DERA-BAUSTEIN

Nachdem die DERA_{EC}-C47M erfolgreich via HaloTagTM-System immobilisiert werden konnte, wurde im folgenden Schritt eine verlässliche und reproduzierbare Methode im kontinuierlichen *Flow*-Modus zur Synthese des einfachen Aldolproduktes **6** entwickelt. Als Modellsubstrat wurde Hexanal (**5**) gewählt. Zur Etablierung eines geeigneten *Flow*-Systems mit der immobilisierten DERA als Biokatalysator, wurden drei entscheidende Parameter berücksichtigt, um die idealen Reaktionsbedingungen zu finden: Die Konzentrationen der Substrate Acetaldehyd (**2**) und Hexanal (**5**) sowie die Flussrate. Letztere bestimmt die Kontaktzeit zwischen Katalysator und Substrat und nimmt somit direkten Einfluss auf den Umsatz und die Zusammensetzung des Produktgemisches. Der Parameter der Enzymaktivität wurde konstant gehalten, in dem alle Versuche zunächst mit einem Festbettreaktor von 5 cm Länge und einem Durchmesser von 3 mm (Ø 3 mm, L 50 mm) durchgeführt wurden. Die Standardisierung der Immobilisierungsmethode und die Aktivitätsbestimmung des Enzymreaktors nach jeder Immobilisierung gewährleisteten dabei gleichbleibende Bedingungen bezüglich der eingesetzten Enzymaktivität.



Schema 40: A: Schematische Darstellung der grundlegenden Theorie des verwendeten Zwei-Level „*full factorial*“ *Design of Experiments* unter Berücksichtigung von drei Parametern (Faktoren) der ersten Optimierungsrunde. Würfel-Modell, wobei jeder der drei Parameter Flussrate [μL/min] (Faktor A), Acetaldehyd (2) [Äqu.] (Faktor B) und Hexanal (5) [mol/L] (Faktor C) eine Dimension im Raum darstellt. Jeder Faktor hat zwei Ebenen, dargestellt in blau (Ebene 1) und rot (Ebene 2). B: praktische Umsetzung - Schema der Testreaktion von Hexanal (5) und Acetaldehyd (2) zur gezielten Synthese des Monoaldolproduktes 6 mit der Halo-DERA_{EC}-C47M unter Implementierung der drei Faktoren A, B und C.

Bei diesen initialen Versuchen mit der Halo-DERA_{EC}-C47M sollte das Verhältnis von gewünschtem Monoaldolprodukt 6 zu unerwünschtem doppeltem Aldolprodukt 51 im Fokus stehen, da zunächst ein Produktgemisch diverser Nebenprodukte zu erwarten war (vgl. Schema 40). Eine Reaktionsoptimierung wurde systematisch mit Hilfe einer *statistischen Versuchsplanung*, engl. *Design of Experiments* (im Folgenden kurz: DoE), durchgeführt. Im ersten Schritt wurde ein so genanntes *full factorial* DoE angewendet, bei dem die drei zu untersuchenden Parameter (sog. Faktoren) die Flussrate (Faktor A) sowie die Substratkonzentrationen von Acetaldehyd (2) (Faktor B) und Hexanal (5) (Faktor C) auf zwei Leveln untersucht werden, resultierend in 2³ Experimenten (vgl. Schema 40). Jedes dieser Experimente wurde als Duplikat durchgeführt, so dass in Summe 16 Experimente durchzuführen waren (s. Tabelle 11). Ziel dieser Optimierungsrunde war es, eine Gewichtung der entsprechenden Reaktionsparameter zu erhalten, d.h. ob der jeweilige Reaktionsparameter einen starken oder weniger starken Einfluss auf die Reaktion ausübt. Dafür wurden die niedrigsten und höchsten zu untersuchenden Grenzwerte der jeweiligen Parameter so ausgewählt, dass sie möglichst weit voneinander entfernt liegen. Unter Berücksichtigung der Löslichkeiten der Substrate im Reaktionsmedium, also in wässrigem Puffer, und den üblich verwendeten Konzentrationen an Acetaldehyd (2) in der Synthese von DERA-katalysierten Reaktionen wurde für die Hexanal-Konzentration ein unterer Grenzwert von 0.05 mol/L und ein oberer Grenzwert von 0.2 mol/L, für die eingesetzten Äquivalenten an Acetaldehyd (2) 0.8 und 3.0 sowie für die eingesetzten Flussrate 50 und 500 μL/min ausgewählt.^[10, 80, 84]

Tabelle 11: Reaktionsparameter des „full factorial“ Design of Experiments. Die Berechnung der Parameter erfolgte mit Hilfe von *DesignExpert®*, basierend auf den drei Faktoren A (Flussrate in $\mu\text{L}/\text{min}$), B (Äquivalente an Acetaldehyd (2)) und C (Hexanal (5) in mol/L). Jedes Experiment wurde als Duplikat durchgeführt. [a] relativer Umsatz zu 3-Hydroxyoctanal (6). [b] relativer Umsatz zum doppelten Aldolprodukt (1).

Versuchs-Nr.	Flussrate [$\mu\text{L}/\text{Min}$]	Acetaldehyd (2) [Äqu.]	Hexanal (5) [mol/L]	Monoaldol 6 [%] ^[a]	Doppeltes Aldol 1 [%] ^[b]
1	50	0.8	0.05	32 ± 5.0	0
2	50	3	0.05	54 ± 5.0	3 ± 0.0
3	50	0.8	0.20	48 ± 5.0	5 ± 0.4
4	50	3	0.20	64 ± 2.0	13 ± 0
5	500	0.8	0.05	23 ± 2.0	0
6	500	3	0.05	22 ± 6.0	0
7	500	0.8	0.20	20 ± 1.0	0
8	500	3	0.20	23 ± 1.0	0

Die Versuche wurden zunächst jeweils in einem 5 mL-Maßstab angesetzt. Die Substrate wurden entsprechend ihrer Mengen gemäß Tabelle 11 in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) vorgelegt, mit einer Spritze aufgezogen und diese intensiv geschüttelt. Aufgrund eines Totvolumens des Festbettreaktors von etwa 900 μL wurden die ersten beiden Milliliter der Produktlösung verworfen. Danach folgte die Probenentnahme, welche nach Extraktion gaschromatographisch analysiert wurde. Da allerdings das gewünschte Monoaldolprodukt 6 zu instabil ist, um es zu isolieren, wurde ein relativer Umsatz berechnet (vgl. Kapitel 9.4.6155 und Kapitel 9.4.7 für genauere Details der Berechnung). Dafür wurde bei der Extraktion der Produktgemische ein interner Standard 2-Phenylethanol zugesetzt und die Proben anschließend gaschromatographisch vermessen. Die Peakfläche des Monoaldolproduktes (sowie des Substrates Hexanal (5) und der möglichen Nebenprodukte) wurden dann auf die Peakfläche des internen Standards normiert, und die prozentualen Anteile der Produkte wurden berechnet, um den relativen Umsatz zu bestimmen. Die gesammelten Daten wurden anschließend mittels der Programme *DesignExpert®* und *OriginPro®* ausgewertet. Abbildung 22 veranschaulicht die Auswertung der Daten. Die erzielten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der Flussrate auf den Umsatz (vgl. auch Tabelle 11). Dabei zeichnete sich eine geringe Flussrate in Bezug auf den Umsatz zum Monoaldolprodukt 6 besonders vorteilhaft gegenüber der hohen Flussrate aus (Einträge 1 bis 4 der Tabelle 11). Die Werte des relativen Umsatzes waren bei einer langsameren Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ etwa zwei- bis dreimal so hoch wie bei einer schnelleren Flussrate von 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Einträge 4 bis 8 der Tabelle 11). Besonders deutlich wird dieser Einfluss anhand der Einträge 4 und 8 der Tabelle 11: Diese beiden Experimente unterscheiden sich lediglich in der Flussrate und verwenden die jeweils höchsten Konzentrationen an Substraten Acetaldehyd (2) und Hexanal (5). Aus

den Daten wird ebenfalls ersichtlich, dass je höher die Konzentration an eingesetzten Substraten, desto besser ist der erzielte Umsatz. So zeigen die Experimente mit einer Kombination aus langsamer Flussrate und hohen Mengen an Acetaldehyd (2) die besten Resultate mit 54 % bzw. 64 % Umsatz zum Monoaldolprodukt 6 (vgl. Einträge 2 und 4 der Tabelle 11). Diese Trends können auch der 3D-Illustration aus Abbildung 22 entnommen werden. Je dunkler der dort gezeigte Rotton, desto höher ist die Menge an Monoaldolprodukt 6. Das beste Resultat mit 64 % Umsatz zum Monoaldolprodukt 6 wurde erzielt mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, einer Konzentration an Hexanal (5) von 0.2 mol/L und 3 Äquivalente Acetaldehyd (2) (entsprechend 0.6 mol/L). Zu verzeichnen sind bei diesen Reaktionsparametern allerdings auch 13 % des unerwünschten doppelten Aldolproduktes 51 (s. Eintrag 4 der Tabelle 11).

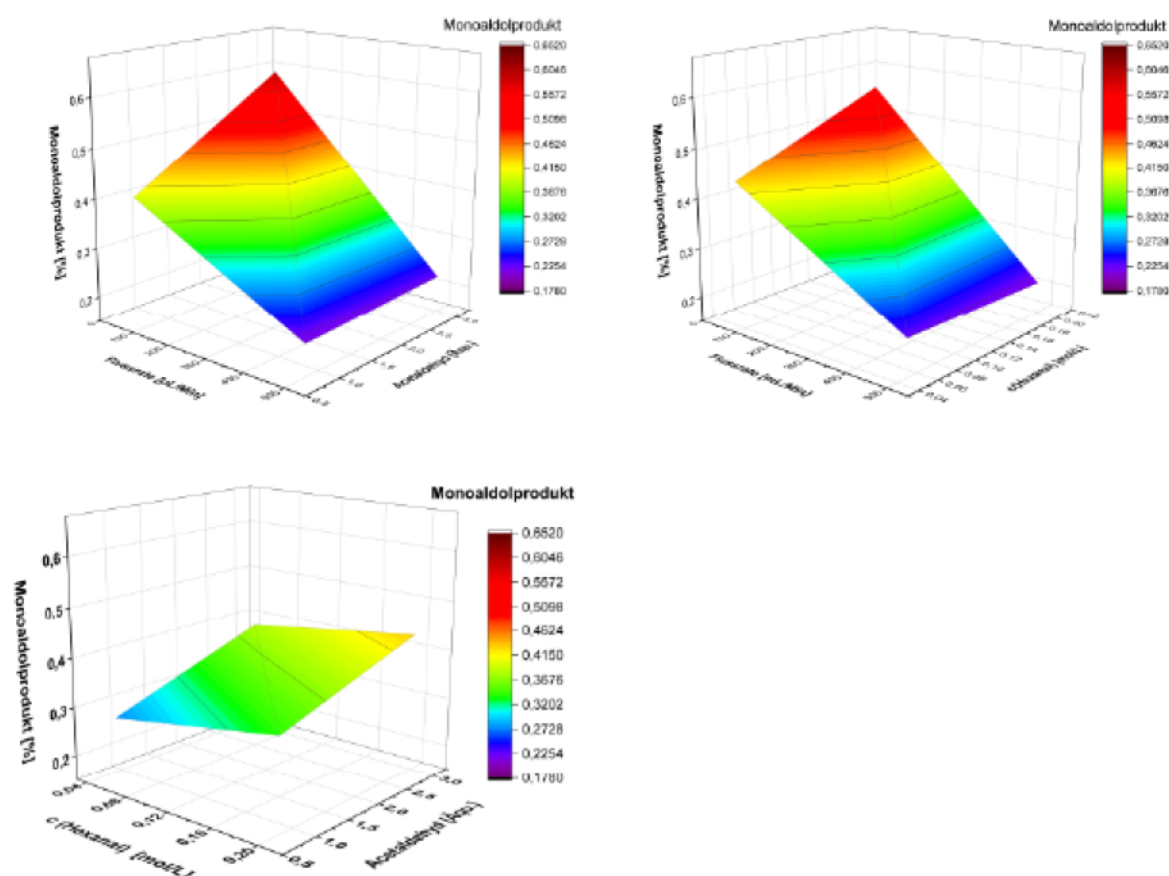


Abbildung 22: 3D-Darstellung der Ergebnisse des *full factorial DoE* der ersten Reaktionsoptimierung hinsichtlich der drei Reaktionsparameter für die gezielte Synthese des Monoaldolproduktes 3-Hydroxyoctanal (6): A) Flussrate in $\mu\text{L}/\text{min}$ und Menge an Acetaldehyd (2) [Äqu.]; B) Flussrate in $\mu\text{L}/\text{min}$ und Hexanal (5) Konzentration; C) Menge Acetaldehyd (2) [Äqu.] und Hexanal (5) Konzentration [mol/L]. Je dunkler der Rotton, desto höher ist die Menge an Monoaldolprodukt 6 im Produktgemisch.

Basierend auf dieser zunächst vielversprechenden ersten Optimierungsrunde, wurde die Reproduzierbarkeit der Daten adressiert. Schnell zeigten sich die Schwächen des Set-Ups: Ein

drastischer Abfall des Umsatzes auf bis zu 20–30 % wurde verzeichnet, so dass Versuche die Daten zu reproduzieren scheiterten. Zudem kam es zu einem starken Anstieg des Aldolkondensationsproduktes (*E*)-Octenal (**11**), welches zuvor lediglich Spuren vorhanden war.

Bekanntermaßen können Aldolkondensationsreaktionen unter sauren Bedingungen katalysiert werden.^[182–184] Aus diesem Grund wurde versucht jegliche acide Quelle, also protonierende Substanzen, aus dem Reaktions-Set-Up zu entfernen. Der verwendete Festbettreaktor besteht aus Glas, weshalb ein Versuch unternommen wurde, die Glasoberfläche mittels Oberflächendeaktivierung für eventuell schädliche Einflüsse auf das Reaktionsgeschehen unschädlich zu machen. Dafür wurde der Festbettreaktor mit Chlortrimethylsilan behandelt. Dabei kommt es zur Silanisierung der freien Hydroxylgruppen der Glasoberfläche (vgl. Abbildung 23) und somit zu Silyl-Schätzung der aciden Hydroxylgruppen. Der Effekt ist direkt nach der Behandlung zu beobachten, da die Glasoberfläche nicht mehr mit Wasser benetzbar ist und das Wasser direkt abperlt. Da dieser Effekt allerdings reversibel ist (vermutlich durch mechanischen Abrieb), wurde die Behandlung des Festbettreaktors vor jedem Experiment wiederholt.

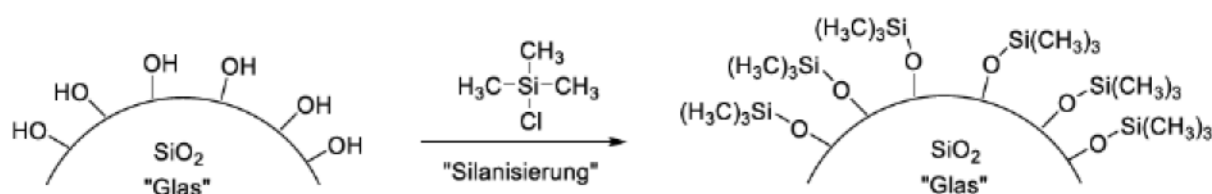


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Oberflächenaktivierung von Glas durch den Einsatz von Trimethylsilan. Bei der Behandlung von Glasoberflächen mit Chlortrimethylsilan kommt es zu einer Silanisierung der freien Hydroxylgruppen.

Versuche mit dem inaktivierten Festbettreaktor erzielten eine teilweise Verbesserung. Der relative Umsatz zum gewünschten Monoaldolprodukt 3-Hydroxyoctanal (**6**) konnte auf bis zu 38 % als Hauptprodukt der Reaktion erhöht werden, und zwar ohne Spuren des doppelten Aldolproduktes **51**. Dennoch waren weiterhin bis zu 6 % an relativem Umsatz zum Kondensationsprodukt (**11**) zu beobachten. Basierend auf diesen reproduzierbaren Daten wurde eine zweite Optimierungsrunde eingeleitet mit dem Ziel den Umsatz weiter zu erhöhen und die Bildung des ungewünschten Kondensationsproduktes (*E*)-Octenal (**11**) zu unterbinden. Wieder wurde ein systematischer Optimierungsansatz mittels eines DoE gewählt, und zwar die sogenannte *response surface* Methode, bei dem zusätzlich zu den Koordinaten des oben gezeigten Würfelmodells (vgl. Schema 40) weitere Koordinaten außerhalb des Würfels, also „nach außen“, versetzt werden, um eine höhere statistische

Sicherheit am Rand zu erzielen. Mit dieser Optimierung konnte allerdings keine weitere Verbesserung erreicht werden.

Nachdem die Möglichkeiten der Anpassung der Reaktionsparameter der Substratkonzentrationen und Flussrate erschöpft waren, wurde die Erhöhung der Enzymaktivität adressiert. Grundsätzlich kann dies durch zwei Optionen erreicht werden: 1. Über die Erhöhung der Enzymmenge, d.h. die Verwendung eines längeren Festbettreaktors und damit mit einem höheren Verbrauch an Enzym oder 2. der Einsatz einer aktiveren Enzymvariante, die dennoch eine ausreichend hohe Stabilität gegenüber dem Acetaldehyd (2) aufweist. Wie in 6.1 diskutiert, konnte im Rahmen der Untersuchung der Acetaldehyd-Toleranz der DERA_{EC} neben der bisher verwendeten Variante DERA_{EC}-C47M die entsprechende Variante mit einer Valin-Substitution an Position 47 identifiziert werden. Auch wenn diese DERA-Variante keine volle Acetaldehyd-Toleranz aufweist, sondern lediglich eine eingeschränkte ($T_{1/2}$ in 300 mM Acetaldehyd = 3.3 h) Stabilität, ist sie der Methionin-Variante C47M deutlich in ihrer enzymatischen Aktivität überlegen. DERA_{EC}-C47V weist eine nahezu gleiche Aktivität auf wie der entsprechende DERA-Wildtyp und somit rund 40 % mehr katalytische Aktivität als die entsprechende C47M Variante. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die DERA_{EC}-C47V Variante in dem bisher entwickelten Reaktionssystem getestet. Das entsprechende Konstrukt aus HaloTag™ und DERA_{EC}-C47V wurde durch Aminosäureaustausch basierend auf dem bereits optimierten Konstrukt Halo-DERA_{EC}-C47M gebildet. Nach erfolgreicher Expression und Lyophilisierung, wurde analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise mit der DERA_{EC}-C47M Variante zur Immobilisierung vorgegangen. So konnte mit der DERA_{EC}-C47V Variante rund doppelt so viel Enzymaktivität in dem gleichen Festbettreaktor von 5 cm Länge (theoretisch) immobilisiert werden (vgl. Einträge 1 und 2 der Tabelle 12).

Tabelle 12: Theoretisch immobilisierte Enzymaktivität in dem entsprechenden Festbettreaktor (Omnifit® Glassäulen) vergleichend für die beiden DERA-Varianten Halo-DERA_{EC}-C47M und Halo-DERA_{EC}-C47V. [a]zugrunde liegende Berechnung der theoretisch immobilisierten Enzymaktivität: (Enzymaktivität im ZFRE gemessen vor der Immobilisierung) – (Enzymaktivität im ZFRE im Durchfluss, nach einmaligem Durchlaufen des Reaktors gemessen nach Immobilisierung).

Halo-DERA _{EC} Variante - Reaktordurchmesser, und -länge	Enzymaktivität [U]		
	Vor Immobilisierung	Nach Immobilisierung	theoretisch immobilisiert ^[a]
C47M - Ø 3, 50 mm	137	99	38
C47V - Ø 3, 50 mm	209	133	75
C47V - Ø 3, 100 mm	194	74	118

Es folgten erste Versuche der kontinuierlichen Synthese des Monoaldolproduktes 3-Hydroxyoctanal (**6**). Dabei wurden die bereits optimierten Substratkonzentrationen der Versuche mit der Methionin-Variante verwendet. Bezüglich der Flussrate wurde ein Screening von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 120 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit konstanten Substratkonzentrationen ($c(\text{Hexanal}) = 300 \text{ mM}$ und $c(\text{Acetaldehyd}) = 600 \text{ mM}$) durchgeführt (vgl. Anhang). Aufgrund der höheren enzymatischen Aktivität könnten die Substrate schneller im Festbettreaktor miteinander reagieren und es so auch schneller zur Bildung des (ungewünschten) doppelten Aldolproduktes **51** kommen. Die Durchflusssynthese ermöglicht über Steuerung der Flussgeschwindigkeit eine Kontrollierung und Einflussnahme auf die Kontaktzeit zwischen Substrat und Biokatalysator. Die Ergebnisse dieses Screenings sind in Abbildung 24 dargestellt. Das beste Resultat wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ erzielt, wobei die Substrate zu 56 % zu dem gewünschten 3-Hydroxyoctanal (**6**) und lediglich vernachlässigbare Anteile zu Nebenprodukten (weniger als 5 % des doppelten Aldolproduktes **51** und 2 % (*E*)-Octenal (**11**)) umgesetzt worden sind.

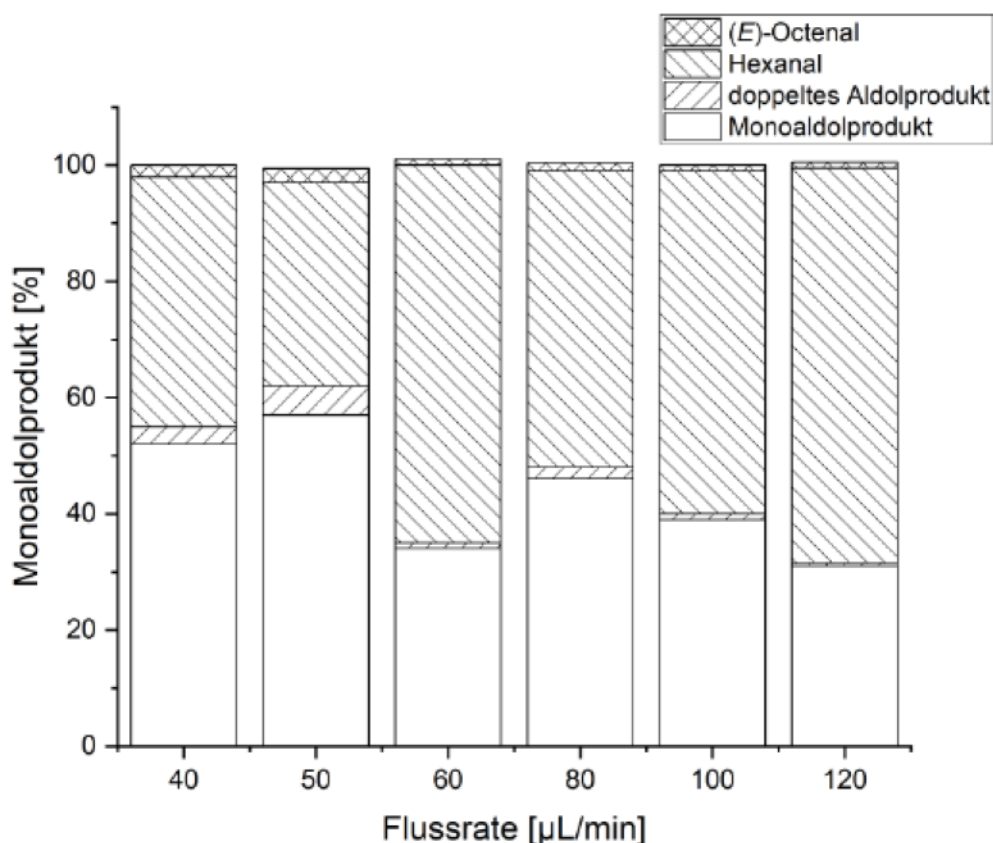


Abbildung 24: Relativer Umsatz zum gewünschten Monoaldolprodukt 6 (ohne Muster), Nebenprodukt (*E*-Octenal (11) (gekreuztes Muster) und doppeltem Aldolprodukt 51 (linksgängige Querstreifen) sowie verbliebenes Substrat Hexanal (5) (rechtsgängige Querstreifen), welcher bei dem Screening der Flussrate bei der Verwendung der Halo-DERA_{EC}-C47V als Biokatalysator ($\varnothing$ 3, 50 mm) erzielt worden ist.

Damit konnte die Verwendung der aktiveren DERA-Variante den Umsatz nicht nur um rund 20 % steigern, sondern auch den Umsatz zu den unerwünschten Nebenprodukten deutlich reduzieren. Dennoch enthielt das Produktgemisch bis zu 35 % nicht umgesetztes Substrat 5, womit das Reaktionssystem hinsichtlich des Umsatzes weiterhin Raum für Verbesserung zuließ.

Da die DERA-Variante DERA_{EC}-C47V, wie oben beschrieben, keine vollständige Toleranz gegen Acetaldehyd (2) aufweist, wurde im nächsten Schritt eine Studie der Langzeitstabilität der Halo-DERA_{EC}-C47V in einem Festbettreaktor ($\varnothing$ 3mm, L 50 mm) durchgeführt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, wie lange bzw. nach wie viel Reaktionsvolumen reproduzierbare und verlässliche Umsätze erreicht werden können. Die Reaktion wurde bei den optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt: Eine Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, $c(\text{Hexanal}) = 0.2 \text{ mol/L}$ und $c(\text{Acetaldehyd}) = 0.6 \text{ mol/L}$. Zwar kommt es nach rund 200 Minuten (bei einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ entsprechend nach 10 mL Reaktionsvolumen) zu einem Einbruch des Umsatzes bei der Verwendung der DERA_{EC}-C47V-Variante; In diesen

ersten 200 Minuten zeigt der entsprechende Biokatalysator aber nahezu verlustfreien Umsatz (vgl. Abbildung 25).

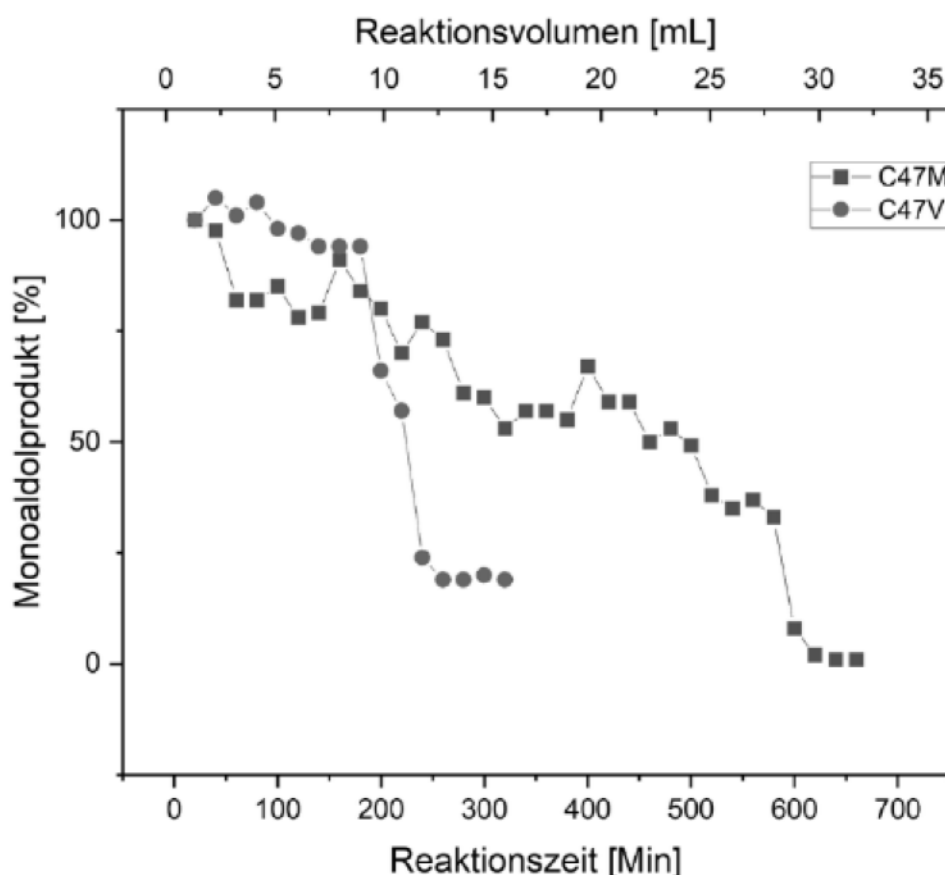


Abbildung 25: Langzeitstabilität vergleichend für Halo-DERA_{EC}-C47V (Punkte) und C47M (Quadrate) im Festbettreaktor (Ø 3 mm, L 50 mm) in der Reaktionslösung. Gezeigt wird der relative Umsatz zum Monoaldolprodukt 6 aufgetragen gegen die Reaktionszeit bzw. Reaktionsvolumen. Die Reaktion wurde bei folgenden Parametern durchgeführt: Flussrate: 50 µL/min, c(Hexanal) = 0.2 mol/L; c(Acetaldehyd) = 0.6 mol/L bei RT in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0).

Anhand dieser Daten konnte also der Rückschluss gezogen werden, dass nach 200 Minuten kontinuierlicher Verwendung unter den untersuchten Reaktionsbedingungen (bzw. nach 10 mL durchlaufenem Reaktionsgemisch) der Festbettreaktor samt immobilisiertem Enzym ausgetauscht werden musste, um eine verlässliche Synthese zu gewährleisten.

Um den Umsatz weiter zu steigern wurde die Menge an eingesetztem Biokatalysator, somit also die Enzymaktivität, weiter erhöht. Dafür wurde ein längerer Festbettreaktor, eine *Omnifit*® Glassäule mit einer Länge von 10 cm (Ø 3 mm, L 100 mm) eingesetzt und gepackt mit immobilisierter Halo-DERA_{EC}-C47V. Erneut wurde das Screening hinsichtlich der Flussrate durchgeführt, da ein längerer Reaktor die Kontaktzeit zwischen Substrat und Biokatalysator erhöht und dies das Produktgemisch beeinflussen kann (s. Abbildung 26). Die

Substratkonzentrationen ($c(\text{Hexanal}) = 0.2 \text{ mol/L}$ und $c(\text{Acetaldehyd}) = 0.6 \text{ mol/L}$) wurden konstant gehalten. Dieser letzte Optimierungsschritt führte zu einer deutlichen Verbesserung des (relativen) Gesamtumsatzes von bis zu 90 %: So konnten bei einer schnelleren Flussrate von $70 \mu\text{L/min}$ bis zu 73 % des gewünschten Monoaldolproduktes 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) als Hauptprodukt, 10 % des doppelten Aldolproduktes **51** und lediglich 6 % des Aldolkondensationsproduktes (*E*)-Octenal (**11**) erzielt werden (s. Abbildung 26).

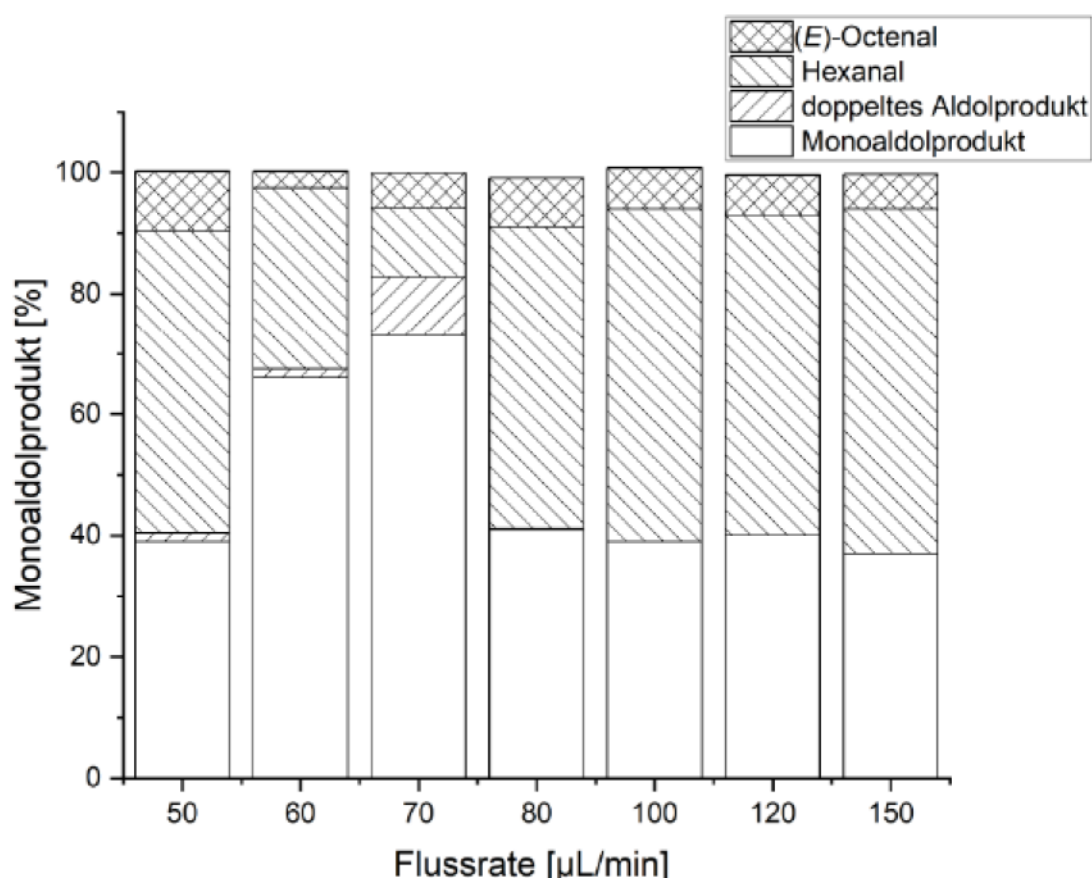
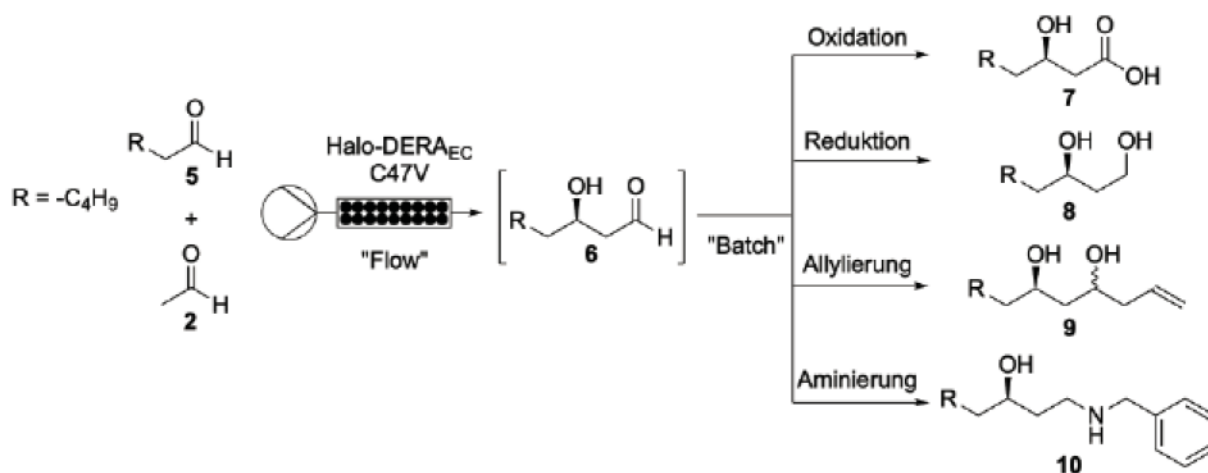


Abbildung 26: relativer Umsatz zum gewünschten Monoaldolprodukt **6** (ohne Muster), Nebenprodukt (*E*)-Octenal (**11**) (gekreuztes Muster) und doppeltem Aldolprodukt **51** (linksgängige Querstreifen) sowie verbliebenes Substrat Hexanal (**5**) (rechtsgängige Querstreifen), welcher bei dem Screening der Flussrate bei der Verwendung der Halo-DERA_{EC}-C47V als Biokatalysator ($\varnothing 3$, L 100 mm) erzielt worden ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Folgenden das synthetisierte Monoaldolprodukt 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) als Hauptprodukt der optimierten DERA-Reaktion im Durchfluss in konsekutiven Reaktionen abgefangen und zu Produkten umgesetzt, welche eine Quantifizierung ermöglichen sollten.

7.2.2 REAKTIONSKASKADEN IM SEMI-KONTINUIERLICHEN REAKTIONSMODUS

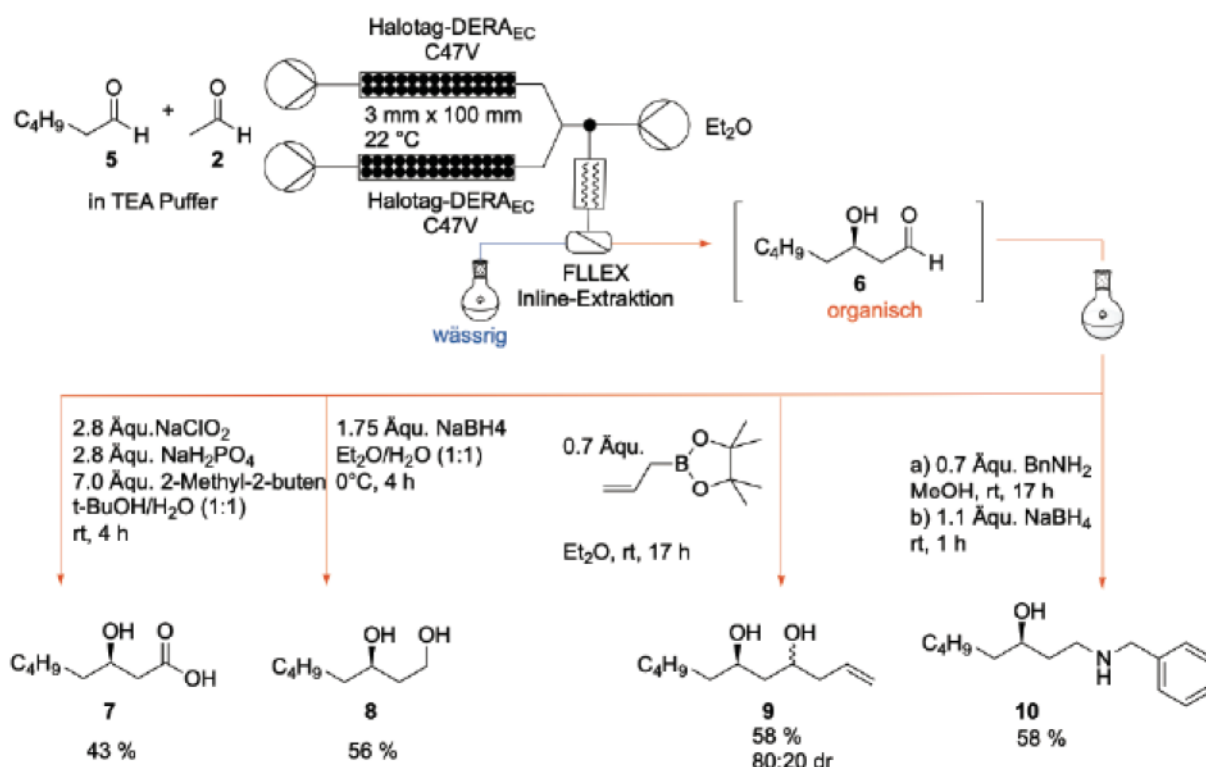
Nach Optimierung der Synthese des gewünschten Monoaldolproduktes **6** wurde das 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) als Intermediat für Reaktionskaskaden genutzt. Neben der Etablierung solcher Kaskaden durch die elegante Kombination von Bio- und Chemokatalyse, die die Anwendbarkeit des synthetisierten Monoaldolproduktes (**6**) aufzeigt, sollte die weitere Umsetzung des Monoaldolproduktes (**6**) ebenfalls den Zweck erfüllen das instabile und nicht in Reinform isolierbare Aldol-Intermediat (**6**) quantifizierbar zu machen. Ziel war es vier Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus durchzuführen, d.h. die Synthese des DERA-Produktes im Durchfluss wurde mit einem Reaktionssystem im *Batch* kombiniert. Adressiert wurden eine Oxidation, eine Reduktion, eine Allyl-Addition sowie eine reduktive Aminierung des 3-(*R*)-Hydroxyaldehyd (**6**) (vgl. Schema 41).



Schema 41: Übersicht der vier geplanten Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus. Gezeigt ist die Kombination der Halo-DERA_{EC}-C47V-katalysierten Synthese des 3-(*R*)-Hydroxyaldehyd-Intermediates **6** im Flow-Modus sowie die vier sequenziellen Reaktionen im Batch-Modus: Oxidation zur entsprechenden (*R*)- β -Hydroxy-Säure **7**, Reduktion zum 1,3-Diol **8**, Allylierung, reduktive Aminierung zu den Produkten **9** und **10**.

Der DERA-katalysierte Reaktionsschritt im *Flow*-Modus wurde für alle vier semi-kontinuierlichen Reaktionskaskaden unter den optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt, wie in 7.2.1 ausgeführt. Um in der ersten Reaktion ausreichend 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) für die weitere Reaktion zu generieren, wurden zwei Festbettreaktoren ($\varnothing$ 3 mm, L 100 mm) parallel verwendet. Das von der DERA umgesetzte Reaktionsgemisch wurde nach Durchlaufen der Reaktoren über ein T-Stück vereinigt und eine Inline-Extraktion durchgeführt. Diese Inline-Extraktion erfolgte über ein FLLEX-System, welches ebenfalls die anschließende Separation von organischer und wässriger Phase ermöglicht. Die organische Phase, welches das Produkt enthält, wurde in einem im Eisbad befindlichen Kolben für den entsprechenden zweiten Reaktionsschritt gesammelt. Eine Übersicht des experimentellen

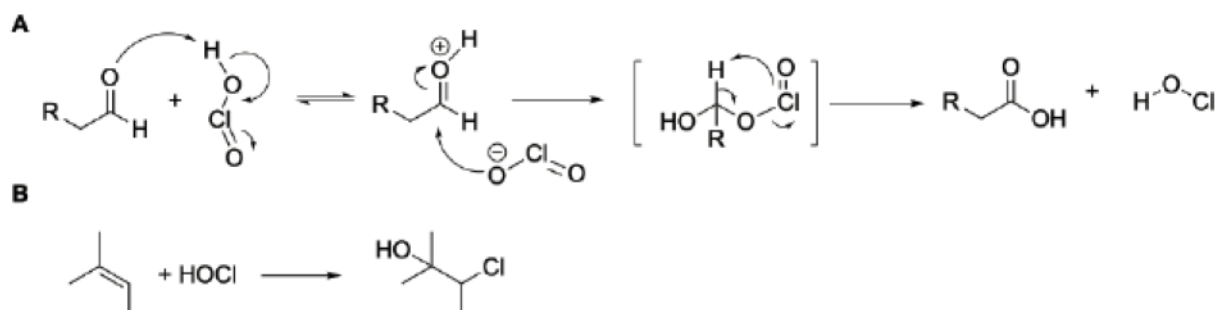
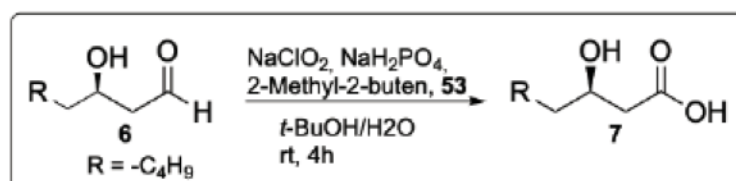
Aufbau der durchgeführten Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Modus ist in Schema 42 dargestellt.



Schema 42: Experimentelles Set-Up der semi-kontinuierlichen Reaktionskaskaden. Es wurden zwei Festbettreaktoren ($\varnothing$ 3 mm, L 100 mm) der Halo-DERA_{EC}-C47V parallel verwendet. Die extrahierte organische Phase (rot) wurde für die weitere Reaktion im Batch-Modus gesammelt: Durchgeführt wurden eine Reduktion mit NaBH₄ zum 1,3-Diol **8**, eine Oxidation zur β -Hydroxycarbonsäure **7**, eine Allyl-Addition zur Isolation eines Homoallylkohols **9** und eine reduktive Aminierung zum Produkt **10**. Angegeben sind die isolierten Ausbeuten nach säulenchromatographischer Reinigung. Die Konfiguration wurde mittels Drehwertbestimmung bestätigt.

