

Stereoselektive Diolsynthese mit Lyasen und Oxidoreduktasen – Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

David Kihumbu

aus Essen

Bonn, 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Arbeit ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.unibonn.de/diss_online/ elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Erstgutachter: Prof. Dr. C. Wandrey

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Wamhoff

Fachnaher Gutachter: Prof. Dr. A. Gansäuer

Fachangrenzender Gutachter: Prof. Dr. H. Mommsen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden in der Zeit von Juni 1999 bis August 2002 am Institut für Biotechnologie II der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Meinem Doktorvater für die herausfordernde Themenstellung, die großzügige Bereitstellung der Gerätschaften, seine Begeisterungsfähigkeit und die hilfreichen und lehrreichen Diskussionen.
- Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff, Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie, Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferats
- Herrn Prof. Dr. A. Liese für die gute Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Frau U. Mackfeld, Frau H. Offermann, Herrn C. Reimers, Herrn B. Lalla und Herrn K. Genz für ihre tatkräftige Hilfe im Labor.
- Den Herren aus der E-Werkstatt bei der Bewältigung von Soft- und Hardwareproblemen.
- Herrn Hummel und Frau V. Ophoven für die großzügige Überlassung und Bereitstellung der *Lb*-ADH.
- Frau Dr. M. Pohl, Frau Dr. P. Siegert, Frau Dr. B. Lingen und Frau W. Lange am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf, für die großzügige Überlassung der Benzoylformiatdecarboxylase und Unterstützung bei der Bereitstellung derselben.
- Herrn Dr. M. Vilella für den hilfreichen Diskussionsaustausch im Umgang mit der *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase.
- Meinen Bürokollegen Herrn Dr. C. Hoh, Herrn Dr. S. Laue und besonders Herrn Dr. L. Greiner für wertvolle Diskussionen und Hilfestellung.
- Dem Sonderforschungsbereich 380 „Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden“ für die finanzielle Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. B.-J. Kim für die Möglichkeit am Institute for Biotechnology an der Seoul-National- University-Süd-Korea im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes arbeiten zu dürfen.
- Dem DAAD für die finanzielle Unterstützung des Auslandsaufenthaltes in Seoul.
- Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre
- Meinen Eltern für die Unterstützung meines Studiums und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Verzeichnis der Abbildungen	iv
Verzeichnis der Tabellen	vii
Symbole und Abkürzungen	viii
1 Einleitung	1
1.1 Enzyme in der organischen Chemie	2
1.1.1 Vorteile der Enzymkatalyse	3
1.1.2 Nachteile der Enzymkatalyse	4
1.1.3 Cofaktorregenerierung	5
1.2 Bedeutung vicinaler Diole	8
1.2.1 Chemische und Biologische Darstellungsmethoden	9
1.3 Membranverfahren	10
2 Themenstellung	13
3 C-C-Bindungsknüpfung	15
3.1 Einleitung	15
3.2 Bereitstellung der Benzoylformiatdecarboxylase	17
3.2.1 Fermentation von <i>Escherichia coli</i> SG13009	17
3.2.2 Aufreinigung der Benzoylformiatdecarboxylase	18
3.3 Eigenschaften der Benzoylformiatdecarboxylase	21
3.3.1 Einflüsse auf die Enantioselektivität	22
3.3.1.1 Einfluss von Substituenten auf die Enantioselektivität	23
3.4 Bereitstellung von (2 <i>S</i>)- und (2 <i>R</i>)-Hydroxy-1-phenylpropanon	32
3.5 Kontinuierliche (2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-phenylpropanon Synthese	33
3.6 Stabilität des (2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-phenylpropanon	34
3.7 Kapitelzusammenfassung	35
4 Hydroxyketon-Reduktion	37
4.1 Darstellung der Referenzsubstanzen	37
4.2 Enzym Screening	39
4.3 Biotransformationen mit ausgewählten Alkoholdehydrogenasen	43
4.4 Charakterisierung der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase	45
4.4.1 pH-Abhängigkeit der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase-Aktivität	45

4.4.2	Temperaturabhängigkeit der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase-Aktivität	46
4.4.3	Stabilität der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase	47
4.4.4	Stabilität in Gegenwart von Reaktanden	47
4.4.5	pH-Stabilität	48
4.4.6	Temperaturstabilität	49
4.4.7	Bestimmung der Kinetik	49
4.4.7.1	Kinetik der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase katalysierten (2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-phenylpropanon Reduktion	51
4.4.7.2	Kinetik der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase katalysierten Acetaldehyd Reduktion	53
4.4.7.3	Kinetik der <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase katalysierten Benzaldehyd Reduktion	55
4.5	Cofaktorregenerierung	57
4.5.1	Kinetik der substratgekoppelten Cofaktorregenerierung / <i>Lactobacillus brevis</i> -Alkoholdehydrogenase katalysierte 2-Propanoloxidation	57
4.5.2	Kinetik der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung / Formiatdehydrogenase katalysierte NADP-Reduktion	58
4.5.3	Cofaktorstabilität	61
4.6	Batch-Versuche	61
4.7	Kapitelzusammenfassung	68
5	Kontinuierliche Reduktionsversuche	69
5.1	Einleitung	69
5.2	Kontinuierliche (2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-Phenylpropanon Reduktion	72
5.3	Extraktionsmöglichkeiten für Acetaldehyd	79
5.3.1	Physikalische Methoden	79
5.3.2	Chemische Methoden	82
5.4	Gekoppelte kontinuierliche Produktionsversuche	83
5.5	Kapitelzusammenfassung	87
6	Diskussion und Ausblick	88
6.1	Substratspektrum der Enzyme	88
6.2	Vergleichende Kostenbetrachtung	89
6.3	Möglichkeiten der ttn Erhöhung	91
6.4	Folgechemie	92
7	Zusammenfassung	94
8	Material und Methoden	96
8.1	Material	96

8.1.1	Geräte	96
8.1.2	Verwendete Chemikalien	97
8.1.3	Enzym-Membran-Reaktor	99
8.2	Methoden	100
8.2.1	Bereitstellung der Benzoylformiatdecarboxylase	100
8.2.2	Fermentation	100
8.2.2.1	Zellaufschluss	102
8.2.2.2	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie	102
8.2.2.3	Gelpermeationschromatographie	103
8.2.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	103
8.2.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford	103
8.2.2.6	Bestimmung der Decarboxylaseaktivität	104
8.2.2.7	Bestimmung der Ligaseaktivität	105
8.2.3	Analytik	105
8.2.3.1	Enantiomerenanalytik für (2 <i>S</i>)- und (2 <i>R</i>)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon	105
8.2.3.2	Enantiomerenanalytik für Phenylpropan-1,2-diol	106
8.2.3.3	Quantitative Analytik für (2 <i>S</i>)-2-Hydroxy-1- phenylpropanon und Benzaldehyd	108
8.2.3.4	Quantitative Analytik für (2 <i>S</i>)-2-Hydroxy-1- phenylpropanon und Phenylpropan-1,2-diol	109
8.2.3.5	Quantitative Analytik für Acetaldehyd	109
8.2.4	Synthesen	110
8.2.4.1	<i>rac</i> -1-Phenyl-1,2-propandiol aus 1-Phenylpropanon	110
8.2.4.2	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)- und (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-Phenyl-1,2-Propandiol aus (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-Phenylpropenoxid	111
8.2.4.3	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)- und (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenyl-1,2-Propandiol aus (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Phenylpropenoxid	111
8.2.4.4	Darstellung von (2 <i>S</i>)-2-Hydroxy-1- phenylpropanon	112
8.2.4.5	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	113
8.2.4.6	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	114
8.2.4.7	Darstellung von (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	115
8.2.4.8	Darstellung von (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	116
8.2.4.9	Analytik <i>para</i> -substituierter α -Hydroxyketone	117
8.2.4.10	Analytik <i>meta</i> -substituierter α -Hydroxyketone	118
9	Literatur	121
	Anhang A: Substratspektrum der BFD	
	Anhang B: Schemata für unterschiedliche Stripp-Modi	
	Anhang C: ADH-M Kinetik	
	Anhang D: (<i>R</i>)-PAC-Reduktion zum (1<i>R</i>, 2<i>R</i>)-Diol	
	Anhang E: Scientist sheet für EMR-Modellierung	

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1: Wege zu neuen enantiomerenreinen Synthesebausteinen	2
Abbildung 1-2: Cofaktorregenerierungsmethoden.	6
Abbildung 1-3: Spektrum abgeleiteter chiraler Synthesebausteine und potentieller Zielverbindungen.	8
Abbildung 1-4: Chemische und enzymatische Synthesewege zu 1,2-Diolen	9
Abbildung 3-1: Reaktionsmechanismus der BFD-katalysierten C-C-Bindungsknüpfung zwischen Acetaldehyd und Benzaldehyd zu (2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-phenylpropanon ((2 <i>S</i>)-HPP) in Gegenwart von Thiamindiphosphat.	16
Abbildung 3-2: Schema der BFD-Aufreinigung.	17
Abbildung 3-3: Verlauf der Fermentation von <i>E. coli</i> SG13009 für die BFD-Produktion.	18
Abbildung 3-4: Chromatogramm einer immobilisierten Metallaffinitätschromatographie zur BFD-Aufreinigung.	20
Abbildung 3-5: Proteingel der BFD (links) mit Kontrollspur (rechts)	20
Abbildung 3-6: Enantioselektivität als Funktion der Benzaldehydkonzentration und der Temperatur.	22
Abbildung 3-7: <i>Hammitt</i> -Korrelation zwischen der Verseifungsgeschwindigkeit substituierter Benzoesäureethylester und der Dissoziationskonstante entsprechend substituierter Benzoesäuren.	25
Abbildung 3-8: Auftragung von $\log(S/R)$ gegen σ von a) <i>para</i> - und b) <i>meta</i> -substituierter α -Hydroxyketonen.	26
Abbildung 3-9: Korrelation von $\log(S/R)$ mit der molaren Refraktivität (MR).	30
Abbildung 3-10: Die zwei möglichen Orientierungen des Donor Substrat-ThDP-Komplexes 6 im aktiven Zentrum der BFD.	31
Abbildung 3-11: 5 L Batch zur (2 <i>S</i>)-HPP-Darstellung.	33
Abbildung 3-12: BFD-Membranreaktor betrieben bei 4 °C.	34
Abbildung 3-13: pH-Stabilität des (2 <i>S</i>)-HPP.	35
Abbildung 4-1: Felkin-Ahn-Modell zur nukleophilen Addition.	38
Abbildung 4-2: Erklärung für das Zustandekommen eines Überschusses an den Stereoisomeren (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)- und (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-Diol anhand des Felkin-Ahn-Modells.	39
Abbildung 4-3: Säurekatalysierte Epoxidhydrolyse.	42

Abbildung 4-4: Schema zur Synthese der vier möglichen Stereoisomere des 1-Phenylpropan-1,2-diols.	44
Abbildung 4-5: Bild der synthetisierten Stereoisomere des Phenylpropandiols.	44
Abbildung 4-6: <i>Lb</i> -ADH-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Werts.	45
Abbildung 4-7: <i>Lb</i> -ADH-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur.	46
Abbildung 4-8: <i>Lb</i> -ADH-Aktivität in Gegenwart der Substrate.	47
Abbildung 4-9: Halbwertszeiten der <i>Lb</i> -ADH-Aktivität in Gegenwart von Stabilisatoren.	48
Abbildung 4-10: pH-Stabilität der <i>Lb</i> -ADH: 50 mM KPi-Puffer; 30 °C.	48
Abbildung 4-11: Temperaturstabilität der <i>Lb</i> -ADH.	49
Abbildung 4-12: Kinetik der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten (2S)-HPP Reduktion bei 30 °C.	52
Abbildung 4-13: Kinetik der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten Acetaldehyd-Reduktion bei 30 °C.	54
Abbildung 4-14: Kinetik der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten Benzaldehyd-Reduktion bei 30 °C.	56
Abbildung 4-15: Kinetik der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten 2-Propanol-Oxidation bei 30 °C.	58
Abbildung 4-16: Kinetik der FDH-katalysierten NADP-Reduktion bei 30 °C.	60
Abbildung 4-17: NADPH-pH-Stabilität: 0,77 mM NADPH, 50 mM KPi-Puffer; 25 °C.	61
Abbildung 4-18: (2S)-HPP-Reduktion im Batch und als Simulation.	62
Abbildung 4-19: Batch-Simulation zur Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses.	64
Abbildung 4-20: 2-Propanol gekoppelte 2S-HPP-Reduktion.	65
Abbildung 4-21: Einfluss von Acetaldehyd auf die (2S)-HPP-Reduktion.	66
Abbildung 4-22: Umsatz- und Enzymaktivitätsverlauf bei der (2S)-HPP-Reduktion in Gegenwart von Acetaldehyd.	67
Abbildung 5-1: Schema des Reaktoraufbaus.	70
Abbildung 5-2: Bild des Reaktoraufbaus.	71
Abbildung 5-3: Kontinuierliche (2S)-HPP-Reduktion im 10 mL EMR mit YM 10 Membran.	73
Abbildung 5-4: Kontinuierliche (2S)-HPP-Reduktion unter Cofaktorlimitierten Bedingungen.	74
Abbildung 5-5: Vergleich der Ausspülkurven bei verschiedenen Retentionen.	75
Abbildung 5-6: Schematisch Darstellung der Retentionsmessung.	76
Abbildung 5-7: Retentionsmessung einer YC05-Membran.	77
Abbildung 5-8: Kontinuierliche Reduktion im EMR mit cofaktorrückhaltender YC05-Membran.	78
Abbildung 5-9: Funktionsprinzip des Liqui-Cel-Extraktionsmoduls	80
Abbildung 5-10: Extraktionsleistung des Liqui-Cel-Moduls; Anfangskonzentrationen.	81
Abbildung 5-11: Destillative Extraktion.	82

Abbildung 5-12: Erster gekoppelter Reaktorlauf.	84
Abbildung 5-13: Zweiter gekoppelter Reaktorlauf.	85
Abbildung 5-14: EMR-Simulation mit und ohne Acetaldehyd-Restkonzentration.	86
Abbildung 6-1: Schema zur Kostenbetrachtung.	91
Abbildung 6-2: Schema zur Synthese von 1,2-Aminoalkoholen aus 1,2 Diolen.	93
Abbildung 8-1: Explosionszeichnung des Enzymmembranreaktors.	99
Abbildung 8-2: HPLC-Chromatogramm zur 1,2-Dioltrennung.	106
Abbildung 8-3: GC-Chromatogramm zur 1,2-Dioltrennung.	107
Abbildung 8-4: Reduktion von 1-Phenylpropanon mit LiAlH_4 .	110
Abbildung 8-5: Hydrolyse von (1S,2S)-Phenylpropenoxid.	111
Abbildung 8-6: Hydrolyse von (1R,2R)-Phenylpropenoxid	111
Abbildung 8-7: Darstellung von (2S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon	112
Abbildung 8-8: <i>Lb</i> -ADH-katalysierte (2S)-HPP Reduktion.	113
Abbildung 8-9: <i>Th.sp.</i> -ADH -katalysierte (2S)-HPP Reduktion.	114
Abbildung 8-10: <i>Lb</i> -ADH-katalysierte (2R)-HPP Reduktion.	115
Abbildung 8-11: <i>Th.sp.</i> -ADH-katalysierte (2R)-HPP Reduktion	116

