



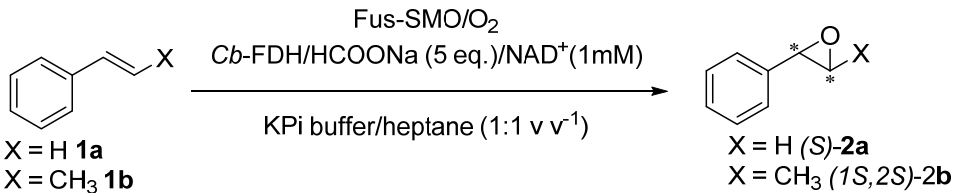
Multi-enzymatische routes voor de synthese van amino-alcoholen

M.L. Corrado

Samenvatting

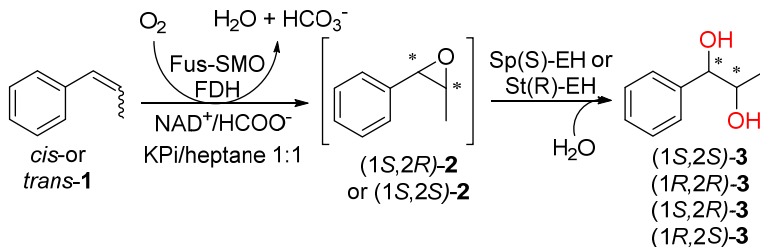
De chemische industrie is nog voor een groot deel afhankelijk van fossiele brandstoffen. Vele hedendaagse productieprocessen leiden tot grote hoeveelheden afval. Het model voor in afvalvrije circulaire economie is in het afgelopen decennium opgekomen en bevat de kern van groene energieprincipes. Een oplossing voor dit probleem is de vervanging van het stoichiometrische gebruik van reagentia met katalytische alternatieven. Verder heeft het vermijden van fossiele grondstoffen waardevermeerdering gebracht voor hernieuwbare alternatieven uit plantaardige materialen, zoals lignocellulose, afkomstig van landbouwresiduen. Desalniettemin vraagt deze overgang om de ontwikkeling van de infrastructuur en nieuwe technologieën en processen, die moeten voldoen aan duurzaamheidseisen, voor de behandeling van dergelijke grondstoffen. In deze context speelt biokatalyse een belangrijke rol in de behandeling van lignocellulose uit biomassa en de daaropvolgende omzettingen van uit biomassa verkregen bouwstenen in hoogwaardige eindproducten. Biokatalysatoren zijn inherent veilig, duurzaam en selectief omdat de vijf groene energieprincipes worden vervuld door de intrinsiek hoge chemo-, regio- en stereoselectiviteit van enzymen. Enzymatische processen worden vaak uitgevoerd in waterige oplossingen bij pH dichtbij neutraal, kamertemperatuur en druk. Verder zijn biokatalysatoren over het algemeen biologisch afbreekbaar, biocompatibel en duurzaam. Deze aspecten zijn zeer gunstig voor de ontwikkeling van milieuvriendelijke chemische processen. Daarnaast zijn enzymen met verschillende reactiviteiten vaak verenigbaar en kunnen daarom tegelijkertijd in hetzelfde reactievat worden toegepast zonder ze fysiek te hoeven scheiden en dus maken ze de combinatie van meerdere reactiestappen in één pot mogelijk. Al deze kwaliteiten zijn met name van belang bij de vervaardiging van actieve farmaceutische ingrediënten (APIs). Alhoewel de overgang naar milieuvriendelijke en duurzame processen langzamer gaat in de farmaceutische en fijnchemicaliënindustrie, zijn er verscheidene industriële routes geïmplementeerd voor het uitvoeren van belangrijke omzettingen met enzymen (zoals het introduceren van chirale centra: α -chirale amines met transaminases, chirale alcoholen met alcohol dehydrogenases, enz.). Onder de functionaliteiten die zich in biologisch actieve stoffen bevinden, vormen vicinale amino alcoholen de kern van verschillende natuurstoffen en actieve farmaceutische ingrediënten (zoals alkaloiden, neurotransmitters, HIV protease inhibitors, aminopeptidase inhibitor en antibiotica). In deze thesis hebben wij verschillende multi-enzymatische cascadereducties toegepast voor de synthese van gerichte optisch actieve vicinale amino alcoholen. Ons onderzoek start in **hoofdstuk 2** met het genereren van een

zelfontworpen styreen mono-oxygenase enzym (Fus-SMO). De twee units van het katalytische bi-enzymatische systeem (StyB, het reductase domein, en StyA, de epoxidatie unit) zijn genetische gefuseerd m.b.v. een dertig aminozuur lange linker. In dit hoofdstuk hebben wij de katalytische prestatie van gevriesdroogde *E. coli* cellen met Fus-SMO (die tot overexpressie is gebracht) bepaald in de asymmetrische epoxidatie van styreen **1a** in trans- β -methylstyreen **1b** (Schema 1). Een verdere verbetering in de praktische toepassing van dit systeem was gemaakt door Fus-SMO en Cb-FDH tot co-expressie te brengen in hetzelfde gastorganisme.