Synthese von (*R*)-Hydroxyoctansäure (**7**): *Pinnick*-Oxidation^[185]

Die Kombination der DERA-katalysierten Synthese des Monoaldol-Intermediates und einer sequenziellen *Pinnick*-Oxidation ermöglichte den Zugang zur Stoffgruppe der (*R*)- β -Hydroxycarbonsäuren. Ausgehend von dem 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) wurde unter den milden Reaktionsbedingungen der *Pinnick*-Oxidation die (*R*)- β -Hydroxyoctansäure (**7**) isoliert, ohne dass eine Schützung der β -ständigen Hydroxylgruppe notwendig war. Als aktives Oxidationsmittel der Aldehydfunktion diente NaClO₂, bzw. die *in situ* unter aciden Bedingungen gebildete chlorige Säure (vgl. Schema 43). Um unerwünschte Nebenreaktionen der hypochlorigen Säure, welche während der Reaktion als Nebenprodukt anfällt und selbst wiederum ein reaktives Oxidationsmittel ist, zu unterbinden, wurde der Reaktion ein „Opfer-Substrat“, 2-Methylen-2-buten (**53**), hinzugefügt. Dieses reagiert mit der hypochlorigen Säure ab, so dass das aktive Oxidationsmittel NaClO₂ nicht auf unerwünschte Weise durch die hypochlorige Säure zerstört wird (vgl. Schema 43).



Schema 43: Reaktionsschema der *Pinnick* Oxidation sowie der zugrundeliegende Mechanismus der Aldehyd-Oxidation zur entsprechenden Carbonsäure (7) und Nebenreaktion zum Abfangen des Nebenproduktes hypochlorige Säure mittels 2-Methyl-2-buten (53). A: Nach Protonierung der Aldehydfunktion und pericyclischer Reaktion entsteht die entsprechende Carbonsäure 7. B: „Opfer-Substrat“ 2-Methyl-2-buten (53) zum Abfangen der gebildeten hypochlorigen Säure, um unerwünschte Zerstörung des aktiven Oxidationsmittels NaClO_2 zu unterbinden.

Auf diese Weise konnten nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung 270 mg (*R*)-Hydroxyoctansäure (7) (1.7 mmol, 43 % Ausbeute) isoliert werden.

Synthese von (*R*)-Octan-1,3-diol (8): Reduktion mit NaBH_4

Das 1,3-Diol **8** wurde über eine einfache Reduktion mit NaBH_4 synthetisiert. Das Natriumborhydrid fungiert als synthetisches Äquivalent eines Hydrid-Nukleophils, welches die Aldehydfunktion zur entsprechenden Hydroxylfunktionalität reduziert. Nach Zugabe des NaBH_4 zur organischen Phase des ersten DERA-katalysierten Reaktionsschrittes, einer Reaktionszeit von 4 h und säulenchromatographischer Reinigung wurden über die beiden Reaktionsschritte 56 % des enantiomerenreinen (*R*)-Octan-1,3-diol (**8**) isoliert.

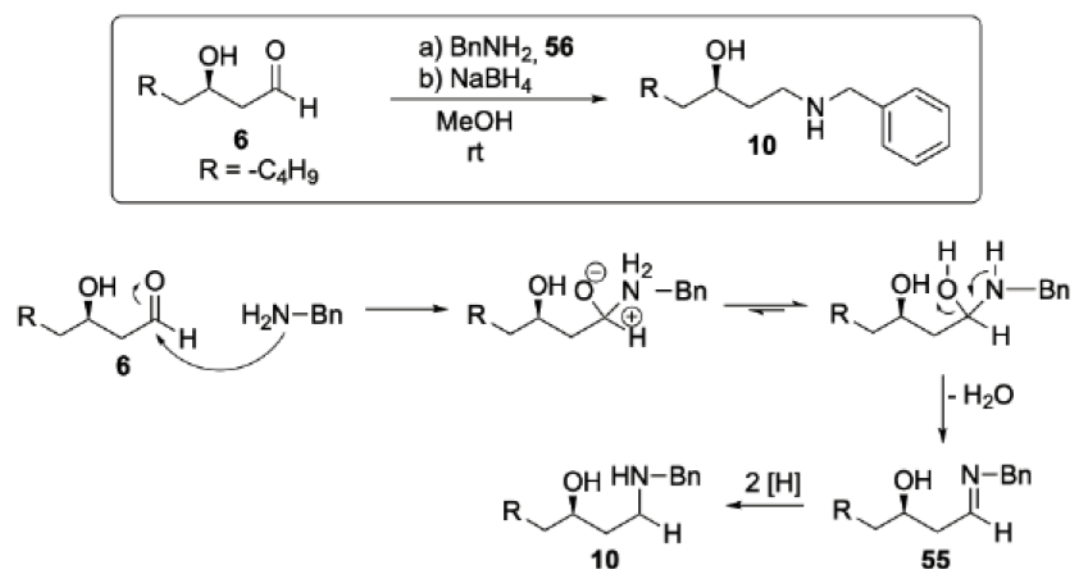
Synthese von (6*R*)-Undec-1-en-4,6-diol (9): Allyl-Addition

Für die Addition eines Allylrestes an das (*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) wurde Pinakol-Allylboronat (**54**) verwendet. Da Allyl-Additionen bekanntermaßen sehr Wasser-empfindlich sind, wurde nach erfolgter DERA-Katalyse und Inline-Extraktion über das FLLEX-System ein weiterer Festbettreaktor, gefüllt mit Molekularsieb (4 Å), zur Trocknung der organischen Phase angeschlossen und das getrocknete Produktgemisch in einem Kolben aufgefangen. Sodann wurde das Allyl-Reagenz **54** hinzugefügt und die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Da der erste DERA-katalysierte Reaktionsschritt keinen vollen Umsatz zum gewünschten 3- (*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) aufwies, sondern auch Spuren des doppelten Aldolproduktes **51** und

Aldolkondensationsproduktes **11** enthielt, resultierte die Allyladdition in einem Produktgemisch. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden 58 % des gewünschten Produktes (6*R*)-Undec-1-en-4,6-diol (**9**) mit einem Diastereomerenverhältnis von 80:20 isoliert.

Synthese von (6*R*)-1-(Benzylamino)octan-3-ol (**10**): (Direkte) Reduktive Aminierung

Zur reduktiven Aminierung des (6*R*)-Hydroxyoctanals (**6**) wurde im ersten Schritt zur Bildung des entsprechenden Imins **55** eine Äquivalente Benzylamin (**56**) zur organischen Phase des ersten DERA-katalysierten Reaktionsschritts hinzugefügt und über Nacht gerührt. Ohne Isolierung des Imins **55** folgte anschließend in einer Eintopfreaktion die Reduktion des Imins **55** mittels NaBH₄ zum gewünschten Aminierungsprodukt **10** (vgl. Schema 44). So wurde nach säulenchromatographischer Reinigung 56 % des (6*R*)-(Benzylamino)-octan-3-ol (**10**) isoliert.



Schema 44: Reaktionsschema der direkten reduktiven Aminierung zum gewünschten Produkt **10** sowie der zugrundeliegende Mechanismus über die Bildung des Imin-Intermediates **55**.

7.2.3 SYNTHESE DES ALDOLKONDENSATIONSPRODUKTES IM KONTINUIERLICHEN REAKTIONSMODUS

Neben der vier Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus, wurde die gezielte Synthese des Aldolkondensationsproduktes, also die gezielte Synthese von α,β -ungesättigten Aldehyden adressiert. Viele Aromastoffe umfassen solche α,β -ungesättigten Aldehyde ^[186] womit sie ein interessantes Strukturmotiv darstellen. Mit Hexanal (5) als Modells substrat sollte konkret das (*E*)-Octenal (11) isoliert werden. Dieser α,β -ungesättigte Aldehyd ist eine bekannte Aromastoff-Komponente in diversen Früchten und Pilzen.^[6, 186, 187] Die Synthese wurde vorliegend im kontinuierlichen Reaktionsmodus durchgeführt. Bezüglich der Wahl des Biokatalysators wurde vom Protokoll der semi-kontinuierlichen Reaktionen abgewichen: Zur gezielten Synthese des α,β -ungesättigten Aldehyds wurde die Halo-DERA_{EC}-C47M gewählt, da bei dieser Enzymvariante bereits die Bildung des Aldolkondensationsprodukts 11 bevorzugt ist (vgl. Kapitel 7.2.1).

Die Eliminierung von Wasser ausgehend von dem 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) kann sowohl unter aciden als auch von basischen Reaktionsbedingungen katalysiert werden. Die Verwendung von Ionenaustauschharzen, die es sowohl in acider als auch basischer Form gibt, ermöglicht eine saure bzw. basische Katalyse im Flow-Modus, indem man Festbettreaktoren mit dem entsprechenden Ionenaustauschharz befüllt. Drei verschiedene Ionenaustauschharze wurden getestet, davon zwei acider und eines basischer Ausführungsform: AmberlystTM 15 (kurz: A 15; sauer), AmberliteTM IR-120 (sauer) und AmberlystTM A-21 (basisch).

Zunächst wurden konsekutive Versuche im Batch-Modus durchgeführt, um die Effektivität der drei Ionenaustauschharze zu testen und zu vergleichen. Dazu wurde die vorgeschaltete DERA-katalysierte Reaktion im *Flow* unter den optimierten Bedingungen mit den Substraten Hexanal (5) (*c* = 0.2 mol/L) und Acetaldehyd (2) (*c* = 0.6 mol/L) unter Verwendung der DERA_{EC}-C47M gepackt in einem 5 cm Festbettreaktors (Ø 3 mm, L 50 mm) in einem Maßstab von jeweils 5 mL durchgeführt und das Produktgemisch in einem Kolben gesammelt. Anschließend wurde das jeweilige Ionenaustauschharz zu dem Produktgemisch hinzugefügt und das Reaktionsgemisch gerührt. Nach 15, 30 und 45 Minuten wurden Proben entnommen und gaschromatographisch hinsichtlich ihrer Produktverteilung analysiert. Tabelle 13 zeigt die relativen Umsätze zu dem α,β -ungesättigten Aldehyd (*E*)-Octenal (11) und dem 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) vergleichend für alle getesteten Ionenaustauschharze und Reaktionszeiten. Während bei den beiden aciden Ionenaustauschharzen A 15 und IR-120

auch nach 45 Minuten kein nennenswerter Umsatz zum gewünschten (*E*)-Octenal (**11**) zu erkennen ist, wurde nach 30 Minuten Reaktionszeit bei Verwendung des basischen Amberlyst™ A-21 bereits die Bildung von (*E*)-Octenal (**11**) beobachtet. Mit einem Anfangsverhältnis von rund 7:93 (*E*)-Octenal:3-(*R*)-Hydroxyoctanal verschob sich dieses nach 30 Minuten auf ein Produktverhältnis von 49:51 (*E*)-Octenal:3-(*R*)-Hydroxyoctanal. Das Produktgemisch wurde für weitere 60 h gerührt. Erneute Probenentnahme zeigte einen nahezu vollständigen Umsatz des Monoaldolproduktes (**6**) zum gewünschten α,β -ungesättigten Aldehyd (*E*)-Octenal (**11**).

Tabelle 13: Screening von Ionenaustauschharzen zur Synthese von (*E*)-Octenal (11**) ausgehend vom Monoaldolprodukt 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) im Batch.** Nach erfolgter DERA-katalysierten Reaktion im Durchfluss wurde das Produktgemisch mit jeweils einem der Ionenaustauschharze Amberlyst™ 15 (acide), Amberlite™ IR-120 (acide) oder Amberlyst™ A-21 (basisch) versetzt und die Reaktion nach 15, 30 und 45 Min gaschromatographisch analysiert. [a] relativer Umsatz zu (*E*)-Octenal (**11**). [b] relativer Umsatz zu 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**).

Katalysator	Reaktionszeit [Min]	(<i>E</i>)-Octenal (11) [%] ^[a]	3-(<i>R</i>)-Hydroxyoctanal (6) [%] ^[b]
A 15	15	20	80
IR-120	15	20	80
A-21	15	7	93
A 15	30	18	82
IR-120	30	17	83
A-21	30	49	51
A 15	45	19	81
IR-120	45	21	79
A-21	45	49	51
A-21	60 h	98	2

Im nächsten Schritt wurde das Experiment in den kontinuierlichen *Flow*-Reaktionsmodus übertragen. Dafür wurde ein 15 cm langer Festbettreaktor (Omnifit®; Ø 3 mm, L 150 mm) mit dem Ionenaustauschharz A-21 befüllt und der Reaktor hinter das FLLEX-System, d.h. nach Extraktion der DERA-Reaktion und Phasentrennung, geschaltet. Zunächst war ein Screening der Flussrate notwendig, um die optimale Kontaktzeit zwischen Substrat (also 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**)) und basischem Katalysator zu ermitteln. Das beste Ergebnisse wurde mit einer Flussrate von 10 μ L/min erzielt (vgl. Tabelle 14), wobei sich ein Produktverhältnis von 51:49 (*E*)-Octenal: 3-(*R*)-Hydroxyoctanal einstellte. Um den Umsatz zum gewünschten ungesättigten Aldehyd **11** weiter zu steigern, wurde die Menge an basischem Katalysator erhöht. Konkret wurde ein zweiter 15 cm langer Festbettreaktor (Ø 3 mm, L 150 mm) hinter den ersten Festbettreaktor mit A-21 geschaltet. Auf diese Weise wurde voller Umsatz zum gewünschten α,β -ungesättigten Aldehyd (*E*)-Octenal (**11**) erzielt. So konnte bei Verwendung eines kontinuierlichen Reaktionsmodus über die Kombination zweier verschieden

katalytisch-aktiver Festbettreaktoren (DERA-Katalyse und Base-Katalyse) die gezielte Synthese des (*E*)-Octenals (11) mit einer Ausbeute von 60 % (über zwei Stufen) erzielt werden. Der finale experimentelle Aufbau ist in Schema 45 dargestellt.

Tabelle 14: Screening der Flussrate für die In-line Eliminierung von Wasser zum gewünschten α,β -ungesättigten Aldehyd (*E*)-Octenal (11) ausgehend vom 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) mittels des basischen Ionenaustauschharzes A-21. Verwendet wurde ein Festbettreaktor mit den Maßen $\varnothing$ 3 mm, L 150 mm. [a] relativer Umsatz zu (*E*)-Octenal (11). [b] relativer Umsatz zu 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6).

Katalysator, Durchmesser und Länge des Reaktors	Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	(<i>E</i>)-Octenal (11) [%] ^[a]	3-(<i>R</i>)-Hydroxyoctanal (6) [%] ^[b]
A-21	50	12	88
($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm)	30	48	52
	10	51	49
A-21 2 x ($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm) = L 30 mm	10	100	0



Schema 45: Experimenteller Aufbau der kontinuierlichen zweistufigen Synthese des α,β -ungesättigten Aldehyds (*E*)-Octenal (11) im *Flow*-Modus bei Kombination eines DERA-katalysierten Reaktionsschrittes zum 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) und eine sequenzielle In-line-Eliminierung katalysiert mit einem basischen Ionenaustauschharz A-21. Parallele Verwendung zweier Festbettreaktoren ($\varnothing$ 3 mm, L 50 mm) gepackt mit Halo-DERA_{EC}-C47M. Nach Extraktion und Phasentrennung, wurde das Reaktionsgemisch durch zwei in Reihe geschaltete Festbettreaktoren beinhaltend A-21 ($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm) zur Eliminierung von Wasser gepumpt. 60 % (isoliertes Produkt über zwei Stufen) des α,β -ungesättigten Aldehyds (*E*)-Octenal (11) wurden isoliert.

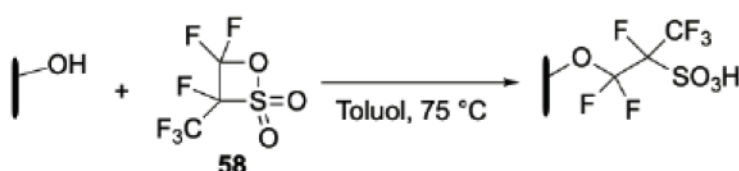
7.2.4 UNTERSUCHUNG DER IN SITU ACETALDEHYD-BEREITSTELLUNG IM KONTINUIERLICHEN SYSTEM

Eine der großen Herausforderungen bei der Anwendung der DERA in der organischen Synthese ist ihr Substrat Acetaldehyd (2). Es erschwert die Entwicklung möglichst effizienter und reproduzierbarer Synthesen nicht nur aufgrund seiner Eigenschaft die DERA zu inaktivieren, sondern erschwert es auch die praktische Durchführung der Experimente aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit. Mit einem Siedepunkt von 21 °C ist Acetaldehyd (2) bereits bei Raumtemperatur flüchtig.^[188] Damit erfordert es Übung Acetaldehyd (2) präzise zu pipettieren, um die Reproduzierbarkeit nicht zu gefährden. Zudem neigt die (gesundheitsgefährdende) Substanz bei schlechter Lagerung aufgrund von Oligomerisierung unbrauchbar zu werden. Daher ist es von großem Interesse, Lösungen zu finden, welche den Umgang mit dem notwendigen Substrat der DERA erleichtern. Einen möglichen Ansatz könnte die *in situ* Herstellung von Acetaldehyd (2) bieten, also eine der eigentlichen DERA-katalysierten Reaktion vorgelagerte Bildung von Acetaldehyd unmittelbar im Reaktionsmedium.

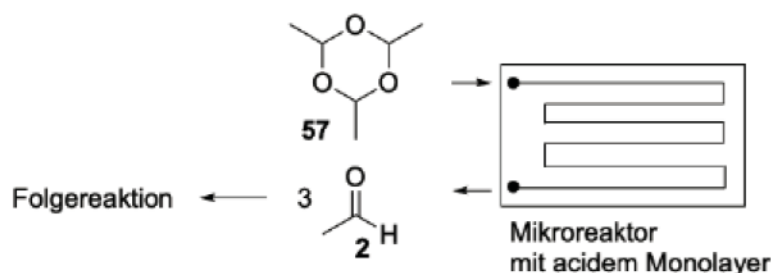
So beschäftigte sich ein Teil der vorliegenden Arbeit mit der Studie einer solchen *in situ* Bereitstellung des Acetaldehyds (2) und zwar im *Flow*-Modus. Als Acetaldehyd-Quelle wurde Paraldehyd (57) verwendet, dem Trimer von Acetaldehyd, das einen hohen Siedepunkt von 124 °C aufweist und somit deutlich einfacher in der Handhabung ist.^[189] Unter sauren Reaktionsbedingungen werden aus einem Molekül Paraldehyd (57) drei Moleküle Acetaldehyd (2) freigesetzt (vgl. Schema 46). Um eine solche Säure-katalysierte Freisetzung von Acetaldehyd (2) im *Flow*-Modus zu ermöglichen, wurde versucht die Oberfläche eines Mikroreaktor aus Glas (s. Schema 46) zu funktionalisieren. Ricciardi *et al.* berichten von einer Möglichkeit der Ausbildung eines aciden Monolayers auf den Innenwände eines Glas-Mikroreaktors via Funktionalisierung mit 1,2,2-Trifluoro-2-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethan sulfonsäure β -sulton (58).^[104] Nach gründlicher Reinigung des Mikroreaktors mit Peroxomonoschwefelsäure („Piranha-Säure“) wurde eine Lösung des β -Sultons 58 für 4 h bei 75 °C und einer Flussrate von 0.05 μ L/min durch den Mikroreaktor gepumpt. Um den Mikroreaktor über den Zeitraum von 4 h konstant auf 75 °C zu heizen wurden Versuche sowohl im Sandbad als auch im Wasserbad unternommen. Nach dem Funktionalisierungsschritt folgten erste Testläufe zur Freisetzung von Acetaldehyd (2) aus Paraldehyd (57). Da das Ziel die Verwendung in Kombination mit der optimierten DERA-Reaktion ist und die notwendige Acetaldehydkonzentration bei 0.6 mol/L liegt, wurde eine 0.2 molare Lösung von Paraldehyd (57) durch den Mikroreaktor gepumpt. Dabei wurden

Flussraten von 550 $\mu\text{L}/\text{Min}$ bis 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ getestet. Lediglich die Experimente mit Flussraten von $\leq 50 \mu\text{L}/\text{min}$ zeigten geringe Spuren von Acetaldehyd (2), hauptsächlich zeigten die Proben nicht umgesetzten Paraldehyd (57). Da Versuche im Batch die Freisetzung von Acetaldehyd (2) aus Paraldehyd (57) unter saurer Katalyse bestätigten, lag die Vermutung nahe, dass die Funktionalisierung des Mikroreaktors nicht erfolgreich war. Mehrfache Wiederholungen schlugen fehl. Es wird vermutet, dass besonders die Schwierigkeit der Aufrechterhaltung der konstanten Temperatur von 75°C während des Funktionalisierungsschrittes gleichmäßig verteilt über den gesamten Mikroreaktor ausschlaggebend für die negativen Resultate waren.

1. Funktionalisierung des Mikroreaktors:



2. Acetaldehyd-Freisetzung aus Paraldehyd:



Schema 46: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der Innenwände eines Mikroreaktors zur *in situ* Freisetzung von Acetaldehyd (2) im *Flow-Modus*. Die Funktionalisierung mit 1,2,2-Trifluoro-2-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethan sulfonsäure β -sulton (58) erfolgte anhand des Protokolls von Ricciardi *et al.* (2014).^[104]

Alternative Versuche mit Festbettreaktoren, gepackt mit sauren Ionenaustauschharzen wie z.B. Amberlite™ IR-120 zeigten zwar gute Ergebnisse bezüglich der Umsetzung von Paraldehyd (57) zu Acetaldehyd (2). Die starke Empfindlichkeit der DERA im Hinblick auf saure Reaktionsbedingungen erschwerten allerdings die Kombination eines vorgelagerten Festbettreaktors mit Amberlite™ IR-120 und einem folgenden Festbettreaktor mit der DERA_{EC}-C47V. Trotz mehrfacher und gründlicher Spülung des Amberlite IR-120 vor seiner Anwendung zur Entfernung von überschüssiger Säure aus dem Herstellungsverfahren des Ionenaustauschharzes, wurde kein enzymatischer Umsatz beobachtet. Somit bleibt festzuhalten, dass die Entwicklung einer solchen *in situ* Freisetzung von Acetaldehyd (2) im *Flow-Modus* sicherlich Potenzial mit sich bringt, allerdings weiterer Optimierung bedarf.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Diese Arbeit beschreibt die umfassende Entwicklung eines grundlegenden Reaktions-Set-Ups zur gezielten und stereoselektiven Synthese eines 3-Hydroxyaldehyds als neuer DERA-Baustein. Dieser wiederum bietet den Ausgangspunkt für Konsekutivreaktionen bis hin zu komplexen Reaktionskaskaden. Im ersten Teil der Arbeit konnte eine hinsichtlich ihrer Acetaldehyd-Toleranz optimierte DERA-Variante als vielversprechender Kandidat für den Einsatz in der Biokatalyse identifiziert werden, für welche darauf eine geeignete Immobilisierungsmethode etabliert wurde. Eine systematische Optimierungsstrategie führte zu einer erfolgreichen Biokatalyse des gewünschten Intermediates **6** mit bis zu 90 % Umsatz. Die Anwendbarkeit der entwickelten Biokatalyse im Durchfluss wurde anhand von fünf zweistufigen Reaktionssystemen unter Kombination von Biokatalyse und klassisch-chemischen Methoden sowohl im kontinuierlichen Reaktionsmodus als auch im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus gezeigt.

Die erzielten Ergebnisse werden in diesem Kapitel noch einmal zusammengefasst. Anschließend wird ein Ausblick gegeben, in welchem eine mögliche Weiterverfolgung offener oder neuer Fragestellungen diskutiert wird.

8.1 ACETALDEHYD-TOLERANZ DER DERA: EINFLUSS DER POSITIONEN

CYS-47 UND THR-18

Aufbauend auf den Ergebnissen von *Markus Dick* bezüglich des postulierten Inhibierungsmechanismus der DERA über das Cys-47 und der vorangegangenen Masterarbeit der vorliegenden Arbeit, wurde das Augenmerk dieses Projektes auf der abschließenden, systematischen Untersuchung besagter Position 47 im Hinblick auf Aktivität, Enantioselektivität und besonders der Acetaldehydtoleranz gelegt. Dazu wurden über Mutagenese gezielt die fehlenden DERA-Varianten erstellt und getestet, welche in den vorangehenden Studien aufgrund dort gewählter Selektionskriterien nicht untersucht worden sind. Die von *Markus Dick* erstellte Acetaldehyd-resistente DERA Mutante DERA_{EC-C47M} weist lediglich 60 % der DERA-Wildtyp Aktivität auf. In Bezug auf eine synthetische Anwendung der DERA als Biokatalysator wurde eine ebenfalls resistente oder mindestens ausreichend tolerante DERA-Mutante mit geringerem Verlust der enzymatischen Aktivität gesucht, um einen möglichst effizienten Einsatz als Biokatalysator zu adressieren. Das Cys-47 wurde gegen die Aminosäuren Phenylalanin, Arginin, Lysin und Valin ausgetauscht, so dass vier neue DERA-Konstrukte untersucht wurden. Nach erfolgreicher Klonierung und

Expression der gewünschten Konstrukte, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt. Während drei der DERA-Mutanten starke Verluste zeigten, wies das Konstrukt DERA_{EC}-C47V nahezu Wildtyp-Aktivität auf (vgl. Tabelle 15). Damit konnte hinsichtlich der enzymatischen Aktivität eine Verbesserung um rund 45 % im Vergleich zu der Variante DERA_{EC}-C47M erzielt werden. Hinsichtlich der Acetaldehyd-Toleranz (und Crotonaldehyd-Toleranz) konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem bekannten Inhibierungsmechanismus unter Beteiligung des Cys-47 um kein *on-off*-Tool handelt und es weitere bisher ungeklärte Inhibierungsmechanismen geben muss.^[11] Mit Halbwertszeiten von 1.4 h, 1.3 h bzw. 1.7 h nach Inkubation in eine 300 mM Acetaldehydlösung zeigten die DERA_{EC}-Konstrukte DERA_{EC}-C47F, DERA_{EC}-C47K und DERA_{EC}-C47R zwar eine Verbesserung im Vergleich mit dem DERA_{EC}-Wildtyp, allerdings reichen diese Werte nicht für eine effiziente synthetische Anwendung aus (vgl. Tabelle 15). Das Konstrukt mit dem Valin-Austausch zeigte auch bezüglich ihrer Acetaldehyd-Toleranz von über 3 Stunden sowie eine Crotonaldehyd-Toleranz nach Inkubation in eine 20 mM Crotonaldehydlösung von einer Stunde die besten Ergebnisse. Damit handelt es sich bei dem Valin-Konstrukt zwar nicht um eine vollständig resistente DERA-Variante, wie die DERA_{EC}-C47M, sondern um eine Acetaldehyd-tolerante Mutante. In Kombination mit ihrer herausstechenden enzymatischen Aktivität und keinen signifikanten Auswirkungen hinsichtlich des Enantiomerenüberschusses erwies sich dieses DERA-Konstrukt als ein vielversprechender Kandidat für eine weitere synthetische Verwendung als Biokatalysator.

Tabelle 15: Ergebnisse der Untersuchung der in dieser Arbeit erstellten DERA-Varianten.

DERA _{EC} - Variante	spez. Akt. [U/mg]	T _{1/2} (300 mM Acetaldehyd)	T _{1/2} (20 mM Crotonaldehyd)	ee [%]
C47F	3.4 ± 0.3	1.4 h	7.5 min	86.4 ± 0.2
C47K	0.5 ± 0.1	1.3 h	16 min	72.4 ± 0.1
C47R	0.6 ± 0.1	1.7 h	19 min	71.1 ± 0.7
C47V	18.4 ± 0.6	3.3 h	1 h	83 ± 0.2
C47G-T18V	0.9 ± 0.1	1 min	16 min	n.b.
C47M	7.9 ± 0.1	n.b.	14 h	85 ± 0.1
wt	20.09 ± 0.7	37.5 min	3.7 min	85 ± 0.1

Zudem wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um alternative Substrat-abhängige Inaktivierungsmechanismen der DERA aufzuklären und eine Erklärung zu finden, warum sich der Aminosäureaustausch an der Position 47 nicht einheitlich in Form einer Acetaldehyd-Resistenz auswirkte. Unter Hinzuziehung der Kristallstruktur der DERA, wurde eine weitere nukleophile Aminosäure im aktiven Zentrum, das Threonin an Position 18,

lokalisiert. Analog zu dem von *Markus Dick* postulierten Inhibierungsmechanismus über das nukleophile Cys-47, wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch das Thr-18 einen solchen nukleophilen Angriff über seine Hydroxylfunktion auf das im aktiven Zentrum gebundene Addukt ermöglichen könnte und wiederum so zur Blockierung des aktiven Zentrums und folglich zur Inaktivierung der DERA führen könnte (vgl. Abbildung 14). Um diese Hypothese zu testen, wurde das Thr-18 durch ein nicht nukleophiles, räumlich ähnlich stark beanspruchendes Valin ausgetauscht. Als einfachster Vertreter aller untersuchten DERA_{EC}-C47 Konstrukte, wurde DERA_{EC}-C47G exemplarisch für den Einbau der zweiten Punktmutation ausgewählt. Dieser zweite Aminosäureaustausch wirkte sich allerdings negativ sowohl auf die enzymatische Aktivität als auch auf den Enantiomerenüberschuss aus (vgl. Tabelle 15). Inkubationsexperimente in 300 mM Acetaldehyd (2) und 20 mM Crotonaldehyd zeigten, dass die Eliminierung des nukleophilen Threonins nicht zu der erwarteten Substratresistenz führte. Bereits innerhalb weniger Minuten wurde das DERA-Konstrukt sowohl von Acetaldehyd (2) als auch von Crotonaldehyd inaktiviert (vgl. Tabelle 15). Eine Erklärung, wieso die Inaktivierung durch Acetaldehyd (2) deutlich schneller verlief, konnte an dieser Stelle nicht gefunden werden.

Im Ergebnis konnte zwar keine verbesserte *vollständig Acetaldehyd-tolerante* DERA-Variante entwickelt werden, doch konnte ein vielversprechendes *Acetaldehyd-tolerantes* DERA-Konstrukt DERA_{EC}-C47V identifiziert werden. Durch die Ausweitung der Studie zu den Inhibierungsmechanismen der DERA durch ihr eigenes Substrat konnte ein analoger Inhibierungsmechanismus durch das Thr-18 ausgeschlossen werden, wodurch die Frage nach weiteren ungeklärten Inaktivierungsmechanismen offenbleibt.

8.2 UNTERSUCHUNG UNBEKANNTER PSYCHROPHILER DERAS: ZUGANG ZU EINEM EFFIZIENTEN BIOKATALYSATOR?

Als Vertreter der extremophilen Organismen handelt es sich bei psychrophilen Organismen, um solche, die kalte Temperaturen bevorzugen. Aufgrund dieser extremen Lebensbedingungen zeigen Enzyme psychrophiler Organismen andere Eigenschaften als beispielsweise thermo- oder mesophile Enzyme. So zeichnen sich literaturbekannte kälteliebende Enzyme im Allgemeinen durch eine höhere enzymatische Aktivität und erhöhte Flexibilität aus.^[12-14] Im Hinblick auf einen möglichst effizienten Biokatalysator, kann es also durchaus interessant sein, psychrophile Enzyme zu untersuchen. Neben den bereits charakterisierten psychrophilen DERAs der Organismen *C. psychrerythraea* und *S.*

halifaxensis wurden drei weitere kälteliebende DERAs der Organismen *Exiguobacterium sibiricum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* und *Psychromonas ingrahamii* untersucht.^[93] Unter Berücksichtigung eines institutsinternen etablierten Expressions- und Reinigungsprotokolls konnten alle drei DERAs erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung und mit besonderem Augenmerk auf eine spätere biokatalytische Anwendung, wurde jeweils die Enzymaktivität und der Enantiomerenüberschuss bestimmt.

Hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität konnten literaturbekannte Beobachtungen einer gesteigerten Aktivität psychrophiler Enzyme bestätigt werden. Jede der drei untersuchten psychrophilen DERAs zeigte höhere Werte hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität im Vergleich zu der mesophilen DERA aus *E. coli*, zwei der drei sogar höhere Aktivitäten im Vergleich zu den beiden bekannten psychrophilen DERAs. Hervorzuheben ist hierbei die DERA aus *E. sibiricum*, welche mit einer spezifischen Aktivität von 54 U/mg rund 6-mal aktiver ist als der mesophile Gegenspieler mit 9 U/mg und damit doppelt so aktiv, wie die DERA aus *P. haloplanktis* mit rund 28 U/mg (vgl. Tabelle 16).

Trotz ihrer vielversprechend hohen enzymatischen Aktivität, welche auf eine schnellere Katalyse (und nach geeigneter Reaktionsoptimierung) auf verbesserte Umsätze hoffen lässt, wiesen die drei untersuchten DERAs stark negative Abweichungen in Bezug auf ihre Stereoselektivität auf. Da der Parameter der Stereoselektivität Enzyme in der organischen Synthese attraktiv machen, waren die untersuchten psychrophilen DERAs mit Enantiomerenüberschüssen zwischen 75 % bis 68 % damit vorliegend nicht weiter von Interesse.

Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchung der drei psychrophilen DERAs vergleichend zu bekannten psychro- und mesophilen DERAs.

DERA	Anpassung	spez. Aktivität [U/mg]	ee [%]
DERA _{ES} -wt	psychrophil	53.9 ± 7.0	75.0 ± 2.6
DERA _{PH} -wt		28.3 ± 1.8	74.0 ± 1.0
DERA _{PI} -wt		12.6 ± 0.2	68.0 ± 1.1
DERA _{CP} -wt		12.0 ± 0.7	95 ^[158]
DERA _{SH} -wt		14.0 ± 0.4	97 ^[158]
DERA _{EC} -wt	mesophil	9.0 ± 0.2	85 ^[158]

8.3 DERA ALS BIOKATALYSATOR IN DER ORGANISCHEN *FLOW*

SYNTHESE

C–C-bindungsknüpfende Enzyme, wie die DERA, sind wichtige Instrumente beim Aufbau von Kohlenstoffgerüsten in der (bio-)organischen Synthese. Die elegante Reaktionsroute zum doppelten Aldolprodukt **1** der DERA über eine sequenzielle stereoselektive Aldoladdition wurde bereits im industriellen Maßstab bei der Synthese von Statinen etabliert.^[3] Während besonders das doppelte Aldolprodukt **1** Gegenstand intensiver Forschung war, wurde im zweiten Projekt dieser Arbeit die selektive Synthese des einfachen Aldolproduktes **6** der DERA, ein 3-Hydroxyaldehyd, adressiert. Denn auch das einfache Aldolprodukt **6** stellt ein interessantes Strukturelement dar, welches sich in zahlreichen Naturstoffen wiederfindet.

Die besondere Herausforderung lag in der gezielten Isolation dieses instabilen Intermediates **6**. Dieses Problem wurde mit Hilfe der Möglichkeit einer präzisen Reaktionskontrolle der *Flow* Chemie gelöst. Voraussetzung dafür war im ersten Schritt eine erfolgreiche Immobilisierung der DERA. Konkret wurden als Biokatalysator die optimierten DERA-Varianten DERA_{EC}-C47M und DERA_{EC}-C47V gewählt. Initiale Versuche einer adsorptiven Immobilisierung über einen Polyhistidin-Tag an eine Ni-NTA-Säule waren aufgrund eines starken Ablösens des Enzyms vom Säulenmaterial nicht zielführend. Doch zeigten erste Syntheseveruche unter Verwendung von Hexanal (**5**) und Acetaldehyd (**2**) als Substrate einen, wenn auch geringen, Umsatz zum gewünschten Intermediat **6**. Trotz der Vorteile, die diese Methode mit sich bringt (schnelle und unkomplizierte Herstellung des Immobilisates, günstige Materialien) wurde diese Immobilisierungsmethode aufgrund der überwiegenden Nachteile (vgl. Tabelle 17) verworfen. Der zweite Immobilisierungsansatz verfolgte eine kovalente Immobilisierung über das HaloTagTM-System, welches ein ungewolltes Ablösen des Enzyms vom Säulenmaterial verhindert. Da diese Methode einen vergleichsweise massiven Eingriff in die Proteinstruktur durch Fusionierung der DERA mit dem HaloTagTM erforderte, wurden Verluste hinsichtlich der DERA-Aktivität verzeichnet. Nach Optimierung des fusionierten Konstruktes, wurde in ersten Immobilisierungsversuchen eine theoretisch immobilisierte Enzymaktivität von 38 U in einem 5 cm langen Festbettreaktor mit entsprechendem HaloTagTM-Trägermaterial ermittelt. Auch wenn diese Immobilisierungsmethode mit einem gewissen vorgeschalteten Aufwand durch die molekularbiologischen Arbeiten verbunden ist, wurde dieser Ansatz für die weitere Entwicklung eines geeigneten Reaktions-Set-Ups aufgrund einer planbaren, schnellen,

zuverlässigen Immobilisierung und vergleichsweise hohen (theoretischen) Enzymaktivität zur Synthese des gewünschten einfachen Aldolproduktes **6** gewählt.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der getesteten Immobilisierungsansätze.

adsorptive Immobilisierung (Polyhistidin-Tag an Ni-NTA)		kovalente Immobilisierung (HaloTag™)	
Vorteile	Nachteile	Vorteile	Nachteile
• schnelle und unkomplizierte Herstellung des Immobilisats • günstige Materialien • Synthese des Monoaldolproduktes möglich	• Ablösen des Enzyms von der Festphase („Leaching“) • schwierige Aufarbeitung des Reaktionsansatzes (bedingt durch Leaching-Effekt) • geringer Umsatz (bedingt durch Leaching-Effekt)	• Kein Ablösen des Enzyms vom Trägermaterial • Immobilisierung direkt aus Rohextrakt • Zuverlässige und schnelle Immobilisierung	• (einmalige) aufwändige Erstellung des Fusionkonstruktes aus Zielenzym und HaloTag™ • Hohe Kosten der Materialien (z.B. HaloLink™-Resin)

Die Reaktionsoptimierung erfolgte unter Verwendung einer systematischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*). Die erste Optimierungsrunde zeigte neben den Stärken auch Schwächen des Systems auf: Erste vielversprechende Ergebnisse mit der DERA_{EC}-C47M in einem 5 cm langen Festbettreaktor haben gezeigt, dass eine Trennung des Monoaldolproduktes **6** von dem ungewünschten Eliminierungsprodukt als Nebenprodukt möglich ist. Auch eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts von der Seite des doppelten Aldolproduktes **51** auf die Seite des gewünschten einfachen Aldolproduktes **6** wurde erreicht. Dabei wurde ein Trend für die Reaktionsparameter ersichtlich: Je höher die eingesetzte Substratkonzentration, desto besser war der Umsatz. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Flussrate von 50 µL/min, 600 mM Acetaldehyd (**2**) und 200 mM Hexanal (**5**) erreicht. Jedoch gab es Rückschläge bezüglich der Reproduzierbarkeit dieses Systems. Aufgrund der verwendeten Glassäulen als Festbettreaktor wurde eine negative Beeinflussung des Reaktionsmedium durch acide Hydroxylgruppen der Glasoberfläche vermutet. Eine Oberflächendeaktivierung mittels Chlortrimethylsilan konnte die starken Verluste hinsichtlich des Umsatzes zumindest teilweise auffangen. Um den Umsatz weiter zu steigern, wurde zu der doppelt so aktiven und Acetaldehyd-toleranten DERA-Variante DERA_{EC}-C47V gewechselt (vgl. Tabelle 18). Aufgrund der höheren Aktivität des Enzyms wurde eine erneute Anpassung der Flussrate zur Steuerung der Kontaktzeit zwischen Substrat und Enzym

notwendig. Das beste Resultat wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{L}/\text{Min}$ erzielt, wobei die Substrate zu 56 % zu dem gewünschten 3-Hydroxyoctanal (**6**) und lediglich vernachlässigbare Anteile zu Nebenprodukten (weniger als 5 % des doppelten Aldolproduktes (**51**) und 2 % (*E*-Octenal (**11**)) umgesetzt worden sind. Somit konnte der Anteil der ungewünschten Nebenprodukte **51** und **11** im Produktgemisch bereits deutlich reduziert werden. Um den Umsatz weiter zu verbessern wurde die eingesetzte Enzymmenge erhöht. Konkret realisiert wurde dies durch die Verwendung eines doppelt so langen Enzymreaktors ($\varnothing$ 3 mm, L 100 mm; vgl. auch Tabelle 18). Da sich aufgrund des längeren Reaktors wiederum auch die Kontaktzeit zwischen Substrat und Enzym erhöht, somit die Reaktionszeit, wurde erneut ein Screening auf Basis verschiedener Flussraten durchgeführt. Die Substratkonzentrationen ($c(\text{Hexanal}) = 0.2 \text{ mol/L}$ und $c(\text{Acetaldehyd}) = 0.6 \text{ mol/L}$) wurden konstant gehalten. Durch diesen finalen Optimierungsschritt konnte eine deutliche Verbesserung des (relativen) Gesamtumsatzes von bis zu 90 % erreicht werden. Bei einer schnelleren Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{Min}$ konnten bis zu 73 % des gewünschten Monoaldolproduktes 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) als Hauptprodukt, 10 % des doppelten Aldolproduktes **51** und lediglich 6 % des Aldolkondensationproduktes (*E*-Octenal (**11**)) erzielt werden.

Tabelle 18: Theoretisch immobilisierte Enzymaktivität in dem entsprechenden Festbettreaktor (*Omnifit*® Glassäulen) vergleichend für die beiden DERA-Varianten Halo-DERA_{EC}-C47M und Halo-DERA_{EC}-C47V. [a] zugrunde liegende Berechnung der theoretisch immobilisierten Enzymaktivität: (Enzymaktivität im ZFRE gemessen vor der Immobilisierung) – (Enzymaktivität im ZFRE im Durchfluss, nach einmaligem Durchlaufen des Reaktors gemessen nach Immobilisierung).