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1-1: Einteilung der Enzyme in Enzymklassen.	3
Tabelle 1-2 : Preise von Cofaktoren.	6
Tabelle 3-1: BFD-Aufreinigungsprotokoll.	19
Tabelle 3-2: Eigenschaften der BFD.	21
Tabelle 3-3: Variation des Enantiomerenüberschusses in Abhängigkeit des Substituenten.	24
Tabelle 4-1: ADH-Screening Ergebnis.	41
Tabelle 4-2: Parameter der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten Reduktion von (2 <i>S</i>)-HPP.	52
Tabelle 4-3: Parameter der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten Reduktion von Acetaldehyd.	53
Tabelle 4-4: Parameter der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten Reduktion von Benzaldehyd.	55
Tabelle 4-5: Parameter der <i>Lb</i> -ADH-katalysierten 2-Propanol-Oxidation.	57
Tabelle 4-6: Parameter der FDH-katalysierten Reduktion von NADP.	59
Tabelle 6-1: Kostenvergleich.	90

Symbole und Abkürzungen

Symbol	Wert, Einheit	Größe
δ	ppm	chemische Verschiebung
λ	nm	Wellenlänge
J	Hz	Kopplungskonstante
k	min^{-1}	Geschwindigkeitskonstante
k_{des}	$\text{min}^{-1}, \text{d}^{-1}$	Desaktivierungskonstante
K_I	$\mu\text{mol/L}$	Inhibierungskonstante
K_M	$\mu\text{mol/L}$	Michaelis-Menten-Konstante
pH	$-\log [\text{H}_3\text{O}^+]$	Maß der Protonenkonzentration in einer (wäßrigen) Lösung
R	$8,314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$	allgemeine Gaskonstante
T	$^{\circ}\text{C}$	Temperaturangabe in Grad Celsius
t	min, h	Zeit
T	$^{\circ}\text{C} / \text{K}$	Temperaturangabe in Grad Celcius/ Kelvin
U	$\mu\text{mol}/\text{min}$	Einheit der Enzymaktivität, unit
V_{max}	$\text{U}/\text{mL}, \text{U}/\text{mg}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Abk.	Abkürzung für
(1 <i>R</i> , 2 <i>R</i>)-Diol	(1 <i>R</i> , 2 <i>R</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol
(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)-Diol	(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol
(1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-Diol	(1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol
(1 <i>S</i> , 2 <i>S</i>)-Diol	(1 <i>S</i> , 2 <i>S</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol
(2 <i>R</i>)-HPP	(2 <i>R</i>)-Hydroxy-1-Phenylpropanon
(2 <i>S</i>)-HPP	(2 <i>S</i>)-Hydroxy-1-Phenylpropanon
¹³ C-NMR	¹³ C-Kernresonanzspektrum
¹ H-NMR	Protonenresonanzspektrum
AA	Acetaldehyd
ADH-M	<i>Thermoanaerobium species</i> -ADH
BA	Benzaldehyd
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BSA	Bovine Serum Albumin
de	Diastereomerenüberschuss $\%de = [D_1 - D_2] / [D_1 + D_2] \times 100$
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	Enantiomerenüberschuss (engl. enantiomeric excess) $\%ee = [E_1 - E_2] / [E_1 + E_2] \times 100$
EMR	Enzymmembranreaktor
FDH	Formiat Dehydrogenase
KPi	Kaliumphosphat
<i>Lb</i> -ADH	<i>Lactobacillus brevis</i> -ADH
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, ox. Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, red. Form
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, ox. Form
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, red. Form
PAC	Phenylacetylcarbinol (1-Hydroxy-1-Phenylpropanon)
PDC	Pyruvatdecarboxylase
ppm	parts per million (10 ⁻⁶)
TEA	Triethanolamin
ThDP	Thiamindiphosphat oder Cocarboxylase)
ttn	total turn-over number, auch Zyklenzahl

1 Einleitung

Die Nachfrage nach enantiomerenreinen Arzneimitteln, Pflanzenschutzmitteln und Nahrungsmittelzusätzen wächst stetig, da häufig reine Enantiomere zielgerichteter wirken und weniger Nebenwirkungen aufweisen als das Racemat¹ [Stinson, 1998]. Bekannte Beispiele biologisch aktiver Verbindungen, die Enantiomere mit unterschiedlichen Eigenschaften aufweisen sind Thalidomid [Eriksson *et al.*, 1995] (sedativ (*R*); teratogen (*S*)), Aspartam (süß (*S,S*); bitter (*R,R*)) und Limonen (Zitronen-Geruch (*S*); Orangen-Geruch (*R*)). Dies hat zu einem steigenden Bedarf an effizienten Methoden für die industrielle Synthese von optisch aktiven Produkten im Besonderen und der Entwicklung neuer asymmetrischer Methoden im Allgemeinen geführt [Sheldon *et al.*, 1993].

Von den verschiedenen Möglichkeiten enantiomerenreine Verbindungen herzustellen, ist die Racematspaltung über die Bildung von diastereomeren Salzen oder Komplexen immer noch die am häufigsten angewandte Methode in der chemischen Industrie. Nichtsdestotrotz kann es aus ökonomischer Sicht wichtig sein, die gewünschte Stereochemie zu einem frühen Zeitpunkt in der Synthese einzuführen. Somit kann die benötigte Menge an Reaktanden, Lösungsmitteln und Reaktionsvolumina verringert werden. Dies wird durch die Verwendung von chiralen Bausteinen (Syntonen) erreicht, die enantiomerenrein vorliegen und die nötigen Funktionalitäten besitzen, um sie in das gewünschte Endprodukt umzuwandeln.

Abbildung 1-1 zeigt die verschiedenen Wege um enantiomerenreine Vorläufermoleküle zu erhalten. Der erste Ansatz verwendet billige und leicht zugängliche Verbindungen aus dem so genannten *chiral pool*². Der zweite Weg beschreibt die Racematspaltung und der dritte Weg die asymmetrische Synthese ausgehend von einer - im Prinzip beliebigen - achiralen Verbindung.

¹ In der Chemie bezeichnet man als ein Racemat ein äquimolares Gemisch von zwei Enantiomeren.

² Der *chiral pool* umfasst Verbindungen wie Aminosäuren, Zucker, Terpene und deren Derivate. Trotz der großen Vielfalt natürlicher Verbindungen, besteht großes Interesse an der Entwicklung neuer chiraler nicht natürlicher Synthesebausteine.

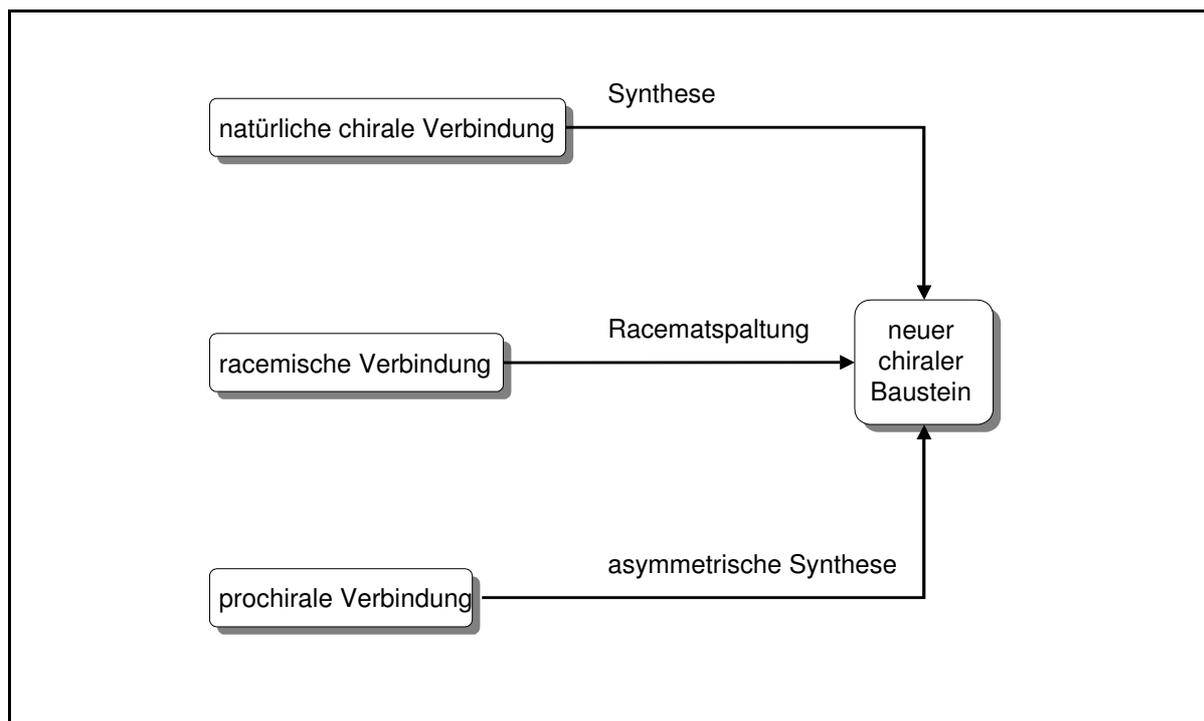


Abbildung 1-1: Wege zu neuen enantiomerenreinen Synthesebausteinen

1.1 Enzyme in der organischen Chemie

Die Verwendung von natürlichen Katalysatoren für die Umwandlung nicht natürlicher organischer Verbindungen hat bereits eine über hundertjährige Geschichte. Während sich die Forschung anfänglich auf die Aufklärung von biochemischen Stoffwechselwegen und Enzymmetabolismen konzentrierte, stehen heute eine Vielzahl von präparativen Anwendungen bis hin zum industriellen Produktionsprozess [Liese *et al.*, 2000] im Vordergrund. Das potentielle Anwendungsspektrum von Enzymen für die organische Synthese verdeutlichen unter anderem die über 3000 bekannten und in sechs Enzymklassen³ katalogisierten Enzyme [IUBMB, 1992] (siehe Tabelle 1-1). So gibt es, bis auf wenige Ausnahmen wie die der Diels-Alder Reaktion oder der Cope-Umlagerung, zu jeder organisch-chemischen Reaktion ein enzymatisches Pendant [Sih *et al.*, 1977]. Bezogen auf präparativ nützliche Biotransformationen beschäftigte sich die Fachwelt am Ende des vergangenen Jahrhunderts vor allem mit Hydrolasen, die überwiegend für die Esterhydrolyse (25 %) und Veresterungen (28 %) eingesetzt wurden [Roberts, 1999]. 13 % der Veröffentlichungen bezogen sich auf Reduktions- und 12,5 % auf Oxidationsreaktionen. Der Anteil der Beiträge zu C-C-Bindungsknüpfungen betrug 5 %, die Synthese von komplexen Kohlenhydraten 10 % und die Verwendung von katalytischen Antikörpern und

anderen Enzymmimetika machten 6 % aus. Biochemische Methoden erweitern und bereichern demnach das breite Arsenal der klassischen, organisch-chemischen Methoden. Bedingt durch den immer wachsenden Bedarf an optisch reinen Verbindungen, gewinnen Enzyme vor allem auf dem Gebiet der asymmetrischen Synthese seit 1970 immer mehr an Bedeutung [Corsby, 1992]. Die Verleihung des Chemie-Nobelpreises 2001 [Ahlberg, 2001] an *Knowles*, *Noyori* und *Sharpless* für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der asymmetrischen katalytischen Hydrierung bzw. Oxidation unterstreicht die Bedeutung der asymmetrischen Katalyse - wozu das Teilgebiet der asymmetrischen Biokatalyse ebenfalls zählt - für die organische Chemie.

Tabelle 1-1: Einteilung der Enzyme in Enzymklassen.

Klasse	Enzym	Katalysierte Reaktion
1	Oxidoreduktasen	Oxidations- und Reduktionsreaktion
2	Transferasen	Übertragung von funktionellen Gruppen
3	Hydrolasen	Spaltung und Bildung von Estern, Amiden und Glykosiden
4	Lyasen	Spaltung von Bindungen, Eliminierung
5	Isomerasen	Isomerisierung und Racemisierung
6	Ligasen	Knüpfung von Einfachbindungen (auch Synthetasen)

1.1.1 Vorteile der Enzymkatalyse

Enzyme sind Katalysatoren, die fast alle als Proteine vorliegen. Wie alle in der Natur vorkommenden Proteine sind Enzyme ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut⁴. Das aktive Zentrum eines Enzyms stellt demnach eine chirale Umgebung dar, welches in der Lage ist die Chiralität eines Substrates zu "erkennen" bzw. seine Chiralität auf das Substrat zu übertragen. Somit können einerseits Enantiomere eines racemischen Substrates aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionsraten in einer kinetischen Racematspaltung voneinander getrennt werden, andererseits können prochirale Substrate zu optisch aktiven Produkten umgewandelt werden. In der Praxis zeigt sich, dass Enzyme die Erzeugung fast ausschließlich eines Stereoisomeren ermöglichen. Gerade diese hohe Stereoselektivität macht Enzyme so interessant. Da Enzyme mit nur einer funktionellen Gruppe von mehreren

³ Enzyme werden nach ihrer natürlichen Katalyseaktivität oder nach der zuerst entdeckten Aktivität eingeteilt.

⁴ Für seltene D-chirale Proteine siehe [Jung et al., 1992]

derselben (Regioselektivität) oder Ähnlichen (Chemoselektivität) in einem Molekül selektiv reagieren, kann das Anbringen und spätere Entfernen von Schutzgruppen entfallen, das normalerweise bei klassischen organischen Synthesen erforderlich ist. Aufgrund der Chemo- und Regioselektivität entstehen bei enzymkatalysierten Reaktionen weniger Nebenprodukte.