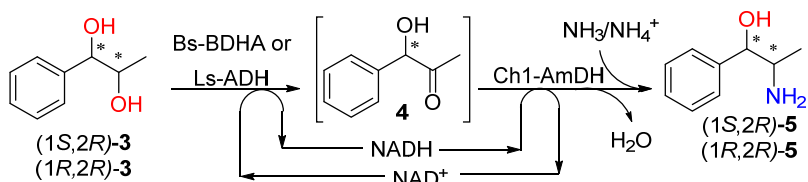


Schema 1. Cell systeem waarbij Fus-SMO en Cb-FDH tegelijkertijd tot expressie zijn gebracht in *E. coli* BL21 DE3 als gast organisme voor de omzetting van **1a-b** naar optisch actieve epoxides **2a-b**.

In **hoofdstuk 3** hebben we onze Fus-SMO toegepast in een een-pots cascade met stereocomplementaire epoxide hydrolases (Sp(S)-EH of St(R)-EH) voor de synthese van chirale 1,2-fenylpropanediol isomeren **3** (Schema 2). Vervolgens werd de formele regio-, chemo- en stereoselectieve synthese van twee isomeren van nor(pseudo)efedrine **5** behaald m.b.v. de biokatalytische hydrogen-borrowing (HB) aminering van het alcohol; dit is een redox neutrale cascade. Optisch actieve diolen **3** werden omgezet naar de desbetreffende amino alcoholen door het combineren van geselecteerde alcohol dehydrogenases (Bs-BDHA of Ls-ADH) en een amine dehydrogenase (Ch1-AmDH) gebruikmakende van wederom een een-pots cascade (Schema 3).

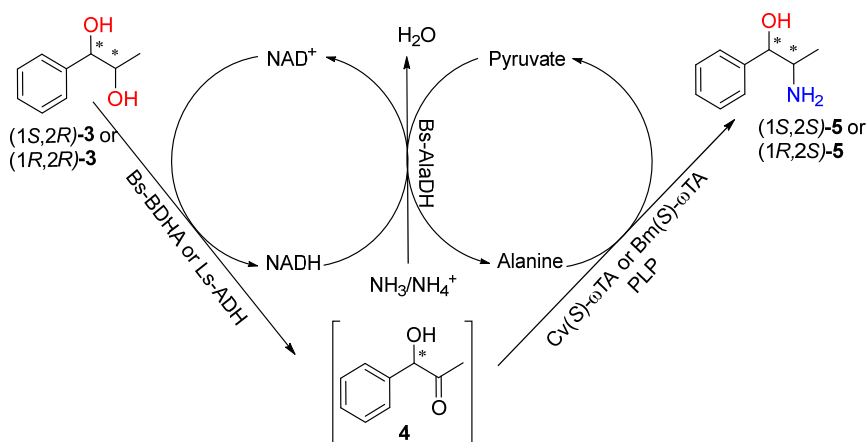


Schema 2. Een-pots multi-enzymatische cascades voor de synthese van optisch actieve diol isomeren **3** van olefine **1** d.m.v. een koppeling van Fus-SMO met twee stereocomplementaire EHs.



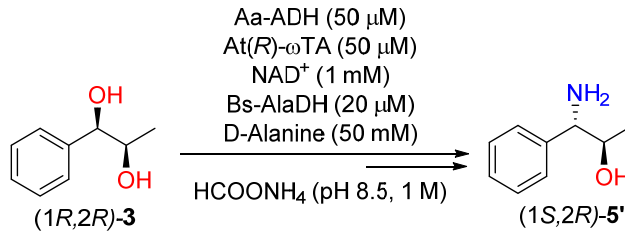
Schema 3. Formeel regio-, chemo- en stereoselectieve enzymatische synthese van twee isomeren van nor(pseudo)efedrine **5** via de HB bio-aminering cascade.

