

Enantioselective reduction of carbonyl groups

biocatalyst discovery and cofactor recycling

Doctoral Thesis

Author(s):

Zhang, Jie

Publication date:

2006

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005318017>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 16810

**Enantioselective reduction of carbonyl groups: biocatalyst discovery
and cofactor recycling**

A dissertation submitted to the

Swiss Federal Institute of Technology Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Jie Zhang

born July 30, 1974

Citizen of P. R. China

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bernard Witholt, examiner

Prof. Dr. Zhi Li, co-examiner

Prof. Dr. Hauke Hennecke, co-examiner

Prof. Dr. Kevin O'Connor, co-examiner

Zurich, 2006

Novel miniaturized screening system has been established with fast detection of conversion and enantioselectivity in the reduction of β -ketoesters. Wild type bacterial strains containing alcohol dehydrogenase were screened based on their degradation of phenylalanine or tyrosine. The best four strains, *Bacillus pumilus* Phe-C3 and *Klebsiella pneumoniae* Phe-E4, *Pseudomonas sp.* Tyr-F10 and *Acinetobacter sp.* Tyr-B12 were selected and used in reduction of ethyl 3-keto-4,4,4-trifluoro-butylate and methyl 3-keto-(3'-pyridyl)-propionate, respectively. The corresponding optically active β -hydroxyesters as the pharmaceutical synthons were prepared in gram scale with opposite enantiomers in high ee (90-98%) and high yield (81-87%).

Strain *Bacillus pumilus* Phe-C3 was discovered to contain NADPH-dependent ketoreductase and a glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH). The cells were permeabilized and used for reduction of ethyl 3-keto-4,4,4-trifluorobutylate. With the externally addition of NADP^+ , (*R*)-ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutylate was formed in 95% ee with the recycling of NADPH for 4220 times. The permeabilized cells were shown to be stable and active for a long period (>60 h), allowing for high product concentration with high cofactor TTN by new addition of NADP^+ . With continuously addition of glucose-6-phosphate and the addition of 0.01 mM NADP^+ twice, 55.2 mM (*R*)-ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutylate was formed in 95% ee in the catalysis of 60 mM substrate by permeabilized cells with recycling of NADPH for 2760 times.

A new concept for efficient cofactor recycling in oxidoreduction based on "coupled permeabilized microorganisms" was developed. The strain *Bacillus subtilis* BGSC 1A1 containing glucose dehydrogenase was permeabilized and used for NADPH recycling with glucose. The reduced NADPH was utilized by permeabilized *Bacillus pumilus* Phe-C3 for reduction of ethyl 3-keto-4,4,4-trifluorobutylate. In the catalysis of 140 mM substrate by two permeabilized cells above, with 0.12 mM NADP^+ added initially and 3.6 M glucose added at different time points, (*R*)-ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutylate was afforded in 114.4 mM (21 g/L) with a TTN of

NADPH of 953 at 68 h. In the bioreduction of 120 mM substrate by two permeabilized cells, with NADP⁺ concentration of 0.01 mM for 43 h, The TTN of NADPH could be further increased to 1620.

Strain *Bacillus pumilus* Phe-C3 for the production of (*R*)-ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutyrate, the intermediate of antidepressant Bifloxadone, was chosen for large scale production in fermentor on 1 L scale. Biotransformation was performed in fed-batch with growing cells in the catalysis of 100 mM substrate, giving 40 mM (7.4 g/L) product at 5 h. Different methods were ever tried to solve the chemical inhibition problem: repeatedly removal of the product by centrifugation, by absorption with Amberlite XAD-4 resin, and the use of dodecanol as the second phase, giving the final product in 68 mM, 76 mM, and 63 mM, respectively. With the cofactor recycling by the addition of permeabilized cells of *Bacillus subtilis* BGSC 1A1 containing a glucose-dehydrogenase and glucose, product was obtained in 62 mM without addition of NADP⁺ and 78 mM with the addition of 0.01 mM NADP⁺. Both strains were discovered to become permeable in high concentration of product and substrate. Combining of resting cells of *B. pumilus* Phe-C3 and *B. subtilis* BGSC1A1 for bioreduction of 150 mM substrate gave 94.2 mM of final product in 93% ee with addition of 0.01 mM NADP⁺ twice.