Halo-DERA _{EC} Variante - Reaktordurchmesser, und - länge	Enzymaktivität [U]		
	Vor Immobilisierung	Nach Immobilisierung	theoretisch immobilisiert ^[a]
C47M - $\varnothing$ 3, 50 mm	137	99	38
C47V - $\varnothing$ 3, 50 mm	209	133	75
C47V - $\varnothing$ 3, 100 mm	194	74	118

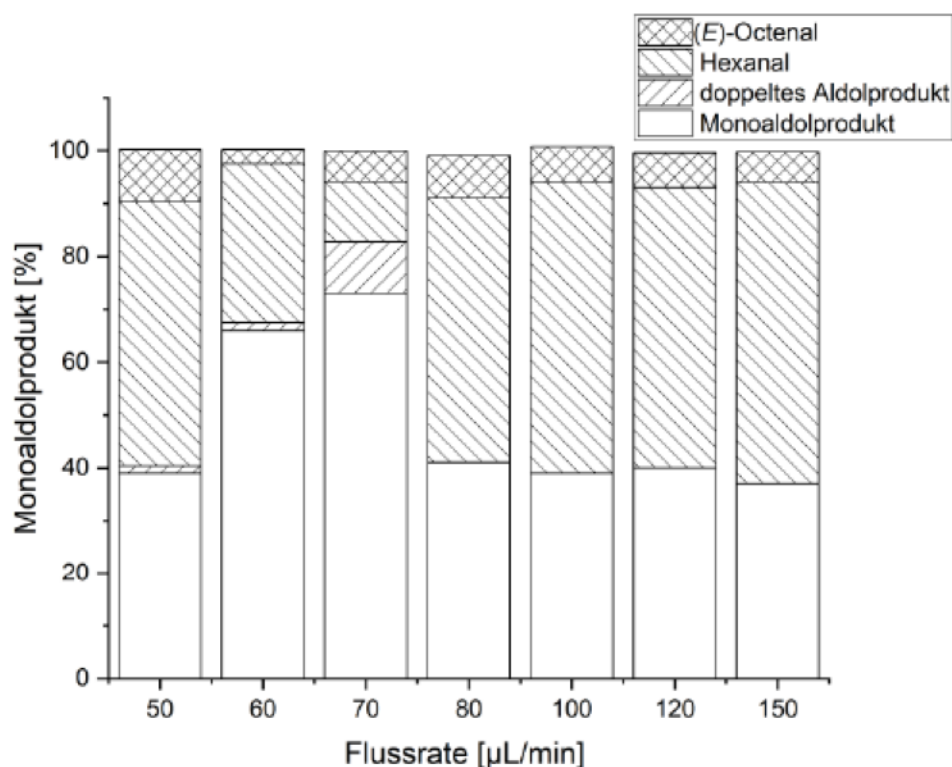


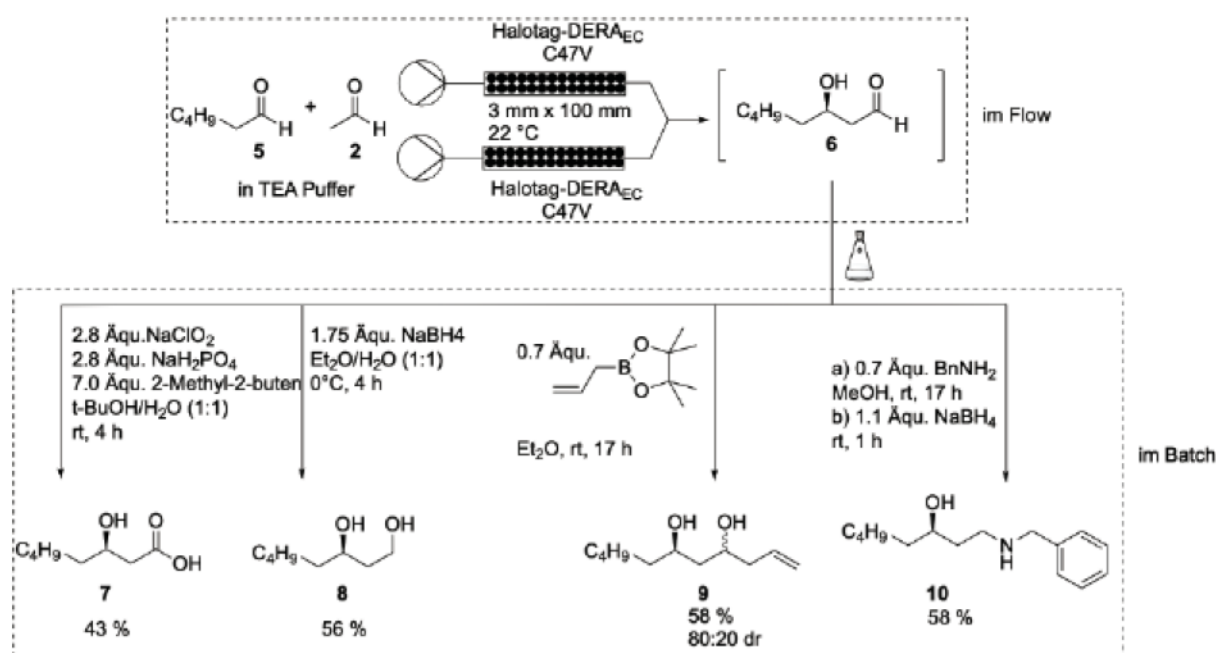
Abbildung 27: Relativer Umsatz zum gewünschten Monoaldolprodukt **6** (ohne Muster), Nebenprodukt (*E*)-Octenal (**11**) (gekreuztes Muster) und doppeltem Aldolprodukt **51** (linksgängige Querstreifen) sowie verbliebenes Substrat Hexanal (**5**) (rechtsgängige Querstreifen), welcher bei dem Screening der Flussrate bei der Verwendung der Halo-DERA_{EC}-C47V als Biokatalysator (Ø 3, L 100 mm) erzielt worden ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) als Intermediat für zweistufige Reaktionskaskaden genutzt. Dafür wurde das im Durchfluss synthetisierte 3-(*R*)-Hydroxyoctanal (**6**) in Konsekutivreaktionen sowohl im kontinuierlichen als auch im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus abgefangen und weiter umgesetzt (vgl. Schema 47).

Sowohl für die Reaktion im kontinuierlichen als auch im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus wurden für den ersten DERA-katalysierten Reaktionsschritt zwei der 10 cm langen Enzymreaktoren parallel verwendet und die Produktgemische anschließend vereinigt, um so die Menge des gewünschten Monoaldolproduktes **6** zu erhöhen. Im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus wurden eine *Pinnick*-Oxidation, eine Reduktion mittels NaBH₄, eine Allyl-Addition sowie eine reduktive Aminierung des 3-(*R*)-Hydroxyoctanals (**6**) adressiert. Das konkrete experimentelle Set-Up dieser vier Zwei-Stufen-Synthesen ist in Schema 47 dargestellt. Mittels der *Pinnick*-Oxidation konnte die Stoffgruppe der (*R*)- β -Hydroxycarbonsäuren, konkret der (*R*)- β -Hydroxyoctansäure (**7**), mit einer Ausbeute von 43 % (nach Reinigung und über zwei Schritte) dargestellt werden. Diese Namensreaktion ermöglichte eine selektive Oxidation der Aldehydfunktionalität, ohne dass eine vorherige Schützung der β -ständigen Hydroxylgruppe notwendig war. Eine einfache und

unproblematische Reduktion mit NaBH_4 ermöglichte den Zugang zu dem enantiomerenreinen (*R*)-Octan-1,3-diol (**8**) mit 56 % Ausbeute (nach Reinigung über zwei Schritte). Auch eine Allyl-Addition konnte erfolgreich durchgeführt werden. Diese machte allerdings aufgrund ihrer starken Wasserempfindlichkeit eine zusätzliche Trocknung der organischen Phase nach Inline-Extraktion mittels eines Festbettreaktors, welcher Molekularsieb ($4 \text{ \AA}$) enthielt, notwendig. Anschließend wurde Pinakol-Allylboronat (**54**) hinzugefügt. Das Produktgemisch wies sowohl das gewünschte Produkt (*R*)-Undec-1-en-4,6-diol (**9**) als Hauptprodukt auf, als auch als Nebenprodukte die entsprechenden Allylierungs-Produkte des doppelten DERA-Aldolproduktes (**51**) und des Aldolkondensationsproduktes (**11**). Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden 58 % des gewünschten Produktes (*R*)-Undec-1-en-4,6-diol (**9**) mit einem Diastereomerenverhältnis von 80:20 isoliert.

Semi-kontinuierliche Synthesen

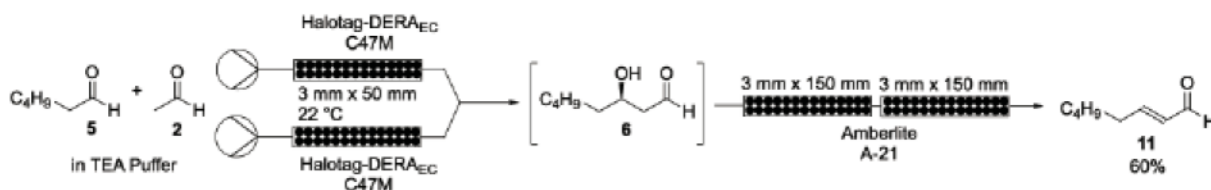


Schema 47: Schema der semi-kontinuierlichen Zwei-Stufen-Synthese. Die DERA-katalysierte Synthese des Monoaldolproduktes **6** im Flow wurde im semi-kontinuierlichen Modus mit vier weiteren sequenziellen Reaktionen im Batch-Modus gesammelt. Angegeben sind die isolierten Ausbeuten nach säulenchromatographischer Reinigung. Die Konfiguration wurde mittels Drehwertbestimmung bestätigt.

Für eine reduktive Aminierung des (*R*)-Hydroxyoctanals (**6**) wurde Benzylamin (**56**) zur organischen Phase hinzugegeben und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von NaBH_4 konnte so nach säulenchromatographischer Reinigung 56 % des (*R*)-(Benzylamino)-octan-3-ol (**10**) isoliert werden.

Der kontinuierliche Reaktionsmodus wurde für die gezielte Synthese von α,β -ungesättigten Aldehyden gewählt (vgl. Schema 48). Ermöglicht wurde dies durch die Kombination des immobilisierten Biokatalysators DERA im ersten Reaktionsschritt und zwei in Reihe geschaltete Festbettreaktoren im zweiten Reaktionsschritt, welche einen basischen Katalysator für die konsekutive Kondensationsreaktion enthielten. Da die Bildung des Aldolkondensationsproduktes durch DERA_{EC}-C47M im Vergleich mit der DERA_{EC}-C47V ohnehin bevorzugter verläuft, wurde für dieses Reaktions-Set-Up die DERA_{EC}-C47M als Biokatalysator gewählt. Als Katalysator für die Kondensationsreaktion fungierte das basische Ionenaustauschharz Amberlite 21 (A-21), welches sich nach einem Screening diverser acider und basischer Ionenaustauschharze als das effektivste erwies. Durch Optimierung der Flussrate konnte bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{Min}$ und der Verwendung eines 15 cm langen Festbettreaktors gefüllt mit A-21 ($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm) ein Produktverhältnis von 51:49 (*E*-Octenal (11):3-(*R*)-Hydroxyoctanal (6) erreicht werden. Vollständiger Umsatz zum gewünschten α,β -ungesättigten Aldehyd 11 konnte schließlich durch zwei A-21-Festbettreaktoren, welche in Reihe geschaltet wurden, erzielt werden.

Kontinuierliche Synthese im Flow



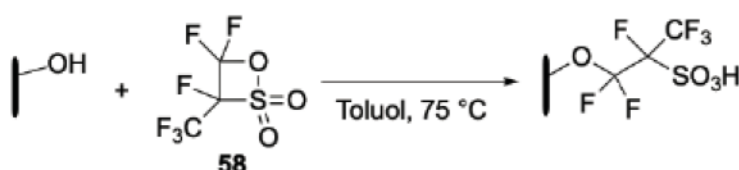
Schema 48: Schema der kontinuierlichen Zwei-Stufen-Synthese. An die DERA-katalysierte Synthese des Monoaldolproduktes 6 wurde über zwei in reihe geschaltete Amberlite A-21 enthaltende Festbettreaktoren ($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm) geleitet. Angegeben sind die isolierten Ausbeuten nach säulenchromatographischer Reinigung. Die Konfiguration wurde mittels Drehwertbestimmung bestätigt.

Diese experimentellen Resultate bieten einen wertvollen Erkenntnisgewinn hinsichtlich der DERA-Katalyse. Sie erweitern den Einsatz dieses Biokatalysators um einen weiteren DERA-Baustein für die synthetische Anwendung, ein weiterer Schritt auf dem Weg zur vollen Ausschöpfung des synthetischen Potenzials der DERA.

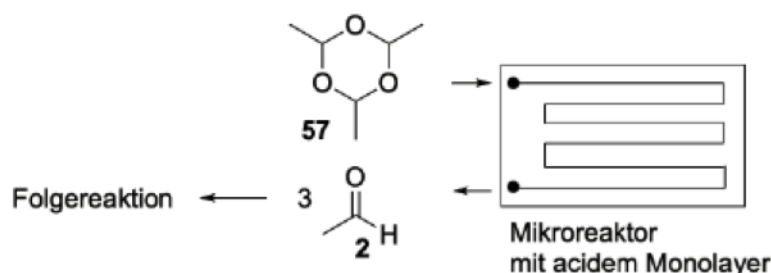
Letztlich beschäftigte sich ein Teil der vorliegenden Arbeit mit einem weiteren einflussreichen Faktor der Optimierung der DERA-Reaktion, nämlich die Bereitstellung des DERA-Substrates Acetaldehyd (2). Sowohl die sehr hohe Flüchtigkeit des Acetaldehyds (2) als auch seine stark gesundheitsgefährdende Eigenschaft erschweren die praktische Arbeit. Daher wurde versucht die Bereitstellung des Acetaldehyds (2) *in situ* zu ermöglichen, und zwar implementiert im kontinuierlichen Reaktionsmodus. Ermöglicht werden sollte dies durch die Verwendung von Paraldehyd (57), dem Trimer des Acetaldehyds (2), welcher unter

saurer Katalyse drei Moleküle Acetaldehyd (2) freisetzt. Für die Funktion des aciden Katalysators wurde versucht die Innenwände eines Mikroreaktors aus Glas mit 1,2,2-Trifluoro-2-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethan sulfonsäure β -sulton (58) zu funktionalisieren (vgl. Schema 49) und anschließend eine Paraldehyd-Lösung einer Konzentration von 0.6 mol/L bei Flussraten von 10 $\mu\text{L}/\text{Min}$ bis 550 $\mu\text{L}/\text{Min}$ durch den Mikroreaktor gepumpt. Dabei konnten lediglich Spuren einer Acetaldehyd-Bildung bei Flussraten $\leq 50 \mu\text{L}/\text{Min}$ beobachtet werden, so dass eine fehlgeschlagene Funktionalisierung des Mikroreaktors vermutet wurde. Im Ergebnis waren auch weitere Versuche und Wiederholungen dieses Ansatzes zur *in situ* Bereitstellung von Acetaldehyd (2) als vorgelagerter Reaktionsschritt im kontinuierlichen Modus nicht zielführend. Versuche mit aciden Ionenaustauschharzen in einem Festbettreaktor zur Freisetzung des Acetaldehyds (2) aus Paraldehyd (57) als alternativer acider Katalysator führten zwar zu der gewünschten Umsetzung zu Acetaldehyd (2), jedoch in Kombination mit der nachgeschalteten DERA-Reaktion zur gänzlichen Inaktivierung des Enzyms. Ursächlich dafür wird vermutlich die Fragilität der pH-Akzeptanz der DERA sein.

1. Funktionalisierung des Mikroreaktors:



2. Acetaldehyd-Freisetzung aus Paraldehyd:



Schema 49: Schematische Darstellung der Funktionalisierung der Innenwände eines Mikroreaktors zur *in situ* Freisetzung von Acetaldehyd im Flow-Modus. 1) Die Funktionalisierung mit 1,2,2-Trifluoro-2-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethan sulfonsäure β -sulton erfolgte anhand des Protokolls von Ricciardi *et al.* (2014).^[104] 2) Nach der Ausbildung des berichteten aciden Monolayers sollte Paraldehyd X als Acetaldehyd-Quelle dienen und für Folgereaktion, wie z.B. die DERA-katalysierte Aldolreaktion zur Verfügung stehen.

8.4 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse können als Ausgangspunkt weiterer Investigationen dienen. Im Folgenden soll ein Überblick über Möglichkeiten zur Weiterführung der Projekte gegeben werden.

8.4.1 DERA ALS BIOKATALYSATOR – WEITERER OPTIMIERUNGSBEDARF?

Für den Einsatz als Biokatalysator ist besonders der Parameter der Enzymaktivität entscheidend. Je aktiver ein Biokatalysator ist, desto höher ist im Ergebnis auch der mit ihm erreichte Umsatz in der Synthese. Aufbauend auf den Ergebnissen von *Markus Dick* konnte neben der Acetaldehyd-resistenten DERA_{EC}-C47M eine weitere vielversprechende DERA-Mutante identifiziert werden, nämlich die DERA_{EC}-C47V.^[10] Trotz ihrer doppelt so hohen Enzymaktivität im Vergleich zur DERA_{EC}-C47M, wurden durch die vorliegende Immobilisierungsmethode durch das HaloTagTM-System deutliche Verluste im Hinblick auf die Enzymaktivität beobachtet. So besteht auch weiterhin Interesse daran, eine DERA-Variante ausfindig zu machen, welche noch aktiver, noch effizienter arbeitet. Ein Ausgangspunkt könnten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten psychrophilen DERAs sein. Besonders die DERA aus *E. sibiricum* sticht durch ihre mehr als 5-mal so hohe Enzymaktivität im Vergleich zur mesophilen DERA aus *E. coli* hervor, womit sie auch um ein Vielfaches aktiver ist als die bereits bekannten psychrophilen DERAs aus *S. halifaxensis* und *C. psychrerythraea* (vgl. Tabelle 16). Doch scheint der in dieser Arbeit bestimmte Enantiomerenüberschuss von lediglich 75 % von der Verwendung des Enzyms in der Synthese abzuschrecken. Ein genauer Blick in das aktive Zentrum der DERA_{ES} könnte allerdings Aufschluss geben, wodurch eine solche Abweichung der Stereoselektivität begründet wird und eine mutagenetische Anpassung ermöglichen. Besonders im Kontext der beiden bekannten psychrophilen DERA_{SH} und DERA_{CP} sind diese Abweichung bezüglich der Stereoselektivität auffällig, welche wiederum außergewöhnlich hohe Enantiomerenüberschüsse aufweisen (vgl. Tabelle 16). Somit könnten Investigationen hinsichtlich dieser Selektivitätseinbußen und ein genauerer Blick in das aktive Zentrum sowie der Faltung dieser Enzyme auch für die Entwicklung einer stereokomplementären DERA von Interesse sein. Eine Solche konnte bis heute nicht entwickelt werden. Da die DERA_{ES} sehr gut zu exprimieren ist (vgl. Kapitel 6.2) und die DERA im Allgemeinen nach institutsinternen Erfahrungen leicht zu kristallisieren ist, sollte dafür eine Kristallstruktur der DERA_{ES} bestimmt werden.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob es weitere Immobilisierungsstrategien für die verwendete DERA_{EC}-C47V gibt, welche für die Verwendung des etablierten Reaktions-Set-Ups im *Flow* geeignet sind und mit geringeren (vorzugsweise ohne) Aktivitätsverlusten einhergehen. Bereits einige Immobilisierungstechniken wurden für die DERA beschrieben.^[89, 132, 163, 166] Es werden jedoch entweder Leaching-Effekte oder Aktivitätsverluste auf Kosten der Effizienz der DERA beobachtet. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung könnte die Bildung von CatIBs (*catalytically active inclusion bodies*) sein. Bei solchen *inclusion bodies* handelt es sich Proteine, welche mit einem Aggregation-triggernden versehen sind und katalytische Aktivität aufweisen. Sie können als natürlich hergestelltes trägerlose Enzymimmobilisat angesehen werden können.^[190] Die Herstellung erfolgt in der Regel über die Fusionierung des Zielproteins mit entsprechenden Polypeptiden oder Proteintags (z.B. Elastin-ähnliche Peptide^[191] oder Varianten des grün fluoreszierenden Proteins^[192]), somit eine ähnliche Vorgehensweise, wie sie in vorliegender Arbeit bei der Herstellung des HaloTagTM-DERA-Konstruktes notwendig war. Für den Fall einer Alkoholdehydrogenase wurde die erfolgreiche Verwendung solcher CatIBs bereits im *Flow* beschrieben.^[193] Die dort von *Ölcücü et al.* verwendeten synthetischen Peptid-Tags wiesen im Gegensatz zu dem hier verwendeten sehr großen HaloTagTM mit 34 kDa vergleichsweise sehr kleine Größen von 0.9 bis 2.3 kDa auf, wodurch etwaige negative Auswirkungen auf die Proteinfaltung und Enzymaktivität der DERA geringer ausfallen könnte. Eine weitere vielversprechende Immobilisierungsmethode könnte die CLEA (*cross-linked enzyme aggregates*) Technologie darstellen, welche für zahlreiche Enzyme bereits mit lediglich geringen Aktivitätsverlusten beschrieben wurde.^[144]

Die in dieser Arbeit getestete adsorptive Immobilisierung mittels Ni-NTA-System erwies sich besonders aufgrund des starken Leaching-Effektes als nachteilig. Ein Lösungsansatz für dieses Problem könnte die Verwendung anderer Metallionen sein, welche sich durch eine höhere Affinität zum His-Tag auszeichnen. Ein interessanter Kandidat stellt Cobalt da und zwar Co(III). Co(III) zeichnet sich mit einer Halbwertszeit von bis zu sieben Tagen in Anwesenheit von Imidazol gegenüber einem 6-fachen His-Tag als besonders robust aus.^[194] Die Verwendung eines [Co(III)NTA(His6-Tag)]-Komplexes zur Immobilisierung der DERA könnte somit durchaus Potenzial bergen. Eine ebenso interessante Alternative der Immobilisierung mittels Adsorption könnte die Verwendung von Holz als umweltfreundliches Trägermaterial in Verbindung mit Gold-Nanopartikeln darstellen.^[195] Bei dieser zweistufigen Immobilisierung erfolgt in einem ersten Schritt die Reduzierung von Au³⁺-Ionen auf der Oberfläche und im Inneren eines präparierten Holzstücks, wobei Gold-

Nanopartikel entstehen, für welche wiederum eine hohe Protein-Affinität beschrieben wird. Im zweiten Immobilisierungsschritt wird die Enzymlösung über das Holz geleitet, wobei im Fall einer Laccase keine erheblichen Aktivitätsverluste und eine gute Wiederverwendbarkeit beobachtet worden ist.

Auch hinsichtlich der Acetaldehyd-Toleranz der DERA könnten weitere Untersuchungen von Interesse sein. So konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass der von *Markus Dick* postulierte Inaktivierungsmechanismus über das Cys-47 nicht der einzige Mechanismus sein kann, welcher zur Inaktivierung der DERA führt. Die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese eines analogen nukleophilen Angriffs im aktiven Zentrum ausgehend vom Thr-18, welcher ebenfalls zu dem beobachteten Reaktionsaddukt und somit zur Blockierung des aktiven Zentrums führen könnte, konnte nicht bestätigt werden. Ein denkbarer Ansatz, welcher Einblicke in strukturelle Vorgänge weiterer Inaktivierungsmechanismus geben könnte, wäre die Erstellung einer Kristallstruktur der erstellten Doppelmutante DERA-C47G-T18V vor und nach Acetaldehydinkubation. Auf diese Weise könnten, analog zur Vorgehensweise von *Dick et al.*,^[10] mögliche Reaktionsaddukte oder sonstige strukturelle Prozesse, die Einfluss auf eine reibungslose Wirkweise des aktiven Zentrums haben könnten, definiert werden.

8.1.1 DERA IN DER SYNTHETISCHEN *FLOW*CHEMIE

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die DERA als immobilisierter Biokatalysator in ein Reaktions-Set-Up im *Flow*-Modus implementiert werden. Damit konnten offene Fragestellungen und Weiterentwicklungen von *Carolin Bisterfeld* adressiert werden.^[171]

Die Möglichkeiten der Katalyse, welche heutzutage bereits im *Flow* durchführbar sind, sind umfangreich und wachsen stetig.^[101] Das etablierte Reaktions-Set-Up im *Flow* eröffnet im Sinne des Baukasten-Prinzips zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten der DERA-Katalyse mit weiteren Bio- und/oder chemischen Katalysatoren bis hin zu komplexen Reaktionskaskaden.

Das Strukturmotiv des Monoaldolproduktes findet sich in vielen Naturstoffen und pharmazeutisch aktiven Substanzen. Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, ermöglicht eine folgende Reduktion den Zugang zu chiralen 1,3-Diolen, welche das Grundgerüst vieler Makrolide und Polyole bildet. Diese Strukturen sind beispielsweise in Form der Makrolidantibiotika, wie Roxaticin oder Mycoticin A und B, für die pharmazeutische Industrie und Forschung von großem Interesse.^[196]

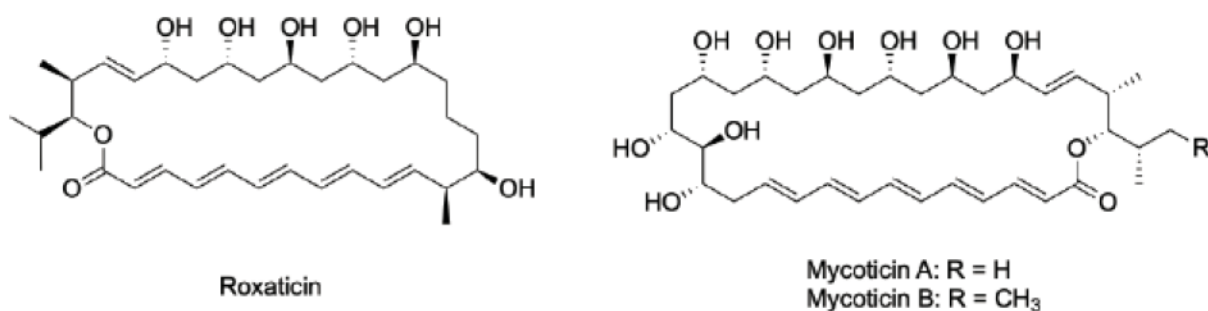
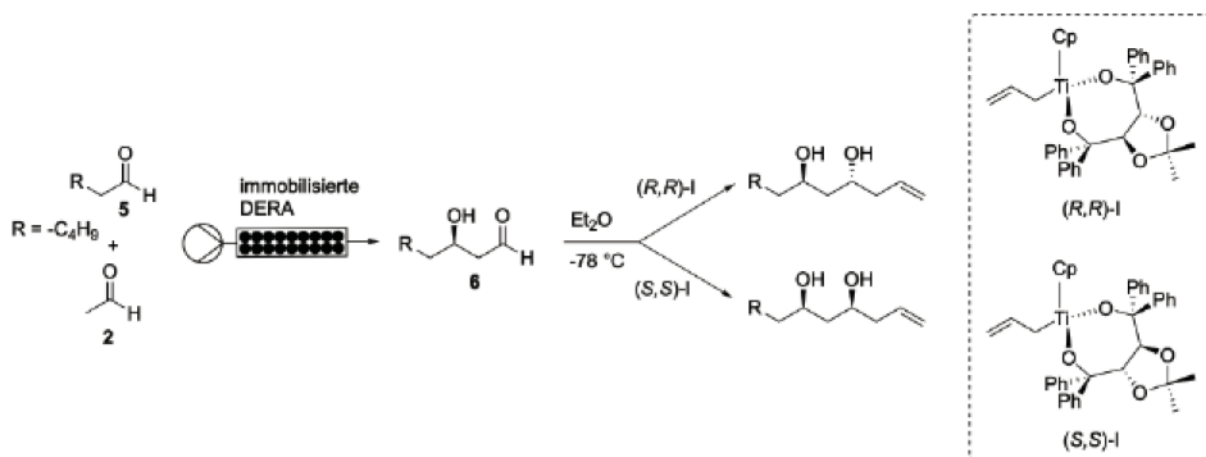


Abbildung 28: Roxaticin und Mycoticin A und B als Vertreter der Makrolidantibiotika.

Für die stereoselektive Synthese von 1,3-Diolen mit klassisch chemischen Methoden sind häufig mehrstufige Reaktionssequenzen zum Teil unter harschen Bedingungen notwendig.^[196, 197] Die Kombination der hier gezeigten DERA-katalysierten stereoselektiven Synthese von 3-(*R*)-Hydroxyaldehyden mit geeigneten Methoden zum Aufbau des zweiten Chiralitätszentrums könnte eine kürzere Alternative bieten. *Bouzbouz* und *Cossy* berichten von einer enantioselektiven Allyltitanierung ausgehend von chiralen 3-Hydroxyaldehyden.^[198] Unter Verwendung des jeweiligen Titankomplexes kann so im semikontinuierlichen Reaktionsmodus die entsprechenden *anti*- und *syn*-1,3-Diole in einer zweistufigen Synthese dargestellt werden (vgl. Schema 50). Es sollte überprüft werden, ob die Überführung in eine kontinuierliche Reaktionsführung beispielsweise durch den Einsatz von Mikrochip- oder Spulenreaktoren möglich ist.



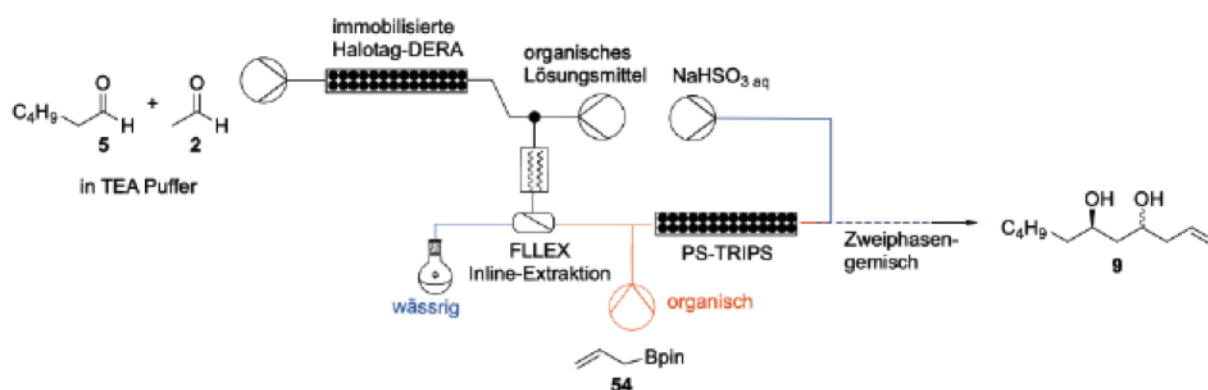
Schema 50: Reaktionsschema zur semikontinuierlichen zweistufigen Synthese von chiralen 1,3-Diolen.^[198]

Auch könnte die Übertragung der Reduktion mit NaBH₄, wie sie in vorliegender Arbeit im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus durchgeführt worden ist, in einen kontinuierlichen Reaktionsmodus umgesetzt werden. *Bernardin et al.* berichten die Verwendung einer mit Natriummethanolat stabilisierten NaBH₄-Lösung und eines Corning® *Advanced-Flow* Reaktor („*low flow*“ Reaktor) mit verbesserten Mischungs- und Wärmeaustausch-

Eigenschaften und erzielten dabei für eine Vielzahl von Aldehyd-Substraten nahezu vollständige Umsätze bei außergewöhnlich kurzen Reaktionszeiten von 20 s.^[199] Mit Hilfe dieses Systems wäre auch die Durchführung einer sich anschließenden Luche-Reduktion ausgehend von dem einfachen Aldolkondensationsprodukt (vgl. die in vorliegender Arbeit beschriebene Synthese des α,β -ungesättigten Aldehyds 11) denkbar.

Ebenfalls von Interesse kann die Etablierung des Reduktionsschrittes im wässrigen Medium im *Flow*-Modus sein, wodurch der Schritt der Inline-Extraktion zum Wechsel des Lösungsmittels eingespart werden könnte. Für Versuche im Batch wurde Ammoniumboran als Reduktionsmittel in Wasser erfolgreich eingesetzt.^[200]

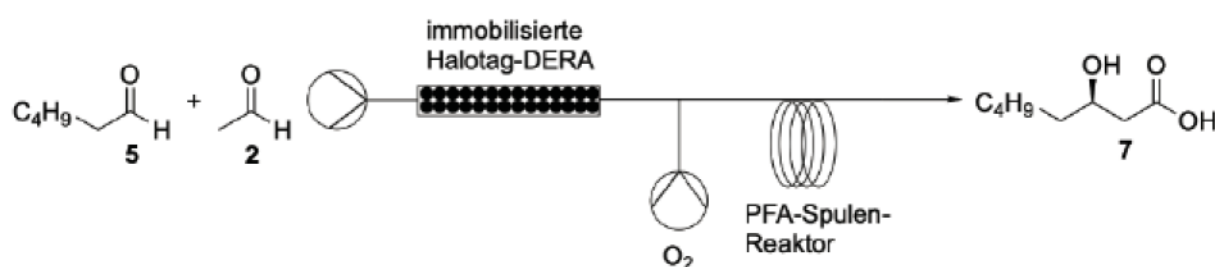
Weiterhin sollte die in vorliegender Arbeit beschriebene Allylierungsreaktion, welche im semikontinuierlichen Reaktionsmodus umgesetzt worden ist, weiterentwickelt werden. Die Verwendung des TRIP Katalysators (eine chirale Phosphorsäure) immobilisiert an einer Polystyrol-Festphase (PS-TRIP) ermöglicht die Übersetzung einer enantioselektiven Allylierungsreaktion in den *Flow*-Modus.^[201, 202] Der etablierten DERA-Reaktionsschritt im *Flow* mit einer Inline-Extraktion sowie ein anschließender Wechsel in ein organisches Lösungsmittel kann mit dem von *Almenara et al.* entwickelten Festbettreaktor mit PS-TRIP kombiniert werden, für welchen exzellente Enantiomerenüberschüsse und eine herausragende Aktivität berichtet worden sind (vgl. Schema 51). Nach Durchlaufen des PS-TRIP Festbettreaktors wurde ein NaHSO_3 -Scavenger nachgeschaltet, um nicht abreagierte Aldehyde aus dem Produktgemisch abzufangen. Zur weiteren Aufarbeitung wäre auch an dieser Stelle ein weiteres Inline-Extraktionsmodul denkbar.



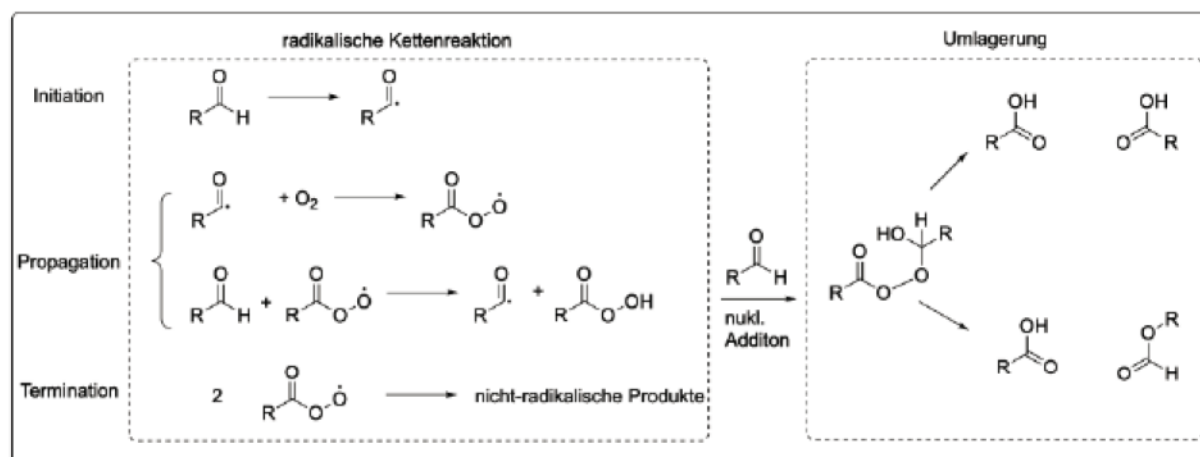
Schema 51: Reaktionsschema einer anschließenden Allylierungsreaktion nach erfolgter DERA-Reaktion im kontinuierlichen Reaktionsmodus unter Verwendung eines Polystyrol-TRIP-Festbettreaktors.^[201]

Auch die vorliegend gezeigte Oxidation des DERA-katalysierten Monoaldolproduktes 6 zu der entsprechenden 3-Hydroxycarbonsäure birgt durchaus Potenzial zur Weiterentwicklung.

Mittels aerober Oxidation kann der im Flow durchgeführte DERA-Reaktionsschritt mit einem PFA-Spulenreaktor bei Raumtemperatur ohne die Zugabe eines weiteren Katalysators im kontinuierlichen Durchfluss kombiniert werden.^[203] Durch die Einleitung von O₂-Gas bildet sich ein kontinuierliches flüssig-gasförmiges Reaktionssystem, das sich aufgrund der Unterbrechung des Flüssigkeitsstromes durch längliche O₂-Blasen (die sogenannte Taylor-Strömung) insbesondere durch die vorteilhaft großen Grenzflächen und ein schnelles Durchmischen auszeichnet.^[204] Eine solche Oxidation mit Sauerstoff wurde auch bereits erfolgreich in wässrigem Medium mit aliphatischen Aldehyden durchgeführt, sodass die Entwicklung einer solchen zweistufigen Synthese von (chiralen) 3-Hydroxycarbonsäuren weiterverfolgt werden sollte.^[205] Mechanistisch liegt der aeroben Oxidation von Aldehyden ein stufenweiser Prozess zugrunde, welcher die radikalische Kettenreaktion des Aldehyds (Autooxidation), die nukleophile Addition eines Aldehydmoleküls an die gebildete Persäure sowie die Umlagerung des Criegee-Intermediates zur Carbonsäure umfasst (vgl. Schema 53).



Schema 52: Synthese von 3-Hydroxyoctansäure über eine DERA-katalysierte Reaktion und anschließender aerober Oxidation im kontinuierlichen Reaktionsmodus.^[203]



Schema 53: Mechanismus der aeroben Oxidation von Aldehyden zu ihren entsprechenden Carbonsäuren.^[206]

Ein weiterer vorstellbarer Ausgangspunkt zur Weiterentwicklung bietet das Aldolkondensationsprodukt, welches beispielhaft für den Fall des 2-(*E*)-Octenals (11) in vorliegender Arbeit in kontinuierlichem Reaktionsmodus unter DERA-Katalyse dargestellt

werden konnte. Das Strukturmotiv der α,β -ungesättigten Aldehyde ist in zahlreichen Aromastoffen zu finden.^[6, 186] Die Ausweitung des Substratspektrums und Erprobung des Reaktionsprotokolls mit weiteren (aliphatischen) Aldehyden unterschiedlicher Kettenlänge könnte Zugang zu diversen Aromastoffen eröffnen. Ein einfacher Vertreter, der ausgehend von Butanal als Substrat zugänglich wäre, stellt zum Beispiel das 2-(*E*)-Hexenal dar, welches zum charakteristischen Geschmack von Äpfeln und Kirschen beiträgt. Der Baustein der α,β -ungesättigten Aldehyde ist zudem reizvoll für eine Reihe von anschließenden klassischen Namensreaktion, wie der Michael-Addition oder der Morita-Baylis-Hillman-Reaktion. Besonders spannend könnte die Kombination der DERA-katalysierten Aldolkondensation mit einer weiteren DERA sein, welche hinsichtlich ihrer Effizienz zur Katalyse einer asymmetrischen Michael-Addition von Nitromethan (**59**) an α,β -ungesättigten Aldehyde zur Synthese von γ -Nitroaldehyden (**60**) optimiert worden ist.^[207] Der Austausch von zwölf Aminosäuren in dem Wildtyp der DERA_{EC}, welche interessanterweise auch die Mutation C47S umfasst, führte zu einer 190-fach so hohen katalytischen Aktivität hinsichtlich der beabsichtigten Michael-Addition. Sowohl aromatische als auch aliphatische Aldehyde wurden von der optimierten DERA (DERA-MA; „*Michaelase*“) akzeptiert. Die Implementierung dieser mutagenetisch angepassten DERA könnte den Aufbau einer eleganten Reaktionskaskade zunächst im *Batch* und anschließend nach Immobilisierung im *Flow*-Modus durch Kombination zweier unterschiedlich optimierten DERAs und somit den Zugang zu weiteren neuen nicht-natürlichen DERA-Produkten ermöglichen.

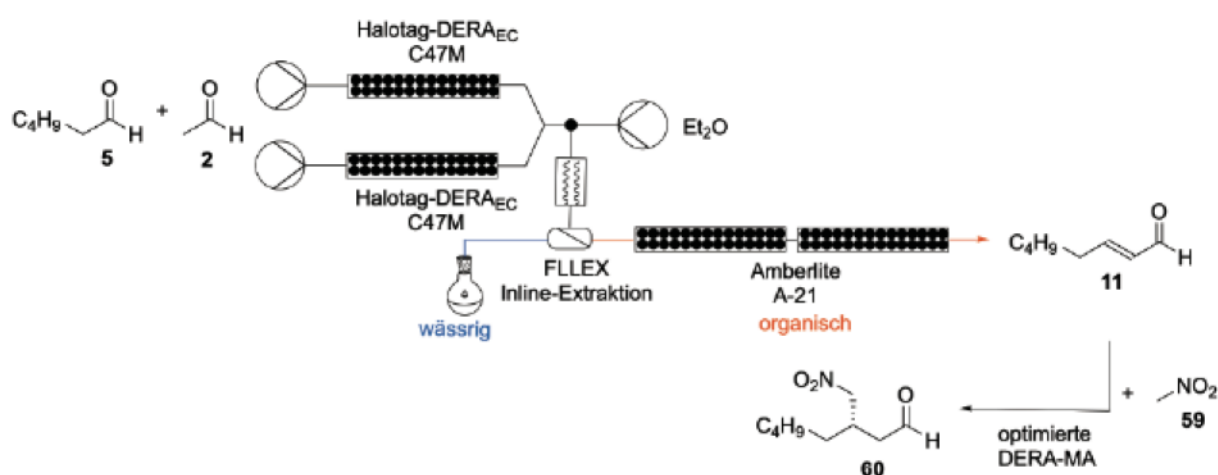
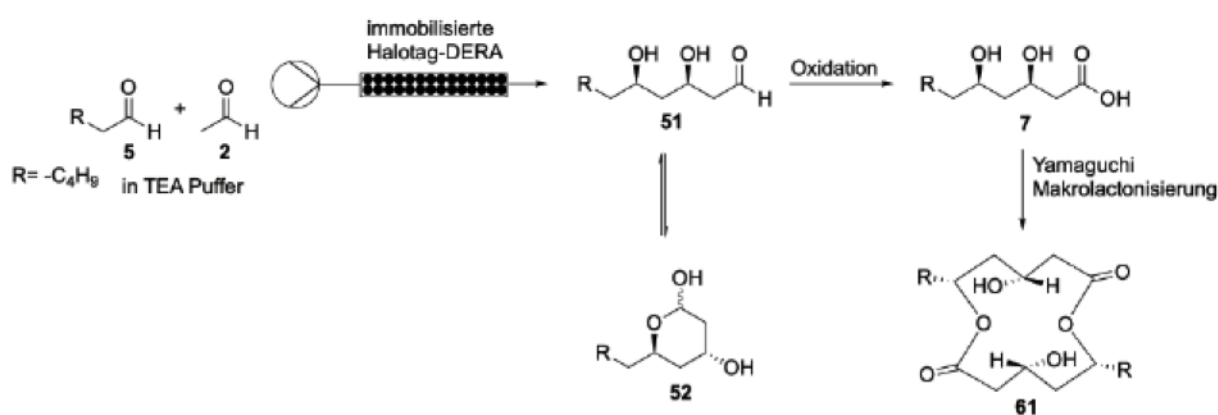


Abbildung 29: Reaktionsschema zur DERA-katalysierten Synthese von γ -Nitroaldehyden (**60**) durch Kombination des etablierten Protokolls zur Aldolkondensation und einer optimierten DERA-MA.^[207]

Auch das Monoaldolprodukt **6** bietet die Möglichkeit weiterer Carboligationsreaktionen, welche essenziell im Aufbau von Kohlenstoffgerüsten besonders in der pharmazeutischen Chemie sind. Hier sind Folgereaktionen in Form der Knoevenagel-Reaktion, der Mannich-

Reaktion oder Henry-Reaktion denkbar, für welche es bereits spannende Umsetzungen in den kontinuierlichen *Flow* Modus gibt.^[208-210]

Um das volle Reaktionsspektrum der DERA in dem Reaktionssystem im *Flow* nutzen zu können, sollte auch die gezielte Synthese des doppelten Aldolproduktes der DERA im *Flow* optimiert werden. Das *Flow*-System bietet durch die direkte und einfache Einflussnahme auf die Reaktionsparameter eine gute Möglichkeit eine solche Reaktionssteuerung vorzunehmen. Es ist zu vermuten, dass eine Drehung des Gleichgewichtes auf die Seite des doppelten Aldolproduktes bereits durch eine herabgesetzte Flussrate und somit eine längere Kontaktzeit zwischen Substrat und Enzym, die für die zweifache Addition je eines Moleküls Acetaldehyd (2) notwendig ist, erreicht werden kann. Auf diese Weise könnte im *Flow*-Modus eine Reihe von Lactonderivaten als Bausteine von Naturstoffen und Pharmazeutika, wie die Statine, hergestellt werden, wie sie in der Literatur bereits im klassischen *Batch*-System für die DERA beschrieben sind.^[35, 211] Denkbar wäre zum Beispiel auch eine DERA-induzierte Synthese des Verbalactons (61), ein antibakterieller Naturstoff, welcher ein makrozyklisches Dimer des Lactons (+)-(3*R*,5*R*)-Dihydroxy-5-decanolid darstellt. Während die klassisch chemische Synthese mit bis zu zehn Reaktionsschritten beschrieben wird,^[212, 213] könnte durch die gezielte Synthese des doppelten DERA-Produktes ausgehend von Hexanal (5), einer folgenden Oxidation und Makrolactonisierung ein eleganter und kürzerer Syntheseweg entwickelt werden (vgl. Schema 54)^[214, 215].