Vanwege het ontbreken van (*S*)-selectieve AmDHs, beschrijven we in **hoofdstuk 4** de enzymatische synthese van de twee andere isomeren van nor(pseudo)efedrine **5** door een combinatie van de geselecteerde ADHs met stereocomplementaire ω -transaminases (ω TAs) in een een-pots cascade voor de omzetting van chirale diolen **3**. Deze laatstgenoemde stoffen werden enzymatisch gesynthetiseerd, zoals geïllustreerd in Schema 2. Net als de HB bio-aminering, re-geneereerd de redox-neutrale ADH/ ω TA cascade het vereiste en geoxideerde NAD⁺ co-enzym m.b.v. een alanine dehydrogenase (AlaDH). Gelijktijdig wordt het pyruvaat bijproduct terug omgezet naar alanine: de ultieme amino donor voor de transaminering (**Schema 4**).



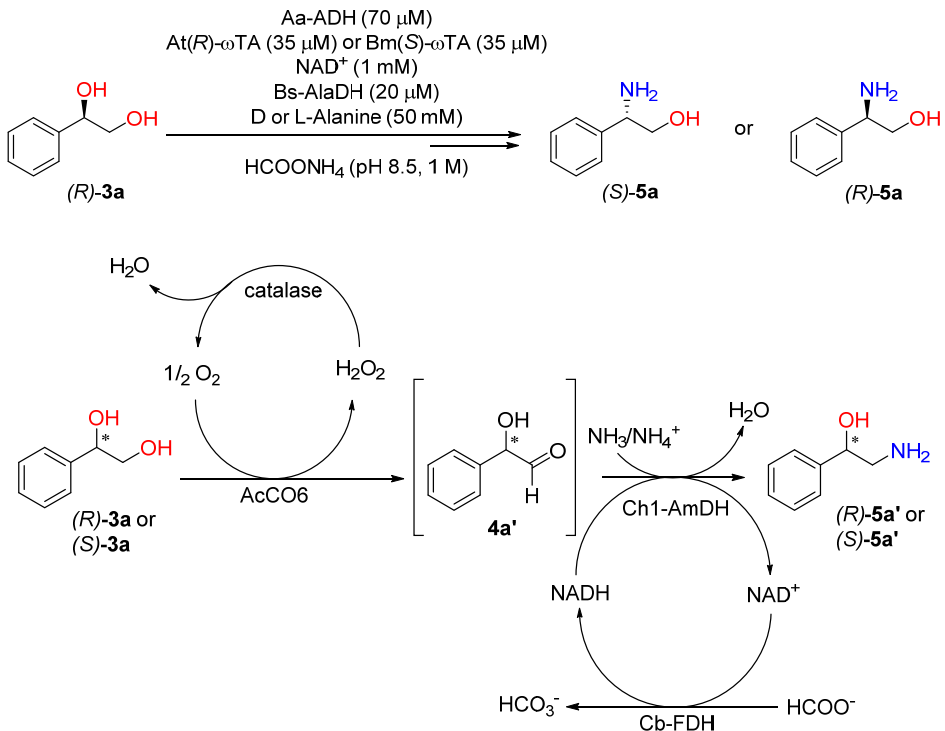
Schema 4. Een-pots cascade voor de omzetting van optisch actieve diolen **3** naar twee isomeren van nor(pseudo)efedrine **5** door een combinatie van ADH en stereocomplementaire ω TAs.

Verder zijn we in staat geweest om regio-isomeer (1*S*,2*R*)-**5'** te verkrijgen met de cascade uit **Schema 4** door een specifieke combinatie van diol substraat, ADH en ω TA te kiezen.