Die hohe Katalyseeffizienz von Enzymen unter milden Bedingungen (pH-Bereich 5-8 und Temperaturbereich 20-40 °C) minimiert ebenfalls das Auftreten von Nebenprodukten, die aufgrund von Zersetzungs-, Isomerisierungs-, Racemisierungs- oder Umlagerungserscheinungen hervorgerufen werden. Die vergleichbaren Bedingungen, unter denen die meisten Enzymreaktionen durchgeführt werden, machen sie miteinander kompatibel. Somit sind sequentielle Reaktionschritte unter Verwendung von Multienzymssystemen möglich, die vor allem die Aufarbeitung empfindlicher Zwischenprodukte umgehen können. Des Weiteren kann der ungünstigen Lage eines Reaktionsgleichgewichts durch nachgeschaltete Enzymreaktionen begegnet werden, um die Gleichgewichtslage zum gewünschten Produkt zu verschieben.

Wie alle Katalysatoren beschleunigen Enzyme eine Reaktion ohne einen Einfluss auf das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion auszuüben. Folglich können manche enzymkatalysierten Reaktionen in beide Richtungen ablaufen.

Abschließend sei noch auf die Umweltverträglichkeit von Enzymen hingewiesen, die im Gegensatz zu Schwermetall-enthaltenden Katalysatoren abbaubar sind.

1.1.2 Nachteile der Enzymkatalyse

Nachteilig beim Einsatz von Enzymen ist deren häufig zu beobachtende geringere Aktivität und Stabilität in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln und organischen Reaktionskomponenten. Diese Tatsache schränkt den Einsatz organischer Lösungsmittel oder Lösungsvermittler in enzymkatalysierten Reaktionen erheblich ein, was wiederum die maximal erreichbare Raum-Zeit-Ausbeute begrenzt. Erfreulicherweise ermöglichen neue Untersuchungen zur Lösungsmitteltoleranz von Enzymen ihre breitere Anwendbarkeit in nicht natürlicher Umgebung [Bortolini *et al.*, 1998, Klibanov, 2001]. Weiterhin lassen sich

mit Hilfe der gerichteten Evolution stabilere Mutanten für die Biokatalyse entwickeln [Reetz *et al.*, 2000; Arnold, 2001; Bornscheuer *et al.*, 2001].

Enzyme natürlichen Ursprungs liegen nur in einer Enantiomerenform vor. Da keine allgemeinen Methoden vorliegen, um Spiegelbild-Enzyme aus D-Aminosäuren zu erzeugen, ist es unmöglich die chirale Induktion einer gegebenen enzymatischen Reaktion umzukehren. Der Zugang zum Produktspiegelbild gelingt jedoch in einigen Fällen nach eingehender Suche nach einem Enzym mit der entgegengesetzten Stereoselektivität.

Manche Reaktionen wie Redoxreaktionen benötigen in der Enzymkatalyse Cofaktoren (z. B. NAD(P)H), die als Redoxäquivalente dienen. Die meisten Cofaktoren sind instabil und die hohen Cofaktorkosten verbieten deren Einsatz in stoichiometrischen Mengen. Mangels synthetischer Ersatzstoffe müssen Cofaktoren in Nebenreaktionen regeneriert werden.

Viele Enzymreaktionen weisen eine Substrat- oder Produktinhibierung auf, die sich vor allem bei hohen Substrat und/oder Produktkonzentrationen bemerkbar macht. Während eine Substratinhibierung in einfacher Weise durch Einstellung einer niedrigen Substratkonzentration (z. B. kontinuierliche Substratdosierung) verhindert werden kann, ist die Vermeidung einer Produktinhibierung mit größerem technischem Aufwand verbunden.

Der genannte Vorteil der milden Reaktionsbedingungen enzymatischer Reaktionen schränkt den Umfang der Betriebsparameter erheblich ein. Ähnliches gilt für das Substratspektrum eines Enzymes, welches meist auf wenige Substrate begrenzt ist.

1.1.3 Cofaktorregenerierung

Zur Übertragung von Redoxäquivalenten benötigen Oxidoreduktasen sogenannte Cofaktoren. Die wichtigsten Cofaktoren für Oxidoreduktasen sind Nicotinamidadenindinucleotide (NAD(H)), die 80 % der Redoxenzyme benötigen oder NADP(H), das von ca. 10 % der bekannten Redoxenzyme benötigt wird. Andere Cofaktoren wie Flavine (FAD oder FMN), Methoxatin (PQQ) oder Cytochrome sind vergleichsweise selten. Da diese Cofaktoren recht teuer (Tabelle 1.2) sind, ist ihre effektive *in situ* Regenerierung bei einem Einsatz in präparativen Ansätzen unumgänglich.

Tabelle 1-2 : Preise von Cofaktoren.

Cofaktor	Molgewicht / g mol ⁻¹	Preis/Euro g ^{-1,5}	Preis/Euro mol ⁻¹
NAD ⁺	663	3,7	2.453
NADH	664	12,5	8.300
NADP ⁺	741	14,5	10.744
NADPH	742	190	140.980

Eine Vielzahl von Regenerierungsmethoden für Nicotinamid-Cofaktoren wurden beschrieben und in Übersichtsartikeln [Chenault *et al.*, 1988; Chenault *et al.*, 1987; Leonida, 2001] zusammengefasst. Für NAD(P)H sind neben chemischen [Ruppert, 1988], biologischen [Morita *et al.*, 1994], elektrochemischen [Fry *et al.*, 1994] und photochemischen [Hilthorst *et al.*, 1982; Laane *et al.*, 1987] Methoden vor allem enzymatische Methoden von praktischer Bedeutung. Die Regenerierungsstrategien kann man, wie in (Abbildung 1-2) dargestellt, in zwei Klassen teilen:

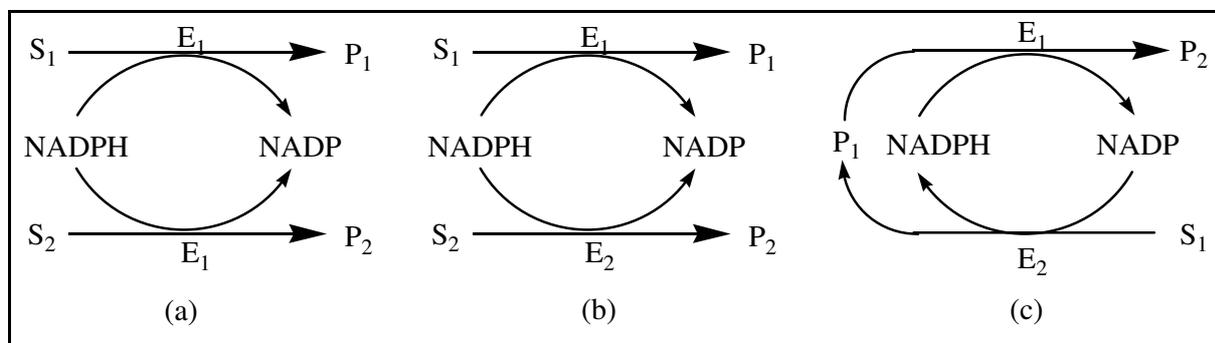


Abbildung 1-2: Cofaktorregenerierungsmethoden.

Die substratgekoppelte Regenerierung, wie sie in Abbildung 1.2 a) dargestellt ist, nutzt nur ein Enzym zur Synthese und Regenerierung. Es wird ein Alkohol, z. B. 2-Propanol als Cosubstrat eingesetzt, der im selben Maße oxidiert wird, wie das eingesetzte Keton reduziert wird. Vorteilhaft wird dieses Verfahren eingesetzt, wenn der Cofaktor sehr eng an das Enzym gebunden ist, wie dies z. B. bei der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase der Fall ist. Es wird aber auch, aufgrund der einfachen Handhabung, bei Enzymen mit dissoziierbarem Cofaktor eingesetzt.

Die enzymgekoppelte oder gekoppelte Regenerierung, wie in Abbildung 1-1: Wege zu neuen enantiomerenreinen Synthesebausteinen b) dargestellt, nutzt ein zweites Enzym mit seinem Substrat zur Cofaktorregenerierung. Ein von *Tischkov* und Mitarbeitern [Tischkov *et al.*, 1999; Seelbach *et al.*, 1996] entwickeltes System für die Regenerierung von NADPH nutzt eine Formiatdehydrogenase als Regenerierenzym mit Formiat als Substrat. Dieses System bietet eine Reihe von Vorteilen:

Durch die Entkopplung der Enzymaktivitäten kann eine effektive Regenerierung zu jedem Zeitpunkt gewährleistet werden.

- Formiat ist nach molekularem Wasserstoff die günstigste Wasserstoffquelle, zudem ist es in Lösung stabil und unbedenklich für Enzyme und Cofaktoren auch in hoher Konzentration.
- Das Gleichgewicht der Reaktion ($K_{eq} \gg 15.000$) liegt stark auf Seiten der Reaktionsprodukte (CO_2 und NADPH), sodass die Aufarbeitung nicht durch Produkte der Regenerierungsreaktion kompliziert wird.
- Die FDH ist stabil und einfach in einem kontinuierlichen fermentativen Verfahren herzustellen und aufzuarbeiten.

Andere Regenerienzyme wie die Glucosedehydrogenase oder eine zweite Alkoholdehydrogenase haben nur untergeordnete Bedeutung. Ebenso die Verwendung einer Hydrogenase und elementarer Wasserstoff [Mertens *et al.*, 2003]. Ein Sonderfall der enzymgekoppelten Regenerierung nutzt zwei Enzyme, von denen das Produkt des Regenerienzyms gleichzeitig das Substrat des Synthesenzyms ist (Abbildung 1-2 c). Hierbei dienen das oxidierte Produkt und NAD(P)H, die durch die erste enzymatische Reaktion gebildet wurden, als Substrate für den zweiten Schritt, eine enzymatische Reduktion. Ein Beispiel für diese Strategie ist die Synthese von α -Aminosäuren aus α -Hydroxycarbonsäuren in einem Zweistufenprozess.

1.2 Bedeutung vicinaler Dirole

Chirale Dirole im Allgemeinen und *vic*-Dirole wie das hier behandelte 1-Phenylpropan-1,2-diol im Besonderen spielen nicht nur in biologischen Systemen eine wichtige Rolle, sondern dienen sehr häufig als Synthesebausteine für die stereospezifische Synthese von Pharmaka, chiralen Auxiliaren, Liganden für Metallkomplexe und für die Totalsynthese natürlich vorkommender Verbindungen [Servi, 1990; Csuk *et al.*, 1991]. Abbildung 1-3 zeigt das Spektrum chiraler Synthesebausteine, die sich von der Zielverbindung in dieser Arbeit ableiten lassen. Die Grundstruktur der Zielverbindung ist ferner in pharmakologisch interessanten Verbindungen wie der Taxolseitenkette [Mukaiyama *et al.*, 1999; Nicolaou *et al.*, 1994; Denis *et al.*, 1990], dem in der AIDS-Therapie eingesetzten Fungizid Sch 42427 [Gala *et al.*, 1996] und in chiralen Auxiliaren des Evans-Typs [Evans, 1982] enthalten.

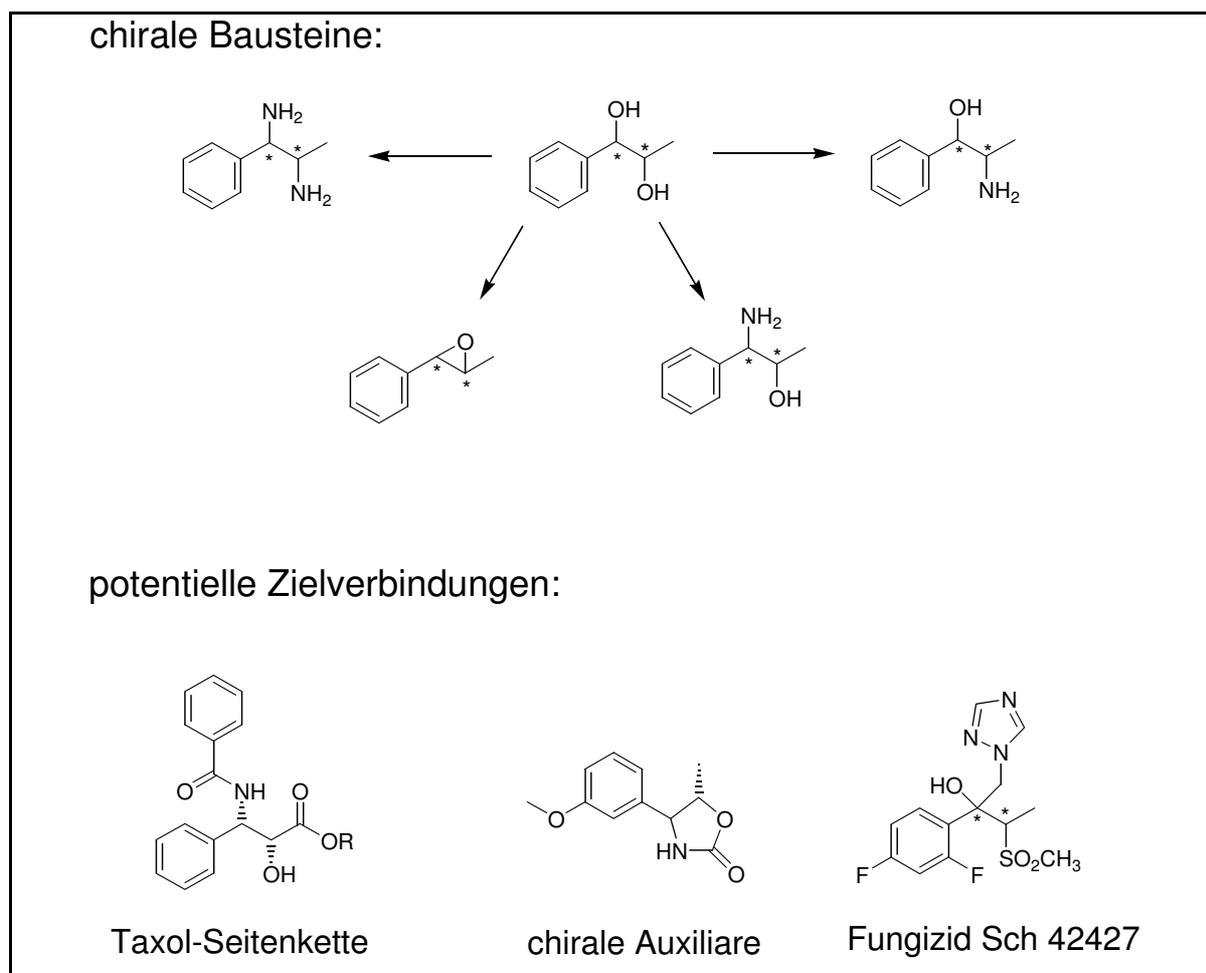


Abbildung 1-3: Spektrum abgeleiteter chiraler Synthesebausteine und potentieller Zielverbindungen.