Schema 54: Mögliches Reaktionsschema zur Synthese von Verbalacton (61) mittels DERA-Katalyse.

Dabei könnte die von *Carolin Bisterfeld* im Batch getestete Kombination der DERA mit einer Laccase zur Oxidation im zweiten Schritt weiterverfolgt und in den *Flow*-Modus übertragen werden.^[171] Eine Immobilisierung der Laccase kann die Möglichkeit zweier hintereinander geschalteten Enzym-Festbettreaktoren ermöglichen.

Abschließend könnten Test mit der von *Voutilainen et al.* untersuchten DERA-Variante für die biokatalytische Anwendung von Interesse sein. Die Arbeitsgruppe entwickelte mittels *Machine Learning* fünf DERA-Varianten, welche eine hohe Aktivität hinsichtlich der Aldolreaktion mit Acetaldehyd (2) und eine geringe Aktivität hinsichtlich ihrer natürlichen Retroaldolreaktion mit Desoxyribose-5-phosphat aufweisen.^[216, 217] Alle dieser fünf besten DERA-Varianten wiesen Mutationen des Cys-47 auf.

9 EXPERIMENTELLER TEIL

9.1 MATERIALIEN

9.1.1 GERÄTE UND SOFTWARE

Die in nachstehender Tabelle 19 aufgeführten Geräte sind solche, welche im Labor zu regelmäßiger Anwendung kamen. Spezielle Geräte werden in den entsprechenden Methodenteilen beschrieben. Softwareprogramme, welche im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden, sind gesondert in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Laborgeräte des regelmäßigen Gebrauchs.

Gerät	Hersteller
Pipetten	
Eppendorf Research, Pipette 110 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research, Pipette 10100 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research, Pipette 0.11 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Gilson Pipetman, Pipette 0.55 mL	Gilson, Middleton, WI, USA
Schüttler	
BioCote Stuart rotator SB2, Rotorschüttler in 37 °C Konstantraum für Kulturröhrchen	BioCote Ltd, Wolverhampton, UK
Eppendorf Thermomixer compact, beheizter Schüttelblock für 1.52 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
HLC MKR23, beheizter/gekühlter Schüttelblock für 1.550 mL Reaktionsgefäße	HLC BioTech, Bovenden
Infors HT Multitron Standard, beheizbarer/kühlbarer Schüttelinkubator für Flüssigkulturen	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
VKS-75 control, Standschüttler in 37 °C Konstantraum für Flüssigkulturen	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5810R, gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5424, gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Concentrator 5301, Vakuumzentrifuge für Reaktionsgefäße (1.5+2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Sorvall RC5B, gekühlte Standkühlzentrifuge	Thermo Scientific Corp., MA, USA

Gerät	Hersteller
Sorvall RC6B plus, gekühlte Standkühlzentrifuge	Thermo Scientific Corp., MA, USA
Sorvall F10S, Festwinkelzentrifugationsrotor Zentrifuge 204	Thermo Scientific Corp., MA, USA
Waagen	
Sartorius MC1, Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius LA1200S, Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius 2004MP, Ultrafeinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Sonstiges	
Büchi Rotavapor R-205, Rotationsverdampfer	Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Invitrogen Novex Minicell, vertikales Gelelektrophoresesystem für Invitrogen precast SDS-PAGE-gels	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Labor-pH-Meter 766 Calimatic, pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Nano Drop 2000c, Kleinvolumenphotometer	Thermo Scientific Corp., MA., USA
Perfectblue Gelsystem Midi S, horizontales Gelelektrophoresesystem	Peqlab
Shimadzu UV-1800, kühlbares/beheizbares Spektrophotometer (CPS-240A)	Shimadzu, Duisburg
Sonoplus, Ultraschall Zelldisruptor mit diversen Horngrößen (1.550 mL)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
VWR Doppio, Gradienten-PCR-Cycler	VWR International GmbH, Darmstadt
Zirbus VaCo2, Lyophilisator	Zirbus Technology GmbH, Bad Grund, Deutschland
Spritzenpumpe	
Flow Glassäulen	

Tabelle 20: verwendete Softwareprogramme.

Software	Verwendung
Excel	Graphen
Origin Pro	Graphen
UCSF Chimera	Enzym-Abbildungen
Chemdraw	Strukturformeln
MestreNova	NMR Auswertung
DesignExpert®	Auswertung der Reaktionsoptimierung

9.1.2 CHEMIKALIEN, ENZYME UND FERTIGKITS

Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden kommerziell von *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma Aldrich/Fluka* (Steinheim, Deutschland), *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, Deutschland), *TCI Europe* (Zwijndrecht, Belgien), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland) und *VWR International* (Radnor, PA, USA) erworben oder stammen aus Schenkungen.

Enzyme

Die Enzyme T4-Ligase (5U/μL), T4 Polynukleotid Kinase (10 U/μL), Restriktionsendonukleasen und dNTPs (jeweils 10 mM) wurden bei *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, Deutschland) erworben. Die *Phusion® Hotstart II Polymerase* (2 U/μL) sowie *DpnI* (10 U/μL) wurden bei *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, MA, USA) erworben. *GDH/TPI* wurde bei *Sigma Aldrich* (München, Deutschland) bezogen.

Fertigkits

Es wurden folgende Fertigkits verwendet:

Plasmidisolation: *innuPREP Plasmid Mini Kit*, *Analytik Jena AG Life Science* (Jena, Deutschland)

Gelelution: *QIAQuik® Gel Extraction Kit*, *QIAGEN GmbH* (Hilden, Deutschland)

9.1.3 MEDIEN UND STAMMLÖSUNGEN

Die in nachstehender Tabelle 21 aufgeführten Medien wurden mit 1 L destilliertem Wasser aufgefüllt. Bei dem verwendeten TB-Medium handelt es sich um ein Fertigmedium (*Carl Roth*) der unten angegebenen Zusammensetzung. Zusätzlich zu dieser wurden pro Liter TB-Medium 4 mL Glycerin hinzugegeben. Für 1 L Medium wurden 50.8 g der Fertigmischung mit 1 L destilliertem Wasser angerührt. Nach der Herstellung wurden die Medien für mindestens 20 Minuten bei einer Temperatur von 120 °C und 200 kPa autoklaviert.

Tabelle 21: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien.

Medium	Bestandteil	Konzentration [g/L]
LB	Trypton	10
	Hefeextrakt	5
	NaCl	10
TB	Casein, enzymatisch verdaut	12
	Hefeextrakt	24
	K ₂ HPO ₄	12.54
	KH ₂ PO ₄	2.31

IPTG und Ampicillin wurden als Stammlösungen mit 0.45 µm Celluloseacetatmembran Filter (Spritzenvorsatzfilter) sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Acetaldehyd Stammlösungen wurden zur vereinfachten Handhabung der leicht flüchtigen Substanz für synthetische Zwecke frisch vor Gebrauch in jeweiligem Puffer angesetzt.

IPTG (1000-fach): 1 M in *Aqua dest.*

Ampicillin (Amp, 1000-fach): 100 mg/mL in *Aqua dest.*

9.1.4 MIKROORGANISMEN, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 22: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F-ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (llts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1)	<i>Studier & Moffat</i> , 1986 ^[218]
<i>Escherichia coli</i> MACH1	ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rK-mK+)	<i>Invitrogen</i> ^[219]

Plasmide

Es wurde der pET21a(+)-Vektor von *Novagen* (USA) als Plasmid verwendet. Dieser weist einen T7-Promotor, einen lacZ-Operator sowie eine Ampicillin-Resistenz auf. Die fertigen Gene von deoC_{EC} wurden bereits von Frau Dr. Irene Küberl, neé Kullartz, sowie von Herrn Dr. Markus Dick in den Vektor kloniert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die synthetischen Gene von deoC_{PI}, deoC_{ES} und deoC_{PH} wurden kommerziell erstanden von *GenScript* (NJ, USA). Das Plasmid des Fusionskonstruktes kodierend für DERA und HaloTagTM wurde von Herrn Dr. Johannes Döbber zur Verfügung gestellt.

Tabelle 23:verwendete Plasmide.

Plasmidbezeichnung	Eigenschaften	Quelle/Referenz
DERA-Wildtyp		
pET21a::deoC _{EC} -notag	pET21a::deoC _{EC} ohne His-Tag	Irene Küberl ^[220]
pET21a::deoC _{ES} -his	pET21a::deoC _{ES} -his mit 6x Histag (N-terminal)	GenScript®
pET21a::deoC _{PH} -his	pET21a::deoC _{PH} -his mit 6x Histag (N-terminal)	GenScript®
pET21a::deoC _{PI} -his	pET21a::deoC _{PI} -his mit 6x Histag (N-terminal)	GenScript®
DERA-Mutanten		
pET21a::deoC _{EC} -C47F-notag	pET21a::deoC _{EC} -C47F-notag mit Mutation C47F (<i>Round the Horn PCR</i>)	diese Arbeit
pET21a::deoC _{EC} -C47V-notag	pET21a::deoC _{EC} -C47V-notag mit Mutation C47F (<i>Round the Horn PCR</i>)	diese Arbeit
pET21a::deoC _{EC} -C47K-notag	pET21a::deoC _{EC} -C47K-notag mit Mutation C47F (<i>Round the Horn PCR</i>)	diese Arbeit
pET21a::deoC _{EC} -C47R-notag	pET21a::deoC _{EC} -C47R-notag mit Mutation C47F (<i>Round the Horn PCR</i>)	diese Arbeit
pET21a::deoC _{EC} -C47G-T18V	pET21a::deoC _{EC} -C47G-T18V mit Mutationen C47G und T18V	diese Arbeit
HaloTag-DERA Fusionskonstrukte		
pET22b::halotag-deoCEC-C47M	Fusionskonstrukt aus DERA und HaloTag pET22b:: mit Mutation C47M	Johannes Döbber ^[181]
pET22b::halotag-deoCEC-C47V	Fusionskonstrukt aus DERA und HaloTag pET22b:: mit Mutation C47V	diese Arbeit

Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Sigma Aldrich (München) erworben.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendung
<i>deoC E. coli</i>		
JB18_deoC_EC-C47F_fw	[Phos] <u>TTT</u> ATC TAT CCT CGC TTT ATC CCG ATT GC	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von C47
JB17_deoC_EC-C47V_fw	[Phos] <u>GTG</u> ATC TAT CCT CGC TTT ATC CCG ATT G	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von C47
JB15_deoC_EC-C47K_fw	[Phos] <u>AAA</u> ATC TAT CCT CGC TTT ATC CCG ATT GC	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von C47
JB16_deoC_EC-C47R_fw	[Phos] <u>CGT</u> ATC TAT CCT CGC TTT ATC CCG ATT GC	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von C47
J04_deoC_EC-C47S_rv	GATAGCGGCCGGTATTGCCGACC	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von allen in dieser Arbeit erstellten Mutanten der Position C47
JB19_deoC-EC-C47G-T18V_rv	[Phos]CAG GTC CAT CAA TTT CAG TGC ACG CA	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von T18
JB20_deoC-EC-C47G-T18V_fw	[Phos] <u>GTT</u> ACC CTG AAT GAC GAC GAC ACC GA	<i>Round-the-Horn</i> PCR-Mutagenese von T18

9.2 MOLEKULAR- UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

9.2.1 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Einführung von zielgerichteten Punktmutationen in der DNA-Sequenz erfolgte mit Hilfe der *Round-the-Horn*-PCR. Auf diese Weise ist es möglich auf Proteinebene eine gewünschte Aminosäure auszutauschen. Es wird das gesamte Plasmid, welches das zu mutagenisierende Gen beinhaltet, amplifiziert. Die gewünschte Mutation liegt dabei auf dem 5'-Ende des Vorwärts-Primers. Der entsprechende Rückwärts-Primer liegt komplementär zu der Sequenz vor der zu mutierenden Aminosäure vor. Beide Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert und überlappen nicht wodurch die Amplifikation bei dieser Methode exponentiell verläuft. Anschließend wird das 3'-Ende mit dem phosphorylierten 5'-Ende durch einen Ligationsschritt (vgl. 9.2.3) miteinander verbunden. Die Primer wurden bereits phosphoryliert bestellt oder eigenständig mit der T4-Polynukleotidkinase nach Herstellerangaben (1 h bei 37 °C) phosphoryliert. Die Verifikation der PCR erfolgte über die Auftrennung mittels eines

Agarosegels. Die bei der PCR verwendeten Primer sind unter 9.1.4 aufgeführt. Als Polymerase wurde die *Phusion®*-Polymerase gewählt. Das verwendete Pipettierschema sowie das Temperaturprogramm sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 24: Pipettierschema der *Round-the-Horn*-PCR.

	Stammlösung	Volumen [μL]	Endkonzentration
HF-Puffer	5-fach	4.0	1-fach
<i>forward</i> -Primer	100 μM	1.0	0.5 μM
<i>reverse</i> -Primer	100 μM	1.0	0.5 μM
Template-DNA	20 ng/ μL	0.1	0.15 ng/ μL
dNTPs	10 μM	0.4	0.2 mM
Polymerase	2 U/ μL	0.2	0.02 U/ μL
<i>Aqua dest.</i>		13.0	
Summe		20.0	

Tabelle 25: verwendetes Temperaturprogramm der *Round-the-Horn*-PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]
initiale Denaturierung	98	30
Denaturierung	98	10
Anlagerung	65-75	30
Elongation	72	120
finale Elongation	72	300

9.2.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Überprüfung, ob es während einer PCR erfolgreich zur Amplifikation kam, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser kommt es zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld von 180 V für 25 min in 1 x TAE-Puffer (40 mM TRIS; 18 mM Eisessig, 1 mM EDTA; pH 8.0). Es wurde ein 0.8 %-iges Agarosegel verwendet, welches zum Anfärben der DNA-Banden unter UV mit *GelRedTM* (*Biotium Inc.*, Hayward, CA, USA) versetzt wurde. Das Gel wurde in eine Gelkammer gelegt und diese mit TAE-Puffer befüllt, bis das Gel vollständig mit Flüssigkeit bedeckt wurde. Die PCR-Proben wurden mit einem 5 x DNA-Ladepuffer (0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA und 40 % (v/v) Glycerol versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung unter oben genannten Bedingungen konnten die Banden anschließend unter UV sichtbar gemacht werden. Als Standard wurde der GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (*Fermentas*) verwendet.

9.2.3 LIGATION UND RESTRIKTIONSVERDAU

Für die Ligation wurden die Komponenten laut Tabelle 26 zusammengegeben und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge der eingesetzten PCR-Probe richtete sich hierbei nach der Intensität der Bande auf dem Agarosegel. Der Ligationsansatz wurde anschließend zur Inaktivierung der T4 Ligase für 10 min auf 65 °C erhitzt.

Tabelle 26: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

	Menge [µL]
PCR-Ansatz	2-10
T4 Ligase	1
Ligase-Puffer	2
<i>Aqua dest.</i>	7
Summe	20

Zur Trennung der Template-DNA von der neu amplifizierten DNA wurde eine *DpnI*-Restriktion durchgeführt. Hierbei wird von der verwendeten Restriktionsnuklease *DpnI* die methylierte Template-DNA gespalten wohingegen die amplifizierten DNA-Stränge unmethyliert vorliegen und somit erhalten bleiben. Dazu wurden 1 µL *DpnI* zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert.

9.2.4 PLASMIDISOLIERUNG

Die Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des innuPREP Plasmid Mini Fertigkits (9.1.2, *Analytik Jena AG Life Science*, Jena, Deutschland) aus 5 mL Übernachtskulturen. Es wurde unter Beachtung des Herstellerprotokolls vorgegangen. Abweichend zu den Angaben des Herstellers, wurde mit destilliertem Wasser eluiert (2 x 30 µL).

9.2.5 DNA- KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte mittels Extinktionsbestimmung bei 260 nm mit Hilfe des Nanodrop. Für die Messung wurden jeweils 1.5 µL Probe verwendet. Destilliertes Wasser diente als Leerwert. Die Extinktion E bei 260 nm ist hierbei direkt proportional zur DNA-Konzentration. Etwaige Verunreinigungen des Plasmides sind über den Quotienten aus E_{260} und E_{280} abzulesen.

9.2.6 DNA-SEQUENZIERUNGEN

Die in der vorliegenden Arbeit notwendigen Sequenzierungen wurden von *GATC Biotech AG* (Düsseldorf) durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem *Freeware* Programm *BioEdit*.

9.2.7 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER ZELLEN

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurden zwei Lösungen angesetzt:

Lösung 1: 100 mM MgCl_2

Lösung 2: 100 mM CaCl_2 ; 15 % (w/v) Glycerin

400 mL LB Medium wurden mit einer 2 mL Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.4-0.6 inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2000 rcf und 4 °C, wurde das Zellpellet vorsichtig bei 0 °C in 10 mL der Lösung 1 resuspendiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Wiederholung des Zentrifugationsschrittes pelletiert. Nach Resuspension des Zellpellets in 2 mL der Lösung 2, wurden Aliquots von 50 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei – 80 °C gelagert.

Es folgten Kontrollexperimente zur Überprüfung der hergestellten chemisch kompetenten Zellen. Dafür wurden parallel zwei Transformationen durchgeführt, wobei eine pUC-19-Vektor und die Andere Wasser enthielt. Nach erfolgter Transformation wurde auf Agarplatten mit Ampicillinresistenz ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C zeigten bei erfolgreicher Transformation die Agarplatte der E. Coli Zellen mit aufgenommenem pUC-19-Vektor Kolonienbildung wohingegen das Parallelexperiment mit Wasser kein Bakterienwachstum aufweist.

In einem Antibiotogramm der chemisch kompetenten Zellen gegen Kanamycin, Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Streptomycin wurde mittels Übernachtskulturen, welche mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt wurden, das Bakterienwachstum überprüft.

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden zu gefrorenen kompetenten Zellen 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. ein Ligationsansatz zugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach einem

Hitzeschock bei 42 °C für 90 s, wurden 700 µL antibiotikumfreies LB-Medium zugegeben. Es folgte die phänische Expression bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde der Ansatz eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 50-100 µL LB-Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf einem Agarnährboden mit Ampicillinresistenz (100 µg/mL), ausplattiert oder zur Inokulation von Vorkulturen verwendet.

9.2.8 LAGERUNG UND KULTIVIERUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN

Lagerung von Bakterienstämmen

Sollten *E. Coli* Zellen kurzfristig für ein bis zwei Tage gelagert werden, erfolgte dies in Form von LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium bei 4 °C.

Zur langfristigen Lagerung von Zellen, beispielsweise zur Bereitstellung von Enzym für die Synthese, wurden die Proben zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mittels *Zirbus VaCo2 Lyophilisator* (*Zirbus technology GmbH*, Bad Grund, Germany) gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Zellen bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Kultivierung von Bakterienstämmen

Für die Proteinexpression wurden 5 mL Übernachtskulturen mit *E. Coli* BL21(DE3) Zellen, welche zuvor mit dem entsprechenden Vektor transformiert wurden, in LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 120 rpm angesetzt. Anschließend wurde die Kultur in einen 3 L Fernbachkolben mit Schikanen mit 1 L TB-Medium überführt. Wie auch bei der Übernachtskultur, wurde das Expressionsmedium mit Antibiotikum (100mg/µL Endkonzentration) versetzt. Die Expression von mesophilen Proteinen erfolgte bei 25 °C und 120 rpm. Die Expressionen von psychophilen Enzymen (vgl. Kapitel 6.2) wurde bei 18 °C und 120 rpm durchgeführt. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5-0.8 wurde 100 µL IPTG (1 M, sterilfiltriert) zum Starten der Proteinexpression hinzugegeben und weitere 15-20 h bei 25 °C und 120 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C für 20 min.

9.3 PROTEINTECHNIKEN

9.3.1 PROTEINREINIGUNG MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Proteine, welche mit einem terminalen Histidin-Tag versehen waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels IMAC (*immobilisation metal affinity chromatography*) gereinigt. Dieser Histidin-Tag führt durch Wechselwirkung mit den in dem Säulenmaterial immobilisierten Nickelkationen zur Bindung des Proteins. Durch einen Elutionsgradienten können so Verunreinigungen durch andere Proteine entfernt werden und das gewünschte Protein durch einen letzten Waschschrift in guter Ausbeute erhalten werden. Zur Elution wird hierbei ein KPi-Puffer mit 250 mM Imidazol verwendet. Bei den verwendeten Säulen handelt es sich um Säulen mit einem Fassungsvermögen von 5 mL des Herstellers *GE Healthcare*. Diese wurde zunächst auf den verwendeten Puffer (KPi-Puffer, 20 mM, pH 7) äquilibriert und mittels einer Peristaltikpumpe zyklisch mit dem zellfreien Rohextrakt für 15 Minuten beladen. Anschließend wurde die beladene Nickelsäule an ein Äkta®-Reinigungssystem angeschlossen. Die Elution erfolgte über einen Stufengradienten aus 30 mM und 250 mM Imidazol im verwendeten Puffersystem. Die Flussrate betrug konstante 5 mL/Min. Durch Verfolgung der Absorption bei 280 nm konnten so die proteinhaltigen Fraktionen detektiert und vereinigt werden.

9.3.2 ZELLAUFSCHLUSS

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellaufschlüsse erfolgten bei Volumina bis 25 mL mittels Ultraschall. Verwendet wurde dazu der Ultrasonic Desintegrator Sonoplus HP 2070 mit einer dem Volumen entsprechenden Sonotrode. Dazu wurde die gewünschte Menge an Zellen in 20 % (*w/v*) Puffer gelöst und die entstandene Zellsuspension während des Aufschlusses in einem Eisbad gekühlt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20 min, 4 °C, 12000 rcf), um den zellfreien Rohextrakt zu erhalten.

9.3.3 ENTSALZEN UND UMPUFFERN VON PROTEINLÖSUNGEN

Zum Entsalzen oder Umpuffern von Proteinlösungen wurden PD10-Säulen (*GE Healthcare*, München, Deutschland) verwendet. Diese wurden zuvor dreimal mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. 2.5 mL der Proteinlösung wurden auf die Säule gegeben und anschließend mit 3.5 mL des gewünschten Puffers eluiert.

9.3.4 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte zum einen über den *Nanodrop*TM mittels Absorptionsmessung bei 280 nm. Grundlage hierfür ist die Absorption aromatischer Seitenketten der Aminosäuren, wie Tryptophan und Phenylalanin bei 280 nm. Auf diese Weise kann auf die ungefähre Konzentration des Proteins geschlossen werden. Da auch andere Moleküle bei 280 nm absorbieren, wurde diese Methodik lediglich bei gereinigtem Protein verwendet. Als Leerwert wurde der entsprechende Puffer benutzt. Desweiteren wurde auf die Konzentrationsbestimmung nach Bradford zurückgegriffen.^[221] Zur Bestimmung nach Bradford wurde zunächst eine Kalibriergerade, anhand einer Konzentrationsreihe eines BSA-Standards (5-100 µg/mL) in Dreifachbestimmung erstellt. Anschließend wurde 100 µL einer Proteinlösung geeigneter Verdünnung mit 900 µL Bradfordreagenz (0.02 % (w/v) Coomassie G-250, 5 % (v/v) Ethanol, 10 % Phosphorsäure in wässriger Lösung) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 595 nm vermessen.

9.3.5 SDS-PAGE

Zur Überprüfung von Proteinexpressionen und Proteinreinigungen wurden Tricin SDS-Gele angefertigt. Dafür wurden folgende Lösungen benötigt:

Tabelle 27: Lösungen zur Anfertigung von Tricin SDS-Gelelen.

Stammlösungen	
10x Anoden Puffer	1 M TRIS, 0.225 M HCl, pH 8.9
10x Kathoden Puffer	1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.25
3x Gelpuffer	3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % (w/v) SDS, pH 8.45
APS Lösung	10 % (w/v) APS in <i>Aqua dest.</i>
Probenpuffer	12 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mM DTT, <i>ad</i> 150 mM TRIS-HCl (pH 7.0)
Mischlösungen	
Sammelgel Lösung	1.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid lösung (30 %, 37.5:1), 3.0 mL 3x Gelpuffer, 7.4 mL <i>Aqua dest.</i> , 100 µL APS Lösung, 10 µL TEMED
Trenngel Lösung	10 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %, 37.5:1), 10 mL 3x Gelpuffer, 70 mL <i>Aqua dest.</i> , 3 g Glycerin, 150 µL APS Lösung, 15 µL TEMED
Färbelösung	
Fixierlösung	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Kolloidales Coomassie	2 % (v/v) H ₃ PO ₄ , 5 % (w/v) Al ₂ (SO ₄) ₃ , 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) Ethanol

Zur Probenvorbereitung wurden etwa 10 µg Proteinmenge auf 60 µL Lösung mit *Aqua dest.* aufgefüllt und 15 µL Probenpuffer hinzugegeben. Zur Denaturierung des Proteins wurden die Proben für 20 min auf 98 °C erhitzt.

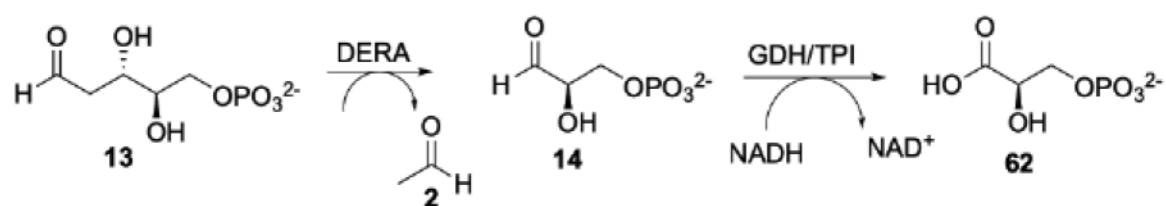
Zur Herstellung der Tricin Gele wurde zunächst das Trenngel in einem *MiniProtein® Tetra Cell Casting Stand* (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen, wobei dieses während der Polymerisation mit 2-Propanol überschichtet wurde. Nach Aushärten des Trenngels wurde das 2-Propanol entfernt und auf dem Trenngel das weniger dichte Sammelgel mit Probentaschen polymerisiert. Es wurden jeweils etwa 10 µL Probe pro Tasche aufgetragen. Als Standard wurden 10 µL des Proteinladders *Rot®-Mark* (10-150 kDa, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Gel wurde an eine Elektrophoresekammer angeschlossen und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

30 V für 20 min; 60 v für 6 min; 190 V für 50 min.

Es folgte eine Inkubation der SDS-PAGE in Fixierlösung für 30 min. Nach einem Waschschriff mit Wasser, wurde das Gel über Nacht mit einer kolloidalen Coomassie Lösung angefärbt. Anschließend wurde mit Wasser entfärbt.

9.3.6 DERA-AKTIVITÄTSASSAY

Die Aktivitätsmessungen der DERA erfolgten in vorliegender Arbeit über einen literaturbekannten GDH/TPI (Glycerophosphatdehydrogenase/Triosephosphatisomerase) gekoppelten Enzymassay.^[55, 222] Hierbei wird die Aktivität bei der Spaltung des natürlichen Substrates 2-Desoxyribose-D-ribose-5-phosphat (DRP, **13**) zu Glyceraldehyd-3-phosphat (**14**) und Acetaldehyd (**2**) betrachtet. Unter Verbrauch von NADH wird das Glyceraldehyd-3-phosphat (**14**) durch die beiden zugesetzten Enzyme GDH und TPI zu Glycerol-3-phosphat (**62**) umgesetzt. Diese Abnahme an NADH wurde photometrisch bei 340 nm.



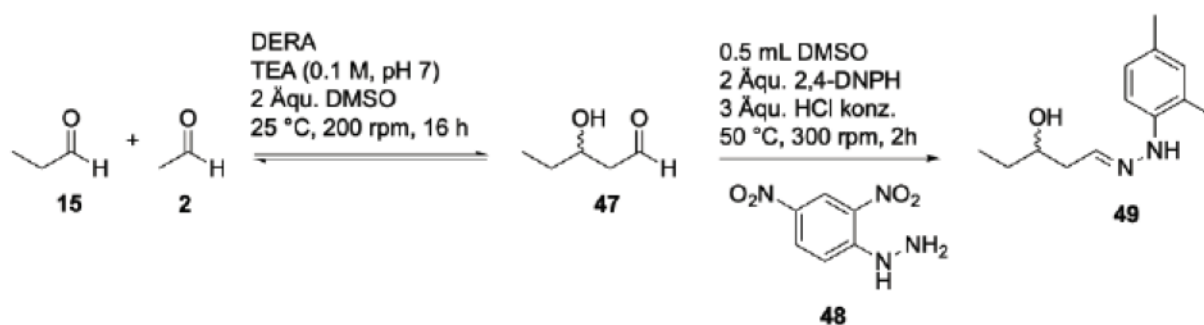
Schema 55: Dem DERA-Aktivitätsassay zugrundeliegende Reaktionen. Bei der DERA-katalysierten Retro-Aldolreaktion werden Acetaldehyd (**2**) und Glyceraldehyd (**14**) gebildet. Dieses wird anschließend durch Isomerisierung unter NADH-Verbrauch reduziert.

Die Reaktionslösung bestand hierbei aus 0.4 mM DRP, 0.15 mM NADH, 4 U GDH, 11 U TPI sowie 10 µL der DERA-Lösung (in TEA-Puffer, 100 mM, pH 7), welche zum Schluss zugegeben wurde. Dabei wurde die Enzymkonzentration der eingesetzten DERA-Lösung so gewählt, dass die lineare Abnahme an NADH einen Wert von 10 % Abnahme nicht überschreitet. Aus dem gemessenen ΔA -Wert konnte anschließend mit dem Küvettenfaktor 16.088 (für ein Messvolumen von 1 mL) die Volumenaktivität berechnet werden. Da der hier gezeigte Assay von *Markus Dick* auf ein Volumen von 400 µL reduziert werden konnte, um die teuren Reagenzien einzusparen, wurde zur Berechnung der Volumenaktivität dementsprechend mit einem Küvettenfaktor von 6.432 gerechnet. Aus der erhaltenen Volumenaktivität kann bei bekannter Enzymkonzentration auf die spezifische Enzymaktivität geschlossen werden.

Formel 1: Formel zur Berechnung der Volumenaktivität. $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ = Absorptionsänderung pro Minute; V = Testvolumen, hier 400 μL ; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient von NADH (6.022 L $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); V = Probenvolumen, hier 10 μL ; d = Schichtdicke; f = Verdünnungsfaktor; Küvettenfaktor = 6.432 (für 400 μL Testvolumen).

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{min}} * V}{\epsilon * \vartheta * d} * f = \frac{\Delta A}{\text{min}} * 6.432 * f$$

9.3.7 SELEKTIVITÄTSASSAY IN ALDOLRICHTUNG



Schema 56: Dem Selektivitätsassay zugrunde liegende Reaktionen. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die Enzymreaktion zum Aldolprodukt unter Ausbildung eines neuen stereogenen Zentrums. Im zweiten Reaktionsschritt folgt die Derivatisierung, welche eine HPLC-Analytik ermöglicht.

Um die bei der DERA-Reaktion entstehenden instabilen Aldolprodukte analysieren zu können, wurde von *Carolyn Bisterfeld* ein Screening entwickelt.^[171, 172] Bei diesem wird durch Derivatisierung der gebildeten Aldolprodukte mit 2,4-DNPH (48) eine Analyse mittels HPLC mit chiraler stationärer Phase ermöglicht. Für die Enzymreaktion wurde eine Stammlösung 1 (vgl. Tabelle 28) erstellt. In 2 mL Reaktionsgefäßen wurde 500 μL TEA-Puffer (0.1 M, pH 7) vorgelegt und 28 μL der Stammlösung 1 zugegeben. Durch Zugabe von 20 μL zellfreien Rohextraktes der DERA-Lösung wurde die Enzymreaktion gestartet und für 16 Stunden bei 25 °C und 200 rpm geschüttelt. Für die folgende Derivatisierung wurde eine Stammlösung 2 (vgl. Tabelle 28) erstellt. 500 μL der Stammlösung 2 wurden zum Reaktionsansatz hinzugegeben und für die Derivatisierung für weitere zwei Stunden bei 50 °C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Produkte mit 600 μL Ethylacetat extrahiert. Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt konnte hierbei eine gute Phasentrennung erreicht werden. Nach Überführung von 450 μL in ein neues Reaktionsgefäß, wurde die organische Phase durch Zugabe einer Spatelspitze MgSO_4 getrocknet und nach erneuter Zentrifugation 350 μL erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels einer Vakuumzentrifuge wurde das Lösungsmittel vollständig entfernt und der Rückstand in *n*-Heptan/*iso*-Propanol (90:10) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der klare gelbe Überstand zur Analyse mittels HPLC verwendet. Die HPLC-Messungen erfolgten an chiraler stationärer Phase. Das Gerät des Herstellers *Dionex* war mit einer LPG-3400A Pumpe, einem

WPS-3000TSL Autosampler, einem DAD-3000 UV-Detektor sowie einem TCC-3000SD Ofen versehen. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine Daicel Chiralpak IA, mit den Maßen 250 mm x 4.6 mm. Das System war auf 25 °C temperiert. Als Lösungsmittel wurde *n*-Heptan/*iso*-Propanol in einem Verhältnis von 80:20 bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 0.5 mL/min verwendet. Es wurde bei 345 nm gemessen. Referenzsubstanzen beider Enantiomere wurden von *Carolin Bisterfeld* zur Verfügung gestellt. Dabei ergaben sich folgende Retentionszeiten:^[171]

HPLC (Chiralpak IA, 0.5 mL·min⁻¹, 80:20 *n*-Heptan/2-Propanol, 345 nm: *S*-**64** *t_R* = 79.0 min.

HPLC (Chiralpak IA, 0.5 mL·min⁻¹, 80:20 *n*-Heptan/2-Propanol, 345 nm: *R*-**64** *t_R* = 70.9 min

Tabelle 28: Zusammensetzung der Stammlösungen des Selektivitätsscreenings.

Stammlösung 1	
Propanal	7 µL (0.1 mmol)
Acetaldehyd	7 µL (0.12 mmol, 1.3 Äqu.)
DMSO	14 µL (0.2 mmol, 2.0 Äqu.)
Stammlösung 2	
DMSO	0.5 mL
HCl, konz.	7 µL
2,4-DNPH	40 mg (0.2 mmol)

9.3.8 AKTIVITÄTSBASIERTE HALBWERTSZEITMESSUNG: ENZYMSTABILITÄT

BEZÜGLICH ACETALDEHYD UND CROTONALDEHYD

Die Bestimmung der Enzymstabilität aller in dieser Arbeit behandelten DERA-Mutanten gegenüber Acetaldehyd (**2**) und Crotonaldehyd basiert auf oben beschriebenem Aktivitätsassay. 900 µL einer DERA-Lösung (in TEA-Puffer, 0.1 M, pH 7) wurden mit 100 µL der entsprechenden wässrigen Aldehydlösung bei 25 °C inkubiert und in bestimmten Zeitintervallen die Aktivität bestimmt. Die Endkonzentration des Acetaldehyds lag bei 0.3 M und die des Crotonaldehyds bei 0.02 M.^[170] Der Messwert direkt nach Zugabe der Aldehydlösung lieferte die Enzymaktivität von 100 %. Mittels einer exponentiellen Zerfallsfunktion erster Ordnung konnte anschließend die Halbwertszeit berechnet werden. (vgl. Formel 2). Der Amplitudenfaktor A wurde zur Anpassung auf 1 normiert.

Formel 2: exponentielle Zerfallsfunktion ersten Grades (1) sowie die daraus resultierende Formel zur Errechnung der Halbwertszeit. Dabei ist A: Amplitude; t_1 : Zerfallskonstante und $T_{1/2}$: Halbwertszeit.

$$(1) y = y_0 + A * e^{\frac{-x}{t_1}}$$

$$(2) T_{\frac{1}{2}} = t_1 * \ln(0.5)$$

9.3.9 LYOPHILISIERUNG VON HALOTAG-DERA_{EC}

2 g Zellen der HaloTag-DERA_{EC} (exprimiert in *E. coli* BL21 (DE3); Verifizierung mittels SDS-PAGE) wurden in 10 mL TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) suspendiert. Nach erfolgtem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde der Rohextrakt bei 7000 x g zentrifugiert. Die Zelllyse erfolgte bei 2 x 10 Min, 5 x 10% Zyklus bei 35%. Der zellfreie Rohextrakt wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Die lyophilisierten Zellen wurden anschließend bis zur Verwendung im Eisfach (bei -8 °C) gelagert.

9.3.10 IMMOBILISIERUNG MITTELS HALOTAGTM-SYSTEM

Zur Immobilisierung der HaloTag-DERA_{EC} wurde zuvor lyophilisiertes Enzym ohne vorherigen Reinigungsschritt verwendet. Die entsprechende *Omnifit*® Glassäule (Ø 3 mm, L 50; 100; 150 mm) wurde mit der HaloLink-Resin Trägermaterial (*Promega*) befüllt. Da das Trägermaterial standardmäßig in ethanolischem Medium (20 Vol-% Ethanol) gelagert wird, war zunächst eine intensive Equilibrierung der Säule) notwendig. Dazu wurde die Säule mit der spritzenpumpe verbunden und zunächst intensiv mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) equilibriert. 25 mg des lyophilisierten Rohextraktes pro mL Lösung wurden in Puffer gelöst und für 20 Min auf Eis gelagert. In Abhängigkeit der Säulenlänge wurde 1 mL des Rohextraktes pro cm der Säule für die Immobilisierung verwendet. Der Immobilisierungsschritt wurde bei einer Flussrate von 30 µL/Min durchgeführt. Danach erfolgte eine Spülung der Säule mit dem entsprechenden Puffer, um überschüssige Enzymlösung zu entfernen. Die theoretisch immobilisierte Enzymaktivität auf der Säule wurde durch Messung der entsprechenden Enzymaktivität der Enzymlösung vor und nach dem Immobilisierungsschritt erhalten.

9.4 CHEMISCHE METHODEN

9.4.1 LÖSUNGSMITTEL

Dichlormethan, Diethylether, Essigsäureethylester und Petrolether wurden vor Gebrauch mittels Rotationsverdampfer zur Reinigung destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel wurden ohne Reinigungsschritt verwendet. Für analytische Zwecke wie NMR, IR, Chirale GC, GC-MS wurde auf Lösungsmittel mit entsprechend hoher Reinheit gemäß den Anforderungen zurückgegriffen.

9.4.2 CHROMATOGRAPHIE

Säulenchromatographie

Zur Reinigung oder Separation von Reaktionsprodukten mittels Säulenchromatographie wurde kommerziell erhältliches Kieselgel 60 M (0.040–0.063 mm, 230–400 mesh) der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet. Als Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische wurden Dichlormethan, Diethylether, Essigsäureethylester, *n*-Pentan oder Petrolether gebraucht.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle oder Verfolgung von Säulenchromatographien wurden Dünnschichtchromatographien mittels Fertigfolien aus POLYGRAM® SIL G/UV254 mit Fluoreszenzindikator der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) eingesetzt. Die Detektion erfolgte im Anschluss entweder über UV-Absorption oder nach Behandlung mit einer Cer-Molybdat-Lösung (10 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 25 g Molybdatophosphorsäure, 60 mL konz. H_2SO_4 , 940 mL H_2O) und anschließender Entwicklung mittels Heißluftföhn.

Gaschromatographie

Zur Analyse von Produktgemischen wurden gaschromatographische Messung an einer stationären chiralen Phase mit Hilfe eines Gaschromatographen *Thermo Scientific Trace® GC Ultra* gemessen. Dabei wurde als chirale Säule Hydrodex- β -3P (*Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland, Länge/Innendurchmesser = 25 m/0.25 mm) verwendet. Das entsprechende Temperaturprogramm wird bei der Beschreibung der jeweiligen Substanz angegeben. Falls nicht anders angegeben wurden zur Messung 1 μL der Probensubstanz in 1 mL MTBE gelöst und davon 1 μL injiziert. Als Trägergas wurde H_2 bei 0.06 bar verwendet. Ein FID Detektor wurde verwendet. Anschließend wurden zur Auswertung die Peakflächen manuell integriert.

High-Performance-Liquid Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden an einem Gerät der Firma *Dionex* an einer stationären chiralen Phase durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Daicel Chiralpak IA (250 mm x 4.6 mm) Säule, welche auf 25 °C temperiert wurde. Die Messeinheit war gekoppelt mit einer LPG-3400A Pumpe, einem WPS-3000TSL Autosampler, einem DAD-3000 UV-Detektor und einem TCC-3000SD Ofen. Als Lösungsmittel wurde Gemisch aus 80:20 *n*-Heptan:2-Propanol bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 mL min⁻¹. Zur Messung wurden die jeweiligen Proben in einer Mischung aus 90:10 *n*-Heptan:2-Propanol gelöst und bei 345 nm vermessen.

9.4.3 SPEZIFISCHER DREHWERT

Die Bestimmung des spezifischen Drehwertes von optisch aktiven Substanzen erfolgte an einem KRÜSS P-8000-TF Polarimeter bei einer Wellenlänge von 589 nm (Natrium-D-Linie). Die jeweiligen Substanzen wurden in CHCl₃ gelöst und in einer auf 20 °C temperierten 10 cm Küvette in Mehrfachbestimmung vermessen. Der Drehwert wurde mit *Biot equation* berechnet.

9.4.4 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN

NMR-Spektroskopie

Messungen von ¹H-NMR-Spektren bzw. ¹³C-NMR-Spektren erfolgten an einem *Bruker* Avance/DRX 600 NMR Spektrometer bei einer Messfrequenz von 600 MHz bzw. 151 MHz in kommerziell erhältlichem, deuterierten Lösungsmittel bei 297 K.

Die erhaltenen ¹H- und ¹³C-Spektren wurden anhand von charakteristischen Verschiebungen für das jeweilige Lösungsmittel referenziert:

CDCl₃: ¹H: 7.26 ppm; ¹³C: 77.00 ppm

D₂O: ¹H: 4.79 ppm

d₆-DMSO: ¹H: 2.5 ppm; ¹³C: 40.00 ppm

Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm und die Kopplungskonstanten *J* in Hz angegeben. Zur Zuordnung der Signale wurden zudem DEPT-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren verwendet. Die Multiplizitäten wurden mit Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), und Multipllett (m) beschrieben.

Infrarot-Spektroskopie

Die Aufnahme von IR-Spektren erfolgte an einem *PerkinElmer FT-IR SpectrumTwo* Infrarot Spektrometer der Firma *Perkin Elmer* (Waltham, MA, USA) im ATR-Verfahren (engl. *attenuated total reflection*, abgeschwächte Reflexion). Die gelösten Proben wurden direkt auf den Kristall aufgetragen und nach Verdampfen des Lösungsmittels vermessen. Die Signale wurden in Wellenzahlen $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1})$ angegeben.

HRMS

Die Messungen wurden von der Massenspektrometrie-Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Proben wurden dazu in Acetonitril gelöst und auf einem UHR-QTOF *maXis 4G* (Bruker Daltonics) vermessen. Ionisation: ESI. Einstellungen: 0.3 bar, 180 °C.

Die gemessenen und erwarteten Molekularzusammensetzungen wurden bei den jeweiligen Verbindungen angegeben.

9.4.5 FLOW-GERÄTE

Spritzen und Spritzenpumpen

Für die Experimente im Flow-Modus wurde eine *Legato™ 100* Spritzenpumpe (*single syringe infusion pump*) verwendet. Damit mehrere Spritzen zeitgleich in der Spritzenpumpe verwendet werden konnten, wurde ein entsprechender Aufsatz mit Hilfe eines 3D-Druckers angefertigt (vgl. Anhang). Zur Verwendung kamen Luer-Lock Spritzen der Firma *B. Braun Injekt* (5 mL, 10 mL, 20 mL).

FLLEX Modul

Zur *inline* Extraktion und Phasentrennung wurde ein FLLEX Modul der Firma *Syrris Asia* genutzt. Das Modul war ausgestattet mit originalen FLLEX PTFE oder FHLP02500 Membranen der Firma *Merck*. Vor Verwendung wurde bei den Membranen der Firma *Merck* zuvor die entsprechenden Polyethylen-Folien entfernt. Der Gesamtdruck der Apparatur wurde konstant bei 3.00 bar gehalten. In Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels wurde der Membrandruck (*cross-membrane pressure*, kurz: CRP) gewählt.