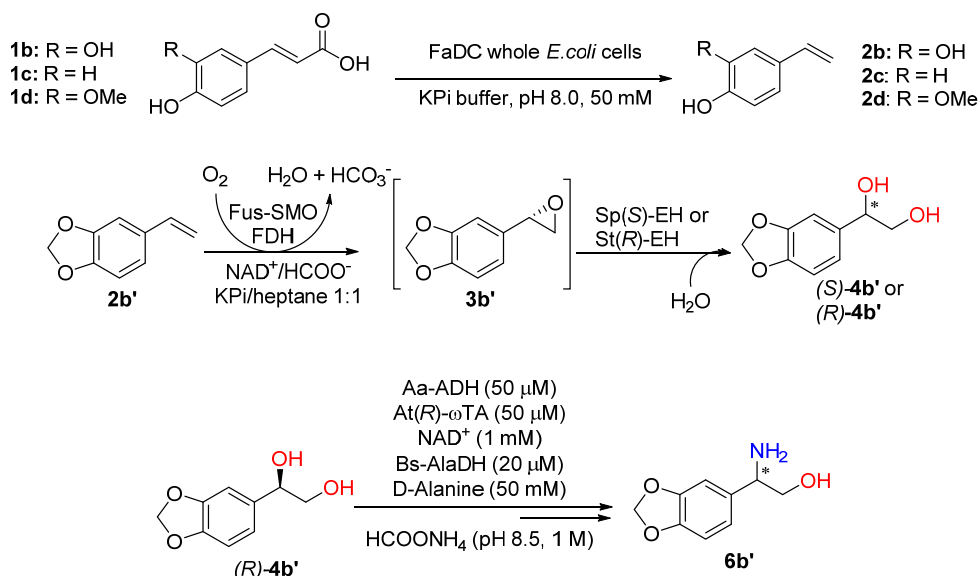
Schema 5. Een-pots cascade reacties voor het verkrijgen van een specifiek regio-isomeer van nor(pseudo)efedrine.

In **hoofdstuk 5** hebben we gebruik gemaakt van de een-pots cascade uit Schema 4 voor de synthese van fenylethanolamine isomeren **5a** (**Schema 6, boven**). Ook in dit geval zijn chirale diolen **3a** enzymatisch gesynthetiseerd m.b.v. de een-pots cascade uit Schema 2. Styreen **1a** is daar als substraat gebruikt. Daarnaast hebben we een orthogonale bio-amineringscascade ontwikkeld voor de enzymatische synthese van amino alcohol **5a'** vanuit optisch actieve diol **3a**. Hier is een alcohol oxidase (AcCO6) gekoppeld met een amine dehydrogenase (Ch1-AmDH). Het laatstgenoemde enzym vereist een orthogonaal enzymatisch systeem voor de recycling van de NADH co-enzymen (**Schema 6, onder**).



Schema 6. Een-pots cascade voor de omzetting van (*R*)-**3a** naar optisch actief (*R*)-**5a** en (*S*)-**5a** d.m.v. koppeling van geselecteerde ADHs met stereocomplementaire ω TAs (boven); orthogonale bio-amineringscascade voor de omzetting van (*R*)-**3a** en (*S*)-**3a** naar de corresponderende chirale amino alcoholen (*R*)-**5a'** en (*S*)-**5a'** respectievelijk (onder).

We hebben vervolgens besloten de multi-enzymatische cascade reacties, zoals bovenstaand beschreven, uit te breiden voor de synthese van andere waardevolle amino alcoholen (i.e., adrenaline en derivaten daarvan). **Hoofdstuk 6** behandelt een principebewijs dat als voorbeeld dient voor de hoge potentie van deze cascades. Een extra enzymatische stap was geïntroduceerd voor de biokatalytische decarboxylatie van hernieuwbare grondstoffen zoals cafeïnezuur, cumaarzuur en ferulinezuur **1b-d**, voor het verkrijgen van de corresponderende aromatische olefines **2b-d** (**Schema 7, boven**). Echter leidde de een-pots dehydroxylatiecascade uit Schema 2 niet tot de vorming van gerelateerde diolen. Mede daarom was de synthese van substraat **2b'** voortgezet met cafeïnezuur **1b** als uitgangsstof wat leidt tot chirale diolen **4b'** (**Schema 7, midden**). Als laatste is de een-pots cascade uit Schema 4 toegepast voor de synthese van amino alcohol **6b'** (**Schema 7, onder**). Desalniettemin is er meer werk nodig aan deze cascade om de daadwerkelijke prestatie van het systeem te bepalen alsmede de stereochemie van het amino alcohol product te bepalen. Verder zullen andere tests moeten worden uitgevoerd met alle substraten die aan het begin van dit hoofdstuk zijn beschreven en zullen passende routes gevonden moeten worden om de gewenste amino alcoholen te verkrijgen (i.e., adrenaline en derivaten). De integratie van computationele biokatalyse en eiwitengineering is essentieel voor uitbreiding van de enzymatische systemen die nodig zijn voor deze cascades.



Schema 7. Voorlopige resultaten van de aanpak beschreven in hoofdstuk 6 als principebewijs voor de potentiële toepassing van de cascades voor de synthese van hoogwaardige vicinale amino alcoholen, zoals beschreven in deze thesis.