1.2.1 Chemische und Biologische Darstellungsmethoden

Die wichtigsten chemischen Wege zu *vic*-Diolen in Bezug auf Stereospezifität und Enantioselectivität sind die katalytische *cis*-Dihydroxylierung von Olefinen mit Osmiumtetroxid (OsO_4) [Kolb *et al.*, 1994; Choudry *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 1999] und die katalytische asymmetrische Hydrierung von Diketonen [Toukoniitty *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2000] bzw. α -Hydroxyketonen [Koike *et al.*, 2000]. Zufriedenstellende Selektivitäten können auch mit gängigen Metallhydriden erzielt werden. So lassen sich mit LiAlH_4 , NaBH_4 und NaH (bzw. LiH) + Me_2Zn Diastereoselektivitäten zwischen 92 und 96 %⁶ erzielen [Bowlus *et al.*, 1974].

Zu den biologischen Methoden zur Synthese von *vic*-Diolen gehören die enantioselective Hydrolyse von Epoxiden mit Epoxidhydrolasen [Pedragosa *et al.*, 1996; Weijers, 1997], die kinetische Racematspaltung⁷ *vic*-Dirole mit oxidierenden Enzymen [Bortolini *et al.*, 1998] und Lipasen [Kim *et al.*, 1995] sowie die enzymatische und mikrobielle Reduktion von 1,2-Diketonen und α -Hydroxyketonen [Bortolini *et al.*, 1997; Mochizuki *et al.*, 1995; Takeshita *et al.*, 1989].

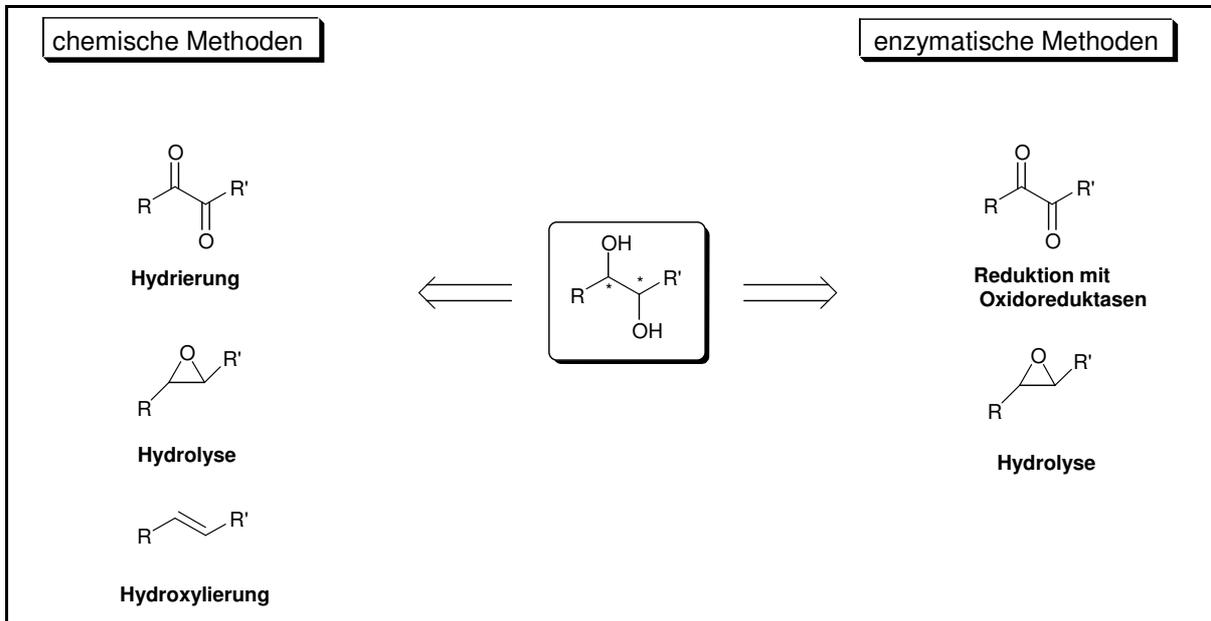


Abbildung 1-4: Chemische und enzymatische Synthesewege zu 1,2-Diolen

⁶ Dies bezieht sich unter anderem auf die hier behandelte Diol-Zielverbindung. Als Ausgangsverbindungen wurden das entsprechende Diketon oder Hydroxyketon eingesetzt.

⁷ Für einen Überblick hoch effizienter biotechnologischer Methoden, die einzelne Produktisomere aus einem Racemat in nahezu 100 % chemischer und optischer Reinheit entstehen lassen, siehe [Strauss *et al.*, 1999]

1.3 Membranverfahren

Membranen spielen bei vielen Stoffaustauschprozessen in der Natur - wie beispielsweise beim Stoffwechsel von lebenden Zellen oder bei der Wasseraufnahme von Pflanzen - eine zentrale Rolle. Sie haben die Eigenschaft, bestimmte Stoffe hervorragend passieren zu lassen und für andere eine nahezu unüberwindbare Barriere darzustellen, d.h. sie sind in der Lage, zwischen den Komponenten einer Lösung zu unterscheiden. Die Treibende Kraft beim Stoffaustausch ist i) die Druckdifferenz, ii) Lösungs/-Diffusionskräfte oder iii) das elektrochemische Potential. Meist überlagern sich beim Stofftransport mehrere Mechanismen. Die hauptsächlich am Stofftransport beteiligten Kräfte erlauben eine Gliederung in 3 Gruppen:

1. Druckgetriebene Prozesse:

- Mikrofiltration
- Ultrafiltration
- Nanofiltration
- Umkehrosmose (RO, engl.: reverse osmosis)

2. Lösung/- Diffusion:

- Diffusionsdialyse DD

3. Elektrochemische Kräfte

- Elektrodialyse ED

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl von einem druckbetriebenen Verfahren für die Enzymimmobilisierung als auch von einem Lösung/-Diffusionsverfahren für eine selektive Extraktion Gebrauch gemacht.

Die Immobilisierung von Enzymen ermöglicht es, die Verweilzeiten von Enzymen und Reaktanden zu entkoppeln. Hiermit lassen sich die Zyklenzahlen⁸ der Enzyme erhöhen. Gleichzeitig wird die Trennung von Reaktanden und Enzymen am Ende einer Reaktion erleichtert bzw. können kontinuierlich betriebene Reaktoren eingesetzt werden [Kragl *et al.*, 1991; Kragl *et al.*, 1992]. Vor allem bei hohen produktspezifischen Enzymkosten und bei langfristig absehbar großen benötigten Produktmengen bieten kontinuierlich betriebene Prozesse Vorteile. So ermöglicht der kontinuierlich Betrieb in der Regel höhere Raum-Zeit-

⁸ Die Zyklenzahl - auch bekannt als total turnover number (ttn) - beschreibt die Stoffmenge in Mol des Produktes, die pro Mol Stoffmenge des eingesetzten Katalysators entsteht.

Ausbeuten, besser kontrollierbare Reaktionsbedingungen, eine gleichbleibende Produktqualität und schließlich eine bessere Ausnutzung des Enzyms.

2 Themenstellung

Anknüpfend an Arbeiten zur enzymatischen α -Hydroxyketon Synthese mit den C-C-Bindungsknüpfenden Enzymen BFD, PDC und BAL sollte untersucht werden, ob ein stereoselektiver Zugang zu den Stereoisomeren des 1-Phenylpropan-1,2-diol auf enzymatischem Wege möglich ist. Für die Umsetzung sollten kommerziell erhältliche und *in house* verfügbare Alkoholdehydrogenasen in Betracht gezogen werden.

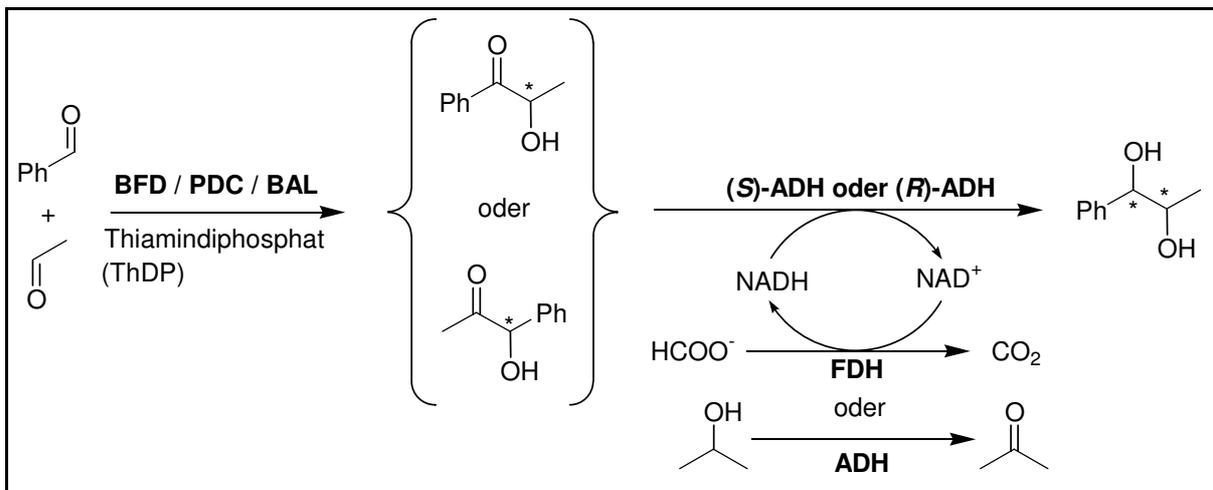


Abb. 2-1: Multikatalysatorsystem.

Einsatz der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD), der Benzaldehydlyase (BAL) oder der Pyruvatdecarboxylase (PDC) in einem Multikatalysatorsystem mit Alkoholdehydrogenasen (ADH) verschiedener Stereospezifität - in Kombination mit einer Formiatdehydrogenase (FDH) oder ADH zur Cofaktorregenerierung.

Vor dem Hintergrund einer optimalen Enzymausnutzung, hoher Raum-Zeit-Ausbeuten und eines leichten *down-stream-processing* sollte exemplarisch anhand eines der Reduktionsprodukte ein Prozess im Labormaßstab entwickelt werden. Im Vorfeld und prozessbegleitend, sollten reaktionstechnische Untersuchungen Hinweise zur Reaktorwahl und Parameteroptimierung geben. Die Auswertung kinetischer Parameter mit einem Datenauswertungs- und Simulationsprogramm soll zu einem besseren Verständnis des Systems führen.

3 C-C-Bindungsknüpfung

3.1 Einleitung

Die Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) gehört zu der Enzymklasse der Lyasen (EC 4.1.1.7). Eine Reihe dieser Enzyme sind wie die BFD thiamindiphosphatabhängig. Im lebenden Organismus ist die BFD das dritte Enzym in dem Mandelsäurestoffwechsel [Gunsalus *et al.*, 1953; Hegemann, 1966]. Im Mandelsäurestoffwechsel wird (*R*)-Mandelsäure zu Benzoesäure abgebaut. Die Enzyme des Mandelsäureabbauweges ermöglichen es somit bestimmten Bakterien wie z.B. *Pseudomonas putida* auf (*R*)-Mandelsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es hat sich gezeigt, dass die Hauptkatalyseaktivität der isolierten BFD erwartungsgemäß die Decarboxylierung von α -Ketocarbonsäuren zu Benzaldehyden und Kohlendioxid ist. In einer Nebenreaktion ist die BFD imstande, die C-C-Bindungsknüpfung zwischen einem Donor- und Akzeptoraldehyd zum α -Hydroxyketon zu katalysieren. Der Mechanismus der beiden genannten Reaktionen ist ähnlich und benötigt in beiden Fällen den Cofaktor ThDP. Der Mechanismus für die C-C-Bindungsknüpfung ist in Abbildung 3-1 beschrieben.

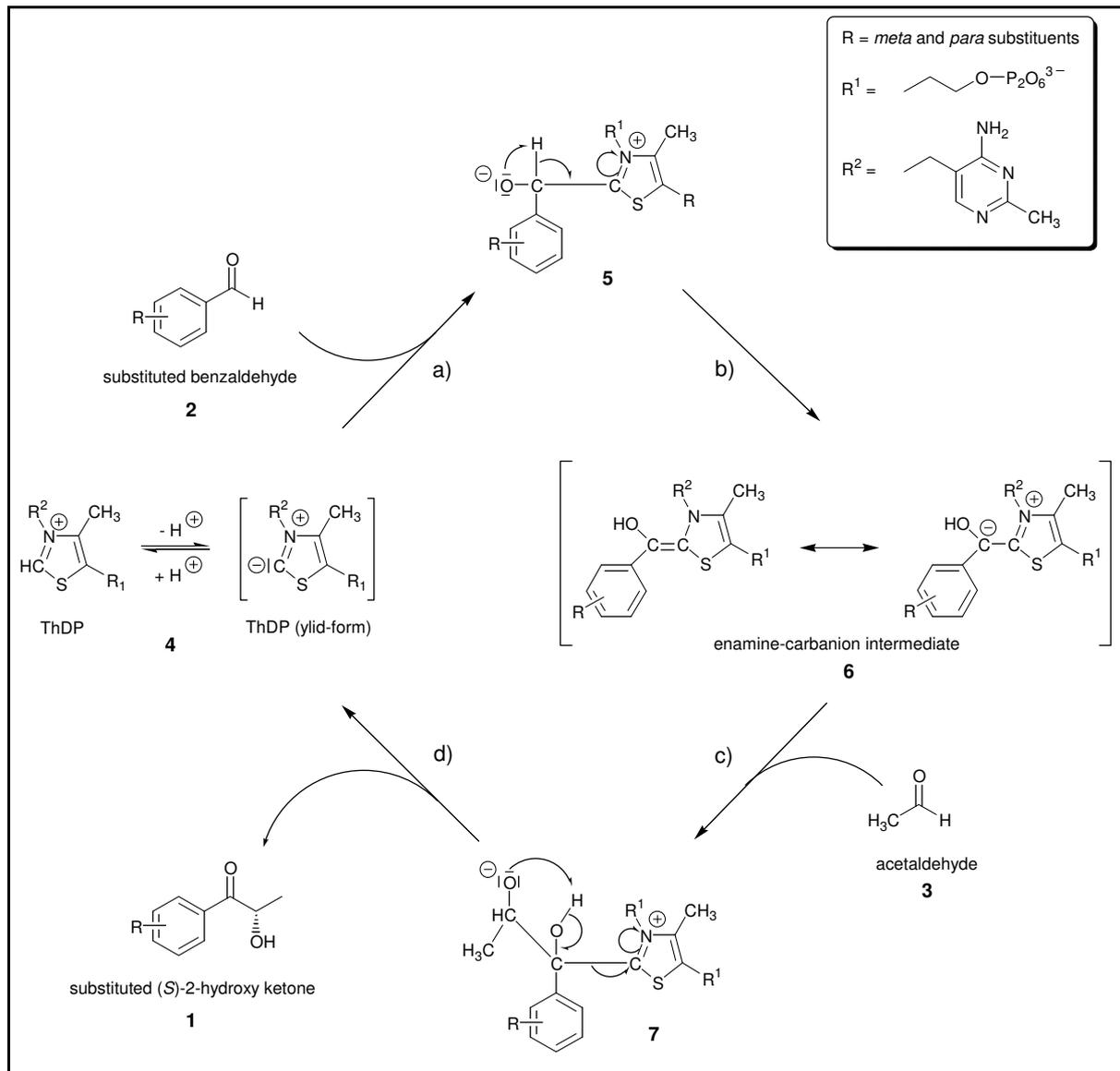


Abbildung 3-1: Reaktionsmechanismus der BFD-katalysierten C-C-Bindungsknüpfung zwischen Acetaldehyd und Benzaldehyd zu (2S)-Hydroxy-1-phenylpropanon ((2S)-HPP) in Gegenwart von Thiamindiphosphat.
 a) Addition von 4 in Form des nucleophilen Ylids an 2 b) Umlagerung des Additionsproduktes 5 zu dem Enamin-Carbanion-Intermediat 6 c) Addition von 6 an Acetaldehyd d) Umlagerung des Additionsproduktes 7 und gleichzeitiges Freisetzen von 1 und 4.