Inaktivierung der Glasgeräte (Silanisierung)

Um jegliche acide Quelle zu vermeiden, wurden die *Omnifit®* Glassäulen, welche als Festbettreaktoren in den durchgeführten Experimenten im flow-Modus verwendet worden sind, zuvor inaktiviert. Dafür wurden die Säulen in einer 10-prozentigen Me_3SiCl -Lösung (in Dichlormethan) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Glasgeräte sorgfältig mit Dichlormethan gespült und in einem zweiten reinigungsschritt mit Aceton gespült. Bis zur Verwendung wurden die inaktivierten Glassäulen im Heizschrank gelagert.

9.4.6 RESPONSE-FAKTOR ANALYSE

Aufgrund der Instabilität des Monoaldolproduktes **6** wurden gaschromatographische Messungen zur Bestimmung der Umsätze zu den jeweiligen Reaktionsprodukten gewählt. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden Standardreihen der entsprechenden Substanzen vermessen, um Response-Faktoren für das Modellsubstrat Hexanal (**5**) und die Produkte der sequenziellen Reduktion **8**, der Aminierung **10**, der Allylierung **9** und des Aldol-Kondensationsprodukts **11** zu berechnen. Die entsprechenden Graphen sind in Abbildung 30-Abbildung 34 dargestellt.

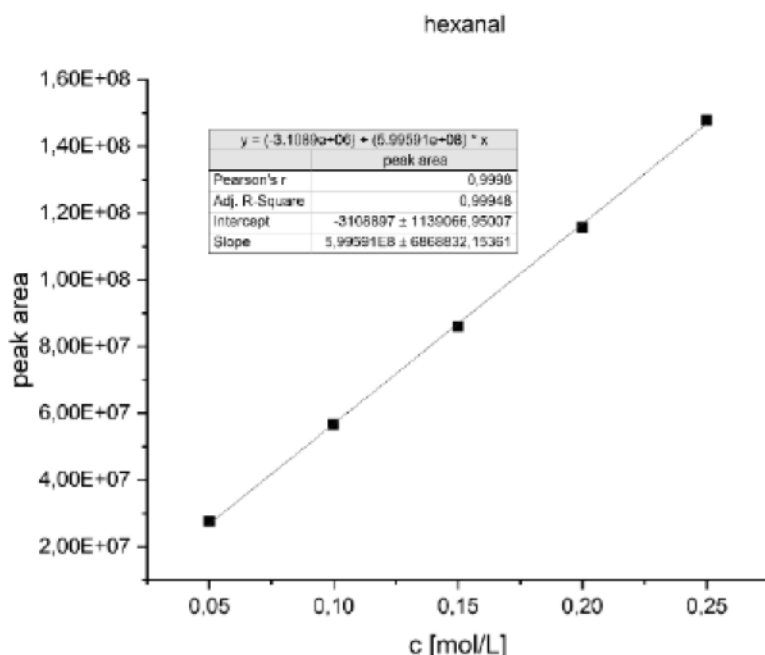


Abbildung 30: Standardreihe des Substrats Hexanal (5). Dafür wurden GC-Messungen bei Hexanalkonzentrationen von 0,05 bis 0,2 mol/L durchgeführt. Säule: FS-Hydrodex- β 3P; 25 mm*0,25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H_2 (0,6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min bis zu 200 °C-2min.

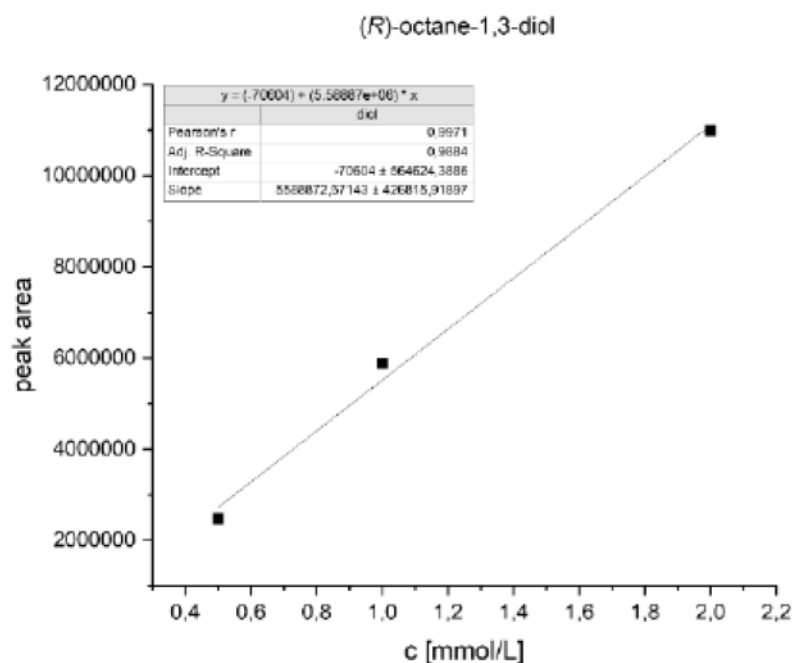


Abbildung 31: Standardreihe des Produkts 8. Dafür wurden GC-Messungen bei Konzentrationen von 0.5 bis 2.0 mmol/L durchgeführt. Säule: FS-Hydrodex-β3P; 25 mm*0,25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H₂ (0,6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min bis zu 200 °C-2min.

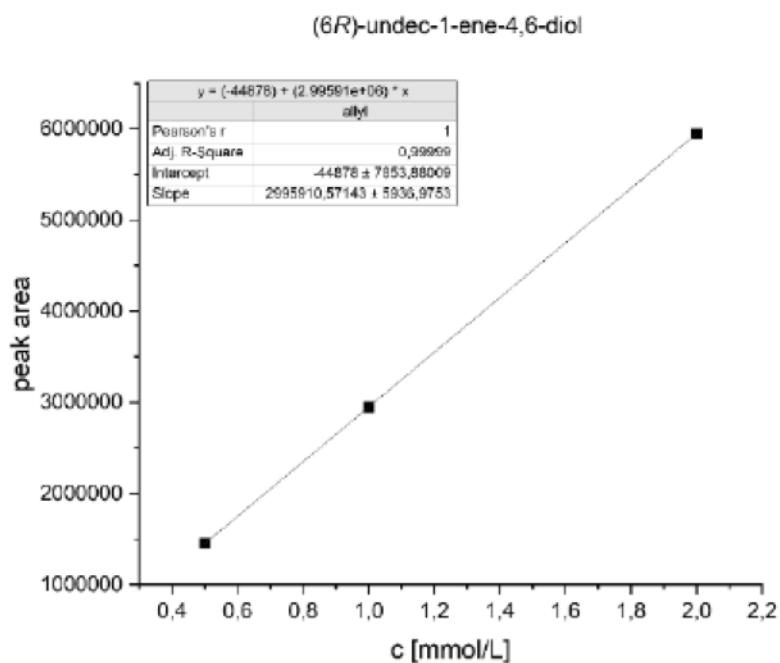


Abbildung 32: Standardreihe des Produkts 9. Dafür wurden GC-Messungen bei Konzentrationen von 0.5 bis 2.0 mol/L durchgeführt. Säule: FS-Hydrodex-β3P; 25 mm*0,25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H₂ (0,6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min bis zu 200 °C-2min.

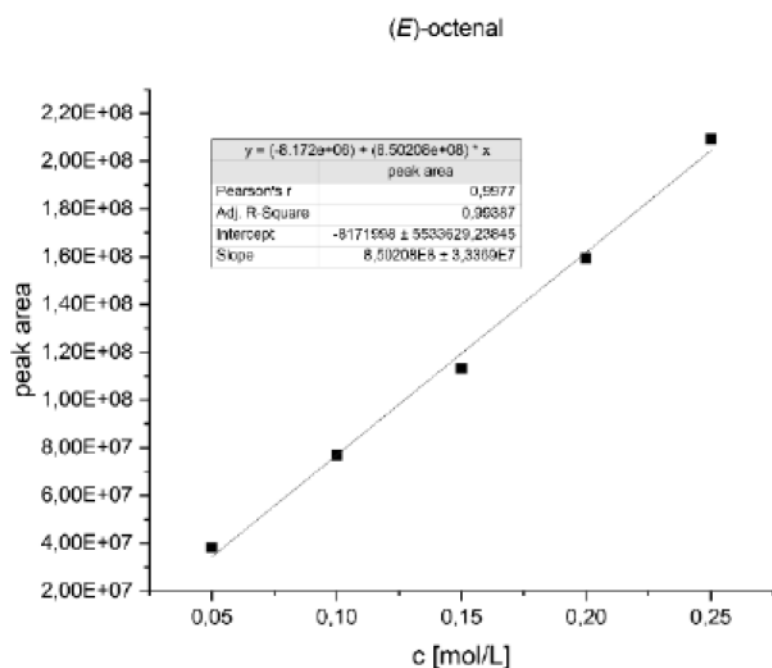


Abbildung 33: Standardreihe des Produkts 11. Dafür wurden GC-Messungen bei Konzentrationen von 0,5 bis 2,0 mol/L durchgeführt. Säule: FS-Hydrodex-β3P; 25 mm*0,25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H₂ (0,6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min bis zu 200 °C-2min.

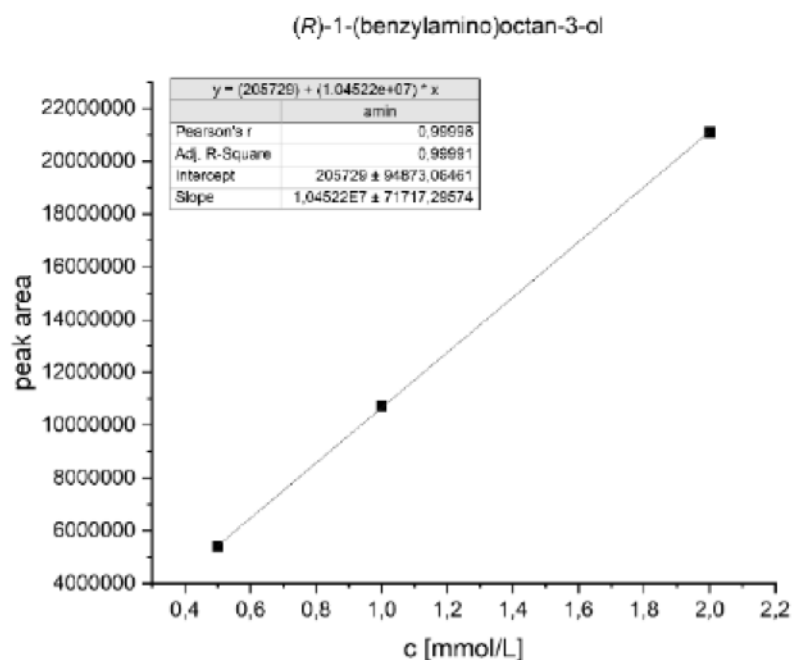


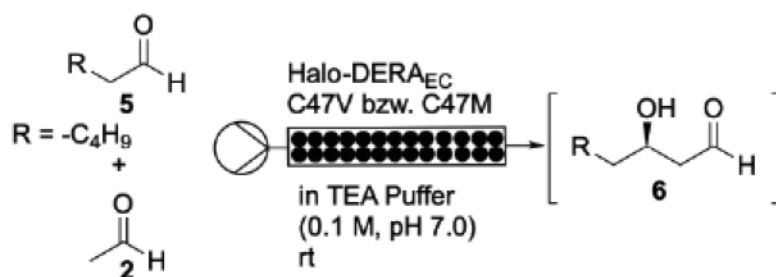
Abbildung 34: Standardreihe des Produkts 10. Dafür wurden GC-Messungen bei Konzentrationen von 0,5 bis 2,0 mol/L durchgeführt. Säule: FS-Hydrodex-β3P; 25 mm*0,25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H₂ (0,6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min bis zu 200 °C-2min.

9.4.7 BESTIMMUNG DER RELATIVEN UMSÄTZE MITTELS GC

Da das Monoaldolprodukt **6** nicht stabil genug ist, um in reiner Form isoliert und analysiert zu werden, wurde zunächst der relative Umsatz mittels GC berechnet. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, das 1 mM 2-Phenylethanol als internen Standard enthielt. Die Peakflächen der entsprechenden Substanzen wurden dann auf die Peakfläche des internen Standards normiert, und die prozentualen Anteile der Produkte wurden berechnet, um den relativen Umsatz zu bestimmen. Entsprechende Chromatogramme sind im Anhang beigefügt (vgl. Abs. 10.4)

9.5 SYNTHSEVORSCHRIFTEN

9.5.1 SYNTHESE VON (*R*)-3-HYDROXYOCTANAL (**6**): ISOLATION & OPTIMIERUNG



Allgemeine Vorgehensweise

Für die ersten Experimente zur Synthese des Monoaldolproduktes wurde Hexanal (**5**) als Modellsubstrat ausgewählt. Ein Festbettreaktor (Ø 3 mm, L 50 mm), welcher den immobilisierten Biokatalysator Halo-DERA_{EC}-C47M bzw. Halo-DERA_{EC}-C47V enthält, wurde verwendet. Die beiden Substrate Hexanal (**5**) und Acetaldehyd (**2**) wurden in den entsprechenden Konzentrationen in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) in einem Becherglas vorgelegt, mit einer Spritze aufgezogen und diese anschließend gründlich geschüttelt. Der erste Milliliter der Reaktionslösung wurde verworfen, um ein Einstellen eines Gleichgewichtes in dem Reaktor zu gewährleisten. Das Produktgemisch wurde auf Eis gesammelt. Der Umsatz wurde gaschromatographisch bestimmt. Dazu wurden 500 µL der entsprechenden Produktlösung dreimal mit Ethylacetat, welches zusätzlich mit 1 mM 2-Phenylethanol als interner Standard versetzt wurde, extrahiert. Nach Trocknung mit MgSO₄ wurde der Überstand in GC-Probenials überführt und vermessen.

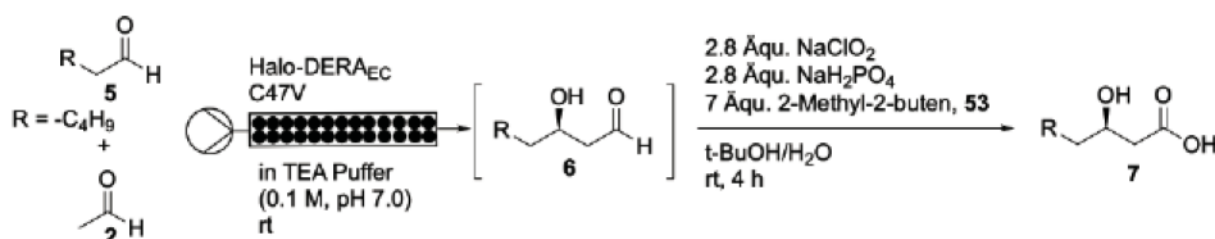
Optimierung mittels Design of Experiment (DoE)

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde ein systematischer Ansatz verfolgt, nämlich die Verwendung eines Design of Experiment. Dazu wurden die Programme DesignExpert® (Version 7) und OriginPro® (2021) verwendet. Zunächst wurde die DERA-Variante Halo-DERA_{EC}-C47M gewählt. Für die erste Optimierungsrunde wurde ein factorial Design verwendet. Dabei wurden die drei Faktoren Durchflussmenge, Acetaldehyd (2) und Hexanal (5) auf zwei Ebenen untersucht, was zu 23 Versuchen mit je einem Duplikat, also 16 Versuchen, führte. Als Niveau wurde jeweils ein minimaler und ein maximaler Grenzwert des jeweiligen Parameters festgelegt, die sich stark voneinander unterschieden. Die gesammelten Daten wurden dann mit DesignExpert® und OriginPro® ausgewertet.

An diese Optimierungsrunde schloss sich eine weitere Feinoptimierung mittels eines Response-Surface-Designs an. Die Bedingungen wurden von DesignExpert® auf der Grundlage der Anforderung berechnet, den Umsatz des einfachen Aldolprodukts 7 zu maximieren und den Umsatz des doppelten Aldolprodukts 51 und des Nebenprodukts Octenal 11 zu minimieren. Insgesamt wurden 25 Experimente durchgeführt. Um Duplikate zu erzeugen, wurde eine zweite Säule mit denselben Experimenten parallel durchgeführt, jedoch in einer anderen Reihenfolge. Alle Experimente wurden in einem klimatisierten Labor durchgeführt, sodass die Raumtemperatur konstante 22 °C betrug.

Die Rohdaten des factorial Designs als auch des Response-Surface-Designs sind im Anhang beigefügt (vgl. Abs. 10.4).

9.5.2 SYNTHESE VON (*R*)-HYDROXYOCTANSÄURE (7)



Zwei *Omnifit*® Glassäulen (Ø 3 mm, L 100 mm), welche die immobilisierte Halo-DERA_{EC}-C47V enthielten, wurden parallel verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mL Reaktionslösung pro Festbettreaktor verwendet (in Summe also 20 mL). 10 mL Substratlösung mit 0.2 M Hexanal ((5); 0.2 mmol; 20 mg) und 0.6 M Acetaldehyd ((2); 0.6 mmol; 26.5 mg) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit der Spritze aufgezogen, wobei auf eine gründliche Durchmischung geachtet worden ist. Die Substratlösung wurde bei einer

Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch die Festbettreaktoren gepumpt. Um den Umgang mit dem stark flüchtigen Acetaldehyd (**2**) zu vereinfachen wurde eine 1 M Stammlösung von Acetaldehyd (**2**) verwendet. Nachdem die Substratlösung die beiden Festbettreaktoren durchlaufen hat, wurden die Produktgemische mittels eines T-Stücks miteinander vereinigt und anschließend durch das FLLEX Modul zur *inline* Extraktion und Phasentrennung gepumpt. Dabei wurde Diethylether zur Extraktion genutzt, welches mit einer Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das FLLEX-Modul gepumpt worden ist. Die extrahierte organische Phase wurde in einen Rundkolben gepumpt und das Lösungsmittel wurde vorsichtig entfernt (nicht bis zur Trocknung!). Das erhaltene Intermediat (**6**) wurde in 20 mL *t*-Butanol gelöst. Nach Zugabe von 7 Äqu. 2-Methyl-2-Buten (**53**) (28 mmol, 2.9 mL) und 10 mL einer NaClO_2 -Lösung (2.8 Äqu., 11.2 mmol, 1.00 g) sowie nach tropfenweiser Zugabe einer wässrigen $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (2.8 Äqu. 11.2 mmol, 1.35 g) wurde die Reaktion für 4 h bei rt gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktion mit 30 mL Wasser verdünnt und 1 M HCl wurde hinzugefügt zur pH-Einstellung von 1-3. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Diethylether extrahiert und die organischen Phasen mit NaCl gewaschen. Nach anschließender Trocknung über MgSO_4 , wurde das Lösungsmittel entfernt. Zur Reinigung des Produktes wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{AcOH}$ 98:2:0.1). 270 mg (1.7 mmol, 43%) des reinen Produktes **7** wurden isoliert.

$R_f = 0.16$

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3):

δ 4.04 (s, 1H, 3-OH), 2.57 (dd, $^2J_{2b,2a} = 16.6$ Hz, $^3J_{2b,3} = 3.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.48 (dd, $^2J_{2a,2b} = 16.5$ Hz, $^3J_{2a,3} = 9.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 1.57 – 1.54 (m, 1H, 3-H), 1.47 – 1.39 (m, 2H, 4-H), 1.36 – 1.24 (m, 5H, 5-H, 6-H, 7-H), 0.89 (t, 3H, 8-H).

^{13}C (151 MHz, CDCl_3):

δ 176.58 (C-1), 67.01 (C-3), 40.06 (C-2), 35.45 (C-4), 30.63 (C-5), 24.10 (C-6), 21.55 (C-7), 12.98 (C-8).

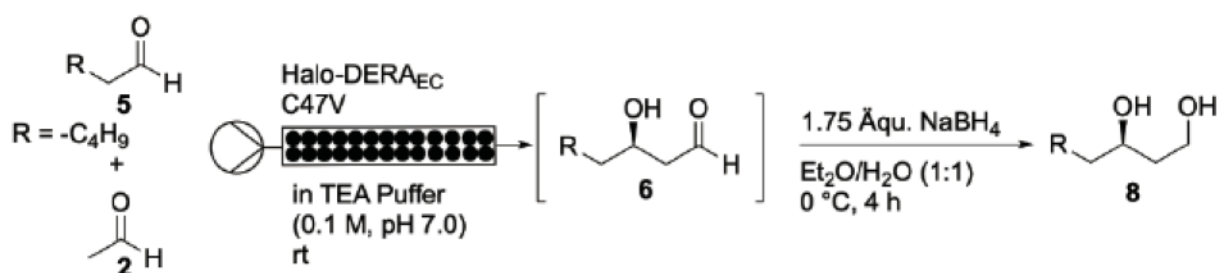
IR (ATR): 3387, 2930, 2864, 2657, 1711, 1405, 1262, 173, 1079, 941, 882, 805, 621.

$[\alpha]_D^{25} = -10$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

HRMS (ESI, positive-ion): m/z (%) berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 183.0992; gefunden: 183.0992.

Die analytischen Daten stehen im Einklang mit Literaturwerten.^[223]

9.5.3 SYNTHESE VON (*R*)-OCTAN-1,3-DIOL (**8**)



Zwei *Omnifit*® Glassäulen (Ø 3 mm, L 100 mm), welche die immobilisierte Halo-DERA_{EC}-C47V enthielten, wurden parallel verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mL Reaktionslösung pro Festbettreaktor verwendet (in Summe also 20 mL). 10 mL Substratlösung mit 0.2 M Hexanal ((**5**); 0.2 mmol; 20 mg) und 0.6 M Acetaldehyd ((**2**); 0.6 mmol; 26.5 mg) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit der Spritze aufgezogen, wobei auf eine gründliche Durchmischung geachtet worden ist. Die Substratlösung wurde bei einer Flussrate von 70 µL/min durch die Festbettreaktoren gepumpt. Um den Umgang mit dem stark flüchtigen Acetaldehyd (**2**) zu vereinfachen wurde eine 1 M Stammlösung von Acetaldehyd (**2**) verwendet. Nachdem die Substratlösung die beiden Festbettreaktoren durchlaufen hat, wurden die Produktgemische mittels eines T-Stücks miteinander vereinigt und anschließend durch das FLLEX-Modul zur *inline* Extraktion und Phasentrennung gepumpt. Dabei wurde Diethylether zur Extraktion genutzt, welches mit einer Flussrate von 70 µL/min in das FLLEX-Modul gepumpt worden ist. Die extrahierte organische Phase wurde in einen Rundkolben gepumpt. Nach Zugabe von 1.75 Äqu. NaBH₄ (265 mg, 7.00 mmol) wurde die Reaktion für 4 h bei 0 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch die Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung beendet und dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei reduziertem Druck entfernt. Zur Reinigung des Produktes wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (PE:EE 50:50). 326 mg (2.24 mmol, 56%) des reinen Produktes **8** wurden isoliert.

R_f = 0.23

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ .4.12 (q, 1H, 6-H), 3.88 – 3.86 (m, 2H, 9-H), 2.75 (bs, 1H, 6-OH), 2.17 (s, 1H, 9-OH), 1.75 – 1.63 (m, 2H, 5-H), 1.58 – 1.37 (m, 2H, 7-H), 1.31 – 1.25 (m, 6H, 4-H, 3-H, 2-H), 0.90 (t, 3H, 1-H).

¹³C (151 MHz, CDCl₃):

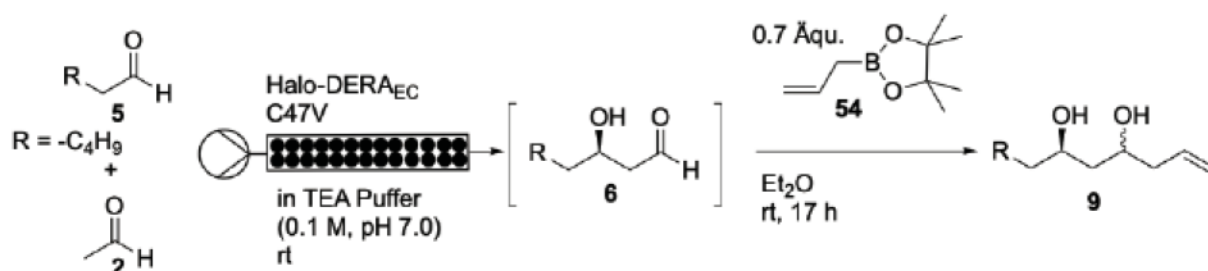
δ 72.49 (C-1), 62.00 (C-3), 38.31 (C-2), 37.86 (C-4), 31.81 (C-5), 25.20 (C-7), 22.63 (C-6), 14.03 (C-8).

IR (ATR): 3338, 2930, 2859, 1741, 1458, 1373, 1212, 1128, 1055, 715, 637.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -6$ ($c = 0.1$, CHCl_3). HRMS (ESI, positive-ion): m/z (%) berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NaO}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 169.1199; gefunden: 169.1201

Die analytischen Daten stehen im Einklang mit Literaturwerten.^[224]

9.5.4 SYNTHESE VON (6*R*)-UNDEC-1-EN-4,6-DIOL (9)



Zwei *Omnifit*® Glassäulen ($\varnothing$ 3 mm, L 100 mm), welche die immobilisierte Halo-DERAEC-C47V enthielten, wurden parallel verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mL Reaktionslösung pro Festbettreaktor verwendet (in Summe also 20 mL). 10 mL Substratlösung mit 0.2 M Hexanal ((5); 0.2 mmol; 20 mg) und 0.6 M Acetaldehyd ((2); 0.6 mmol; 26.5 mg) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit der Spritze aufgezogen, wobei auf eine gründliche Durchmischung geachtet worden ist. Die Substratlösung wurde bei einer Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch die Festbettreaktoren gepumpt. Um den Umgang mit dem stark flüchtigen Acetaldehyd (2) zu vereinfachen wurde eine 1 M Stammlösung von Acetaldehyd (2) verwendet. Nachdem die Substratlösung die beiden Festbettreaktoren durchlaufen hat, wurden die Produktgemische mittels eines T-Stücks miteinander vereinigt und anschließend durch das FLLEX-Modul zur *inline* Extraktion und Phasentrennung gepumpt. Dabei wurde Diethylether zur Extraktion genutzt, welches mit einer Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das FLLEX-Modul gepumpt worden ist. Die extrahierte organische Phase wurde anschließend zur Trocknung durch einen Festbettreaktor gepackt mit Molekularsieb (4 Å) gepumpt. Nach Zugabe von 0.7 Äqu. Allylboronsäureester (525 μL , 2.8 mmol, 54) wurde die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktionslösung unter reduziertem Druck eingeeengt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (PE:EE 80:20). 351 mg (1.88 mmol, 58%) des Produktes 9 wurden isoliert (*syn:anti* 80:20).

$R_f = 0.64$

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 5.94 – 5.72 (m, 2H, 2- H_{syn} , 2- H_{anti}), 5.14 – 5.05 (m, 2H, 1- $\text{H}_{\text{a/syn}}$, 1- $\text{H}_{\text{b/syn}}$), 4.96 – 4.82 (m, 2H, 1- $\text{H}_{\text{a/anti}}$, 1- $\text{H}_{\text{b/anti}}$), 4.09 – 3.85 (m, 2H, 4-H, 6-H), 2.42 – 2.30 (m, 1H, 3- H_{a}), 2.27 – 2.16 (m, 1H, 3- H_{b}), 1.89 (dt, 1H, $^3J_{\text{syn}} = 13.85$ Hz, 5- H_{a}), 1.75 (dt, 1H, $^3J_{\text{anti}} = 4.42$ Hz, 5- H_{b}), 1.64 (d, 2H, 4-OH, 6-OH), 1.43 – 1.41 (m, 2H, 7-H), 1.34 – 1.19 (m, 6H, 8-H, 9-H, 10-H), 0.89 (t, 3H, 11-H).

^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ 134.91 (C-2 $_{\text{syn}}$), 132.91 (C-2 $_{\text{anti}}$), 116.60 (C-1 $_{\text{syn}}$), 112.48 (C-1 $_{\text{anti}}$), 70.37 (C-4), 67.30 (C-6), 40.55 (C-3), 40.06 (C-5), 37.00 (C-7), 30.73 (C-9), 23.66 (C-8), 21.57 (C-10), 13.00 (C-11).

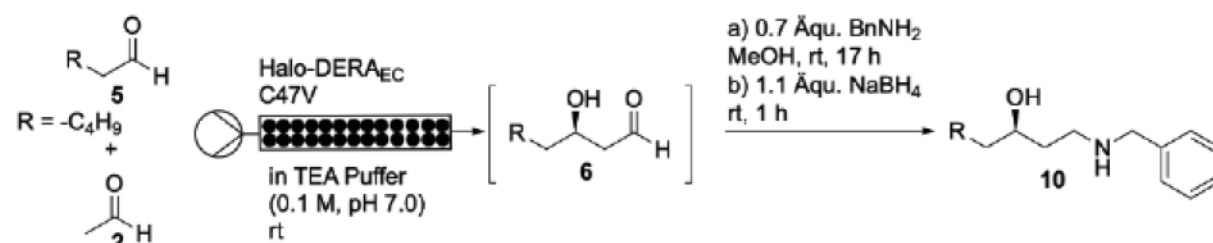
IR (ATR): 3064, 2930, 2864, 1712, 1418, 1296, 1186, 1128, 1083, 1050, 934, 876, 611.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

HRMS (ESI, positive-ion): m/z (%) berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 187.1693; gefunden: 187.1694.

Die analytischen Daten stehen im Einklang mit Literaturwerten.^[212]

9.5.5 SYNTHESE VON (*R*)-1-(BENZYLAMINO)OCTAN-3-OL (10)



Zwei *Omnifit*® Glassäulen (Ø 3 mm, L 100 mm), welche die immobilisierte Halo-DERA_{EC}-C47V enthielten, wurden parallel verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mL Reaktionslösung pro Festbettreaktor verwendet (in Summe also 20 mL). 10 mL Substratlösung mit 0.2 M Hexanal ((5); 0.2 mmol; 20 mg) und 0.6 M Acetaldehyd ((2); 0.6 mmol; 26.5 mg) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit der Spritze aufgezogen, wobei auf eine gründliche Durchmischung geachtet worden ist. Die Substratlösung wurde bei einer Flussrate von 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch die Festbettreaktoren gepumpt. Um den Umgang mit dem stark flüchtigen Acetaldehyd (2) zu vereinfachen wurde eine 1 M Stammlösung von Acetaldehyd (2) verwendet. Nachdem die Substratlösung die beiden Festbettreaktoren durchlaufen hat, wurden die Produktgemische mittels eines T-Stücks miteinander vereinigt und anschließend durch das FLLEX-Modul zur *inline* Extraktion und Phasentrennung gepumpt. Dabei wurde Diethylether zur Extraktion genutzt, welches mit einer Flussrate von

70 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das FLLEX-Modul gepumpt worden ist. Die extrahierte organische Phase wurde in einen Rundkolben gepumpt und das Lösungsmittel wurde vorsichtig entfernt (nicht bis zur Trocknung!). Das erhaltene Intermediat (**6**) wurde in 15 mL MeOH gelöst. Nach Zugabe von 0.7 Äqu. Benzylamin (**56**) (206 μL , 2.8 mmol) wurde die Reaktion für 17 h bei RT zur Bildung des Imin-Intermediates gerührt. Anschließend wurden 1.1 Äqu. NaBH_4 (170 mg, 4.48 mmol) hinzugefügt und die Reaktion für eine weitere Stunde bei rt gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ 98:2:0.01). 270 mg (1.15 mmol, 58%) des reinen Produktes **10** (Base) wurden isoliert.

$R_f = 0.15$

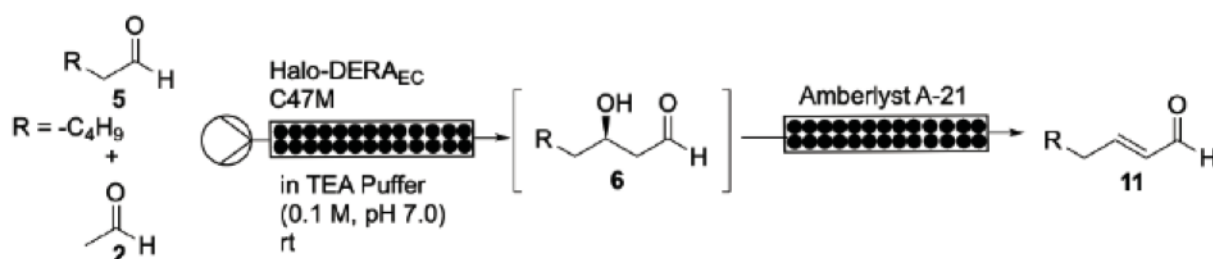
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.34 – 7.29 (m, 4H, Ar- H_{ortho} , Ar- H_{para}), 7.25 – 7.21 (m, 1H, Ar- H_{meta}), 3.78 (d, 2H, 9-H), 2.65 – 2.57 (m, 2H, 1-H), 2.14 – 1.90 (m, 2H, 2-H), 1.55 – 1.48 (m, 2H, 4-H), 1.40 – 1.17 (m, 6H, 5-H, 6-H, 7-H), 0.88 (t, 3H, 8-H).

^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ 140.26 (C-10), 128.31 (C-11, C-12, C-13, C-14, C15), 54.00 (C-9), 49.45 (C-1), 31.61 (C-4), 29.95 (C-2), 29.02 (C-5), 27.05 (C-6), 22. (C-7), 14.07 (C-8).

IR (ATR): 3032, 2926, 2858, 2812, 1747, 1496, 1454, 1354, 1218, 121, 1031, 966, 728, 698. $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -6$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

HRMS (ESI, positive-ion): m/z (%) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 236.009; gefunden: 236.2008

9.5.6 SYNTHESE VON (*E*)-OCT-3-ENAL (**11**)



Zwei *Omnifit*® Glassäulen ($\varnothing$ 3 mm, L 100 mm), welche die immobilisierte Halo-DERA_{EC}-C47M enthielten, wurden parallel verwendet. Dabei wurden jeweils 10 mL Reaktionslösung pro Festbettreaktor verwendet (in Summe also 20 mL). 10 mL Substratlösung mit 0.2 M

Hexanal ((5); 0.2 mmol; 20 mg) und 0.6 M Acetaldehyd ((2); 0.6 mmol; 26.5 mg) in TEA Puffer (0.1 M, pH 7.0) wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit der Spritze aufgezogen, wobei auf eine gründliche Durchmischung geachtet worden ist. Die Substratlösung wurde bei einer Flussrate von 50 μ L/min durch die Festbettreaktoren gepumpt. Um den Umgang mit dem stark flüchtigen Acetaldehyd (2) zu vereinfachen wurde eine 1 M Stammlösung von Acetaldehyd (2) verwendet. Nachdem die Substratlösung die beiden Festbettreaktoren durchlaufen hat, wurden die Produktgemische mittels eines T-Stücks miteinander vereinigt und anschließend durch das FLLEX-Modul zur *inline* Extraktion und Phasentrennung gepumpt. Als Lösungsmittel zur Extraktion wurde Ethylacetat verwendet, welches mit einer Flussrate von 50 μ L/min in das FLLEX-Modul gepumpt worden ist. Zur Trocknung wurde die organische Phase anschließend durch einen Festbettreaktor gepackt mit Molekularsieb (4 Å) gepumpt. Folgend wurde die Reaktionslösung durch zwei in Reihe geschaltete Festbettreaktoren ($\varnothing$ 3 mm, L 150 mm), welche das basische Ionenaustauschharz Amberlyst A-21 enthielten, mit einer Flussrate von 10 μ L/min gepumpt. Das Produktgemisch wurde in einem Rundkolben gesammelt. 304 mg (2.4 mmol, 60 %) des reinen Produktes 11 wurden ohne weiteren Reinigungsschritt isoliert.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 9.51 (d, 1H, $^3J = 1.1$ Hz, 1-H), 6.89 – 6.81 (m, 1H, 3-H), 6.12 (ddt, 1H, $^3J = 15.6$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.58$ Hz), 2.34 (td, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, 4-H), 1.52 (p, 2H, 5-H), 1.38 – 1.34 (m, 4H, 7-H, 8-H), 0.91 (t, 3H, 8-H).

^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ 191.74 (C-1), 157.62 (C-3), 133.14 (C-2), 33.08 (C-4), 311.67 (C-6), 29.14 (C-5), 22.66 (C-7), 14.06 (C-8).

IR (ATR): 2955, 2930, 2860, 1688, 1635, 1467, 1381, 1146, 1095, 974, 900, 632.

HRMS (ESI, positive-ion): m/z (%) berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 128.1196; gefunden: 128.1194.

10 ANHANG

AMINOSÄUREN		
Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Qx
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

10.1 GEN- UND PROTEINSEQUENZEN

10.1.1 DERAEC (*E. COLI*)

DNA-Sequenz (entsprechendes Codon des Cys-47 ist durch Unterstreichung markiert)

atgactgatctgaaagcaagcagcctgcgtgcactgaaattgatggacctgaccaccctgaatgacgacgacaccgacgagaaa
 gtgatcgccctgtgtcatcaggccaaaactccggtcggcaataccgccgctatcatgtatctatcctcgctttatcccgattgctcgc
 aaaactctgaaagagcaggggacccccgaaatccgtatcgctacggttaaccaacttccacacggtaacgacgacatcgacatc
 gcgctggcagaaacccgtgcggcaatcgctacggtgctgatgaagttgacgttggttcccgctaccgcgcgctgatggcgggta
 acgagcaggttggttttgacctgggtgaaagcctgtaaagaggcttgcgcggcagcgaatgtactgctgaaagtgatcatcgaaa
 ccggcgaaactgaaagacgaagcgctgatccgtaaagcgcttgaaatctccatcaaagcgggtgcggacttcatcaaaacctcta
 ccggtaaaagtggctgtgaacgcgacgccggaaagcgcgcgcatcatgatggaagtgatccgtgatatgggcgtagaaaaaac
 gttggtttcaaacggcgggcgcgctgcgtactgcggaagatgcgcagaaatatctcgccattgcagatgaactgttcggtgctg
 actgggcagatgcgcgtcactaccgcttggcgcttcagcctgctggcaagcctgctgaaagcgctgggtcacggcgacggtaa
 gagcgccagcagctactaa

Proteinsequenz (Position 47 ist durch Unterstreichung markiert)

MTDLKASSLRALKLMDLTTLNDDDTDEKVIALCHQAKTPVGNTAAICIYPRFIPIARKTLKEQ
GTPEIRIATVTNFPHGNDIDIALAETRAAIYGADEVVFPYRALMAGNEQVGFDLVKAC
KEACAAANVLLKVIIETGELKDEALIRKASEISIKAGADFIKTSTGKVAVNATPESARIMMEVIR
DMGVEKTVGFKPAGGVRTAEDAQKYLAIADELFGADWADARHYRFGASSLLASLLKALGHG
DGKSASSY

10.1.2 HALOTAG-DERA_{EC} C47M

DNA-Sequenz

Die verschiedenen Farben markieren die entsprechenden DNA-Fragmente, wie folgt:
HaloTag™, grün; Spacer 20aa – 4r, rot; DERA_{EC} C47M, blau.

atgaaacatcaccatcaccatcacgcagaaattggtacgggatttccgtttgacccgcattatgtggaggttctgggtgaacgcat
gcactacgtggatgttggtccgcgcgatggcacaccggtgctgtttctgcatggtaatccgacctccagctatgtttggcgcaacat
tattccgcatgtcgcccaacgcatcgctgtattgcccagatctcattggcatgggcaaaagcgacaaaccggatttgggctact
tcttcgacgatcacgtacggtttatggacgcctttatcgaggctctgggactcgaggaagtagtgctggttattcatgactggggct
ctgcattaggctttcactgggctaaacggaaccagaacgcgtcaaggggattgccttcattggagttcatccgctcgattccgacc
tgggatgaatggcccgaatttggcgtgaaacctttcaggcggttcgtaccacggatgttggccgtaagctcatcatcgacaaaa
cgtgttcattgagggcactcttccatgggagtagtgctcctttaaccgaagtcgagatggaccactatcggaaccttctga
atccggttgatcggaaccgctgtggcgcttcccgaatgagctgcctattgctgggaaccggcgaatatcgtggcactgttgga
gaatacatggattggctgcatcagagtcagtcctaaagctgttttggggtacacctggcggttgattccgcctgcagaagct
gctcgcttagcgaaaagcttggccaaactgcaaagcggctgatattgggccaggcttgaacctgttacaggaggataaccgggatc
tgatcgggagtgaaatcgcgcttggctgtcaactctggaaatctcgggtcttgcagaagcagcggccaaagaagctgcggcca
aagaggcagccgcgaaagaagcagcggcgaaagcggcgcgatgactgatctgaaagcaagcagcctgcgtgcactgaaatt
gatggacctgaccacctgaatgacgacgacaccgacgagaaagtgatcgccctgtgtcatcaggccaaaactccggtcggcaa
taccgccgctatcatgatctatcctcgctttatcccgaattgctcgcaaaactctgaaagagcagggcaccgccgaaatccgtatcg
ctacggtaaccaacttcccacacggtaacgacgacatcgacatcgcgctggcagaaaccgtgcggcaatcgctactcgggtgctg
atgaagttgacgttgtgttcccgtaccgcgctgatggcgggtaacgagcaggttggtttgacctgggtgaaagcctgtaaaga
ggcttgccgggcagcgaatgtactgctgaaagtgatcatcgaaaccggcgaactgaaagacgaagcgtgatccgtaaagcgt
ctgaaatctccatcaaagcgggtgcggacttcatcaaaaccttaccggtaaaagtggctgtgaacgcgacgcggaaagcgcgc
gcatcatgatggaagtgatccgtgatatggcgtagaaaaaaccttgggttcaaaccggcggcggtgcgtactgcggaag
atgcgcagaaatatctcgccattgcagatgaactgttcgggtgctgactgggcagatgcgcgtcactaccgcttggcgcttcagc
ctgctggcaagcctgctgaaagcgtgggtcacggcgacggtaagagcgccagcagctactaa

Proteinsequenz

Die verschiedenen Farben markieren die entsprechenden Protein-Fragmente, wie folgt:
HaloTag™, grün; Spacer 20aa – 4r, rot; DERA_{EC} C47M, blau.

MKHHHHHHAEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVFLHGNPTSSYVWRNIIP
HVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFH
WAKRNPVERVKGIAFMFIRPIPTWDEWPEFARETQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGV
VRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLF
WGTPGVLIPPAEAAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISGLA^{KEAAA}
^{KEAAAKEAAAKEAAKAAA}MTDLKASSLRALKLMDLTTLNDDDTDEKVIALCHQAKTPVGN
TAAIMIYPRFIPIARKTLKEQGTPEIRIATVTNFPHGNDIDIALAETRAAIAYGADEVDDVFPYR
ALMAGNEQVGFDLVKACKEACAAANVLLKVIETGELKDEALIRKASEISIKAGADFIKTSTGK
VAVNATPESARIMMEVIRDMGVEKTVGFKPAGGVRTAEDAQKYLAIADELFGADWADARH
YRFGASSLLASLLKALGHGDGKSASSY

10.1.3 DERA_{ES} (*E. SIBIRICUM*) MIT HIS TAG (N-TERMINAL)

DNA-Sequenz

atgcatcatcatcatcatcatatgaatttggccatattaaactgatgaacccgcagcgcagcaccgtgtggtattaaatgcatcatc
atcatcatcatatgaacctggcgggcatgattgatcataccgcgctgaaagcggaaaccagccgcgcgagattgaaacctgt
gcaaagaagcgtggaatataaatttgcgagcgtgtgcgtgaacccgaccaacgtggcgtggcggcgggaactgctgaaaagc
gatgatgcggtgaaagtgtgcaccgtgattggcttccgctgggcgcgaacaccccggaagtgaagcgtttgaaaccaggat
gcgattaaaaacggcgcgaccgaaattgatatggtgctgaacattggcgcgctgaaagatggcgatctgagcctggtggaacgc
gatattcgcgcggtggtggaagcggcgaacggcaccctggtgaaagtgattttgaaaactgcctgctgaccaaagaagaatt
aaaaccgcggcgggaactgagcgtgaaagcgggcgcggattttgtgaaaaccagcaccggcttagcaccggcggcgcgaccgt
ggaagatattcgctgatgcgcgaacccgtgggcccggatattggcgtgaaagcgcgagcggcggcgtgcgcgattttgaaggcg
cgaaagcgatgattgatgcgggcgcgaccgcattggcgcgagcgcgggcattgcgattgtaccggcggcaccagcgatagc
gattattaa

Proteinsequenz

MHHHHHHMNLGAMIDHTALKAEISRAQIETLCKEALEYKFASVCVNPTNVALAAELLKSDD
AVKVCTVIGFPLGANTPEVKAFETQDAIKNGATEIDMVLNIGALKDGDLSLVERDIRAVVEAA
NGTLVKVIFENCLLTKEEIKTAAELSVKAGADFKTSTGFSTGGATVEDIRLMRETVGPDIGVK
ASGGVRDFEGAKAMIDAGATRIGASAGIAIVTGGTSDSDY

10.1.4 DERA_{PH} (*P. HALOPLANKTIS*) MIT HISTAG (N-TERMINAL)

DNA-Sequenz

atgcatcatcatcatcatcatatgattaaacagcagaaagaagcggcgctggcgggtggcgctgatggatctgaccagcctgaac
agcaacgatgatagcggcgattaacaccctgggtgaacagcattaacccgaaactgggcaccccgggcggtgtgcgtgtat
agcgattttgtggcggaagcgaaaattgcgctggcgacccgcgaactgagccatattaaagtggcgaccgtgaccaactttccg
accggcgatgcgcccgtgaacaccgtgattaacgaaaccctgattgcgattgaacgcggcgcggtatgaaattgatctgggtattc
cgtataaagcgctgattgcggggcgataaaagccgcgtgctggaatatgtgaccgaaagcaaaaaagtgtgcggcagccgcgcg
ctgctgaaagtattattgaaagcggcgaaactgcagaccccgatctgattgcgagcgcgaccctgctggcgattaaaggcggc
gcggattttgtgaaaaccagcaccggcaaaagtggcgggtgaacgcgacccctggatgcgacaaaaccattctgaacaccattaaa
gaaagcggcaaaactgggtgggctttaagcggcgggcggtgaaaaccgtggcggtatgcgagcgattatctgaccctggcgag
caccattatgggcaacgattatctgcaggcgaacacctttcgctttggcgcgagcagcctgctgaccaacgtgtatgcgggtctga
acgaagcgtaa

Proteinsequenz

MHHHHHHMIKQQKEAALAVALMDLTSLSNDDSAINTLVNSINPKLGTPAAVCVYSDFV
AEAKIALATRELSHIKVATVTNFPTGDAPLNTVINETLIAIERGADEIDLVIPIYKALIAGDKSRVL
EYVTESKKVCGSRALLKVIIESGELQTPDLIASATLLAIKGGADFVKSTGKVAVNATLDATKTI
LNTIKESGKLVGFKAAGGVKTVADASDYLTASTIMGNDYLLQANTFRFGASSLLTNVYAVLNE
A

10.1.5 DERA_{PI} (*P. INGRAHAMII*) MIT HISTAG (N-TERMINAL)

DNA-Sequenz

atgcatcatcatcatcatcatatgcgcgatctgcagcaggcgagccgctggcgattcagctgatggatctgaccacccctgaacg
atgatgataacgatcagaaagtattcagctgtgcaaagcggcgcataccattgcggcgataaccgcggcggtgtgcatttatcc
gcgctttattccgattgcgcgcaaaaccctgacctgcagaacacccgcagattaaaattgcgaccgtgaccaactttccgcatg
gcaacgatgatctgaacattgcgctggcggaacccgcgcggcggtggcgtatggcgcggtatgaagtggatctgggtttccgt
atcgcgcgctgattgaaggcaacgcggaaattggcaccacatgggtgaaagcgtgcaaagatatttcggcgataacgtgacc
tgaaagtgattattgaaagcggcgaaactgaaaacccgggaactgattaaagcggcgagcgaaatttcattaacgcggggcgcg
gattttattaaaaccagcaccggcaaaagtccgggtgaacgcgacccctggaagcgacaaaattatgctggaagcgattaaagaa
agcggcctgaacgtgggctttaagcggcgggcggtgaaagatgcgcagaccgcggatgattatgcagctggcgagcag
cattatggcgataactgggtggatcgacccattttcgctttggcgcgagcagcctgctggcgcgctgctgagcgcgctgaac
ctggcgataaagcgaccgaaacggcggtat

Proteinsequenz

MHHHHHMRDLQQASRLAIQLMDLTTLNDDNDQKVIQLCKAAHTIAGDTAAVCIYPRFI
PIARKTLTLQNT PQIKIATVTNFPHGND DLNIALAETRAAVAYGADEV DLVFPYRALIEGNAEI
GTTMVKACKDICGDNVTLKVIIESGELKTPELIKAASEICINAGADFIKTSTGKVPVNATLEATK
IMLEAIKESGLNVGFKAAGGVKDAQTADDYMQ LASSIMGDNWVDRTHFRFGASSLLGALLS
ALNLADKATETGGY

10.2 OPTIMIERUNG DES KONSTRUKTES DES FUSIONSENZYMS HALOTAG- DERA_{EC}-C47M

10.2.1 GETESTETE SPACER-SEQUENZEN

Tabelle 29: Von *Johannes Döbber* (IBG-1: Biotechnologie, FZ Jülich) untersuchte Spacer-Sequenzen, die den HaloTag mit der DERA_{EC} miteinander verbindet.^[181]

Spacer	Proteinsequenz
25 aa – 5f	A(GGGG) ₅ A
25 aa – 4f1r	A(EAAAK)(GGGS) ₄ A
25 aa – 3f2r	A(EAAAK)(GGGS) ₂ (EAAAK)(GGGS)A
25 aa – 2f3r	A(EAAAK)(GGGS) ₂ (EAAAK) ₂ A
25 aa – 1f4r	A(EAAAK)(GGGS)(EAAAK) ₃ A
25 aa – 7r	A(EAAAK) ₇ A
25 aa – 6r	A(EAAAK) ₆ A
25 aa – 5r	A(EAAAK) ₅ A
25 aa – 4r	A(EAAAK) ₄ A

10.2.2 EFFEKT DIVERSE SPACER-SEQUENZEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT

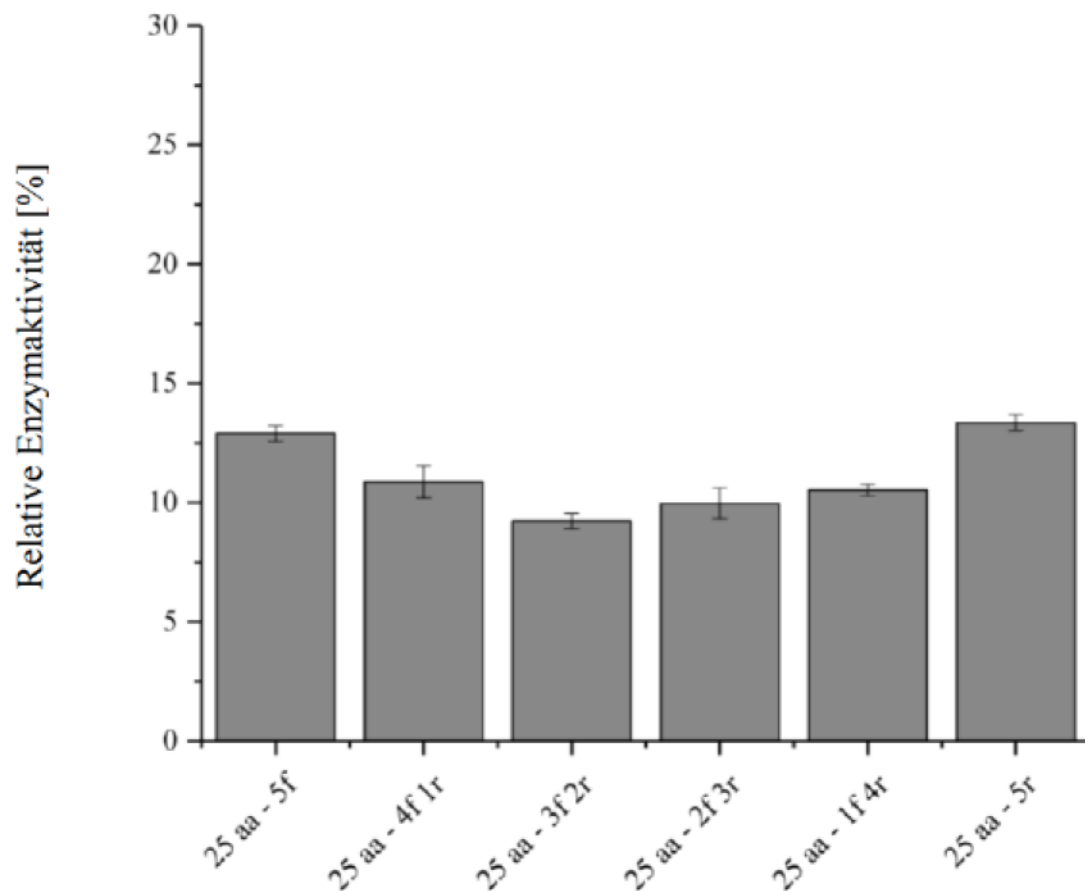


Abbildung 35: Auswirkung der Rigidität bzw. der Flexibilität der Spacer-Sequenz auf die Enzymaktivität der immobilisierten HaloTag-DERA_{EC}-C47M. Die Spacer-Motive EAAAK (starres Motiv, r) und GGGGS (flexibles Motiv, f) wurden miteinander kombiniert und in HaloTag-EcDERA-Fusionsenzyme integriert. Jeder Spacer hatte eine Gesamtlänge von 25 Aminosäuren (aa). Nach der Immobilisierung wurde die Aktivität jedes Konstrukts durch Verfolgung der Umwandlung von 2-Desoxyribose-5-phosphat in Glyceraldehyd und Acetaldehyd analysiert und mit der Aktivität von freier DERA_{EC} ohne HaloTagTM verglichen (Aktivität von freier DERA_{EC} = 100 %). Die Standardabweichungen basieren auf einer Dreifachbestimmung. Experimente wurden durchgeführt von *Johannes Döbber*, IBG-1: Biotechnologie, FZ Jülich.^[181]

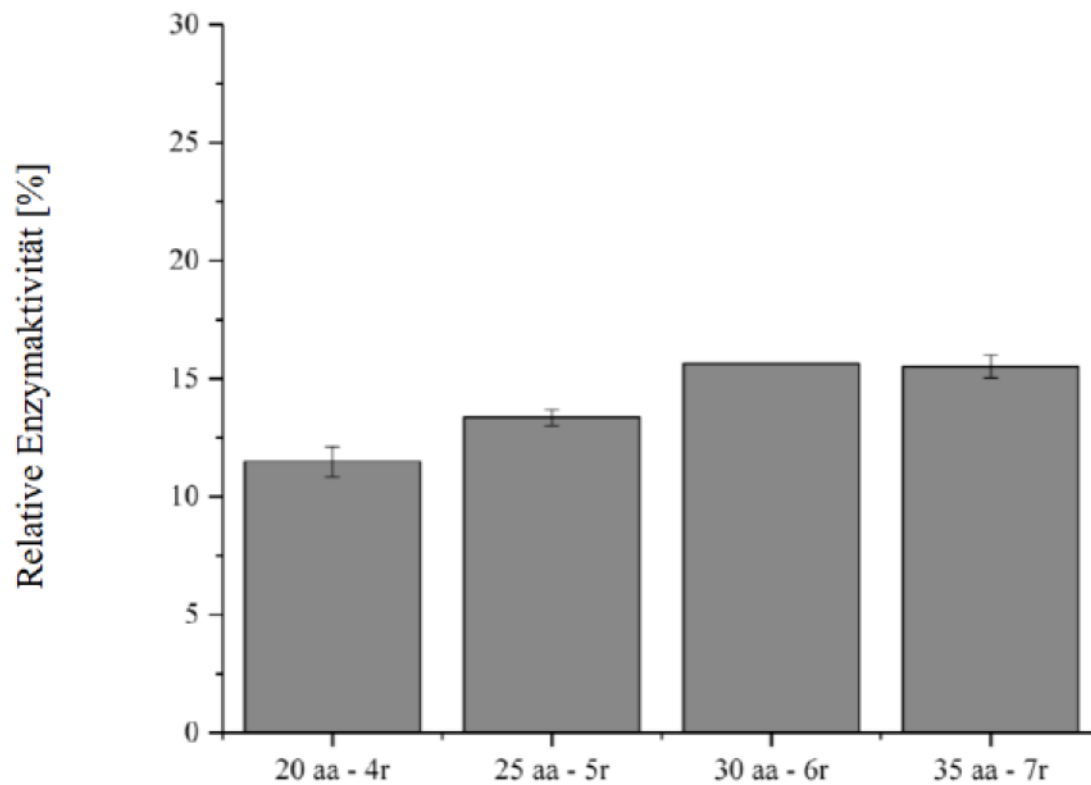


Abbildung 36: Auswirkung der Länge der Spacer-Sequenz auf die Enzymaktivität der immobilisierten HaloTag-DERA_{EC}-C47M. In die HaloTag-DERA_{EC}-C47M-Fusionsenzyme wurde eine unterschiedliche Anzahl von starren Motiven (r) eingefügt, die eine unterschiedliche Länge zwischen 20 und 35 Aminosäuren (aa) umfassten. Nach der Immobilisierung wurde die Aktivität jedes Konstrukts durch Verfolgung der Umwandlung von 2-Desoxyribose-5-phosphat in Glyceraldehyd und Acetaldehyd analysiert und mit der Aktivität von freier DERA_{EC} ohne HaloTagTM verglichen (Aktivität von freier DERA_{EC} = 100 %). Die Standardabweichungen basieren auf einer Dreifachbestimmung. Experimente wurden durchgeführt von Johannes Döbber, IBG-1: Biotechnologie, FZ Jülich.^[181]

10.3 EXPERIMENTELLER AUFBAU DER FLOW-APPARATUR

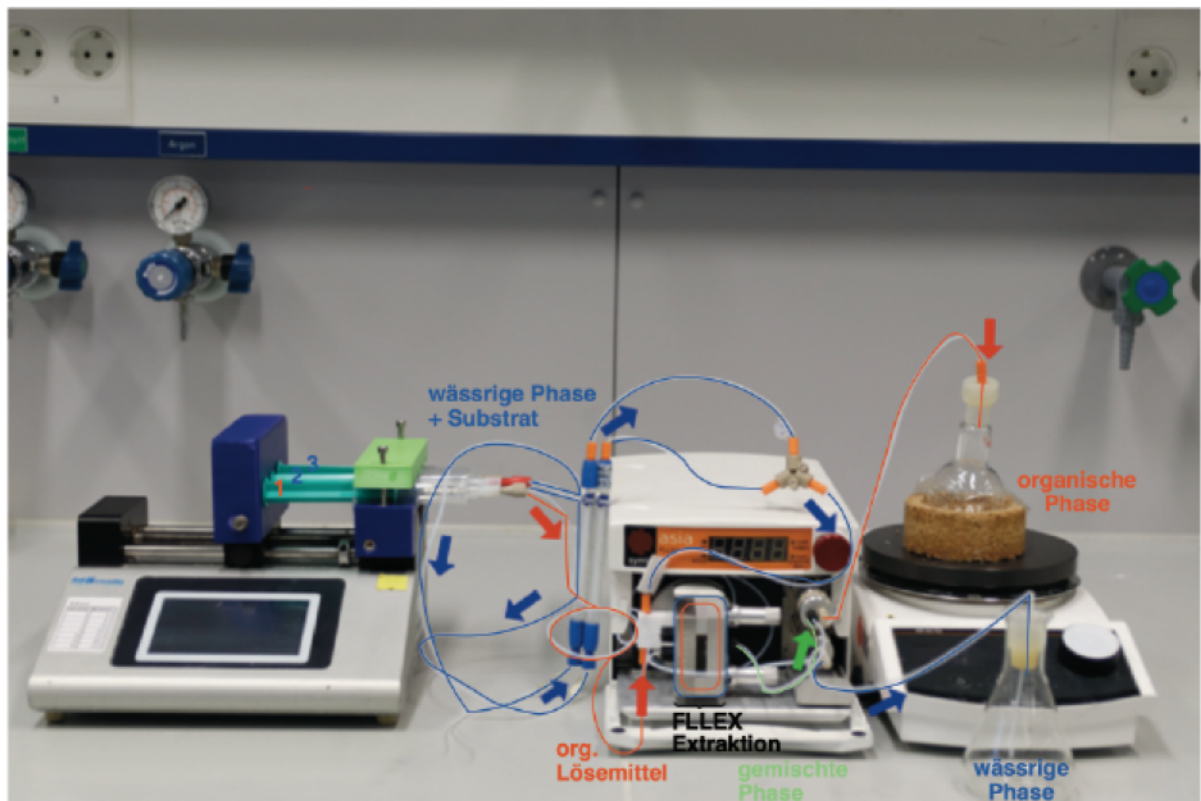


Abbildung 37: Experimenteller Aufbau der kontinuierlichen Durchfluss-Synthese unter Verwendung der immobilisierten DERA in zwei *Omnifit*® Festbettreaktoren. Als Pumpsystem wurde eine Spritzenpumpe verwendet und ein FLLEX Modul von Syrris Asia zur Inline-Extraktion.

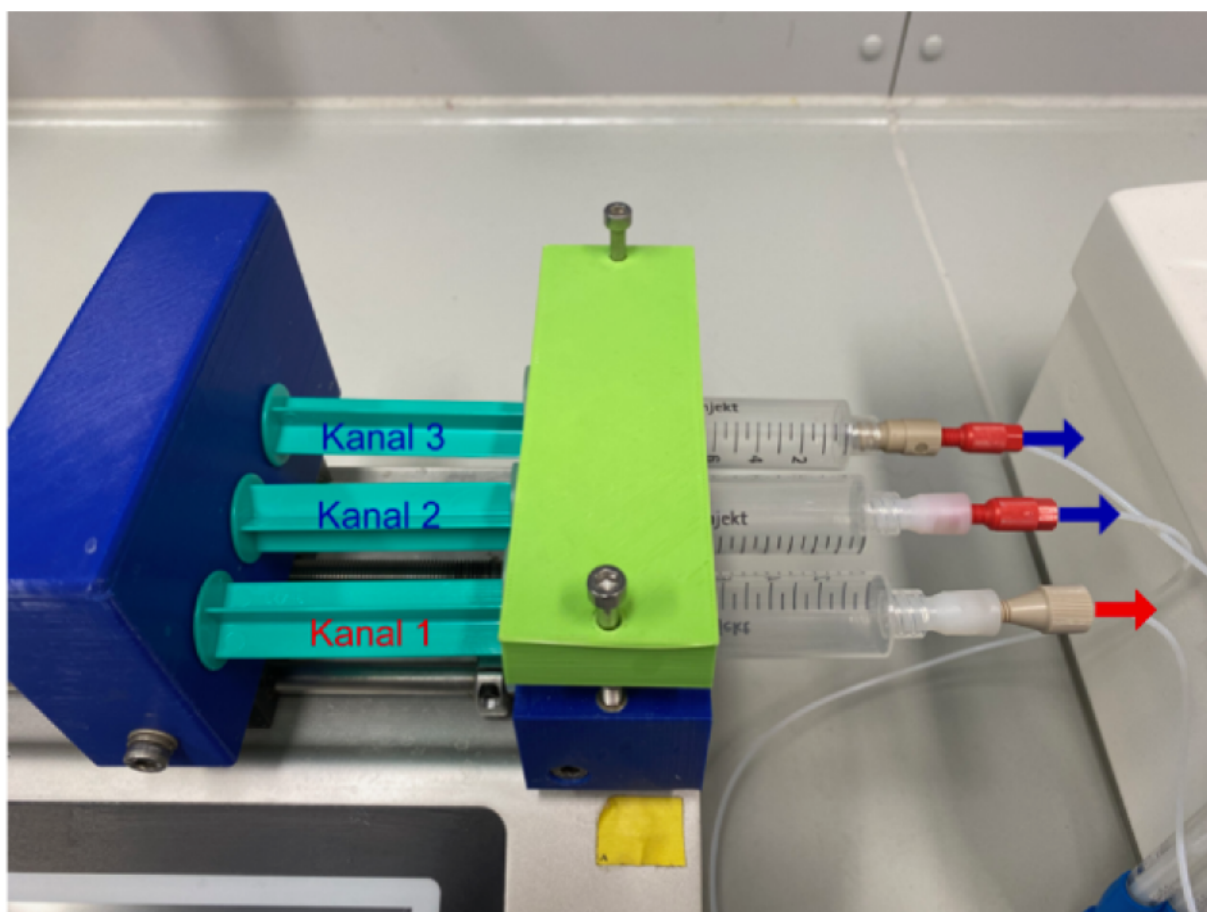


Abbildung 38: Vorrichtung zur gleichzeitigen Verwendung von bis zu drei Spritzen (Multi-Channel System) als Aufsatz auf einer Spritzenpumpe. Der Aufsatz, welche auf die Spritzenpumpe montiert wird, wurde mit einem 3D-Drucker freundlicherweise von *Erik Kranz* (IBOC, HHU Düsseldorf) angefertigt.

10.4 OPTIMIERUNG DER REAKTIONSBEDINGUNGEN

10.4.1 FACTORIAL DESIGN OF EXPERIMENTS

Drei Faktoren Durchflussmenge, Acetaldehyd (2) und Hexanal (5) wurden auf zwei Ebenen untersucht. Als Level wurde jeweils ein minimaler und ein maximaler Grenzwert des jeweiligen Parameters festgelegt, die sich stark voneinander unterschieden. Die gesammelten Daten wurden dann mit DesignExpert® und OriginPro® ausgewertet. Die Vorgehensweise bei den Experimenten entspricht der im Abschnitt 9.5 beschriebenen allgemeinen Vorgehensweise. Alle erhaltenen Daten sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 30: Parameter des factorial Designs.

Parameter	Level 1	Level 2
A: Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	50	500
B: c(Hexanal (5)) [mol/L]	0.05	0.2
C: Acetaldehyd (2) [$\text{\AA}^{\text{qu.}}$]	0.8	3

Tabelle 31: Rohdaten zur Berechnung der relativen Umsätze in % (bezogen auf internen Standard, abgekürzt „IS“) basierend auf den erhaltenen GC-Chromatogrammen. Das beste Resultat ist grün hervorgehoben.

Experiment-Nr.	Flussrate [μL/min]	c (5) [mol/L]	2 [Aq]	A (5)	A (11)	A (6)	A (51)	A (IS)	A (5)/ A (IS)	A (11)/ A (IS)	A (6)/ A (IS)	A (51)/ A (IS)
#1	500	0,05	0,8	1297233	13013	422670	0	2169191	0,5980	0,00600	0,1949	0,00000
#2	50	0,2	3	698472	50047	1840596	377307	14179710	0,0493	0,00353	0,1298	0,02661
#3	500	0,2	0,8	2707163	16590	703606	0	2113125	1,2811	0,00785	0,3330	0,00000
#4	50	0,05	0,8	2367045	39044	983139		14487050	0,1634	0,00270	0,0679	0,00000
#5	500	0,05	0,8	1131425	8564	318777	0	2131251	0,5309	0,00402	0,1496	0,00000
#6	50	0,05	3	460584	25371	661928	0	2187600	0,2105	0,01160	0,3026	0,00000
#7	500	0,2	3	1744697	11183	536868	0	2271700	0,7680	0,00492	0,2363	0,00000
#8	50	0,2	3	591731	44411	1838284	348291	2274247	0,2602	0,01953	0,8083	0,15315
#9	500	0,05	3	1090664	8445	387368	0	2286171	0,4771	0,00369	0,1694	0,00000
#10	50	0,05	0,8	657791	15838	381403	22731	2194398	0,2998	0,00722	0,1738	0,01036
#11	500	0,2	3	1744193	9833	504275	0	2211449	0,7887	0,00445	0,2280	0,00000
#12	50	0,2	0,8	1749065	55358	2264881	321602	2173120	0,8049	0,02547	1,0422	0,14799
#13	500	0,05	3	1293592	9036	283792	0	4371412	0,2959	0,00207	0,0649	0,00000
#14	50	0,05	3	388043	18012	474757	52075	4507083	0,0861	0,00400	0,1053	0,01155
#15	500	0,2	0,8	2040920	12508	478064	0	9950260	0,2051	0,00126	0,0480	0,00000
#16	50	0,2	0,8	1546037	34726	1293596	50898	10247330	0,1509	0,00339	0,1262	0,00497
	5 [%]	11 [%]	6 [%]	51 [%]								
#1	75%	1%	24%	0%								
#2	24%	2%	62%	13%								
#3	79%	0%	21%	0%								
#4	70%	1%	29%	0%								
#5	78%	1%	22%	0%								
#6	40%	2%	58%	0%								
#7	76%	0%	23%	0%								
#8	21%	2%	65%	12%								
#9	73%	1%	26%	0%								
#10	61%	1%	35%	2%								
#11	77%	0%	22%	0%								
#12	40%	1%	52%	7%								
#13	82%	1%	18%	0%								
#14	42%	2%	51%	6%								
#15	81%	0%	19%	0%								
#16	53%	1%	44%	2%								

10.4.2 RESPONSE-SURFACE-DESIGN

Die Bedingungen für die zweite Optimierungsrunde wurden von DesignExpert® auf der Grundlage der Anforderung berechnet, den Umsatz des einfachen Aldolprodukts 6 zu maximieren und den Umsatz des doppelten Aldolprodukts 51 und des Nebenprodukts 11 zu minimieren. Es wurden zwei Säulen parallel verwendet, jeweils in anderer Reihenfolge der Experimente. Die Datensätze der beiden Säulen sind nachstehend separat aufgeführt.

Tabelle 32: Rohdaten zur Berechnung der relativen Umsätze in % (bezogen auf internen Standard, abgekürzt „IS“) basierend auf den erhaltenen GC-Chromatogrammen der ersten Säule. Das beste Resultat ist grün hervorgehoben. Die Proben Nr. 17 und 19 konnten nicht bestimmt werden aufgrund einer zu hohen Acetaldehydkonzentration, die zur Inaktivierung der Enzymsäule führte.

Experiment-Nr.	Flussrate [µL/min]	c(5) [mol/L]	2 [eq]	A (5)	A (11)	A (6)	A (51)	A (IS)	A (5)/A (IS)	A (11)/A (IS)	A (6)/A (IS)	A (51)/A (IS)
#1	23,2	0,2	2,1	4280289	805162	1127583	0	1370377	3,12	0,59	0,82	0,00
#2	106,8	0,1	2,1	2714320	255040	885370	0	1419521	1,91	0,18	0,62	0,00
#3	65	0,25	5,5	6354441	508394	3269863	111347	1440028	4,41	0,35	2,27	0,08
#4	65	0,05	5,5	3859145	454604	1620400	0	1422854	2,71	0,32	1,14	0,00
#5	23,2	0,2	8,9	11077730	0	92748	0	1341029	8,26	0,00	0,07	0,00
#6	65	0,15	5,5	4508762	579154	604632	0	1407326	3,20	0,41	0,43	0,00
#7	65	0,15	5,5	3484504	441881	1858184	0	1430786	2,44	0,31	1,30	0,00
#8	65	0,15	5,5	3427455	396883	1779370	0	1435721	2,39	0,28	1,24	0,00
#9	120	0,15	5,5	5522256	339501	1407789	0	869405	6,35	0,39	1,62	0,00
#10	65	0,15	10	8099959	18892	156168	0	1037222	7,81	0,02	0,15	0,00
#11	65	0,15	5,5	2612842	324350	1786782	17210	1063157	2,46	0,31	1,68	0,02
#12	65	0,15	5,5	3091590	274254	1130420	0	872643	3,54	0,31	1,30	0,00
#13	10	0,15	5,5	3471202	464097	2137768	14822	887837	3,91	0,52	2,41	0,02
#14	65	0,15	5,5	3381098	402468	1652697	0	1008969	3,35	0,40	1,64	0,00
#15	65	0,15	5,5	3424553	358035	2114805	22476	1023681	3,35	0,35	2,07	0,02
#16	65	0,15	1	5212755	423117	2039161	15845	1044722	4,99	0,41	1,95	0,02
#17	106,8	0,2	8,9	Nicht bestimmt								
#18	65	0,15	10	5665660	18722	144118	0	2522869	2,25	0,01	0,06	0,00
#19	23,2	0,1	8,9	Nicht bestimmt								
#20	106,8	0,2	2,1	4340645	405497	822906	0	221131	19,63	1,83	3,72	0,00
#21	65	0,15	5,5	3436103	134369	858819	0	2237749	1,54	0,06	0,38	0,00
#22	65	0,15	1	3714106	314175	1245771	21463	2208198	1,68	0,14	0,56	0,01
#23	65	0,15	5,5	2787734	325599	407244	0	2545299	1,10	0,13	0,16	0,00
#24	106,8	0,1	8,9	3365814	231253	1117564	0	2551900	1,32	0,09	0,44	0,00
#25	23,2	0,1	2,1	1673334	260684	869017	0	3517198	0,48	0,07	0,25	0,00
	5 [%]	11 [%]	6 [%]	51 [%]								
#1	69%	13%	16%	0%								
#2	70%	7%	18%	0%								
#3	62%	5%	29%	1%								
#4	65%	8%	24%	0%								
#5	99%	0%	1%	0%								
#6	79%	10%	9%	0%								
#7	60%	8%	28%	0%								
#8	61%	7%	27%	0%								
#9	76%	5%	18%	0%								
#10	98%	0%	2%	0%								
#11	55%	7%	34%	0%								
#12	69%	6%	22%	0%								
#13	57%	8%	32%	0%								
#14	62%	7%	27%	0%								
#15	58%	6%	32%	0%								
#16	68%	6%	24%	0%								
#17	Nicht bestimmt											
#18	97%	0%	2%	0%								
#19	Nicht bestimmt											
#20	78%	7%	14%	0%								
#21	78%	3%	14%	0%								
#22	70%	6%	18%	0%								
#23	79%	9%	7%	0%								
#24	71%	5%	17%	0%								

Experiment-Nr.	Flussrate [μL/min]	c(5) [mol/L]	2 [eq]	A (5)	A (11)	A (6)	A (51)	A (IS)	A (5)/ A (IS)	A (11)/ A (IS)	A (6)/ A (IS)	A (51)/ A (IS)
#1	23,2	0,1	8,9	1554995	272819	781060	0	1400198	1,11	0,19	0,56	0,00
#2	65	0,15	5,5	3980420	482193	2258649	24546	1413757	2,82	0,34	1,60	0,02
#3	65	0,15	1	2026520	219635	769795	0	1418949	1,43	0,15	0,54	0,00
#4	65	0,15	1	3951826	190096	798033	0	1426991	2,77	0,13	0,56	0,00
#5	65	0,15	5,5	3374229	412643	1946020	0	1326101	2,54	0,31	1,47	0,00
#6	106,8	0,1	2,1	2529134	222974	973671	0	1390738	1,82	0,16	0,70	0,00
#7	106,8	0,2	8,9	7891368	0	24485	0	1394681	5,66	0,00	0,02	0,00
#8	23,2	0,2	2,1	3478031	757028	1329874	0	1424482	2,44	0,53	0,93	0,00
#9	65	0,25	5,5	6587745	448823	3193225	103153	883626	7,46	0,51	3,61	0,12
#10	65	0,15	5,5	3017835	343683	805195	0	882491	3,42	0,39	0,91	0,00
#11	106,8	0,2	2,1	4461265	325004	1960663	26721	885969	5,04	0,37	2,21	0,03
#12	65	0,15	5,5	2156167	277606	1092256	0	1053136	2,05	0,26	1,04	0,00
#13	65	0,15	10	6481145	278236	622947	0	1035326	6,26	0,27	0,60	0,00
#14	65	0,15	5,5	2890240	324650	1713219	17507	1034512	2,79	0,31	1,66	0,02
#15	23,2	0,2	8,9	5149781	45778	152175		1041704	4,94	0,04	0,15	0,00
#16	120	0,15	5,5	3637251	262798	1412820	0	1043604	3,49	0,25	1,35	0,00
#17	65	0,15	5,5						5,49	0,36	1,73	0,01
#18	106,8	0,1	8,9	2700796	217375	1170060	7560	2541426	1,06	0,09	0,46	0,00
#19	65	0,15	5,5						1,35	0,16	0,60	0,00
#20	65	0,15	5,5	2610445	275094	1705709	29032	2432225	1,07	0,11	0,70	0,01
#21	23,2	0,1	2,1	3179736	459405	500448	0	1558346	2,04	0,29	0,32	0,00
#22	10	0,15	5,5	Not determined								
#23	65	0,15	10	Not determined								
#24	65	0,05	5,5	1406237	156347	667036	0	2600929	0,54	0,06	0,26	0,00
#25	65	0,1	5,5	3889884	489668	1545171	0	1737195	2,24	0,28	0,89	0,00
	5 [%]	11 [%]	6 [%]	51 [%]								
#1	60%	10%	23%	0%								
#2	59%	7%	30%	0%								
#3	67%	7%	19%	0%								
#4	80%	4%	13%	0%								
#5	59%	7%	30%	0%								
#6	68%	6%	21%	0%								
#7	100%	0%	0%	0%								
#8	62%	14%	21%	0%								
#9	64%	4%	29%	1%								
#10	72%	8%	17%	0%								
#11	66%	5%	27%	0%								
#12	61%	8%	26%	0%								
#13	88%	4%	8%	0%								
#14	58%	7%	31%	0%								
#15	96%	1%	2%	0%								
#16	68%	5%	23%	0%								
#17	72%	5%	21%	0%								
#18	66%	5%	20%	0%								
#19	64%	8%	22%	0%								
#20	56%	6%	28%	1%								
#21	77%	11%	9%	0%								
#22	Not determined											
#23	Not determined											
#24	63%	7%	17%	0%								
#25	66%	8%	22%	0%								

10.4.3 SCREENING DER FLUSSRATE FÜR DERA_{EC}-C47V

Die getesteten Flussraten sind unten tabellarisch aufgeführt. Die Hexanalkonzentration und die Menge des Acetaldehyds wurden konstant gehalten, nur die Durchflussraten wurden geändert. Als Biokatalysator wurde DERA_{EC}-C47V in einem Omnifit®-Reaktor (Ø 3 mm, 50 mm) verwendet. Jeder Versuch wurde in zweifacher Ausführung durchgeführt.

Experiment-Nr.	Flussrate [µL/min]	c(5) [mol/L]	2 [eq]	A (5)	A (11)	A (6)	A (51)	A (IS)	A (5)/ A (IS)	A (11)/ A (IS)	A (6)/ A (IS)	A (51)/ A (IS)
#1	40	0,2	3,0	2789485	141680	4163097	374414	2764093	1,01	0,05	1,51	0,14
#2	40	0,2	3,0	3887865	119548	3845886	128375	2698156	1,44	0,04	1,43	0,05
#3	50	0,2	3,0	1923358	133798	2766810	147691	1849141	1,04	0,07	1,50	0,08
#4	50	0,2	3,0	3205675	209452	5877047	670969	1818633	1,76	0,12	3,23	0,37
#5	60	0,2	3,0	4189594	81788	2676181	87497	2850755	1,47	0,03	0,94	0,03
#6	60	0,2	3,0	6440543	78248	2724426	39246	2892220	2,23	0,03	0,94	0,01
#7	80	0,2	3,0	3491350	101584	3115080	96549	1978529	1,76	0,05	1,57	0,05
#8	80	0,2	3,0	5684573	144945	5074438	255279	1807118	3,15	0,08	2,81	0,14
#9	1000	0,2	3,0	2602342	57203	1682335	31324	1787910	1,46	0,03	0,94	0,02
#10	100	0,2	3,0	4213017	77014	2810928	64243	2423626	1,74	0,03	1,16	0,03
#11	120	0,2	3,0	2701175	37672	1281017	13019	2385007	1,13	0,02	0,54	0,01
#12	120	0,2	3,0	6172059	60792	2740820	47787	3175378	1,94	0,02	0,86	0,02
	5 [%]	11 [%]	6 [%]	51 [%]								
#1	37%	2%	56%	5%								
#2	49%	1%	48%	2%								
#3	39%	3%	56%	3%								
#4	32%	2%	59%	7%								
#5	60%	1%	38%	1%								
#6	69%	1%	29%	0%								
#7	51%	1%	46%	1%								
#8	51%	1%	45%	2%								
#9	60%	1%	38%	1%								
#10	59%	1%	39%	1%								
#11	67%	1%	32%	0%								
#12	68%	1%	30%	1%								

10.5 GC CHROMATOGRAMME

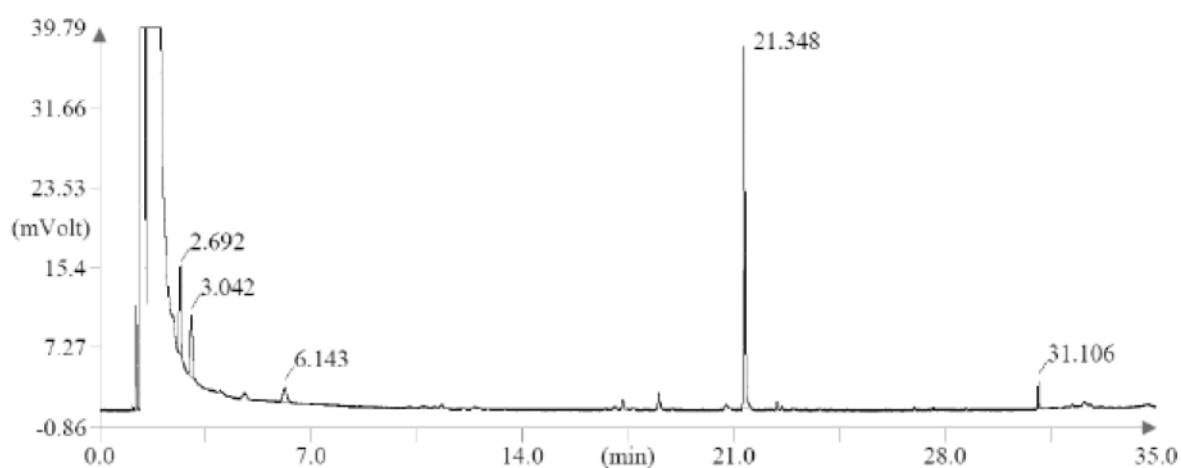


Abbildung 39: GC-Chromatogramm des internen Standards 2-Phenylethanol. Säule: 25 mm*0.25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H₂ (0.6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Method: 60 °C-5 min; 5 °C/min up to 200 °C-2min. t_R [2-phenylethanol] = 21.3 min

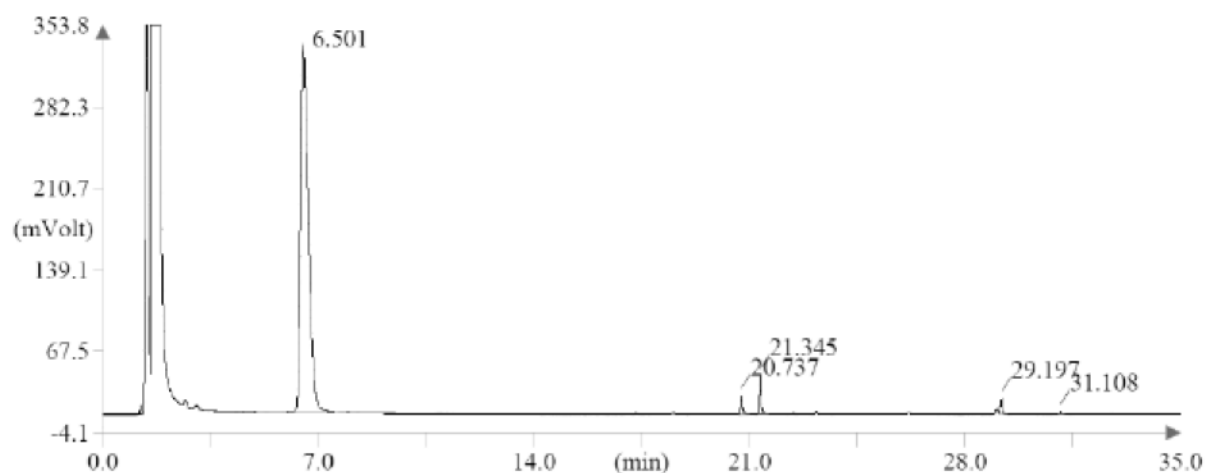


Abbildung 40: GC-Chromatogramm des Substrats Hexanal (5). Säule: FS-Hydrodex- β 3P; 25 mm*0.25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H_2 (0.6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min up to 200 °C-2min. t_R [2-phenylethanol] = 6.6 min.

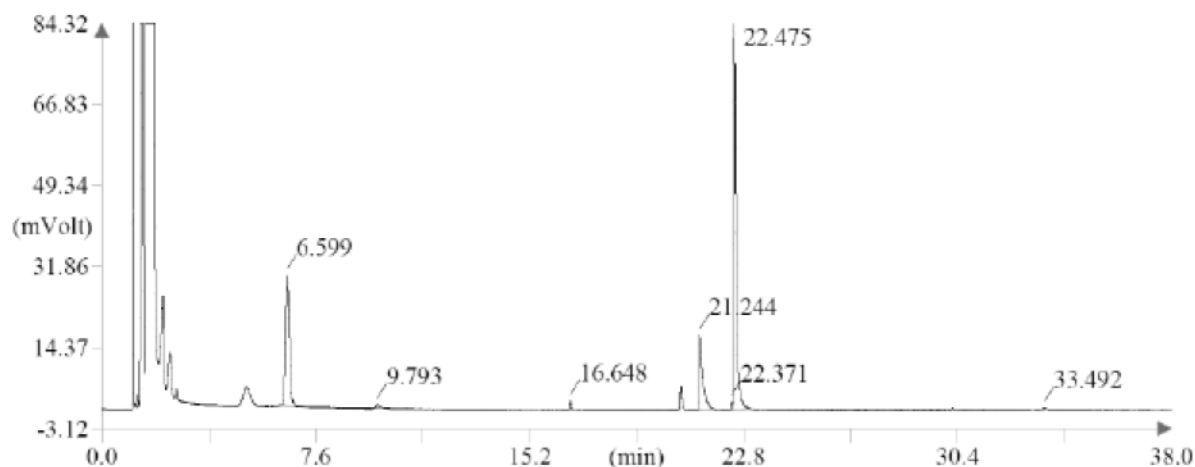


Abbildung 41: GC-Chromatogramm einer Probe des Reaktionsgemisches nach Durchlaufen des DERA-Reaktors Ø 30 mm, L 100 mm). Säule: FS-Hydrodex- β 3P; 25 mm*0.25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H_2 (0.6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min up to 200 °C-2min. t_R [Hexanal 5] = 6.6 min; t_R [(E)-octenal 11] = 16.6 min; t_R [2-Phenylethanol] = 21.2 min; t_R [(R)-Hydroxyoctanal 7] = 22.5 min; t_R [(3R,5R)-3,5-Dihydroxydecanal 13] = 33.5 min.

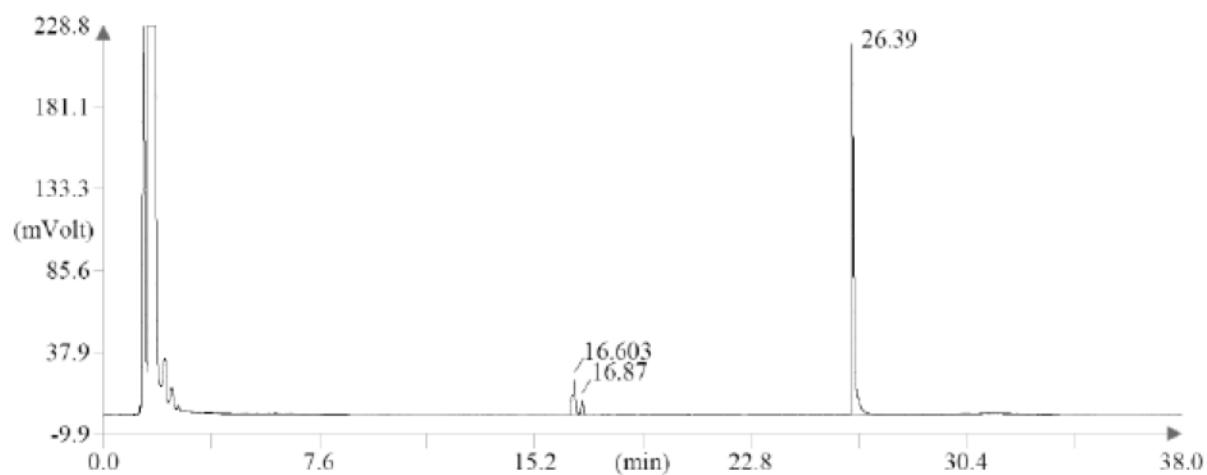


Abbildung 42: GC-Chromatogramm des Diols 8. Säule: FS-Hydrodex- β 3P; 25 mm*0.25 mm, Macherey & Nagel. Trägergas: H_2 (0.6 bar). Lösungsmittel: MTBE. Methode: 60 °C-5 min; 5 °C/min up to 200 °C-2min. t_R [(R)-Octan-1,3-diol 8] = 26.4 min.