Ein neuartiges miniaturisiertes Selektionsverfahren wurde etabliert, das eine rasche Detektion von Umsetzung und Enantioselektivität von reduzierten β -Ketoestern ermöglicht. Alkoholdehydrogenase exprimierende Wildtyp Bakterien wurden, aufgrund Ihrer Fähigkeit Phenylalanin oder Tyrosin als Kohlenstoffquelle zu nutzen, selektiert. Die vier erfolversprechendsten Kandidaten, *Bacillus pumilus* Phe-C3, *Klebsiella pneumoniae* Phe-E4, *Pseudomonas sp.* Tyr-F10 und *Acinetobacter sp.* Tyr-B12 wurden für die Reduktion von Ethyl-3-keto-4,4,4-trifluorobutyrat und Methyl-3-keto-(3'-pyridyl)-propionat verwendet. Die entsprechenden optisch aktiven pharmazeutischen Intermediate (β -Hydroxyester) konnten im Grammasstab mit hohem Enantiomerenüberschuss (ee = 90-98%) und hoher Ausbeute (81-87%) hergestellt werden.

Der Stamm *Bacillus pumilus* Phe-C3 expremiert eine NADPH-abhängige Ketoreduktase und eine Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G-6-PDH). Zellen wurden permeabilisiert und für die Reduktion von Ethyl-3-keto-4,4,4-trifluorobutyrat eingesetzt. Durch die Zugabe von NADP^+ wurde eine 4220-fache Regenerierung von NADPH erreicht und für (*R*)-Ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutyrat ein ee von 95% . Die permeabilisierten Zellen waren stabil und wiesen eine Langzeitaktivität von über 60 Stunden auf. Durch erneute Zugabe von NADP^+ konnte eine hohe Produktkonzentration gebildet und die Gesamtumsatzzahl (TTN) für die Regenerierung des Kofaktors gesteigert werden. Durch kontinuierliche Zugabe von Glukose-6-phosphat und zweimalige Zugabe von 0.01 mM NADP^+ zu den permeabilisierten Zellen, wurden 55.2 mM (*R*)-Ethyl 3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutyrat (ee = 95%), ausgehend von 60 mM Substrat, gebildet. Die Gesamtumsatzzahl (TTN) des Kofaktors NADPH betrug dabei 2760.

Das neue Konzept „Kopplung von permeabilisierten Mikroorganismen“, für eine effiziente Kofaktorregenerierung bei Oxidoreduktionen, wurde entwickelt. Der Stamm *Bacillus subtilis* BGSC 1A1, eine Glukose Dehydrogenase enthaltend, wurde permeabilisiert und für die Regenerierung von NADPH mittels Glukose verwendet.

Der dabei entstehende reduzierte Kofaktor NADPH wurde gleichzeitig von permeabilisierten *Bacillus pumilus* Phe-C3 Zellen für die Reduktion von Ethyl-3-keto-4,4,4-trifluorobutyrat verbraucht. Bei der Umsetzung von 140 mM Substrat, anfänglichen 0.12 mM NADP⁺ und kumulativen 3.6 M Glukose, mithilfe der zwei Mikroorganismen, konnten nach 68 Stunden 114.4 mM (21 g/L) (*R*)-Ethyl-3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutyrat produziert werden. NADPH wurde dabei 953 mal regeneriert. Bei der Bioreduktion von 120 mM Substrat und 0.01 mM NADP⁺ über 43 Stunden, konnte die Gesamtumsatzzahl (TTN) von NADPH, mithilfe dieses Konzeptes, sogar auf 1620 gesteigert werden.

Der Stamm *Bacillus pumilus* Phe-C3 wurde für die Herstellung von (*R*)-Ethyl-3-hydroxy-4,4,4-trifluorobutyrat, ein Intermediat zur Herstellung des Antidepressivum Befloxaton, im 1 Liter Massstab, in einem Bioreaktor eingesetzt. Die Biotransformation wurde im Fed-batch Modus mit wachsenden Zellen durchgeführt. Ausgehend von 100 mM Substrat, wurden nach 5 Stunden 40 mM (7.4 g/L) Produktkonzentration erreicht. Substrat- und Produktinhibition wurden als Ursache für den Stopp der Reaktion angesehen. Verschiedene Methoden zur Umgehung dieser Limitation wurden untersucht: wiederholtes Entfernen des Produktes durch Zentrifugation, durch Absorption auf Amberlite XAD-4 Harz, und durch Applikation von Dodekanol als zweite Phase; dies führte zu Produktkonzentrationen von jeweils 68 mM, 76 mM, und 63 mM. Mit permeabilisierten Zellen von *Bacillus subtilis* BGSC 1A1, die eine Glukose Dehydrogenase expremieren, konnte ohne Zugabe von NADP⁺ 62 mM und, mit Zugabe von 0.01 mM NADP⁺, 78 mM Produkt erzielt werden. Durch die hohen Konzentrationen von Substrat und Produkt konnten beide Stämme permeabilisiert werden. Die Kombination ruhender Zellen, *B. pumilus* Phe-C3 und *B. subtilis* BGSC1A1, für die Bioreduktion von 150 mM Substrat, ergab 94.2 mM Produkt mit einem Enantiomerenüberschuss von 93%, bei zweimaliger Zugabe von 0.01 mM NADP⁺.