3.2 Bereitstellung der Benzoylformiatdecarboxylase

Die in dieser Arbeit verwendete Benzoylformiatdecarboxylase ist als rekombinantes Enzym leicht zugänglich und wurde freundlicherweise vom Institut für Enzymtechnologie zur Verfügung gestellt. Der C-Terminus der BFD-Gensequenz wurde um die Codons für sechs zusätzliche Histidinreste (His-tag) verlängert. Dadurch vereinfacht sich die Aufreinigung der BFD. Die Gewinnung der BFD erfolgte in 5 Schritten wie in nachfolgendem Schema (Abbildung 3-2) gezeigt:

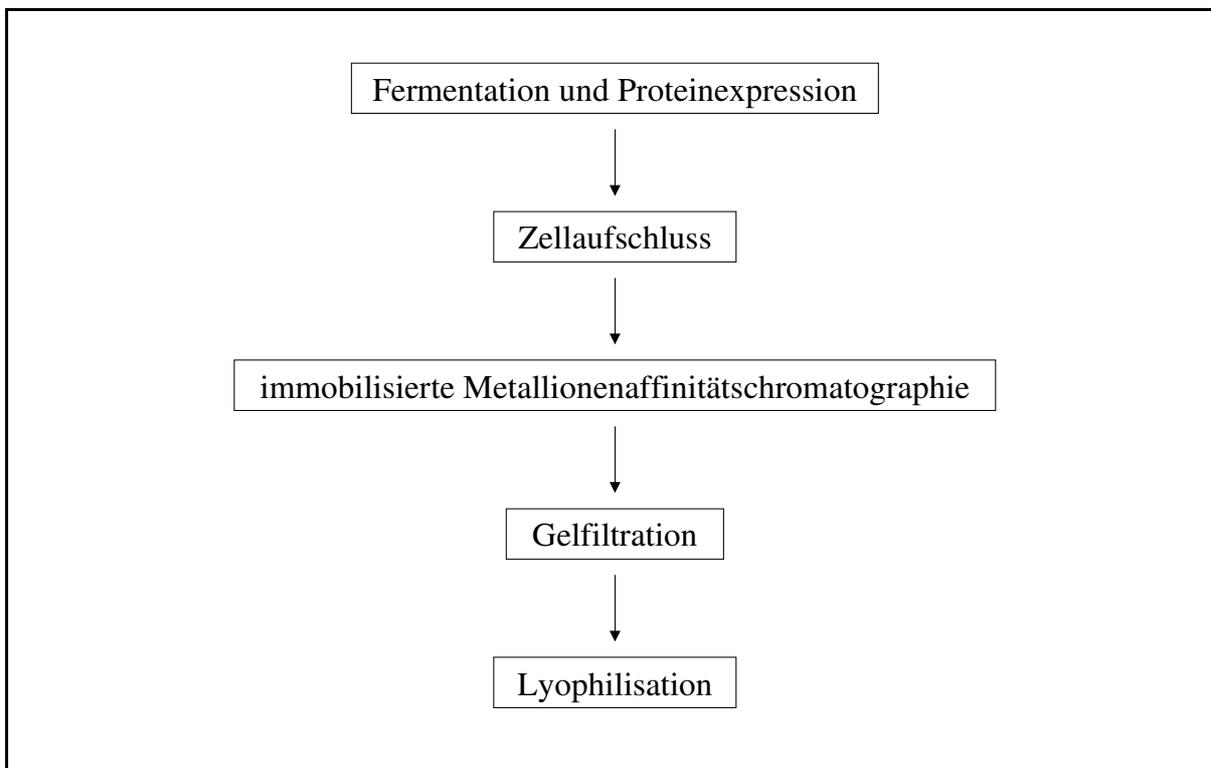


Abbildung 3-2: Schema der BFD-Aufreinigung.

3.2.1 Fermentation von *Escherichia coli* SG13009

Um die Gewinnung einer für die Arbeit ausreichenden Menge an BFD zu gewährleisten, wurde eine Fermentation des BFD-Expressionsplasmid tragenden *E. coli*-Stamms SG13009 im 200 L Maßstab (im 300 L Fermenter) durchgeführt. Dem überwiegend aus Hefeextrakt bestehenden Fermentationsmediums (siehe Material und Methoden) wurde Ampicilin und Neomycin zugesetzt. Somit wird die Vermehrung von *E. coli*-Stämmen verhindert, die das Expressionsplasmid und damit auch die entsprechenden Resistenzgene verloren haben. Zum

Animpfen des 300 L Fermenters wurde eine 20 L Vorkultur (im 30 L Fermenter) fermentiert, die ihrerseits ausgehend von einer 2 L Impfkultur begonnen wurde. Den Verlauf der Zelldichte, abgeleitet von der gemessenen optischen Dichte (Extinktion) bei 600 nm⁹ während der Fermentation im 30 L und anschließend im 300 L Fermenter, zeigt Abbildung 3.3. Nachdem die exponentielle Zellwachstumsphase im 300 L Fermenter bei 36 °C beendet war, wurde auf 25 °C abgekühlt und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG eingeleitet. Nach einer ca. 13-stündigen Expressionsphase wurde das Fermentationsmedium auf 5 °C abgekühlt und die Zellen vom Fermentationsmedium mit einer kontinuierlich betriebenen Zentrifuge abgetrennt. Es lagen insgesamt 700 g Biofeuchtmasse mit einer Decarboxylaseaktivität von 976,5 kU bzw. einer Ligaseaktivität von 31,5 kU vor.

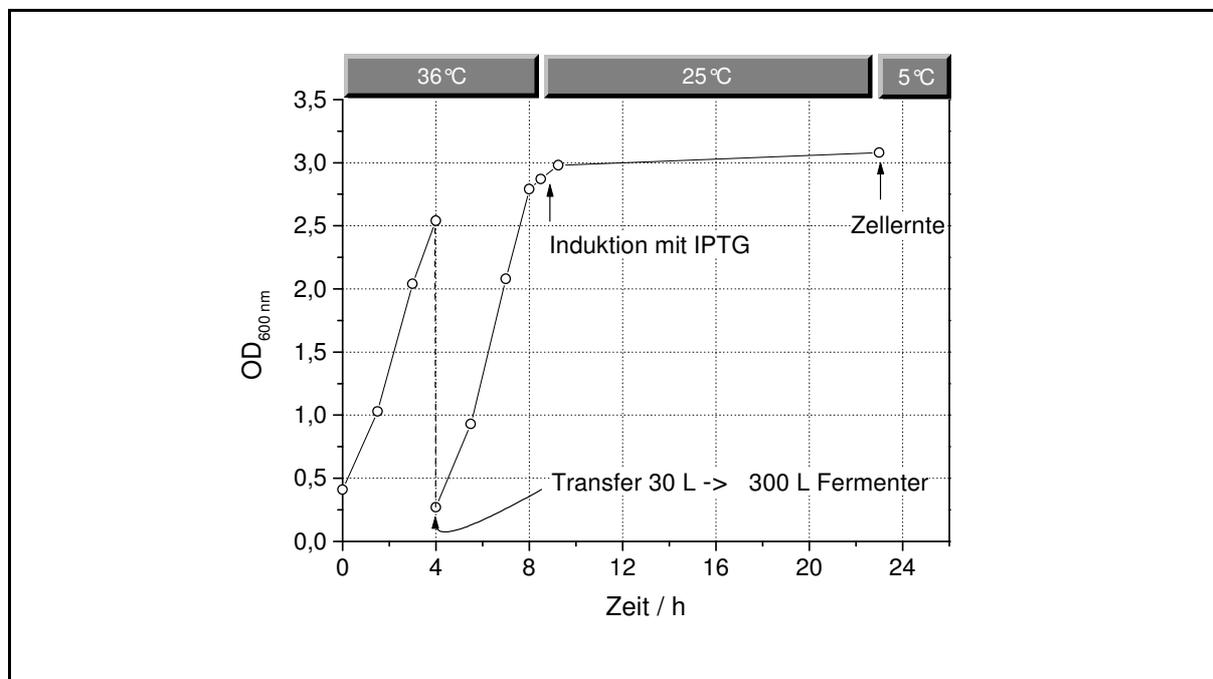


Abbildung 3-3: Verlauf der Fermentation von *E. coli* SG13009 für die BFD-Produktion.

3.2.2 Aufreinigung der Benzoylformiatdecarboxylase

Die BFD mit ihrem exponierten Hexahistidinrest wurde an eine Ni-NTA-Matrix selektiv gebunden. Nichtbindende Begleitproteine werden bei dieser Metallionenaffinitätschromatographie im Durchbruch eluiert (1. Bande in Abbildung 3-4). Die unspezifische Bindung einiger Proteine des Rohextrakts konnte durch eine anschließende Elution mit 20 mM Imidazol im Elutionspuffer aufgehoben werden (2. Bande

⁹ Die optische Dichte (OD) oder Trübung bei 600 nm ist bis zu einem Wert von 0,5 proportional der Biomasse. Bei Werten über 0,5 wurden die Proben verdünnt, um im linearen Bereich zu bleiben.

in Abbildung 3-4). Danach wurde die Elution der spezifisch gebundenen Proteine durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer auf 250 mM erreicht (3. Bande in Abbildung 3-4). In einem Entsalzungsschritt wurde das Imidazol durch eine Gelpermeationschromatographie entfernt, um eine Lagerung des Proteins als Lyophilisat zu ermöglichen. Die Gefriertrocknung dient der längeren Haltbarkeit der Enzympräparation. Alternativ zur Gelpermeationschromatographie konnte auch eine Umpufferung mittels Ultrafiltration durchgeführt werden. Die häufig auftretende Belegung der Ultrafiltrationsmembran und die damit zusammenhängende Druckerhöhung bzw. Flusserniedrigung führten zu unbefriedigenden Aktivitätsausbeuten, so dass diese Alternative in den durchgeführten Apparaturdimensionen (63,5 mm YM 10 Ultrafiltrations-Membran, 100 mL Amicon Zelle, 5 bar) der genannten Gelpermeationschromatographie nicht vorzuziehen war.

Tabelle 3-1: BFD-Aufreinigungsprotokoll.

Fraktion	spezifische Aktivität ¹⁰	Aufreinigungsfaktor ¹¹	Gesamtaktivität
Rohextrakt	0,27 U/mg	1	900 U
Ni-NTA-Eluat	4,74 U/mg	17	846 U
Gelfiltration	6,36 U/mg	23	750 U
Lyophilisat	7,00 U/mg	26	945 U

Die Reinheit der erhaltenen Proteinfractionen wurde per Gelelektrophorese überprüft. Das Chromatogramm in Abbildung 3-5 zeigt die Probe des Lyophilisats (links) und die Proteinmarker (rechts).

Im Rahmen der Arbeit wurde aus wiederholten Aufreinigungen eine Gesamt-Ligaseaktivität von 4725 U als Lyophilisat hergestellt.

¹⁰ Carboligase-Aktivität.

¹¹ Der Aufreinigungsfaktor ist definiert als das Verhältnis aus der spezifischen Aktivität der Fraktion und der spezifischen Aktivität des Rohextrakts.

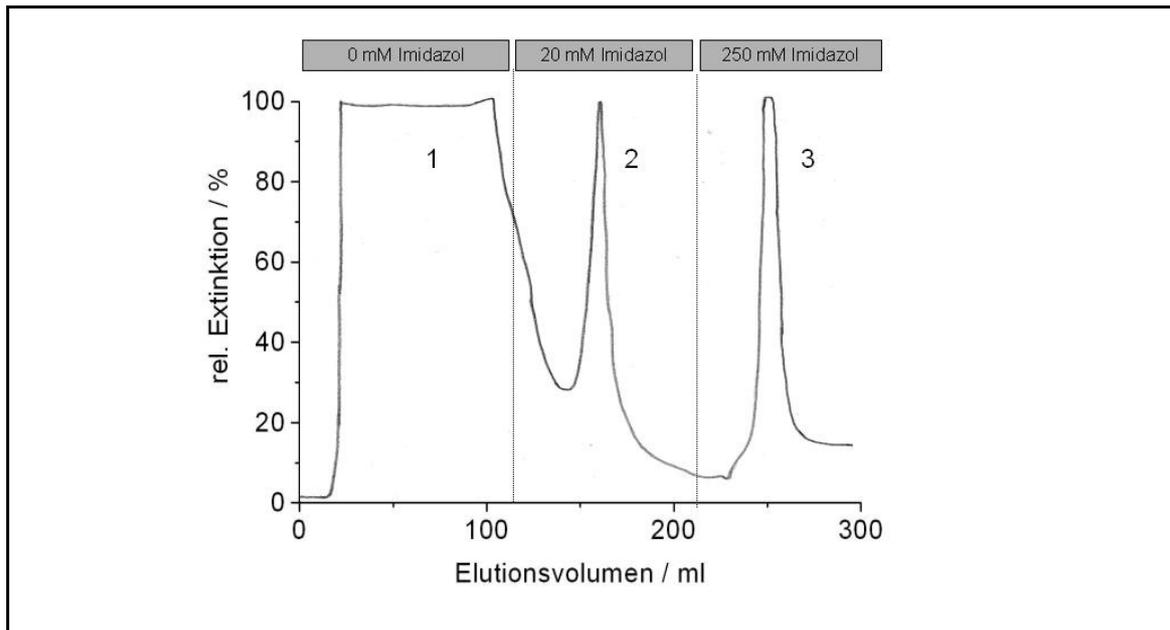


Abbildung 3-4: Chromatogramm einer immobilisierten Metallaffinitätschromatographie zur BFD-Aufreinigung.