10.7.1 (*R*)-OCTAN-1,3-DIOL (8)



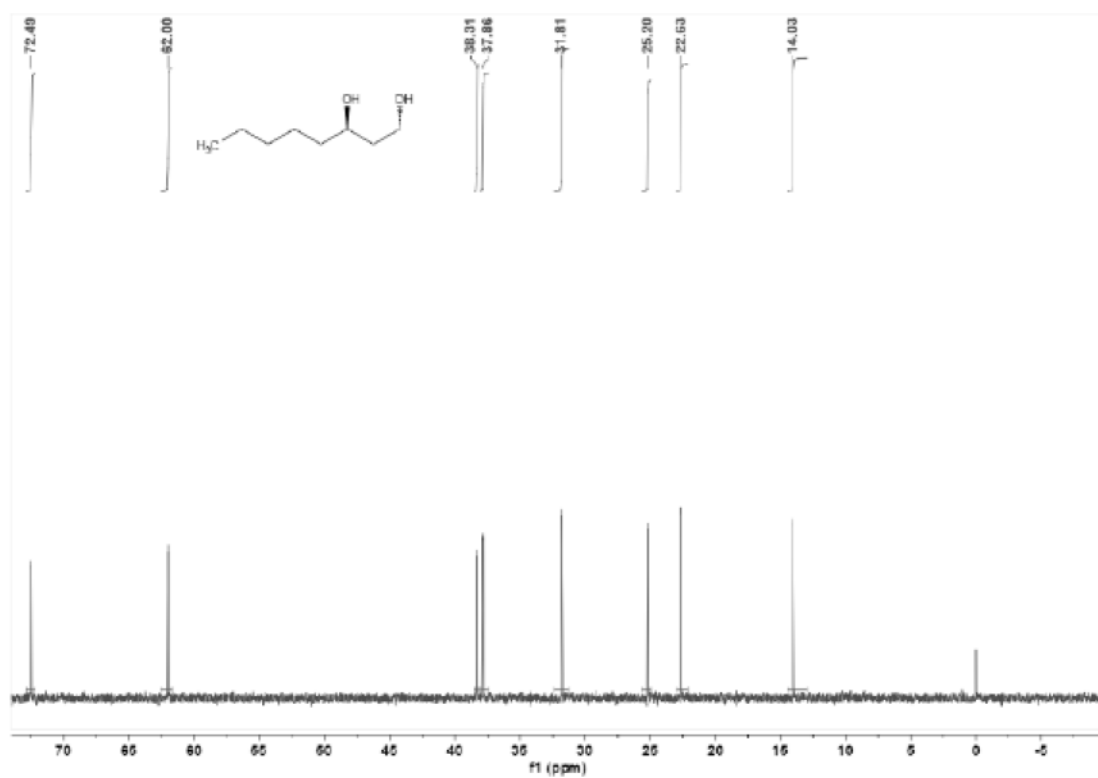


Abbildung 44: ^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) des Diol 8.

10.7.2 (*R*)-HYDROXYOCTANSÄURE (7)

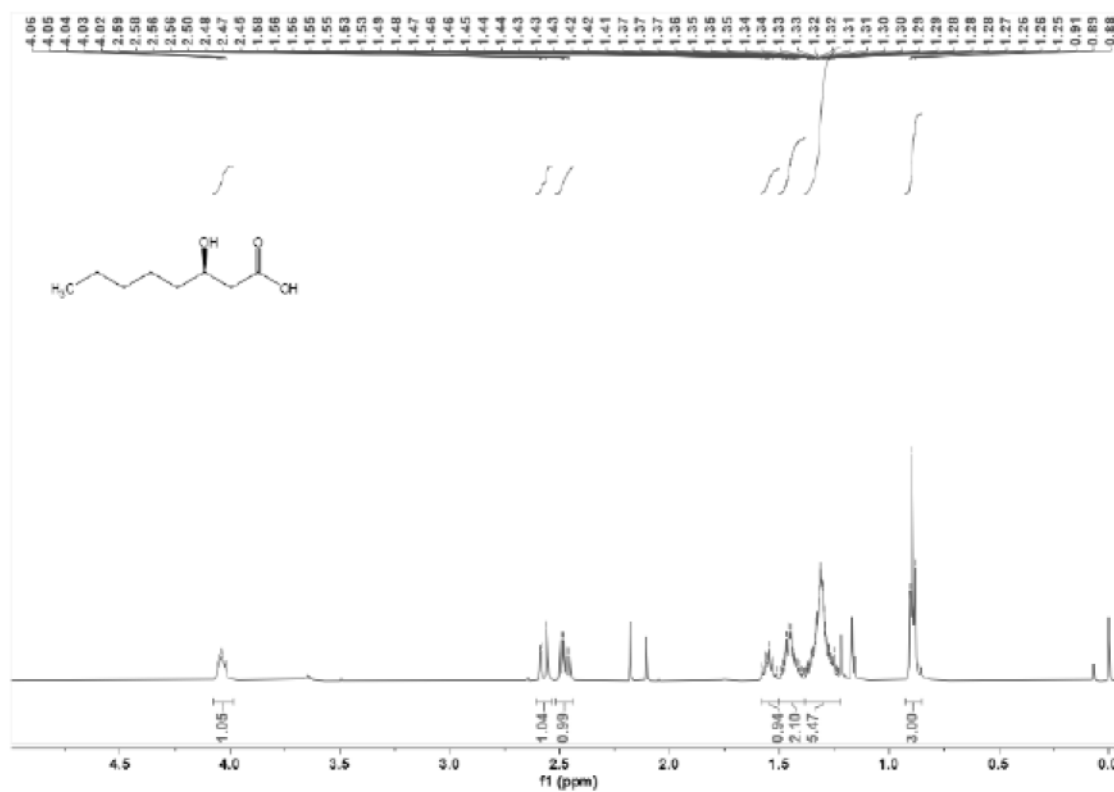


Abbildung 45: ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) von Hydroxyoctansäure (7).

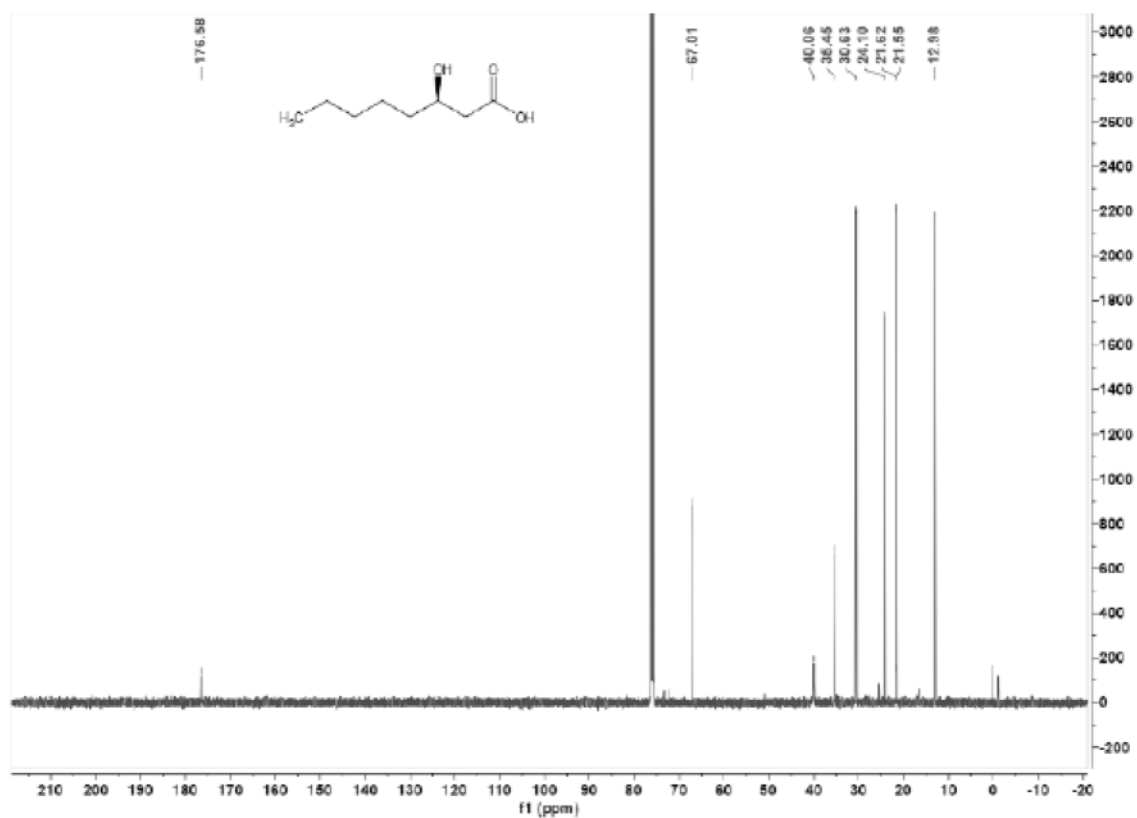


Abbildung 46: ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) von 3-Hydroxyoctansäure (7).

10.7.3 (6*R*)-UNDEC-1-EN-4,6-DIOL (9)

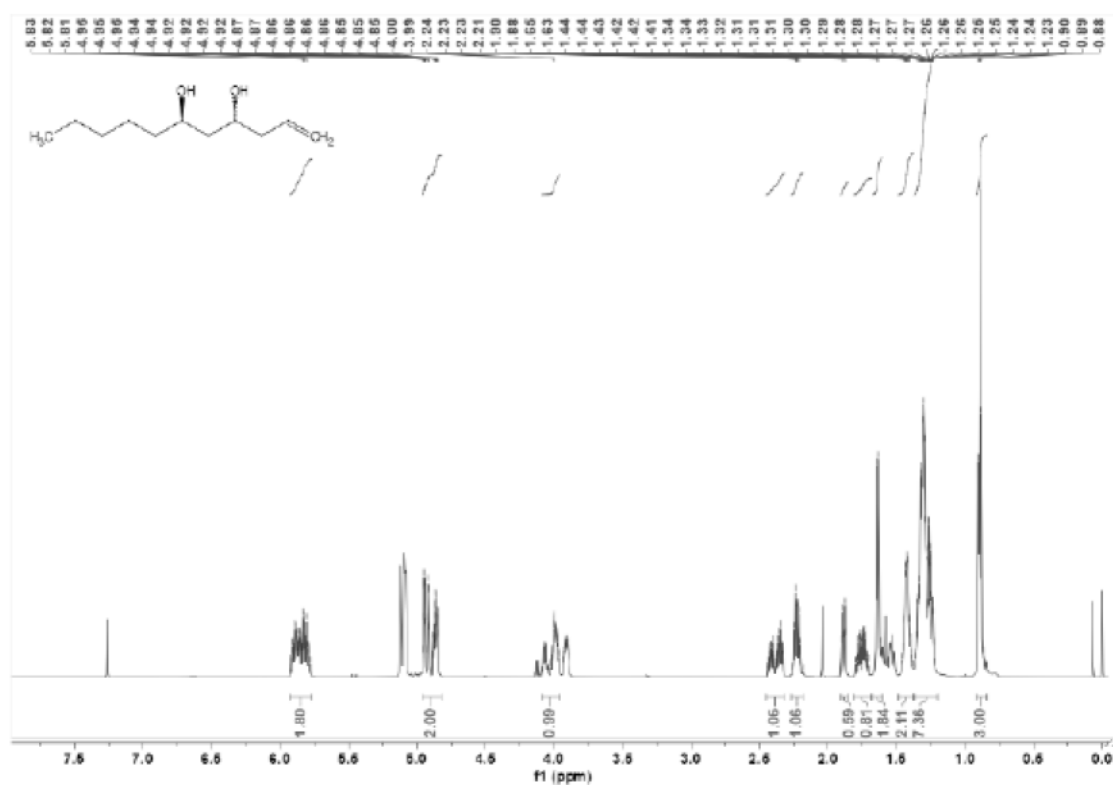


Abbildung 47: ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) der Zielverbindung 9.

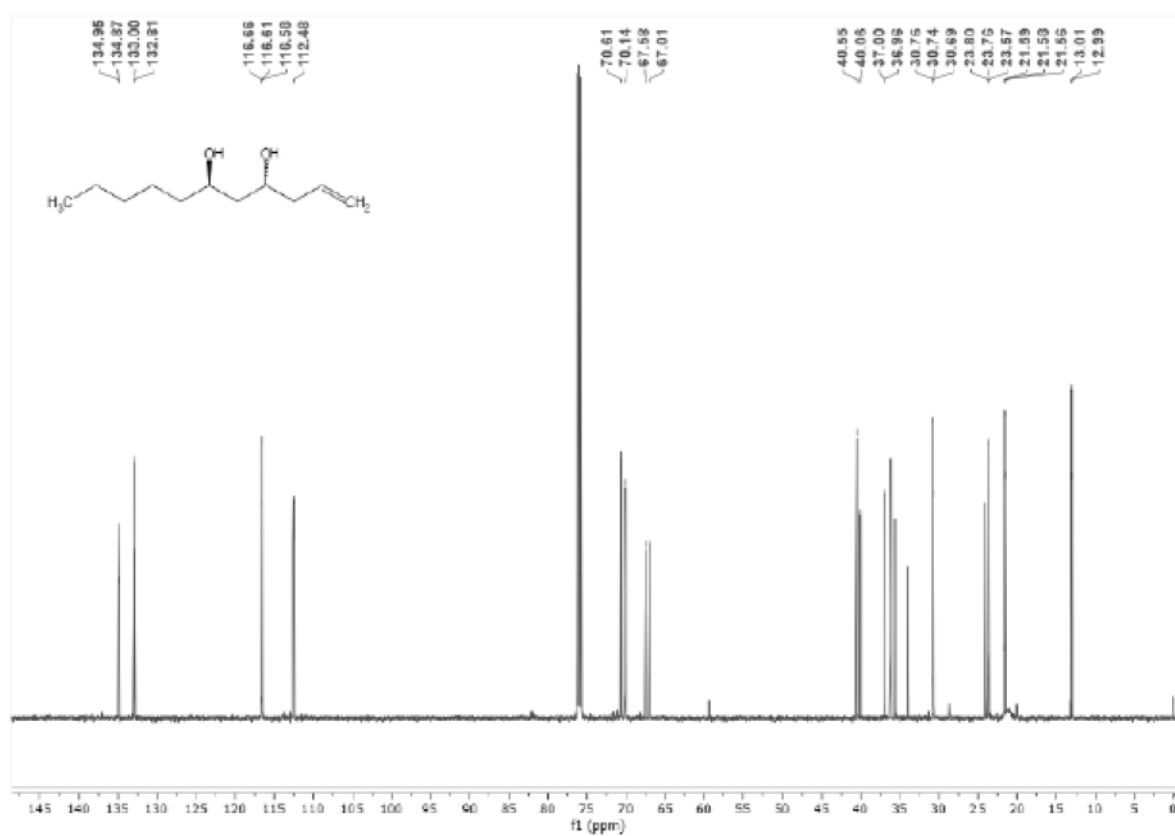


Abbildung 48: ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) des Allylierungsprodukt 9.

10.7.4 (*R*)-1-(BENZYLAMINO)OCTAN-3-OL 10

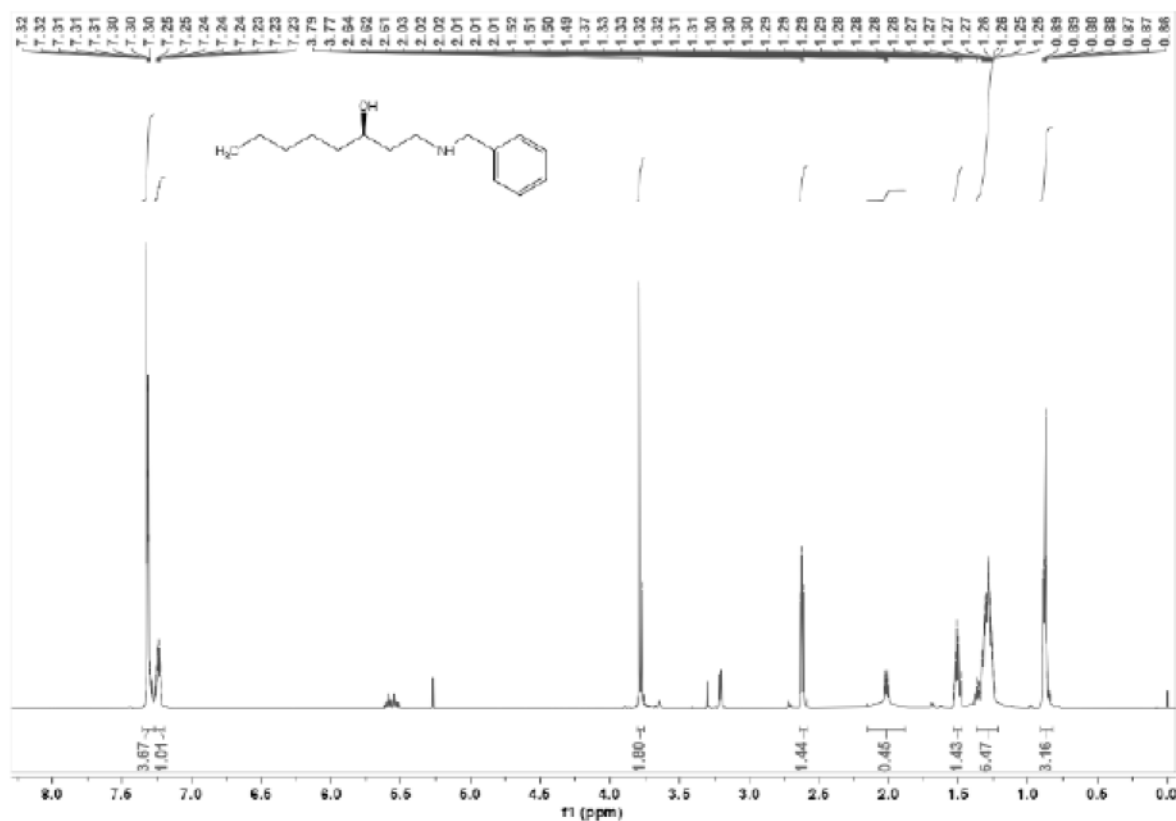


Abbildung 49: ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) des Aminierungsproduktes 10.

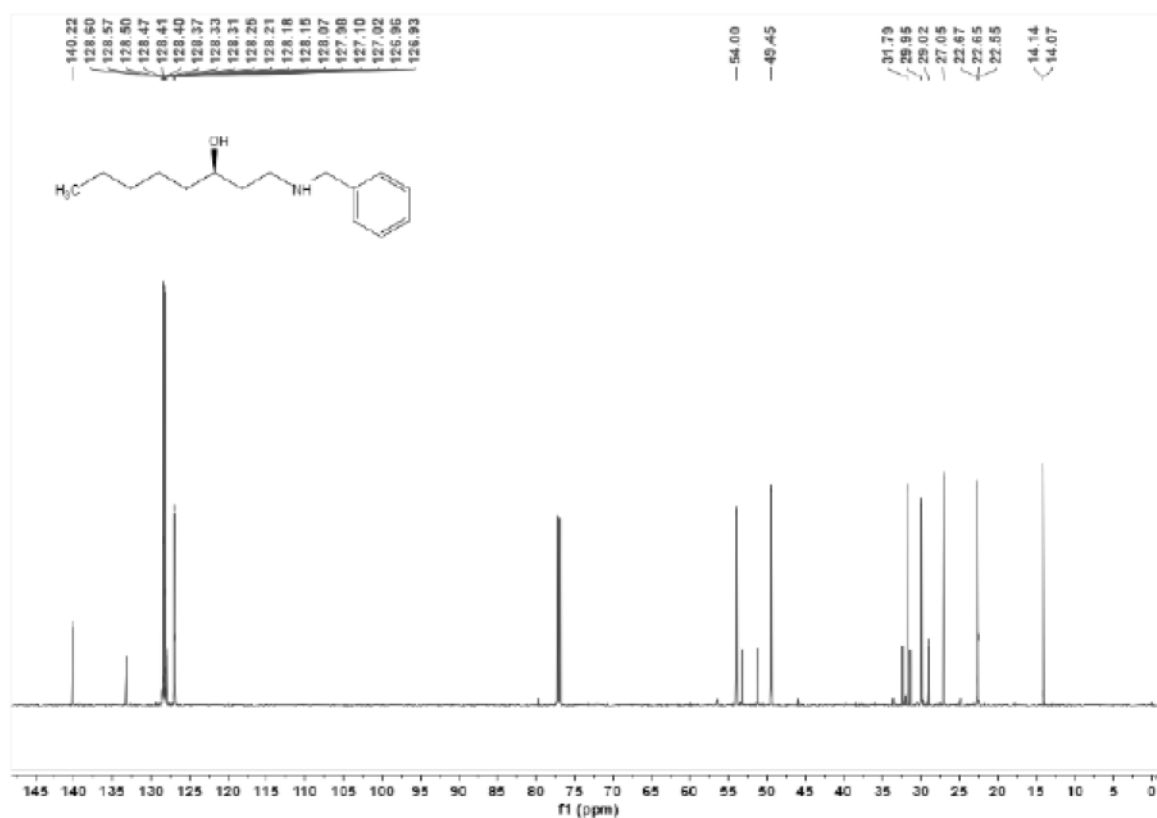


Abbildung 50: ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) der Verbindung 10.

10.7.5 (*E*)-OCT-3-ENAL 11

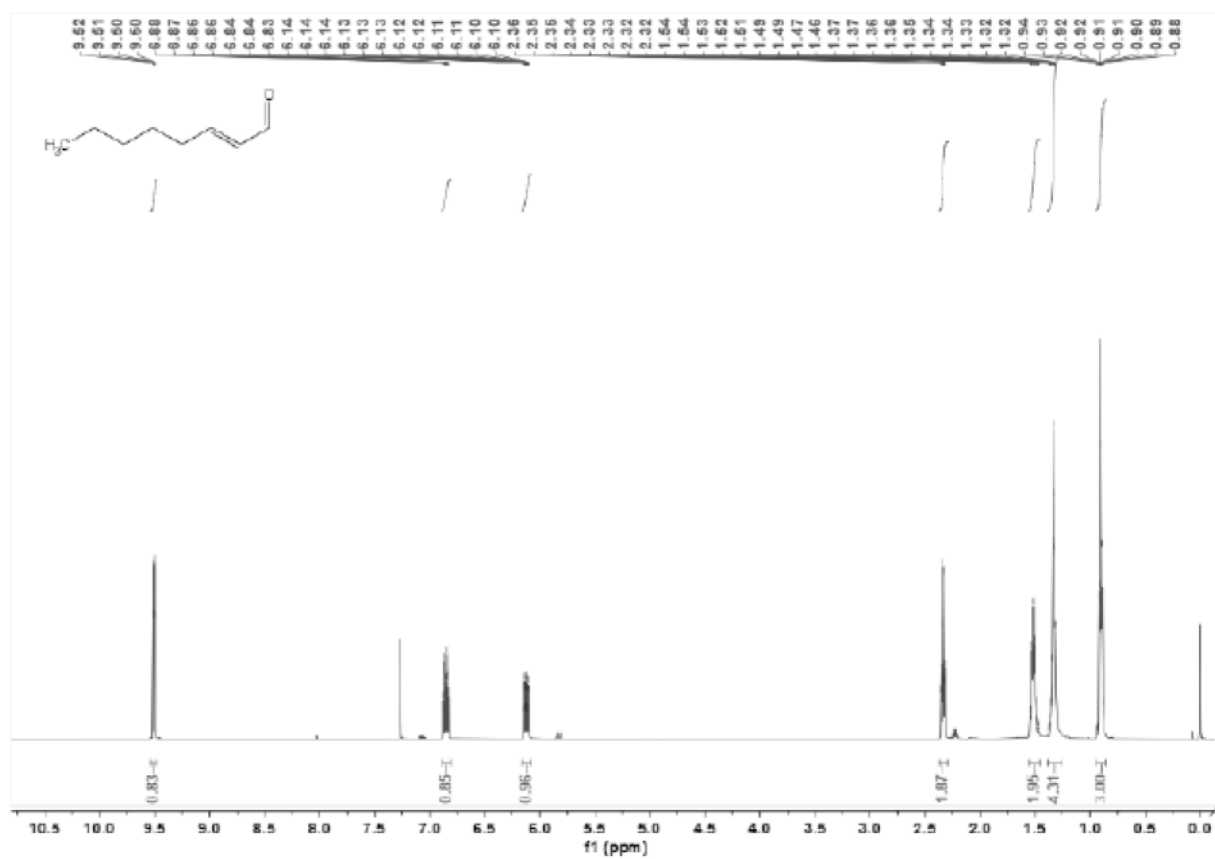


Abbildung 51: ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) des Aldehyds 11.

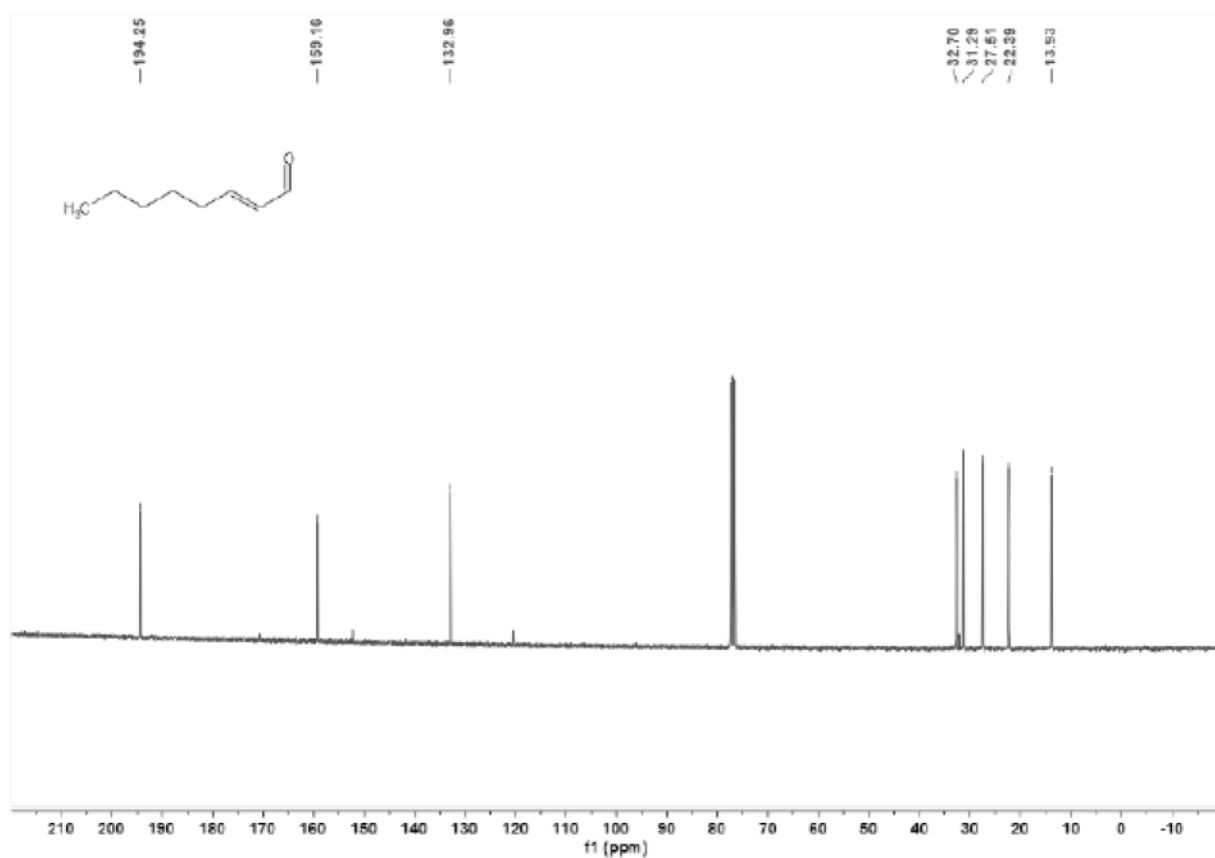


Abbildung 52: ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) des Aldehyds 11.

11 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Brovetto, D. Gamenara, P. Saenz Mendez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346-4403; 'C–C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis', doi.org/10.1021/cr100299p.
- [2] B. Alcaide, P. Almendros, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 858-860; 'The Direct Catalytic Asymmetric Cross-Aldol Reaction of Aldehydes'; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 8, 884-886, doi.org/10.1002/anie.200390232.
- [3] W. A. Greenberg, A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. Huang, P. Chen, M. J. Burk, *PNAS* **2004**, *101*, 5788-5793; 'Development of an Efficient, Scalable, Aldolase-Catalyzed Process for Enantioselective Synthesis of Statin Intermediates', doi.org/10.1073/pnas.0307563101.
- [4] S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537-548; 'Directed Evolution of an Industrial Biocatalyst: 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase', doi.org/10.1002/biot.200600020.
- [5] A. M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, E. Déziel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1323-1336; 'Rhamnolipids: Diversity of Structures, Microbial Origins and Roles', doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2.
- [6] T. Adams, C. L. Gavin, S. Taylor, W. Waddell, S. M. Cohen, V. Feron, J. Goodman, I. Rietjens, L. Marnett, P. Portoghese, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2935-2967; 'The Fema Gras Assessment of α,β -Unsaturated Aldehydes and Related Substances Used as Flavor Ingredients', doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.082.
- [7] K. Chen, J. M. Richter, P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7247-7249; '1, 3-Diol Synthesis Via Controlled, Radical-Mediated C–H Functionalization', doi.org/10.1016/B978-0-323-96025-0.00067-3.
- [8] M. Fresia, M. Kock, T. Lindel, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 12733; 'Synthesis of (–)-Dihydroraputindole D by Enantioselective Benzoylation of a 1, 3-Diol Intermediate', doi.org/10.1002/chem.202002579.
- [9] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716; 'The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity'; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 26, 4782-4811, doi.org/10.1002/anie.200806121.
- [10] M. Dick, R. Hartmann, O. H. Weiergraber, C. Bisterfeld, T. Classen, M. Schwarten, P. Neudecker, D. Willbold, J. Pietruszka, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4492-4502; 'Mechanism-Based Inhibition of an Aldolase at High Concentrations of Its Natural Substrate Acetaldehyde: Structural Insights and Protective Strategies', doi.org/10.1039/C5SC04574F.
- [11] J. Bramski, M. Dick, J. Pietruszka, T. Classen, *J. Biotechnol.* **2017**; 'Probing the Acetaldehyde-Sensitivity of 2-Deoxy-Ribose-5-Phosphate Aldolase (DERA) Leads to Resistant Variants', doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.024.
- [12] T. Lonhienne, C. Gerday, G. Feller, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 1-10; 'Psychrophilic Enzymes: Revisiting the Thermodynamic Parameters of Activation May Explain Local Flexibility', doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00210-7.
- [13] G. Feller, F. Payan, F. Theys, M. Qian, R. Haser, C. Gerday, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 441-447; 'Stability and Structural Analysis of α -Amylase from the Antarctic Psychrophile *alteromonas haloplanctis* A23', doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18883.x.
- [14] L. Zecchinon, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, D. Delille, G. Feller, D. Georlette, E. Gratia, A. Hoyoux, M.-A. Meuwis, *Extremophiles* **2001**, *5*, 313-321; 'Did Psychrophilic Enzymes Really Win the Challenge?', doi.org/10.1007/s007920100207.
- [15] G. C. Lichtenberg, **1967**, 'Aus Den Sudelbüchern'; *Aus Sudelbuch J 860*.

- [16] R. A. Sheldon, *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13*, 20160087; 'Engineering a More Sustainable World through Catalysis and Green Chemistry', doi.org/10.1098/rsif.2016.0087.
- [17] A. Kate, L. K. Sahu, J. Pandey, M. Mishra, P. K. Sharma, *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* **2022**, *5*, 100248; 'Green Catalysis for Chemical Transformation: The Need for the Sustainable Development', doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100248.
- [18] B. D. Ribeiro, M. A. Z. Coelho, A. Machado de Castro, *RSC*, **2015**, 1-8; 'Principles of Green Chemistry and White Biotechnology', doi.org/10.1039/9781782624080-00001.
- [19] S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; 'Trends and Innovations in Industrial Biocatalysis for the Production of Fine Chemicals', doi.org/10.1016/j.copbio.2004.06.011.
- [20] F. Theil, *Enzyme in Der Organischen Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **1998**.
- [21] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer Verlag, **2018**.
- [22] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3132-3158; 'Biokatalysatoren Für Die Organische Synthese—Die Neue Generation'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070-3095, doi.org/10.1002/ange.201302195.
- [23] J. M. Woodley, *Trends biotechnol.* **2008**, *26*, 321-327; 'New Opportunities for Biocatalysis: Making Pharmaceutical Processes Greener', doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.03.004.
- [24] P. Díaz-Kruik, D. Lim, F. Paradisi, *Enabling Tools and Techniques for Organic Synthesis: A Practical Guide to Experimentation, Automation, and Computation*, Wiley VCH **2023**, 1-35.
- [25] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694-1697; 'Dispelling the Myths—Biocatalysis in Industrial Synthesis', doi.org/10.1126/science.1079237.
- [26] T. D. Machajewski, C. H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352-1375; 'The Catalytic Asymmetric Aldol Reaction'; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 8, 1406-1430, doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(20000417)39:8<1352::AID-ANIE1352>3.0.CO;2-J.
- [27] H. E. Zimmerman, M. D. Traxler, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1920-1923; 'The Stereochemistry of the Ivanov and Reformatsky Reactions. I', doi.org/10.1021/ja01565a041.
- [28] C. H. Heathcock, C. T. Buse, W. A. Kleschick, M. C. Pirrung, J. E. Sohn, J. Lampe, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1066-1081; 'Acyclic Stereoselection. 7. Stereoselective Synthesis of 2-Alkyl-3-Hydroxy Carbonyl Compounds by Aldol Condensation', doi.org/10.1021/jo01294a030.
- [29] J. Matsuo, M. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9109-9118; 'The Mukaiyama Aldol Reaction: 40 Years of Continuous Development'; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 35, 9280-9289, doi.org/10.1002/anie.201303192.
- [30] C. H. Heathcock, *Asymm. synth.* **2012**, *3*, 111-212; 'The Aldol Addition Reaction'.
- [31] D. Evans, J. Nelson, T. Taber, *Top. Stereochem.* **1982**, 1-115; 'Stereoselective Aldol Condensations', doi.org/10.1002/9780470147221.
- [32] R. Mahrwald, D. Evans, *Modern Aldol Reactions, Vol. 1*, Wiley-VCH Weinheim, **2004**.
- [33] D. Evans, J. Nelson, E. Vogel, T. Taber, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3099-3111; 'Stereoselective Aldol Condensations Via Boron Enolates', doi.org/10.1016/B978-0-32-390644-9.00068-8.
- [34] H. J. M. Gijzen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8422-8423; 'Unprecedented Asymmetric Aldol Reactions with Three Aldehyde Substrates Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase', doi.org/10.1021/ja00097a082.
- [35] M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 362-365; 'Chemoenzymatic Synthesis of Building Blocks for Statin Side Chains'; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 366-369, doi.org/10.1002/anie.200460852.

- [36] M. Wolberg, B. H. N. Dassen, M. Schürmann, S. Jennewein, M. G. Wubbolts, H. E. Schoemaker, D. Mink, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1751-1759; 'Large-Scale Synthesis of New Pyranoid Building Blocks Based on Aldolase-Catalysed Carbon-Carbon Bond Formation', doi.org/10.1002/adsc.200800224.
- [37] J. M. Patel, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2009**, *61*, 123-128; 'Biocatalytic Synthesis of Atorvastatin Intermediates', doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.07.004.
- [38] M. Ošljaj, J. Cluzeau, D. Orkić, G. Kopitar, P. Mrak, Z. Časar, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62250; 'A Highly Productive, Whole-Cell Dera Chemoenzymatic Process for Production of Key Lactonized Side-Chain Intermediates in Statin Synthesis', doi.org/10.1371/journal.pone.0062250.
- [39] B. Grabner, Y. Pokhilchuk, H. J. C. Gruber-Woelfler, *Catalysts*, **2020**, *10*, 137; 'Dera in Flow: Synthesis of a Statin Side Chain Precursor in Continuous Flow Employing Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase Immobilized in Alginate-Luffa Matrix', doi.org/10.3390/catal10010137.
- [40] D. Holt, M. J. Gaunt, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 7968-7972; 'Copper-Catalyzed Oxy-Alkenylation of Homoallylic Alcohols to Generate Functional Syn-1, 3-Diol Derivatives'; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 27, 7857-7861, doi.org/10.1002/ange.201501995.
- [41] T. Kochi, T. P. Tang, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11276-11282; 'Development and Application of a New General Method for the Asymmetric Synthesis of S Yn-and a Nti-1, 3-Amino Alcohols', doi.org/10.1021/ja0363462.
- [42] S. Shibahara, S. Kondo, K. Maeda, H. Umezawa, M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4353-4354; 'Total Syntheses of Negamycin and the Antipode', doi.org/10.1021/ja00767a059.
- [43] S. Knapp, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1859-1876; 'Synthesis of Complex Nucleoside Antibiotics', doi.org/10.1016/B978-0-443-16166-7.00011-6.
- [44] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235; 'Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How', doi.org/10.1039/C3CS60075K.
- [45] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren: Eine Einführung*, Springer-Verlag, **2013**.
- [46] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3458-3459; 'Enzymimmobilisierung: Ein Weg Zu Verbesserten Biokatalysatoren'; *Angew. Chem.Int. Ed.*, **2003**, *42*, 29, 3336-3337.
- [47] R. Porta, M. Benaglia, A. Puglisi, *Org. Proc. Res. Dev.* **2016**, *20*, 2-25; 'Flow Chemistry: Recent Developments in the Synthesis of Pharmaceutical Products', doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00325.
- [48] M. P. Thompson, I. Peñafiel, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *23*, 9-18; 'Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals', doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00305.
- [49] B. Gutmann, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6688-6728; 'Continuous-Flow Technology—a Tool for the Safe Manufacturing of Active Pharmaceutical Ingredients'; *Angew. Chem.*, **2015**, *127*, 23, 6788-6832, doi.org/10.1002/anie.201409318.
- [50] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 613-630; 'The Flow Synthesis of Heterocycles for Natural Product and Medicinal Chemistry Applications'.
- [51] M. Baumann, T. S. Moody, M. Smyth, S. Wharry, *Org. Proc. Res. Dev.* **2020**, *24*, 1802-1813; 'A Perspective on Continuous Flow Chemistry in the Pharmaceutical Industry', doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00524.
- [52] J. Britton, S. Majumdar, G. A. Weiss, *Chem. Soc. Rev.* **2018**; 'Continuous Flow Biocatalysis', doi.org/10.1039/C7CS00906B.

- [53] D. S. Khafaga, M. G. Radwan, G. Muteeb, M. Aatif, M. Farhan, *Catalysts* **2023**, *13*, 1448; 'Green Synthesis of Biocatalysts Based on Nanocarriers Promises an Effective Role in Pharmaceutical and Biomedical Fields', doi.org/10.3390/catal13111448.
- [54] A. Szekrenyi, X. Garrabou, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapés, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 724-729; 'Asymmetric Assembly of Aldose Carbohydrates from Formaldehyde and Glycolaldehyde by Tandem Biocatalytic Aldol Reactions', doi.org/10.1038/nchem.2321
- [55] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *Science* **2001**, *294*, 369-374; 'Observation of Covalent Intermediates in an Enzyme Mechanism at Atomic Resolution', doi.org/10.1126/science.106360.
- [56] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Perie, M. Willson, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, *63*, 301-340; 'Class I Aldolases: Substrate Specificity, Mechanism, Inhibitors and Structural Aspects', doi.org/10.1016/0079-6107(95)00008-9.
- [57] A. K. Samland, G. A. Sprenger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 253-264; 'Microbial Aldolases as C-C Bonding Enzymes—Unknown Treasures and New Developments', doi.org/10.1007/s00253-006-0422-6.
- [58] J. A. Littlechild, H. C. Watson, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 36-39; 'A Data-Based Reaction Mechanism for Type I Fructose Bisphosphate Aldolase', doi.org/10.1016/0968-0004(93)90048-R.
- [59] W. D. Fessner, A. Schneider, H. Held, G. Sinerius, C. Walter, M. Hixon, J. V. Schloss, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2219-2221; 'The Mechanism of Class II, Metal-Dependent Aldolases'; *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 19, 2366-2369, doi.org/10.1002/anie.199622191.
- [60] B. S. Szwegold, K. Ugurbil, T. R. Brown, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 244-252; 'Properties of Fructose-1, 6-Bisphosphate Aldolase from Escherichia Coli: An Nmr Analysis', doi.org/10.1006/abbi.1995.1159.
- [61] M. G. Tozzi, M. Camici, L. Mascia, F. Sgarrella, P. L. Ipata, *FEBS J.* **2006**, *273*, 1089-1101; 'Pentose Phosphates in Nucleoside Interconversion and Catabolism', doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05155.x.
- [62] E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1952**, *196*, 347-365; 'Enzymatic Synthesis and Breakdown of Desoxyribose Phosphate', doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55739-2.
- [63] W. E. Pricer, B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1292-1298; 'Deoxyribose Aldolase from Lactobacillus Plantarum', doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69401-3.
- [64] E. Grazi, Grazi, H. Meloche, G. Martinez, W. A. Wood, B. L. Horecker, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1963**, *10*, 4-10; 'Evidence for Schiff Base Formation in Enzymatic Aldol Condensations', doi.org/10.1016/0006-291X(63)90257-2.
- [65] O. M. Rosen, P. Hoffee, B. L. Horecker, J. C. Speck, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2092-2093; 'The Acetaldehyde-2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase Complex: Comparison of the Product Obtained on Borohydride Reduction and Hydrolysis with Synthetic N6-Ethyllysine', doi.org/10.1021/ja01064a054.
- [66] P. Valentin Hansen, F. Boetius, K. Hammer Jespersen, I. Svendsen, *Eur. J Biochem.* **1982**, *125*, 561-566; 'The Primary Structure of Escherichia Coli K12 2-Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase. Nucleotide Sequence of the Deoc Gene and the Amino Acid Sequence of the Enzyme', doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06719.x.
- [67] A. Heine, J. G. Luz, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1019-1034; 'Analysis of the Class I Aldolase Binding Site Architecture Based on the Crystal Structure of 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase at 0.99 Å Resolution', doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.066.
- [68] G. DeSantis, J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 43-52; 'Structure-Based Mutagenesis Approaches toward Expanding the Substrate Specificity of D-2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase', doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00429-7.

