

DISS. ETH. No. 16842

Applications of Enzymatic and Whole Cell Bioconversions in Nearly Anhydrous Solvent Systems

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Philipp Sebastian Angerer
Dipl. Natw. ETH Zurich
born 19th March 1977
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Bernard Witholt, (Prof. em.), examiner
Prof. Dr. Zhi Li, co-examiner
Prof. Dr. Sven Panke, co-examiner

Zurich, 2006

Abstract

Several enzymatic systems and a whole cell system were developed, for practical, biotechnological applications in organic solvents of varying polarity. Horseradish peroxidase was made soluble in isooctane using surfactant based ion-pairing with a novel protocol. The catalytically active, almost anhydrous ion-paired enzyme was used for the peroxide-dependent radical-polymerization of hexyloxyl phenol. This system yielded water-insoluble poly-phenol with potentially favorable thermoplastic properties, which may be useful for electronic application as conducting polymer.

In a further solvent-based application, ion-paired horseradish peroxidase was used for peroxide-dependent sulfoxidation of a dialkylthioether, a reaction useful for the preparation of precursors for pharmaceuticals. When complexed with the active site ligand benzohydroxamic acid, the ion-paired enzyme showed drastically enhanced activity. Spectroscopic investigations showed significant structural changes of the ion-paired enzyme complex, explaining the unusually high activity of this biocatalyst.

Complementary to enzymatic setups, a whole cell bio-conversion system was established, in an organic solvent with limiting amounts of water. This system was applied for the cofactor-dependent monooxygenation of unfunctionalized alkanes. It was shown that lyophilized cells are viable after rehydration. Further, they were able to regenerate co-factors for the monooxygenation after resuspension in substrate bulk phase with hydration much below the optimum.

The last chapter documents the *ab initio* setup and application of several enzymatic activity assay systems for determination of control mechanisms of enzymatic activity using strong electric fields. In the experimental setups, enzymes were used in both aqueous and organic phases. Electric fields between 1 - 20 kV/ cm were applied to enzymatic solutions while actively converting substrates. This resulted into a significant, reversible activity reductions of enzyme activity. In one case, activity reduction was dependent on substrate chirality, providing evidence of specific interaction of the field with the enzyme. It was further demonstrated, that alteration frequency of the applied field played a role in the effect on enzymes.

Zusammenfassung

Verschiedene, auf organischen, unterschiedlich polaren Lösungsmitteln basierende, enzymatische Systeme, sowie ein Ganzzellsystem wurden für praktische, biotechnologische Anwendungen entwickelt. Es wurde ein neuartiges Protokoll erstellt, anhand welchem Meerrettichperoxidase mit Hilfe von ionischen Waschmittelsubstanzen nach dem Prinzip der Ionenpaarung in Isooktan löslich gemacht wurde. Das katalytisch aktive und fast wasserfreie ionengepaarte Enzym wurde zur peroxid-abhängigen radikalischen Polymerisation von Hexylolxyphenol verwendet. Mit diesem System konnten wasserunlösliche Polyphenole mit potentiell vorteilhaften thermoplastischen Eigenschaften hergestellt werden, die aufgrund ihrer elektrischen Leitfähigkeit in der Elektronik interessante Anwendung finden.

In einer weiteren lösungsmittelbasierten Anwendung wurde ionengepaarte Meerrettichperoxidase zur peroxidabhängigen Sulfoxidierung eines Dialkylthioethers verwendet, eine wichtige Reaktion zur Herstellung pharmazeutischer Vorläuferverbindungen. Komplexierung mit dem Liganden Benzohydroxaminsäure erhöhte die Aktivität des ionengepaarten Enzyms um ein Vielfaches in diesem System. Spektroskopische Untersuchungen zeigten signifikante strukturelle Veränderungen des ionengepaarten Enzyms, anhand welcher die erhöhte Aktivität erklärt werden kann.

Komplementär zu den enzymatischen Systemen wurde ein auf ganzen Zellen basierendes Biokatalysesystem in organischen Lösungsmitteln mit limitierenden Mengen an Wasser entwickelt. Dieses System wurde zur kofaktorabhängigen Hydroxylierung unfunktionalisierter Alkane eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass zuvor lyophilisierte Zellen nach limitierter Rehydrierung lebensfähig waren und intrazelluläre Kofaktoren auch nach Resuspension in organischer Phase für die Hydroxylierungsaktivität bereitgestellt wurden.

Das letzte Kapitel dokumentiert die Konzipierung und Anwendungen verschiedener enzymatischer Aktivitätsassays, mit dem Ziel, einen auf starken externen elektrischen Feldern basierenden Steuermechanismus enzymatischer Aktivität zu untersuchen. In diesen Experimenten wurden Enzyme sowohl in wässrigen, als auch in organischen Lösungsmitteln angewandt. Elektrische Felder zwischen 1 und 20 kV/cm wurden an Enzymlösungen während des Substratumsatzes angelegt. Dies hatte einen signifikanten, reversiblen Aktivitätsrückgang der Enzyme zur Folge; in einem Fall war der Grad des Aktivitätsrückgangs abhängig von der Chiralität des Substrats, was auf eine spezifische Wechselwirkung des Feldes mit der Enzymstruktur hinweist. Es wurde weiterhin festgestellt, dass die Wechselfrequenz des angelegten Feldes ein wichtiger Parameter für die Interaktion zwischen Feld und Enzym darstellt.