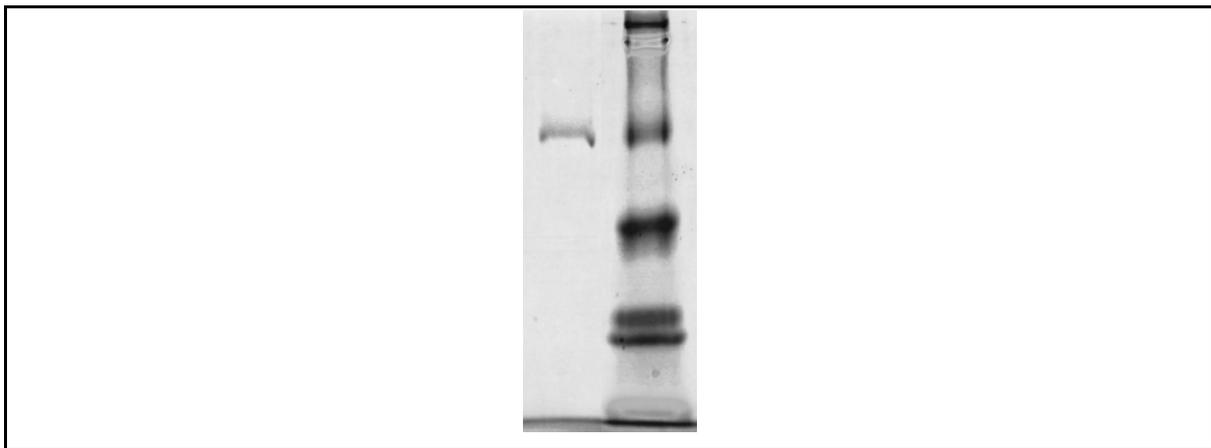


Abbildung 3-5: Proteingel der BFD (links) mit Kontrollspur (rechts)

3.3 Eigenschaften der Benzoylformiatdecarboxylase

Die Eigenschaften der BFD wurden bereits eingehend untersucht und veröffentlicht [Iding *et al.*, 2000; Greiner, 1999]. Nachfolgend sind die wichtigsten Eigenschaften nochmals zusammenfassend aufgeführt:

Tabelle 3-2: Eigenschaften der BFD.

Kinetische Parameter der BFD-Doppelsubstratkinetik		
Parameter	Wert	Standardabweichung
$K_{M;Acetaldehyd}$	310 mM	± 80 mM
$K_{M;Benzaldehyd}$ ¹²	77 mM	± 19 mM
v_{max} ¹²	48 U/mg	± 10 U/mg
Desaktivierungskonstanten u. Halbwertszeiten (Bedingungen: 50 mM KPi, pH 7, 0,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM ThDP)		
Parameter	k_{des}/d^{-1}	$t_{1/2}/d$
4 °C	$0,005 \pm 0,002$	$139,0 \pm 60$
20 °C	$0,019 \pm 0,005$	$36,0 \pm 7$
25 mM Benzaldehyd	$0,13 \pm 0,02$	$5,3 \pm 0,7$
100 mM Acetaldehyd	$0,38 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,1$
200 mM Acetaldehyd	$0,47 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,1$
weitere Eigenschaften		
Aktivierungsenergie	45 kJ mol^{-1}	2 kJ mol^{-1}
pH-Maximum	pH 8,5	
Temperaturmaximum	über 47 °C	

¹² Es handelt sich hier um mit Hilfe der Doppelsubstratkinetik extrapolierte Werte; die maximale Benzaldehydkonzentration in 50 mM KPi-Puffer und pH 7 liegt bei 50 mM.

3.3.1 Einflüsse auf die Enantioselektivität

Aus der Literatur sind eine Reihe von Parametern bekannt, die die Stereo- oder Regioselektivität von Enzymen beeinflussen. Vielfach werden diese gefundenen Parameter dahingehend geändert, um eine bessere Selektivität zu erreichen. Abgesehen von der Veränderung des Katalysators selbst [Reetz *et al.*, 2001a; Reetz *et al.*, 2001b; Reetz *et al.*, 2000] konnten Selektivitätsverbesserungen durch eine geeignete Wahl der Temperatur [Pham, *et al.*, 1990], des Lösungsmittels [Carrea *et al.*, 2000], des pH-Wertes [Lam *et al.*, 1986] oder des Substrates [Carrea *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 1986] erzielt werden. Die Enantioselektivität der BFD-katalysierten asymmetrischen C-C-Bindungsknüpfung wird durch drei verschiedene Parameter beeinflusst: die Temperatur, die Benzaldehydkonzentration und die elektronischen und sterischen Eigenschaften der aromatisch Substituenten des Donor-Aldehydes. Im Falle der C-C-Bindungsknüpfung zwischen Benzaldehyd und Acetaldehyd konnte gezeigt werden, dass die Enantioselektivität durch eine Temperaturerniedrigung erhöht werden kann. Überraschenderweise konnte außerdem beobachtet werden, dass sich die Enantioselektivität durch geringere Benzaldehydkonzentrationen erhöhen lässt.

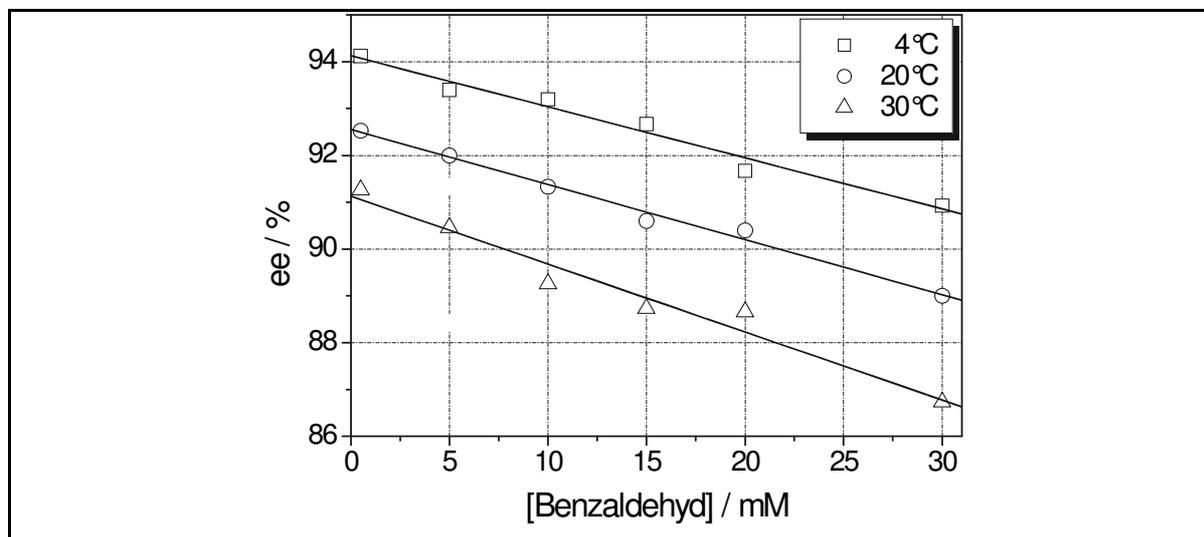


Abbildung 3-6: Enantioselektivität als Funktion der Benzaldehydkonzentration und der Temperatur.

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer; pH 7,0; 500 mM Acetaldehyd; Thermostatisierung bei 4, 20 und 30 °C.

Um die Gültigkeit der Temperaturabhängigkeit auch im kontinuierlich Betrieb nachzu prüfen, wurde der unter 3.5 beschriebene Reaktorlauf bei 4 °C durchgeführt.

3.3.1.1 Einfluss von Substituenten auf die Enantioselektivität

Es wird allgemein akzeptiert, dass die Enantioselektivität in katalytischen Reaktionen weitestgehend aufgrund sterischer Effekte beeinflusst wird. Nichtsdestoweniger gibt es inzwischen eine Reihe von Beispielen, in denen elektronische Effekte ausgehend von dem Substrat die Selektivität des Produktes beeinflussen [Mak *et al.*, 1996; Moussou *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2001; Kunieda *et al.*, 1992; Ueji *et al.*, 1999].

Auffallend am Substratspektrum der BFD ist die Variationsbreite im Enantiomerenüberschuss der BFD-katalysierten C-C-Knüpfung zwischen einem aromatischen Donoraldehyd und einem aliphatischen Akzeptoraldehyd. So weisen die BFD-katalysierten α -Hydroxyketone in Abhängigkeit vom Substituenten einen ee zwischen 74 % und 92 % auf (Tabelle 3-3). Hier galt es zu klären, ob ein Zusammenhang existiert, der den Einfluss der aromatischen Substituenten auf den ee beschreibt. Es lag nahe zu prüfen, ob eine *Hammett*-analoge Korrelation zwischen den elektronischen Eigenschaften eines Substituenten und dem Enantiomeren-Verhältnis des gebildeten α -Hydroxyketons vorliegt. *Hammett* hat 1935 gezeigt, dass eine Beziehung zwischen der Säurestärke (Dissoziationskonstante) von substituierten Benzoesäuren¹³ und den Raten der alkalischen Hydrolyse von entsprechend substituierten Benzoesäureestern besteht [Hammett, 1935; Hammett, 1937]:

$$\text{Log } k = \rho \cdot \log K + b \qquad \text{Gleichung 3-1}$$

mit ρ = Reaktionskonstante

Für die Benzoesäure selbst erhält man:

$$\log k_0 = \rho \log K_0 + b \qquad \text{Gleichung 3-2}$$

¹³*Hammett* hat die Dissoziationskonstante der substituierten Benzoesäuren bei 25 °C als Standardreaktion definiert.

Die Subtraktion der beiden Gleichungen ergibt:

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho \cdot \log \frac{K}{K_0}; \text{ mit } \log \frac{K}{K_0} = \sigma \quad \text{Gleichung 3-3}$$

So erhält man die **Hammett-Gleichung**

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho \cdot \sigma \quad \text{Gleichung 3-4}$$

mit σ = Substituentenkonstante.

Tabelle 3-3: Variation des Enantiomerenüberschusses in Abhängigkeit des Substituenten.

Substituent	ee_{para}	ee_{meta}
Br	87	96
Cl	86	86
CN	74	92
Et	91	-
F	90	87
H	92	92
Me	91	97
OAc	-	99
OCHF ₂	91	-
OEt	-	97
OH	92	92
O <i>i</i> Pr	-	99
OMe	92	96
OPh	-	99

Abbildung 3-7 zeigt die Korrelation zwischen der Verseifungsgeschwindigkeit substituierter Benzoessäureethylester und der Dissoziationsgeschwindigkeit entsprechend substituierter Benzoessäuren¹⁴. Seit den Beobachtungen von *Hammett* wurden weitere Korrelationssysteme gefunden, in denen z. B. die Substituentenkonstante σ mit chemischen Gleichgewichten [Ashton *et al.*, 1998], spektroskopischen, physikalischen und pharmakologischen [Kubinyi *et al.*, 1993] Eigenschaften sowie mit der Regio- [Reetz *et al.*, 1997] und Enantioselektivität [Yang *et al.*, 1998; Palucki *et al.*, 1998] entsprechend substituierter Verbindungen korreliert.

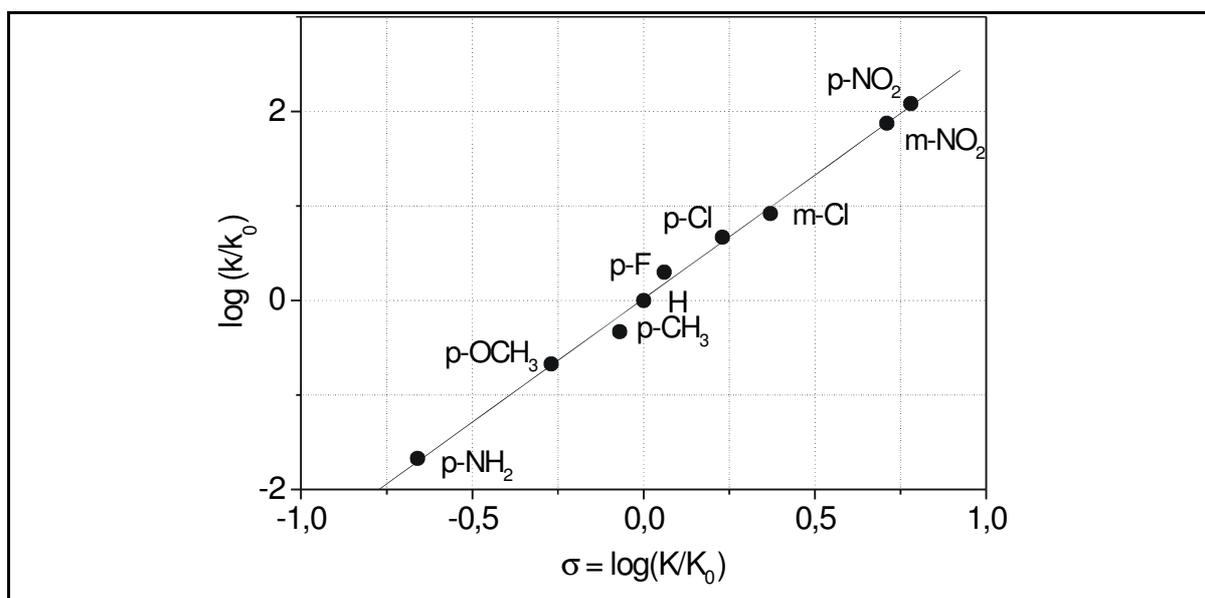
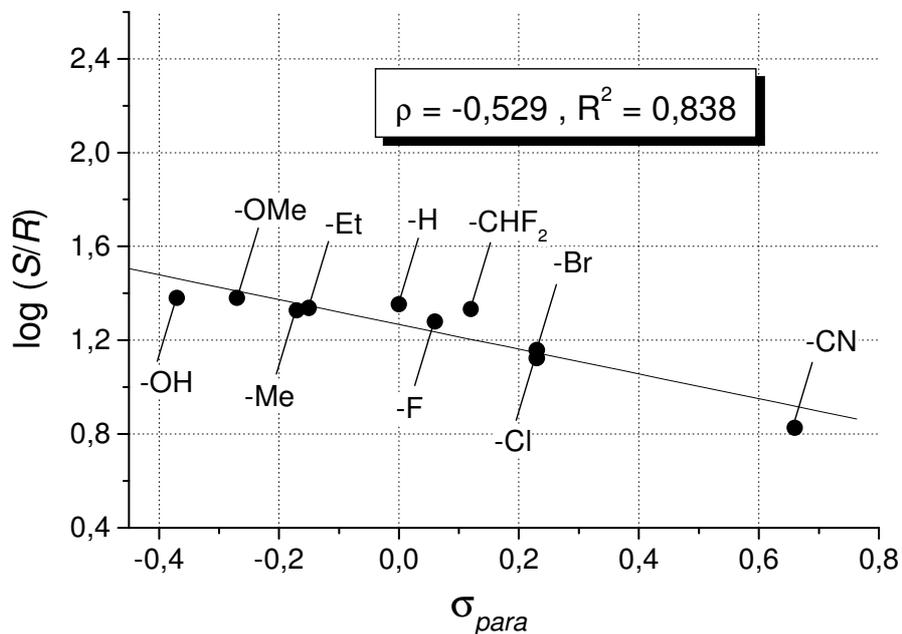


Abbildung 3-7: *Hammett*-Korrelation zwischen der Verseifungsgeschwindigkeit substituierter Benzoessäureethylester und der Dissoziationskonstante entsprechend substituierter Benzoessäuren.