- [69] F. H. Arnold, *Chem. Engin. Sci.* **1996**, *51*, 5091-5102; 'Directed Evolution: Creating Biocatalysts for the Future', doi.org/10.1016/S0009-2509(96)00288-6.
- [70] H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Yoshihara, K. Satoh, R. Kawakami, Y. Uto, H. Tsuge, K. Takahashi, H. Hori, T. Ohshima, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7427-7434; 'Sequential Aldol Condensation Catalyzed by Hyperthermophilic 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase', doi.org/10.1128/AEM.01101-07.
- [71] Y.-M. Kim, N.-S. Choi, Y. O. Kim, D. H. Son, Y.-H. Chang, J. J. Song, J. S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20*, 995-1000; 'Expression and Characterization of a Novel Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase from *Paenibacillus* Sp. Ea001', doi.org/10.4014/jmb.0912.12003.
- [72] X.-C. Jiao, J. Pan, G.-C. Xu, X.-D. Kong, Q. Chen, Z.-J. Zhang, J.-H. Xu, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 4048-4054; 'Efficient Synthesis of a Statin Precursor in High Space-Time Yield by a New Aldehyde-Tolerant Aldolase Identified from *Lactobacillus Brevis*', doi.org/10.1039/C5CY00537J.
- [73] I. Kullartz, J. Pietruszka, *J. Biotechnol.* **2012**, *161*, 174-180; 'Cloning and Characterisation of a New 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase from *Rhodococcus Erythropolis*', doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.018.
- [74] F. Sgarrella, A. Del Corso, M. G. Tozzi, M. Camici, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, *1118*, 130-133; 'Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase of *Bacillus Cereus*: Purification and Properties', doi.org/10.1016/0167-4838(92)90139-5.
- [75] Y.-M. Kim, Y.-H. Chang, N.-S. Choi, Y. Kim, J. J. Song, J. S. Kim, *Prot. Express. Pur.* **2009**, *68*, 196-200; 'Cloning, Expression, and Characterization of a New Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase from *Yersinia* Sp. Ea015', doi.org/10.1016/j.pep.2009.06.002.
- [76] Q. Wang, *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 2898-2905; 'Cloning and Characterization of Thermostable-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase from *Hyperthermus Butylicus*', doi.org/10.5897/AJB2010-3119.
- [77] M.-H. Woo, M. Kim, N. Chung, J.-S. Kim, *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **2014**, *57*, 655-660; 'Expression and Characterization of a Novel 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase from *Haemophilus Influenzae* Rd Kw20', doi.org/10.1007/s13765-014-4231-9.
- [78] T.-P. Cao, J.-S. Kim, M.-H. Woo, J. Choi, Y. Jun, K. Lee, S. Lee, *J. Microbiol.* **2016**, *54*, 311-321; 'Structural Insight for Substrate Tolerance to 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase from the Pathogen *Streptococcus Suis*', doi.org/10.1007/s12275-016-6029-4.
- [79] C. F. Barbas, Y. F. Wang, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013-2014; 'Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase as a Synthetic Catalyst', doi.org/10.1016/B978-0-12-411518-7.00010-X.
- [80] L. Chen, D. P. Dumas, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 741-748; 'Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase as a Catalyst in Asymmetric Aldol Condensation', doi.org/10.1021/acs.joc.4c02819.
- [81] H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2947-2948; 'Sequential One-Pot Aldol Reactions Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase and Fructose-1,6-Diphosphate Aldolase', doi.org/10.1021/ja00115a038.
- [82] H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7585-7591; 'Sequential Three- and Four-Substrate Aldol Reactions Catalyzed by Aldolases', doi.org/10.1021/ja00134a001.
- [83] C.-H. Wong, E. Garcia-Junceda, L. Chen, O. Blanco, H. J. M. Gijsen, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3333-3339; 'Recombinant 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Use of Sequential Two-Substrate and Three-Substrate Aldol Reactions', doi.org/10.1021/ja00117a003.
- [84] W.-C. Chou, L. Chen, J.-M. Fang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6191-6194; 'A New Route to Deoxythio Sugars Based on Aldolases', doi.org/10.1021/ja00093a018.

- [85] T. D. Machajewski, C.-H. Wong, *Synthesis* **1999**, 1999, 1469-1472; 'Chemoenzymatic Synthesis of Key Epothilone Fragments', doi.org/10.1055/s-1999-3650.
- [86] J. Liu, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1462-1465; 'Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis of Novel Pyranose Synthons as a New Entry to Heterocycles and Epothilones'; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 8, 1404-1407, doi.org/10.1002/1521-3773(20020415)41:8<1404::aid-anie1404>3.0.co;2-g.
- [87] J. G. T. Kierkels, D. Mink, S. Panke, F. A. M. Lommen, D. Heemskerk, DSM IP Assets Bv. **2003**, Process for the Preparation of 2,4-Dideoxyhexoses and 2,4,6-Trideoxyhexoses, WO2003006656 A3.
- [88] J. Liu, C.-C. Hsu, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2439-2441; 'Sequential Aldol Condensation Catalyzed by Dera Mutant Ser238asp and a Formal Total Synthesis of Atorvastatin', doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.110.
- [89] M. Haridas, E. M. Abdelraheem, U. Hanefeld, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 1-13; '2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase (DERA): Applications and Modifications', doi.org/10.1007/s00253-018-9392-8.
- [90] Z.-Y. You, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 40, 29-39; 'Characterization and Application of a Newly Synthesized 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase', doi.org/10.1007/s10295-012-1213-y.
- [91] T. Vajdič, M. Ošljaj, G. Kopitar, P. Mrak, *Metabol. Eng.* **2014**, 24, 160-172; 'Engineered, Highly Productive Biosynthesis of Artificial, Lactonized Statin Side-Chain Building Blocks: The Hidden Potential of Escherichia Coli Unleashed', https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.012.
- [92] M. A. Huffman, A. Fryszkowska, O. Alvizo, M. Borra-Garske, K. R. Campos, P. N. Devine, D. Duan, J. H. Forstater, S. T. Grosser, H. M. J. S. Halsey, *Science*, **2019**, 366, 1255-1259; 'Design of an in Vitro Biocatalytic Cascade for the Manufacture of Islatravir', doi.org/10.1126/science.aay848.
- [93] M. Dick, O. H. Weiergräber, T. Classen, C. Bisterfeld, J. Bramski, H. Gohlke, J. Pietruszka, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 17908; 'Trading Off Stability against Activity in Extremophilic Aldolases', doi.org/10.1038/srep17908.
- [94] K. Nemr, J. E. Müller, J. C. Joo, P. Gawand, R. Choudhary, B. Mendonca, S. Lu, X. Yu, A. F. Yakunin, R. Mahadevan, *Metab. Eng.* **2018**, 48, 13-24; 'Engineering a Short, Aldolase-Based Pathway for (R)-1, 3-Butanediol Production in Escherichia Coli', doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.013.
- [95] E. V. Makshina, M. Dusselier, W. Janssens, J. Degreve, P. A. Jacobs, B. F. Sels, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 7917-7953; 'Review of Old Chemistry and New Catalytic Advances in the on-Purpose Synthesis of Butadiene', doi.org/10.1039/C4CS00105B.
- [96] W. Sabra, C. Groeger, A.-P. Zeng, *Bioreac. Eng. Res. Indust. App. I* **2015**, 165-197; 'Microbial Cell Factories for Diol Production', doi.org/10.1007/10_2015_330.
- [97] T. Kim, P. J. Stogios, A. N. Khusnutdinova, K. Nemr, T. Skarina, R. Flick, J. C. Joo, R. Mahadevan, A. Savchenko, A. F. Yakunin, *J. Biol. Chem.* **2019**, 295, 2, 597-609; 'Rational Engineering of 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolases for the Biosynthesis of (R)-1, 3-Butanediol', doi.org/10.1074/jbc.RA119.011346.
- [98] A. R. Bogdan, A. W. Dombrowski, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 6422-6468; 'Emerging Trends in Flow Chemistry and Applications to the Pharmaceutical Industry', doi.org/10.1021/ml400316p.
- [99] K. F. Jensen, *AIChE J.* **2017**, 63, 858-869; 'Flow Chemistry—Microreaction Technology Comes of Age', doi.org/10.1002/aic.15642.
- [100] R. Gérardy, R. Morodo, J. Estager, P. Luis, D. P. Debecker, J.-C. M. Monbaliu, *Acc. Sust. Flow Chem.* **2020**, 111-145; 'Sustaining the Transition from a Petrobased to a Biobased Chemical Industry with Flow Chemistry', doi.org/10.1007/s41061-018-0222-3.

- [101] M. B. Plutschack, B. u. Pieber, K. Gilmore, P. H. Seeberger, *Chem. Rev.* **2017**; 'The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry', doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00183.
- [102] D. T. McQuade, P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6384-6389; 'Applying Flow Chemistry: Methods, Materials, and Multistep Synthesis', doi.org/10.1021/jo400583m.
- [103] J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 17-57; 'Flow Chemistry—a Key Enabling Technology for (Multistep) Organic Synthesis', doi.org/10.1002/adsc.201100584.
- [104] R. Ricciardi, J. Huskens, W. Verboom, *J. Flow Chem.* **2013**, *3*, 127-131; 'Heterogeneous Acid Catalysis Using a Perfluorosulfonic Acid Monolayer-Functionalized Microreactor', doi.org/10.1556/jfc-d-13-00024.
- [105] A. R. Bogdan, K. James, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4060-4063; 'Synthesis of 5-Iodo-1, 2, 3-Triazole-Containing Macrocycles Using Copper Flow Reactor Technology', doi.org/10.1021/ol201567s.
- [106] J. Bao, G. K. Tranmer, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 3037-3044; 'The Utilization of Copper Flow Reactors in Organic Synthesis', doi.org/10.1039/C4CC09221J.
- [107] A. Kirschning, W. Solodenko, K. Mennecke, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5972-5990; 'Combining Enabling Techniques in Organic Synthesis: Continuous Flow Processes with Heterogenized Catalysts', <https://doi.org/10.1002/chem.200600236>.
- [108] R. Nickel, N. Sponge; 'H-Cube® Application Note'.
- [109] S. Saaby, K. R. Knudsen, M. Ladlow, S. V. Ley, *Chem. Comm.* **2005**, 2909-2911; 'The Use of a Continuous Flow-Reactor Employing a Mixed Hydrogen–Liquid Flow Stream for the Efficient Reduction of Imines to Amines', doi.org/10.1039/B504854K.
- [110] C. K. Lee, A. B. Holmes, S. V. Ley, I. F. McConvey, B. Al-Duri, G. A. Leeke, R. C. Santos, J. P. Seville, *Chem. Comm.* **2005**, 2175-2177; 'Efficient Batch and Continuous Flow Suzuki Cross-Coupling Reactions under Mild Conditions, Catalysed by Polyurea-Encapsulated Palladium (II) Acetate and Tetra-N-Butylammonium Salts', doi.org/10.1039/B418669A.
- [111] N. T. Phan, J. Khan, P. Styring, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 12065-12073; 'Polymer-Supported Palladium Catalysed Suzuki–Miyaura Reactions in Batch and a Mini-Continuous Flow Reactor System', <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.07.109>.
- [112] S. J. Haswell, B. O'Sullivan, P. Styring, *Lab on a Chip* **2001**, *1*, 164-166; 'Kumada–Corriu Reactions in a Pressure-Driven Microflow Reactor', doi.org/10.1039/B104035A.
- [113] N. T. Phan, D. H. Brown, P. Styring, *Green Chem.* **2004**, *6*, 526-532; 'A Facile Method for Catalyst Immobilisation on Silica: Nickel-Catalysed Kumada Reactions in Mini-Continuous Flow and Batch Reactors', doi.org/10.1039/B405203J.
- [114] D. Perera, J. W. Tucker, S. Brahmabhatt, C. J. Helal, A. Chong, W. Farrell, P. Richardson, N. W. Sach, *Science* **2018**, *359*, 429-434; 'A Platform for Automated Nanomole-Scale Reaction Screening and Micromole-Scale Synthesis in Flow', doi.org/10.1126/science.aap9112.
- [115] N. Kockmann, M. Gottsponer, B. Zimmermann, D. M. Roberge, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7470-7477; 'Enabling Continuous-Flow Chemistry in Microstructured Devices for Pharmaceutical and Fine-Chemical Production', doi.org/10.1002/chem.200800707.
- [116] D. M. Roberge, B. Zimmermann, F. Rainone, M. Gottsponer, M. Eyholzer, N. Kockmann, *Org. Proc. Res. Dev.* **2008**, *12*, 905-910; 'Microreactor Technology and Continuous Processes in the Fine Chemical and Pharmaceutical Industry: Is the Revolution Underway?', doi.org/10.1021/op8001273.
- [117] N. G. Anderson, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 852-869; 'Using Continuous Processes to Increase Production', doi.org/10.1021/op200347k.

- [118] I. R. Baxendale, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88*, 519-552; 'The Integration of Flow Reactors into Synthetic Organic Chemistry', doi.org/10.1002/jctb.4012.
- [119] S. V. Ley, *Chem. Rec.* **2012**, *12*, 378-390; 'On Being Green: Can Flow Chemistry Help?', doi.org/10.1002/tcr.201100041.
- [120] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *J. Chem. Soc.* **2000**, *23*, 3815-4195; 'Multi-Step Organic Synthesis Using Solid-Supported Reagents and Scavengers: A New Paradigm in Chemical Library Generation', doi.org/10.1039/B006588I.
- [121] T. Tsubogo, H. Oyamada, S. Kobayashi, *Nature* **2015**, *520*, 329-332; 'Multistep Continuous-Flow Synthesis of (R)- and (S)-Rolipram Using Heterogeneous Catalysts', doi.org/10.1038/nature14343.
- [122] T. Tsubogo, Y. Yamashita, S. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13624-13628; 'Toward Efficient Asymmetric Carbon-Carbon Bond Formation: Continuous Flow with Chiral Heterogeneous Catalysts', doi.org/10.1002/chem.201202896.
- [123] J. C. Pastre, D. L. Browne, S. V. Ley, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8849-8869; 'Flow Chemistry Syntheses of Natural Products', doi.org/10.1039/C3CS60246J.
- [124] I. R. Baxendale, C. M. Griffiths-Jones, S. V. Ley, G. K. Tranmer, *Synlett* **2006**, *2006*, 0427-0430; 'Preparation of the Neolignan Natural Product Grossamide by a Continuous-Flow Process', doi.org/10.1055/s-2006-926244.
- [125] J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443-1454; 'Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects', doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.
- [126] E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1-6; '(Chemo)Enzymatic Cascades—Nature's Synthetic Strategy Transferred to the Laboratory', https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.007.
- [127] G. Hughes, J. C. Lewis, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1-3; 'Introduction: Biocatalysis in Industry', doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00741.
- [128] A. Schmid, J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268; 'Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow', doi.org/10.1038/35051736.
- [129] R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Comm.* **2018**; 'The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope', doi.org/10.1039/C8CC02463D.
- [130] F. H. Arnold, A. A. Volkov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54-59; 'Directed Evolution of Biocatalysts', https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80010-6.
- [131] M. S. Packer, D. R. Liu, *Nature Rev. Gen.* **2015**, *16*, 379-394; 'Methods for the Directed Evolution of Proteins', doi.org/10.1038/nrg3927.
- [132] P. De Santis, L.-E. Meyer, S. Kara, *React. Chem. Engin.* **2020**, *5*, 2155-2184; 'The Rise of Continuous Flow Biocatalysis—Fundamentals, Very Recent Developments and Future Perspectives', doi.org/10.1039/D0RE00335B.
- [133] P. V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Proc. biochem.* **2008**, *43*, 1019-1032; 'Enzyme Stability and Stabilization—Aqueous and Non-Aqueous Environment', doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004.
- [134] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 185-205; 'Enzyme Immobilization: An Update', doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9.
- [135] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290-6307; 'Modifying Enzyme Activity and Selectivity by Immobilization', doi.org/10.1039/C2CS35231A.
- [136] L. Tamborini, P. Fernandes, F. Paradisi, F. Molinari, *Trends Biotechnol.* **2017**; 'Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification', doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.005.
- [137] I. R. Baxendale, J. Deeley, C. M. Griffiths-Jones, S. V. Ley, S. Saaby, G. K. Tranmer, *Chem. comm.* **2006**, 2566-2568; 'A Flow Process for the Multi-Step Synthesis of the

- Alkaloid Natural Product Oxomaritidine: A New Paradigm for Molecular Assembly', doi.org/10.1039/B600382F.
- [138] G. Ölcücü, U. Krauss, K.-E. Jäger, J. Pietruszka, *Chem. Ing. Tech.* **2023**, *95*, 4, 531-542, 'Carrier-Free Enzyme Immobilizates for Flow Chemistry', doi.org/10.1002/cite.202200167.
- [139] A. Buthe, *Nanoscale Biocatal.* **2011**, 223-237, 'Entrapment of Enzymes in nanoporous Sol-Gels', doi.org/10.1007/978-1-61779-132-1_18.
- [140] A. Pierre, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 145-170; 'The Sol-Gel Encapsulation of Enzymes', doi.org/10.1080/10242420412331283314.
- [141] M. Bilal, M. Asgher, H. MN Iqbal, *Prot. Pept. Lett.* **2016**, *23*, 812-818; 'Polyacrylamide Gel-Entrapped Fungal Manganese Peroxidase from *Ganoderma Lucidum* Ibl-05 with Enhanced Catalytic, Stability, and Reusability Characteristics', doi.org/10.2174/0929866523999160722145740.
- [142] M. A. Nawaz, A. Aman, H. U. Rehman, Z. Bibi, A. Ansari, Z. Islam, I. A. Khan, S. A. U. Qader, *Appl. biochem. biotechnol.* **2016**, *179*, 383-397; 'Polyacrylamide Gel-Entrapped Maltase: An Excellent Design of Using Maltase in Continuous Industrial Processes', doi.org/10.1007/s12010-016-2001-3.
- [143] J. Jegan Roy, T. Emilia Abraham, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3705-3722; 'Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals', doi.org/10.1021/cr0204707.
- [144] R. Sheldon, *Biochem. Soc. Transact.* **2007**, *35*, 1583-1587; 'Cross-Linked Enzyme Aggregates (Clea®s): Stable and Recyclable Biocatalysts', doi.org/10.1042/BST0351583.
- [145] W. Hartmeier, *Trends Biotechnol.* **1985**, *3*, 149-153; 'Immobilized Biocatalysts—from Simple to Complex Systems', doi.org/10.1016/0167-7799(85)90104-0.
- [146] E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, *J. Mol. catal. B: enzym.* **2000**, *10*, 157-176; 'Eupergit® C, a Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial Potential', doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7.
- [147] A. I. Kallenberg, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905-926; 'Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance', doi.org/10.1002/adsc.200505042.
- [148] M. Tu, X. Zhang, A. Kurabi, N. Gilkes, W. Mabee, J. Saddler, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 151-156; 'Immobilization of β -Glucosidase on Eupergit C for Lignocellulose Hydrolysis', doi.org/10.1007/s10529-005-5328-3.
- [149] Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic, R. Prodanovic, *Biochem. Engin. J.* **2006**, *30*, 269-278; 'Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* on Eupergit® C Supports by Covalent Attachment', doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009.
- [150] Ö. Alptekin, S. S. Tükel, D. Yıldırım, D. Alagöz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 177-183; 'Immobilization of Catalase onto Eupergit C and Its Characterization', doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.010.
- [151] M. L. Contente, F. Paradisi, *Nature Catal.* **2018**, *1*, 452-459; 'Self-Sustaining Closed-Loop Multienzyme-Mediated Conversion of Amines into Alcohols in Continuous Reactions', doi.org/10.1038/s41929-018-0082-9.
- [152] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 435-456; 'Strategies for the One-Step Immobilization-Purification of Enzymes as Industrial Biocatalysts', doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.
- [153] C. G. England, H. Luo, W. Cai, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 975-986; 'Halotag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications', doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00191.

- [154] Y. Li, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, *55*, 73-83; 'Commonly Used Tag Combinations for Tandem Affinity Purification', doi.org/10.1042/BA20090273.
- [155] L. P. Encell, R. F. Ohana, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, M. G. Wood, G. V. Los, M. G. McDougall, C. Zimprich, N. Karassina, *Curr. Chem. Genom.* **2012**, *6*, 55; 'Suppl 1: Development of a Dehalogenase-Based Protein Fusion Tag Capable of Rapid, Selective and Covalent Attachment to Customizable Ligands', doi.org/10.2174/1875397301206010055.
- [156] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382; 'Halotag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis', doi.org/10.1021/cb800025k.
- [157] I. Popa, R. Berkovich, J. Alegre-Cebollada, C. L. Badilla, J. A. Rivas-Pardo, Y. Taniguchi, M. Kawakami, J. M. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12762-12771; 'Nanomechanics of Halotag Tethers', doi.org/10.1021/ja4056382.
- [158] J. Döbber, M. Pohl, *J. Biotechnol.* **2017**, *241*, 170-174; 'Halotag™: Evaluation of a Covalent One-Step Immobilization for Biocatalysis', doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.004.
- [159] J. Döbber, M. Pohl, S. Ley, B. Musio, *Reac. Chem. Engin.* **2018**, *3*, 8-12; 'Rapid, Selective and Stable Halotag-Lb Adh Immobilization Directly from Crude Cell Extract for the Continuous Biocatalytic Production of Chiral Alcohols and Epoxides', doi.org/10.1039/C7RE00173H.
- [160] J. Döbber, T. Gerlach, H. Offermann, D. Rother, M. Pohl, *Green Chem.* **2018**, *20*, 544-552; 'Closing the Gap for Efficient Immobilization of Biocatalysts in Continuous Processes: Halotag™ Fusion Enzymes for a Continuous Enzymatic Cascade Towards a Vicinal Chiral Diol', doi.org/10.1039/C7GC03225K.
- [161] B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2894-2901; 'Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [Nadp (H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis', doi.org/10.1002/adsc.202000058.
- [162] M. Haridas, C. Bisterfeld, L. M. Chen, S. R. Marsden, F. Tonin, R. Médici, A. Iribarren, E. Lewkowicz, P.-L. Hagedoorn, U. J. C. Hanefeld, *Catalysts* **2020**, *10*, 883; 'Discovery and Engineering of an Aldehyde Tolerant 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase (Dera) from Pectobacterium Atrosepticum', doi.org/10.3390/catal10080883.
- [163] F. Subrizi, M. Crucianelli, V. Grossi, M. Passacantando, G. Botta, R. Antiochia, R. Saladino, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3059-3068; 'Versatile and Efficient Immobilization of 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase (DERA) on Multiwalled Carbon Nanotubes', doi.org/10.1021/cs500511c.
- [164] T. Y. Nara, H. Togashi, S. Ono, M. Egami, C. Sekikawa, Y.-H. Suzuki, I. Masuda, J. Ogawa, N. Horinouchi, S. Shimizu, F. Mizukami, T. Tsunoda, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 181-186; 'Improvement of Aldehyde Tolerance and Sequential Aldol Condensation Activity of Deoxyriboaldolase Via Immobilization on Interparticle Pore Type Mesoporous Silica', doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.10.008.
- [165] A. Wang, W. Gao, F. Zhang, F. Chen, F. Du, X. Yin, *Bioproc. Biosyst. Engin.* **2012**, *35*, 857-863; 'Amino Acid-Mediated Aldolase Immobilisation for Enhanced Catalysis and Thermostability', doi.org/10.1007/s00449-011-0670-4.
- [166] H. Fei, G. Xu, J.-P. Wu, L.-R. Yang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *101*, 87-91; 'Improvement of the Thermal Stability and Aldehyde Tolerance of Deoxyriboaldolase Via Immobilization on Nano-Magnet Material', doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.004.
- [167] S. Reinicke, H. C. Rees, P. Espeel, N. Vanparijs, C. Bisterfeld, M. Dick, R. R. Rosencrantz, G. Brezesinski, B. G. de Geest, F. E. Du Prez, *ACS Appl. Mat. Interfac.* **2017**, *9*, 8317-8326; 'Immobilization of 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase in

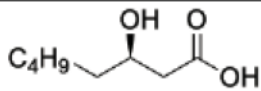
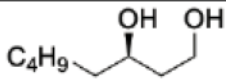
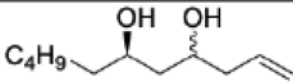
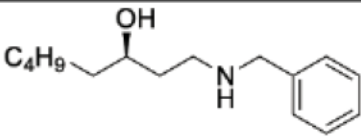
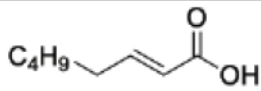
- Polymeric Thin Films Via the Langmuir–Schaefer Technique', doi.org/10.1021/acsami.6b13632.
- [168] S. Zhang, C. Bisterfeld, J. Bramski, N. Vanparijs, B. G. De Geest, J. Pietruszka, A. Böker, S. Reinicke, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 104–116; 'Biocatalytically Active Thin Films Via Self-Assembly of 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase–Poly (N-Isopropylacrylamide) Conjugates', doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00645.
- [169] J. Bramski, Masterarbeit, 'Identifikation und Charakterisierung von Acetaldehyd-resistenten 2-Desoxyribose-5-phosphat-aldolasen', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2016**.
- [170] C. Bisterfeld, Dissertation, 'Rationales Design der Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen und deren Anwendung in der organischen Synthese', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2016**.
- [171] C. Bisterfeld, T. Classen, I. Küberl, B. Henßen, A. Metz, H. Gohlke, J. Pietruszka, *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156525; 'Redesigning Aldolase Stereoselectivity by Homologous Grafting', doi.org/10.1371/journal.pone.0156525.
- [172] S. Sarsan, A. V. Rodhe, K. V. V. Roy, S. Jagavati, *Microb. Essent.* **2024**, 265–299; 'Biotechnological Potential of Cold-Adaptive Extremozymes', doi.org/10.1016/B978-0-443-13932-1.00021-0.
- [173] M. Dick, Dissertation, 'Strukturelle Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität in Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2016**.
- [174] C. Bisterfeld, I. Küberl, M. Dick, J. Pietruszka, *Synlett* **2016**, *27*, 11–16; 'A Fluorogenic Screening for Enantio- and Diastereoselectivity of 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolases', doi.org/10.1055/s-0035-1560723.
- [175] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, 'Organic Chemistry', Oxford University Press, **2012**.
- [176] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416; 'Polyketide Biosynthesis: A Millennium Review', doi.org/10.1039/A909079G.
- [177] H. L. Sham, C. Zhao, L. Li, D. A. Betebenner, A. Saldivar, S. Vasavanonda, D. J. Kempf, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3101–3103; 'Novel Lopinavir Analogues Incorporating Non-Aromatic P-1 Side Chains—Synthesis and Structure–Activity Relationships', doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00643-1.
- [178] G. DeSantis, J. B. Jones, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 324–330; 'Chemical Modification of Enzymes for Enhanced Functionality', doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80059-7.
- [179] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Prot.* **2007**, *2*, 891–903; 'Iterative Saturation Mutagenesis (ISM) for Rapid Directed Evolution of Functional Enzymes', doi.org/10.1038/nprot.2007.72.
- [180] K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente, *Enz. Microb. Technol.* **2011**, *48*, 107–122; 'Control of Protein Immobilization: Coupling Immobilization and Site-Directed Mutagenesis to Improve Biocatalyst or Biosensor Performance', doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.003.
- [181] J. Döbber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2018**.
- [182] L. M. Baigrie, R. A. Cox, H. Slebocka-Tilk, M. Tencer, T. T. Tidwell, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3640–3645; 'Acid-Catalyzed Enolization and Aldol Condensation of Acetaldehyde', doi.org/10.1016/B978-0-12-398484-5.00001-8.
- [183] A. T. Nielsen, W. J. Houlihan, *Org. React.* **2004**, *16*, 1–438; 'The Aldol Condensation', doi.org/10.1002/0471264180.or016.01.
- [184] C. L. Perrin, K.-L. Chang, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 5631–5635; 'The Complete Mechanism of an Aldol Condensation', doi.org/10.1021/acs.joc.6b00959.

- [185] R. K. Boeckman, J. R. Miller, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4544-4547; 'Direct Enantioselective Organocatalytic Hydroxymethylation of Aldehydes Catalyzed by α,α -Diphenylprolinol Trimethylsilyl Ether', doi.org/10.1021/ol9017479.
- [186] D. Rowe, *Chem. Technol. Flav.Fragran.*, John Wiley & Sons, **2009**.
- [187] H. B. Heath, 'Source Book of Flavors', Vol. 2, Springer Science & Business Media, **1981**.
- [188] G. Data, 'Römpp Lexikon Chemie' **2014**, 29.
- [189] X. Fan, C. Rodríguez-Esrich, S. Wang, S. Sayalero, M. A. Pericàs, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13089-13093; 'Highly Enantioselective Cross-Aldol Reactions of Acetaldehyde Mediated by a Dual Catalytic System Operating under Site Isolation', doi.org/10.1002/chem.201404215.
- [190] U. Krauss, V. D. Jäger, M. Diener, M. Pohl, K.-E. Jaeger, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 136-147; 'Catalytically-Active Inclusion Bodies—Carrier-Free Protein Immobilizates for Application in Biotechnology and Biomedicine', https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.033.
- [191] W. Hassouneh, T. Christensen, A. Chilkoti, *Curr. Prot. Prot. Sci.* **2010**, *61.1*, 6-11; 'Elastin-Like Polypeptides as a Purification Tag for Recombinant Proteins', doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s61.
- [192] M. Venning-Slater, D. O. Hooks, B. H. Rehm, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3062-3071; 'In Vivo Self-Assembly of Stable Green Fluorescent Protein Fusion Particles and Their Uses in Enzyme Immobilization', doi.org/10.1128/AEM.00323-14.
- [193] G. Ölçücü, B. Baumer, K. Küsters, K. Möllenhoff, M. Oldiges, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 1881-1896; 'Catalytically Active Inclusion Bodies — Benchmarking and Application in Flow Chemistry', doi.org/10.1021/acssynbio.2c00035.
- [194] S. V. Wegner, J. P. Spatz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7593-7596; 'Cobalt (III) as a Stable and Inert Mediator Ion between NTA and His6-Tagged Proteins'; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 29, 7743, doi.org/10.1002/anie.201210317.
- [195] C. Goldhahn, J. A. Taut, M. Schubert, I. Burgert, M. Chanana, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 20608-20619; 'Enzyme Immobilization inside the Porous Wood Structure: A Natural Scaffold for Continuous-Flow Biocatalysis', doi.org/10.1039/C9RA10633B.
- [196] G. P. Dinos, *Brit. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 2967-2983; 'The Macrolide Antibiotic Renaissance', doi.org/10.1111/bph.13936.
- [197] S. E. Bode, M. Wolberg, M. Mueller, *Synthesis* **2006**, *2006*, 557-588; 'Stereoselective Synthesis of 1, 3-Diols', doi.org/10.1055/s-2006-926315.
- [198] S. BouzBouz, J. Cossy, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 501-504; 'Enantioselective Synthesis of Syn- and Anti-1, 3-Diols Via Allyltitanation of Unprotected β -Hydroxyaldehydes', doi.org/10.1021/ol991349y.
- [199] V. Bernardin, R. g. Philippe, L. Vanoye, C. de Bellefon, A. Favre-Réguillon, *Indust. Engin. Chem. Res.* **2024**, *63*, 6829-6836; 'Continuous Flow Process for Carbonyl and A, B-Unsaturated Carbonyl Compounds Reduction Using NabH4 Solutions: Toward Implementation of Luche Reduction in Flow', doi.org/10.1021/acs.iecr.3c04149.
- [200] L. Shi, Y. Liu, Q. Liu, B. Wei, G. Zhang, *Green Chem.* **2012**, *14*, 1372-1375; 'Selective Reduction of Aldehydes and Ketones to Alcohols with Ammonia Borane in Neat Water', doi.org/10.1039/C2GC00006G.
- [201] L. Clot-Almenara, C. Rodríguez-Esrich, L. Osorio-Planes, M. A. Pericàs, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 7647-7651; 'Polystyrene-Supported Trip: A Highly Recyclable Catalyst for Batch and Flow Enantioselective Allylation of Aldehydes', doi.org/10.1021/acscatal.6b02621.

- [202] S. Hoffmann, A. M. Seayad, B. List, *Angew. Chem. Internat. Ed.* **2005**, *44*, 7424-7427; 'A Powerful Brønsted Acid Catalyst for the Organocatalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation of Imines', doi.org/10.1002/anie-200503062.
- [203] L. Vanoye, A. Aloui, M. Pablos, R. Philippe, A. Percheron, A. Favre-Réguillon, C. de Bellefon, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5978-5981; 'A Safe and Efficient Flow Oxidation of Aldehydes with O₂', doi.org/10.1021/ol401273k.
- [204] P. Sobieszuk, J. Aubin, R. Pohorecki, *Chem. Engin. Technol.* **2012**, *35*, 1346-1358; 'Hydrodynamics and Mass Transfer in Gas-Liquid Flows in Microreactors', doi.org/10.1002/ceat.201100643.
- [205] Y. Zhang, Y. Cheng, H. Cai, S. He, Q. Shan, H. Zhao, Y. Chen, B. Wang, *Green Chem.* **2017**, *19*, 5708-5713; 'Catalyst-Free Aerobic Oxidation of Aldehydes into Acids in Water under Mild Conditions', doi.org/10.1039/C7GC02983G.
- [206] L. Vanoye, A. Favre-Réguillon, A. Aloui, R. Philippe, C. de Bellefon, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 18931-18937; 'Insights in the Aerobic Oxidation of Aldehydes', doi.org/10.1039/C3RA42385A.
- [207] A. Kunzendorf, G. Xu, J. J. Van Der Velde, H. J. Rozeboom, A.-M. W. Thunnissen, G. J. Poelarends, *ACS Catal.* **2021**, *11*, 13236-13243; 'Unlocking Asymmetric Michael Additions in an Archetypical Class I Aldolase by Directed Evolution', doi.org/10.1021/acscatal.1c03911.
- [208] A. Puglisi, S. Rossi, *Phys. Sci. Rev.* **2021**, *6*, 20180099; 'Stereoselective Organocatalysis and Flow Chemistry', doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00524.
- [209] F. Costantini, W. P. Bula, R. Salvio, J. Huskens, H. J. Gardeniers, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1650-1651; 'Nanostructure Based on Polymer Brushes for Efficient Heterogeneous Catalysis in Microreactors', doi.org/10.1021/ja807616z.
- [210] E. Alza, C. Rodríguez-Esrich, S. Sayalero, A. Bastero, M. A. Pericàs, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10167-10172; 'A Solid-Supported Organocatalyst for Highly Stereoselective, Batch, and Continuous-Flow Mannich Reactions', doi.org/10.1002/chem.200901310.
- [211] R. Holt, C. Reeve, H. U. Blaser, H.-J. Federsel, *Asym. Catal. Indust. Scale* **2010**, 111-126; 'Chemoenzymatic Route to the Side-Chain of Rosuvastatin', doi.org/10.1002/9783527630639.
- [212] F. Allais, M.-C. Louvel, J. Cossy, *Synlett* **2007**, *2007*, 0451-0452; 'A Short and Highly Diastereoselective Synthesis of Verbalactone', doi.org/10.1055/s-2007-967946.
- [213] G. B. Salunke, I. Shivakumar, M. K. Gurjar, *Tetrahedr. Lett.* **2009**, *50*, 2048-2049; 'Total Synthesis of Verbalactone: An Efficient, Carbohydrate-Based Approach', doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.02.062.
- [214] M. Van Hoof, G. Force, D. Lebœuf, *Synthesis* **2024**, *56*, 714-732; 'Modern Macrolactonization Techniques', doi.org/10.1055/a-2181-9800.
- [215] K. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 44-122; 'The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century'; *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 46-126, doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(20000103)39:1<44::AID-ANIE44>3.0.CO;2-L.
- [216] S. Voutilainen, M. Heinonen, M. Andberg, E. Jokinen, H. Maaheimo, J. Pääkkönen, N. Hakulinen, J. Rouvinen, H. Lähdesmäki, S. Kaski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 10515-10529; 'Substrate Specificity of 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase (Dera) Assessed by Different Protein Engineering and Machine Learning Methods', doi.org/10.1007/s00253-020-10960-x.
- [217] J. Rouvinen, M. Andberg, J. Pääkkönen, N. Hakulinen, A. Koivula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 1-14; 'Current State of and Need for Enzyme Engineering of 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolases and Its Impact', doi.org/10.1007/s00253-021-11462-0.

- [218] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113-130; 'Use of Bacteriophage T7 Rna Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes', doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- [219] F. R. Bloom, B. J. Schmidt, J. J. Lin, **2011**, 'Rapid growing microorganisms for biotechnology applications', Life Technologies Corporation, US20110151511 A1.
- [220] I. Kullartz, Dissertation, 'Acetaldehyd-abhängige Aldolasen (DERA) in der organischen Chemie - Rationales Design, Charakterisierung und chemoenzymatische Anwendungen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2012**.
- [221] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254; 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [222] P. C. Nicholas, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 753-754; 'Determination of fructose-1,6-diphosphate aldolase activity with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and diformazan formation', doi.org/10.1042/bst0160753.
- [223] J. L. Motley, B. W. Stamps, C. A. Mitchell, A. T. Thompson, J. Cross, J. You, D. R. Powell, B. S. Stevenson, R. H. Cichewicz, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 598-608; 'Opportunistic Sampling of Roadkill as an Entry Point to Accessing Natural Products Assembled by Bacteria Associated with Non-Anthropoidal Mammalian Microbiomes', doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00772.
- [224] M. Campagna, M. Trzoss, S. Bienz, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3793-3796; 'More Than a Protective Group: Synthesis and Applications of a New Chiral Silane', doi.org/10.1021/ol071382h.

12 FORMELREGISTER

Produkte der Reaktionskaskaden im semi-kontinuierlichen Reaktionsmodus			
			
7	JBR003V148	8	JBR003V144
			
9	JBR003V127	10	JBR003V138
Produkte der Reaktionskaskaden im kontinuierlichen Reaktionsmodus			
			
11	JBR003V92		

13 DANKSAGUNG

Die folgenden Zeilen möchte ich dazu nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben und mich bei der Berg- und Talfahrt der letzten Jahre tatkräftig unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Pietruszka. Angefangen bei dem spannenden Projekt, welches er mir zur Verfügung gestellt hat. Ich hätte mir kein vielfältigeres Thema für mich vorstellen können, welches meiner Neugierde sowohl in der Chemie als auch der Biochemie hätte gerecht werden können. So konnte ich jederzeit bei jeglichen Rückschlägen, Problemen, Misserfolgen aber natürlich auch den Erfolgen auf seine Unterstützung zählen. Diese Unterstützung ging auch über den wissenschaftlichen Bereich hinaus. Bei den vielen Steinen, die mir während der Promotion in den Weg gelegt worden sind, und die mir zeitweise zu groß zum Überwinden schienen, stand seine Tür immer weit offen. Ohne seinen Rat und Zuspruch hätte es diese Arbeit vielleicht nicht mehr gegeben. Für das entgegengebrachte Vertrauen bin ich sehr dankbar.

Besonderer Dank geht zudem an Apl. Prof. Dr. Thomas Drepper für die kurzfristige bereitwillige Übernahme der Bewertung der Arbeit als Zweitgutachter.

Zudem danke ich Dr. Thomas Classen für die allzeitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung und die Geduld, die sicherlich hin und wieder von Nöten war, um mir als Chemikerin die Welt der Biochemie verständlich zu machen. Auch danke ich für die gelungene Zusammenarbeit sowohl projektbezogen als auch in der Lehre. Es hat mir immer große Freude gemacht von ihm zu lernen und mit ihm arbeiten zu dürfen. Sein unermüdlicher Einsatz in der Lehre und die Liebe zur Wissenschaft waren mir immer Inspiration.

Großer Dank geht auch an Dr. Johannes Döbber des IBG-1 für die tolle Zusammenarbeit bei der Entwicklung der immobilisierten DERA über das HaloTagTM-System. Es hat mir sehr viel Freude bereitet, nicht zuletzt, weil ich dabei sehr viel lernen konnte. Gleiches gilt ebenfalls für die Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern des Fraunhofer Instituts für angewandte Polymerforschung (IAP) in Potsdam Prof. Dr. Alexander Böker, Dr. Stefan Reinicke und Shuhao Zhang, welche erfolgreich mit drei Publikationen belohnt wurde.

Das Fundament einer erfolgreichen Arbeit liegt für mich in einem harmonischen Miteinander, besonders wenn man so viel Zeit auf der Arbeit verbringt. Genau das wird mir in Erinnerung bleiben, wenn ich an meine Zeit am IBOC zurückdenke. Es war eine

unglaublich lehrreiche und bereichernde Zeit, und zwar in akademischer, als auch menschlicher Hinsicht. Und dies lag vor allem an meinen Kollegen, von denen ich viele bis heute meine Freunde nennen darf. Aufgrund der fachlichen Vielfältigkeit meines Projektes habe ich während meiner Zeit am IBOC diverse Labore bewohnen dürfen. Alles begann in der „Bio“ im Labor 212, weiter in 308 und mündete in meinem letztendlichen Heimatlabor in der „Chemie“ in Labor 204. Dadurch hatte ich das große Glück mit vielen großartigen Menschen zusammenarbeiten zu dürfen. Marc Hayes und Pascal Schneider, mit euch wurde (fast) jede PCR, Plasmidisolierung und Proteinreinigung unter ausreichend musikalischer Beschallung mindestens zum spaßigen Nachmittag, wenn nicht sogar zum Erfolg. Alex Fejzagic und Jan Gebauer danke ich für euer immer offenes Ohr. Wenn alles zu viel wurde, konnte ich jederzeit zu euch „flüchten“ und die Gedanken wieder ordnen. Eine ebenfalls unermüdliche Hilfe waren mir stets Beatrix Paschold und Birgit Henßen. Eure Hilfe und Unterstützung im Labor leistete maßgeblich zu dieser Arbeit bei.

Meinen Laborkollegen Ruth Ganardi, Moritz Klischan, Marvin Mantel, Teresa Friedrichs, Julian Greb und Benedikt Baumer möchte ich für die tolle Atmosphäre im Labor danken. Mit euch ist man tatsächlich gerne zur Arbeit gekommen. Den Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft hat man ganz besonders zu den für uns alle herausfordernden Corona-Zeiten gespürt. Hervorheben möchte ich Marvin Mantel und Julian Greb, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Eure fachliche Kompetenz beeindruckt mich bis heute. Nicht zu vergessen Benedikt Baumer aka Manni. Danke dir für deine Freundschaft seit 14 Jahren. Es fing an mit einer vor die Abzugscheibe laufende Frederike im AC1-Praktikum, über deine brennenden Haare im BC-Praktikum, weiter zu einer improvisierten Rechtskundeklausur, unzähligen Abenden mit vielen gemeinsamen Freunden, naja die Liste ist unendlich! Es war mir eine Freude nun auch mit dir gemeinsam das Gebiet der Flow-Chemie am IBOC voranzutreiben. Doch auch Etagen übergreifend entstanden großartige Freundschaften, die ich nicht mehr missen möchte. Patrick Ullrich danke ich dafür, dass du ganz einfach ein wundervoller Mensch bist, auf den immer Verlass ist. Ein Besuch beim Abzug von Fabian Hogenkamp hatte auch den ein oder anderen *erhellenden* Moment zur Folge, was skuril ist, da du ja immer im Dunklen saßt! Es war immer toll mich mit dir austauschen zu können, sei es fachlich oder privat. Besonderer Dank gilt dir, und auch Julian Greb für die gelungene Vorbereitung des wohl niemals vergessenen Venns – Wir haben Maßstäbe gesetzt!

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie bedingungslos immer hinter mir standen und mich bei jeder meiner Entscheidungen unterstützt haben. Gleiches gilt für meine Geschwister,

trotz all der Lebensproben, die sich euch in dieser Zeit ebenfalls stellten. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Wie sagt man so schön? „Familie kann man sich nicht aussuchen“, doch euch zwei hätte ich auch freiwillig in mein Leben gelassen. Franziska Angelika Steinmetz-Hindges und Steffi Hindges. Was habe ich für ein Glück solche großartigen Menschen meine Schwägerinnen nennen zu dürfen? Auf eure Unterstützung konnte ich ausnahmslos zählen, und zwar in jeglichen Lebenslagen, auch wenn ihr bei zahlreichen Familienfeiern oder spontanen Radeltouren mal wieder auf mich verzichten musstet, weil der Schreibtisch rief. Danke für so Vieles!

Nicht annähernd genug danken kann ich meinem Ehemann Tobi. Ohne dich wäre keiner der Erfolge der letzten Zeit (sowie aller künftigen) auch nur denkbar gewesen. Dabei behaupte ich, dass es Dich ähnlich viele Nerven und Kraft gekostet hat, sowie Verzicht auf so Vieles. Dennoch haben wir es gemeinsam geschafft uns nicht nur all dem zu stellen, sondern sogar den Spaß am Leben nie aus den Augen zu verlieren. Du bist das „Powerhouse“, das mich antreibt, mein Cheerleader, der mich motiviert und mein Anker, der mich erdet.

Tausend Dank!

14 ERKLÄRUNG

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

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

A handwritten signature in black ink, reading "J. Hindges", written over a horizontal line.

Julia Hindges, neé Bramski

Düsseldorf, den