Im vorliegenden Fall der BFD-katalysierten enantioselektiven C-C-Knüpfung unter Verwendung *para*-substituierter Benzaldehyden, kann der Logarithmus der Enantiomerenverhältnisse $\log(S/R)$ mit der σ -Konstante der Hammett Gleichung korreliert werden (Abbildung 3-8 a)).

¹⁴ Neben der häufig wie hier verwendeten standardisierten Auftragung nach Gleichung 3-3 sind auch Auftragung nach Gleichung 3-4 vorzufinden.

a)



b)

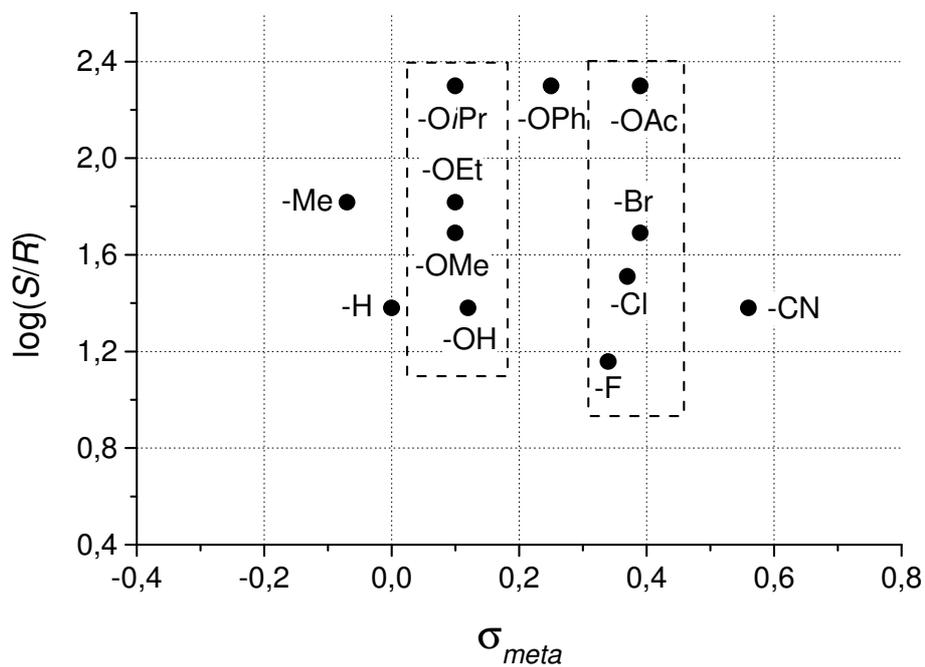


Abbildung 3-8: Auftragung von $\log(S/R)$ gegen σ von a) *para*- und b) *meta*-substituierter α -Hydroxyketonen.

Der Ausdruck $\log(S/R)$ ist proportional zu $-\Delta\Delta G^\ddagger$ entsprechend der folgenden Gleichungen:

$$\log \frac{R}{S} = \frac{-\Delta\Delta G^\ddagger}{2,3 \cdot RT} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

mit

$$-\Delta\Delta G^\ddagger = -(\Delta G^{\ddagger R} - \Delta G^{\ddagger S}) \quad \text{Gleichung 3-6}$$

und

$$-\Delta G^\ddagger = k \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

Gleichung 3-5 bis Gleichung 3-7 verdeutlichen, dass das Verhältnis der erzeugten Enantiomere von der Differenz der Reaktionsraten für das *S*- und *R*-Enantiomer bestimmt wird. Die Differenz der Reaktionsraten kann wiederum von den elektronischen Eigenschaften der Substituenten abhängen. Für *meta*-substituierte Verbindungen ist zunächst keine lineare Korrelation zu erkennen (Abbildung 3-8 b)). Werden jedoch die hervorgehobenen Datenpunkte der Substituenten in Abbildung 3-8 b) betrachtet (gestrichelte Kästen), so fällt auf, dass der ee nicht von den elektronischen Eigenschaft des Substituenten abhängen, sondern von deren Größe:

- Kasten 1: $\sigma_{meta} \sim 0,36$: F < Cl < Br
- Kasten 2: $\sigma_{meta} \sim 0,10$: OH < OMe < OEt < OiPr

Für den *meta*-Fall bestimmen demnach sterische Faktoren den ee. In einem Versuch den beobachteten Trend für *meta*-Substituenten mit Substituentenparametern [Hansch *et al.*, 1979; Kubinyi, 1993; Exner, 1978] zu korrelieren, die den sterischen Anspruch eines Substituenten widerspiegeln, wurde die molare Refraktivität (MR) herangezogen, die durch Gleichung 3-8 definiert ist:

$$MR = \frac{MW}{\rho} \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 - 2} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

mit MR = Molgewicht, n = Brechungsindex und ρ = Dichte

Der Teilausdruck MW/ρ stellt das molare Volumen dar, welches mit der Größe des Substituenten korreliert. Der Brechungsindex beinhaltende Ausdruck $(n^2-1)/(n^2-2)$ stellt

einen Korrekturfaktor dar, der den Einfluss der Polarisierbarkeit des Substituenten berücksichtigt. Da sich die Brechungsindices (n) der meisten organischen Verbindungen nur geringfügig voneinander unterscheiden (zwischen $n = 1,3 - 1,7$ [Lide, 2003; D'Ans *et al.*, 1996]), korreliert der Ausdruck MR in den meisten Fällen sehr gut mit dem molaren Volumen MW/ρ . In Abbildung 3-9a) sind alle $\log(S/R)_{meta}$ -Werte gegen MR aufgetragen. Obwohl die Korrelation aller einbezogenen Datenwerte nur bedingt zufrieden stellend ist (geringer R^2 -Wert der Geradengleichung), ist dennoch die Tendenz zu erkennen. Für Substituenten mit gleichen elektronischen Eigenschaften (annähernd gleicher σ -Wert) ist die Korrelation wesentlich besser (Abbildung 3-9 b) und c)).

Diskussion der Beobachtungen: Beruhend auf der Kristallstruktur der BFD [Hasson *et al.*, 1998] und unter Verwendung computerunterstützender Visualisierungshilfen, wurde ein Model für die zwei möglichen Orientierungen des Enamin-Carbanion-Intermediates **6** (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-10) am aktiven Zentrum der BFD entwickelt. Die zwei möglichen Orientierungen von **6** am aktiven Zentrum korrespondieren mit den zwei Konformationen **A** und **B** in Abbildung 3-10, bei denen man davon ausgeht, dass sie sich in einem kinetisch kontrollierten Gleichgewicht miteinander befinden. In **A** ist der Phenylring von Benzaldehyd zwischen den beiden Phenylringen Phe464 und Phe397 positioniert, die senkrecht zueinander stehen, was zu einer so genannten stabilisierenden *edge-to-face*-Anordnung führt [Burley *et al.*, 1985; Carver *et al.*, 2002; Matsuhima *et al.*, 2000]. Im Gegensatz dazu fehlt bei **B** diese *edge-to-face*- Wechselwirkung aufgrund der nicht senkrechten Anordnung des Phenylrings von Benzaldehyd, das am C2-Atom des Thiazolrings gebunden ist. Weiterhin gelangt der Phenylring in **B** in unmittelbare Umgebung von His70, das eine höhere Abstoßungskraft zur Folge hat. Aus diesem Grund wird **A** vor **B** bevorzugt. Ausgehend von diesen beiden Konformationen und unter der Annahme, dass der katalytische Prozess nur in der Enzymtasche stattfindet, die von den Resten Ala460, Phe464, His70, dem Protein-Rückrad und dem gebundenen ThDP begrenzt wird, sind nur vier mögliche Übergangszustände während der Carboligation vorstellbar: *Re*-Angriff oder *Si*-Angriff auf den Akzeptor 3 in Abbildung 3-10. Die bevorzugte Anordnung **A_{Re}** führt zu (2*S*)-HPP, wohingegen die nicht bevorzugten Anordnungen **A_{Si}** und **B_{Si}** zu dem im Überschuss gebildeten Enantiomeren (2*R*)-HPP führt. Ohne näher ins Detail zu gehen, konnten mit diesem Model sämtliche beobachteten Eigenschaften der BFD erklärt werden [Iding *et al.*, 2000], die nachfolgend zusammengefasst sind:

- i) überwiegende Katalyse von 2-Hydroxyketonen mit *S*-Konfiguration
- ii) nur sehr geringe Katalyse von Benzoin in *R*-Konfiguration
- iii) bevorzugte Katalyse von aromatischen Aldehyden als Donor Aldehyde
- iv) Beobachtung einer Konzentrationsabhängigkeit des Enantiomerenüberschusses

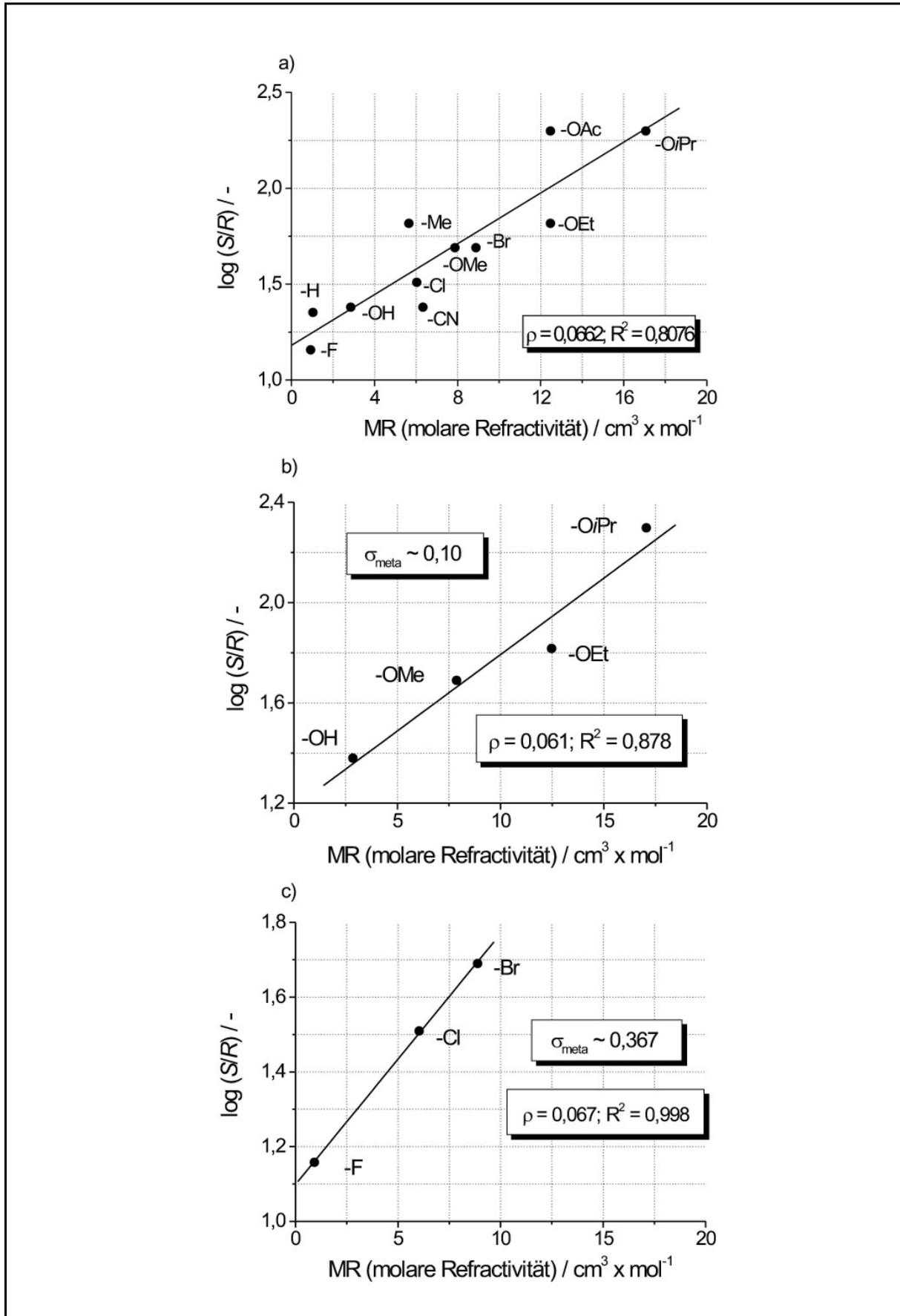


Abbildung 3-9: Korrelation von $\log(S/R)$ mit der molaren Refraktivität (MR).

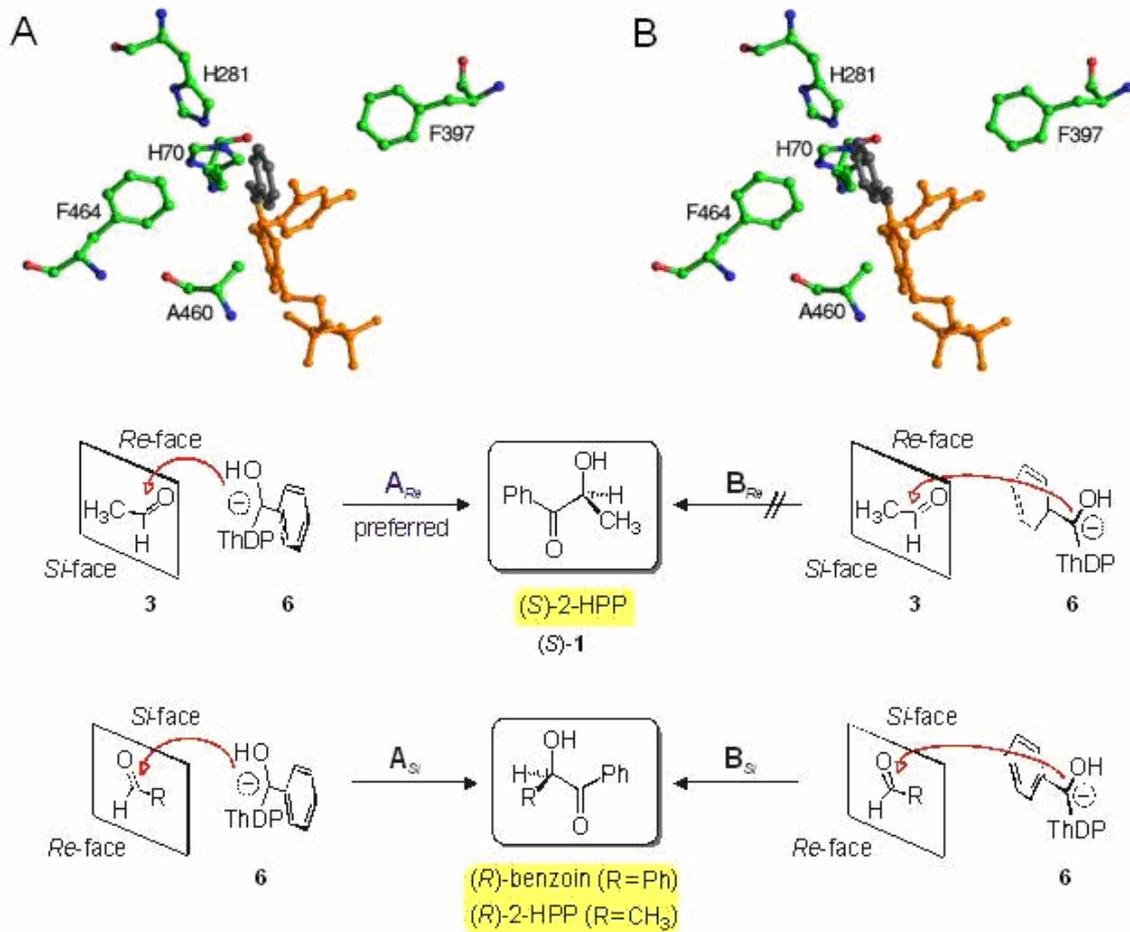


Abbildung 3-10: Die zwei möglichen Orientierungen des Donor Substrat-ThDP-Komplexes **6** im aktiven Zentrum der BFD. modellierter Komplex beruhend auf der Kristallstruktur (oben) und schematische Darstellung des *Re*- und *Si*-Angriffs auf den Akzeptor **3**.

Aus dem bisher beschriebenen Modell lässt sich auch ergänzend eine Erklärung für die Abhängigkeit des ee von der Art des Substituenten ableiten. Eine Zunahme des beobachteten ee für *para*-Substituenten mit immer kleiner werdenden σ -Werten ist mit einer entsprechenden Zunahme des +I-Effektes der Substituenten verbunden, was zu einer immer mehr zunehmenden Elektronendichte am Carbanion **6** führt. Eine erhöhte Elektronendichte am Phenylring von **6** würde zu einer stärkeren *edge-to-face*-Wechselwirkung im Zustand A führen, die maßgebend für einen A_{Re} -Angriff ist (Bildung des *S*-Enantiomeren). Weiterhin würde eine höhere Elektronendichte die Nucleophilie von **6** im Übergangszustand erhöhen, wodurch der nucleophile Angriff von A_{Re} bevorzugt würde. Gleichzeitig wäre die abstoßende Energie eines A_{Si} -Angriffs höher und damit weniger wahrscheinlich. Die beobachtete Korrelation ist nur für *para*-Substituenten befriedigend im Gegensatz zu einem scheinbar wahllosen Einfluss der *meta*-Substituenten auf den Enantiomerenüberschuss

(Abbildung 3-8 b)). Der Grund für diese schlechte Korrelation im Falle der *meta*-Substituenten lässt sich auf die Nähe der Substituenten zur katalytischen Tasche zurückführen, d.h der Einfluss der sterischen Abschirmung des katalytisch aktiven Zentrums durch die Substituenten überwiegt gegenüber den elektronischen Eigenschaften der Substituenten. Es erscheint plausibel, dass die *meta*-Substituenten aufgrund ihrer abschirmenden Wirkung nur einen Angriff von Acetaldehyd in der Anordnung A_{Re} erlauben. Je größer die Substituenten in *meta*-Position werden, desto größer wird ihre abschirmende Wirkung, was einen höheren ee zur Folge hat. In Analogie zur Korrelation der σ -Konstanten mit $\log(S/R)$ -Werten wäre eine Korrelation der σ -Konstanten mit den Termen v_{max}/K_M der jeweiligen BFD-katalysierten Reaktionen zu erwarten. Beispielhaft seien die Arbeiten von *Moussou* zur enzymatischen Epoxidhydrolyse mit substituierten Epoxiden genannt [Moussou *et al.*, 1998]. Die geringe Löslichkeit sämtlicher aromatischer Benzaldehyde in wässrigem Medium (zwischen 2-60 mM) verhindert jedoch eine zuverlässige Bestimmung der kinetischen Parameter v_{max} und K_M der BFD-katalysierten Carboligation. Nichtsdestoweniger kann gezeigt werden, dass man anhand der Hammett Konstanten für den „*para*-Fall“ und anhand der MR-Konstanten für den „*meta*-Fall“ eine Vorhersage darüber treffen kann, welche Substituenten zu einem höheren oder niedrigeren ee bei der BFD-katalysierten C-C-Bindungsknüpfung führen würden. Diese Vorhersage könnte noch zuverlässiger getroffen werden, wenn substituierte Benzaldehyde als Substrate, die den Bereich der niedrigeren und sehr viel höheren σ -Werte abdeckten. Nitro- und aminosubstituierte Benzaldehyde kämen hier in Frage, mit denen jedoch keine Umsätze erzielt worden sind.

3.4 Bereitstellung von (2S)- und (2R)-Hydroxy-1-phenylpropanon

Im Laufe der Arbeit konnten mehrere Satzreaktoransätze mit isolierter BFD als auch mit dem zellfreien Rohextrakt durchgeführt werden. Abbildung 3-11 zeigt das Ergebnis eines 5 L Satzreaktoransatzes über 24 h (Ausbeute: 13 g (2S)-HPP, ee > 99 % nach Umkristallisation). Somit konnten ausreichende Mengen des S-konfigurierten Zwischenproduktes bereitgestellt werden. Die benötigten Mengen an R-HPP wurden von Herrn Stillger [Stillger, 2004] und Frau Kolter [Demir *et al.*, 2002; Demir *et al.*, 2001] zur Verfügung gestellt.

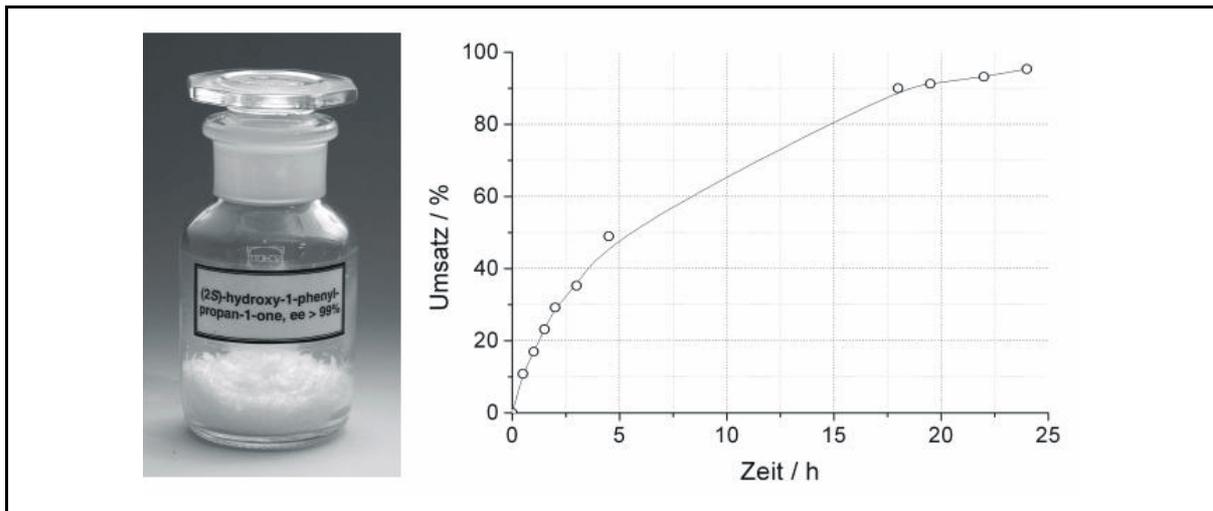


Abbildung 3-11: 5 L Batch zur (2S)-HPP-Darstellung.

Bedingungen: 50 mM KPi-Puffer pH 8, RT, 60 mL BFD Rohextrakt (15 g Zellen / 150 mL Puffer), 150 mM Acetaldehyd, 40 mM Benzaldehyd.

3.5 Kontinuierliche (2S)-Hydroxy-1-phenylpropanon Synthese

Aus kontinuierlichen (2S)-HPP-Reaktorläufen [Greiner, 1999] bei 20 °C ist bekannt, dass ein ee von 92 % erzielt werden kann - in Übereinstimmung mit Abbildung 3-6. Um die Gültigkeit dieser Feststellung auch für niedrigere Temperaturen im kontinuierlichen Betrieb zu demonstrieren, wurde ein Reaktor über einen Zeitraum von 3 Tagen bei 4 °C betrieben. Der ee konnte somit auf durchschnittlich 96 % erhöht und der Umsatz durch Enzymzugabe bei 90 % gehalten werden. Unabhängig davon wie sich der Umsatz (zwischen 70 und 90 %) im Laufe des Versuchs verhält, bleibt der ee auf hohem Niveau.

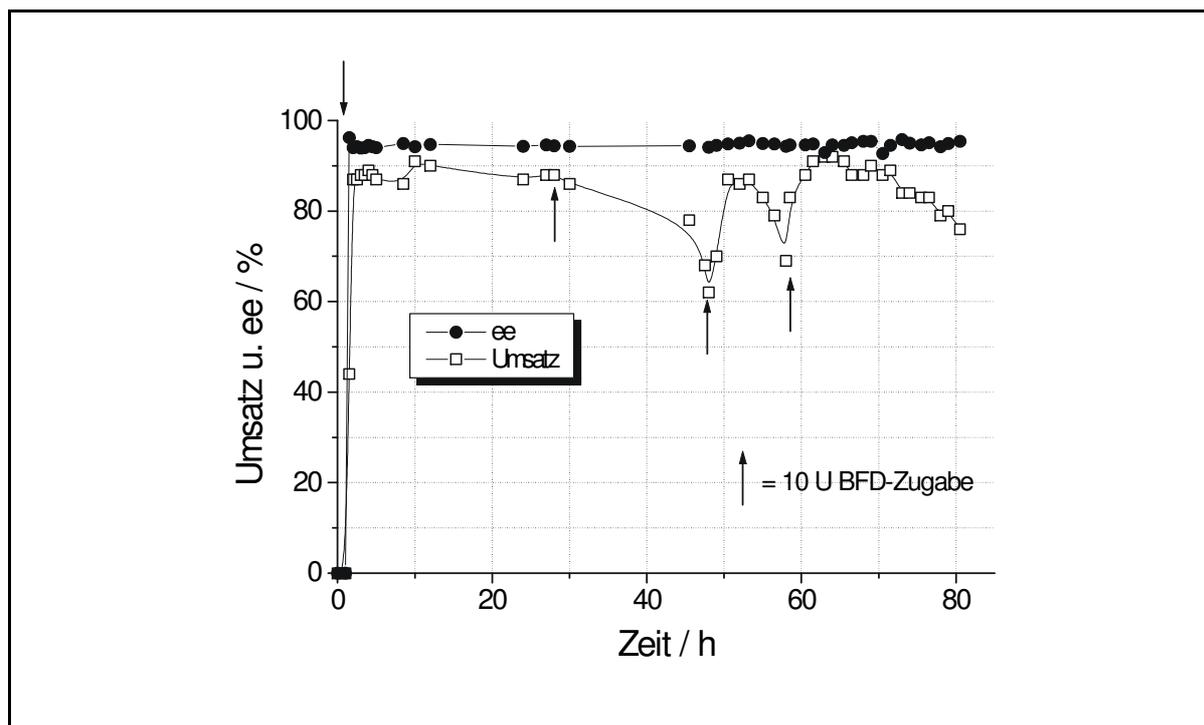


Abbildung 3-12: BFD-Membranreaktor betrieben bei 4 °C.

Bedingungen: 10 mM Benzaldehyd, 100 mM Acetaldehyde, 2 mM MgCl₂, 2 mM ThDP, 50 mM KPi-Puffer, pH 7, 5 °C, τ = 1 h, Fluss = 10 mL/h.

3.6 Stabilität des (2S)-Hydroxy-1-phenylpropanon

Um herauszufinden, in welchen pH-Bereichen die Synthese, Aufarbeitung und Lagerung des (2S)-HPP ohne Verlust durch Zerfall oder Racemisierung stattfinden kann, wurden Lösungen der Verbindung unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen ausgesetzt. Die Inkubationsversuche bei 20 °C und 30 °C über einen Zeitraum von 24 h haben gezeigt, dass die Zielverbindung ab einem pH-Wert von 11 beginnt zu racemisieren und tautomerisieren. So stellt sich bei pH 12 nach 12 h ein Rest ee-Wert von 90 % ein und eine vollständige Tautomerisierung zum Phenylacetylcarbinol (PAC) ist ab pH 14 zu beobachten. Das Tautomerisierungsprodukt konnte extrahiert werden und NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Eine Reaktionsführung im pH-Bereich um 8 hat den Vorteil, dass die BFD für die C-C-Knüpfung ihr Aktivitätsmaximum erreicht und gleichzeitig mehr Substrat (Benzaldehyd) bei höheren pH-Werten in Lösung gebracht werden kann. Weitere Einzelmessungen zur Stabilität haben gezeigt, dass (2S)-HPP bis pH 1 unverändert bleibt. Somit können Reaktionsansätze zwecks Kinetikbestimmung ohne Bedenken mit einer 16 %igen Perchlorsäurelösung angehalten werden.

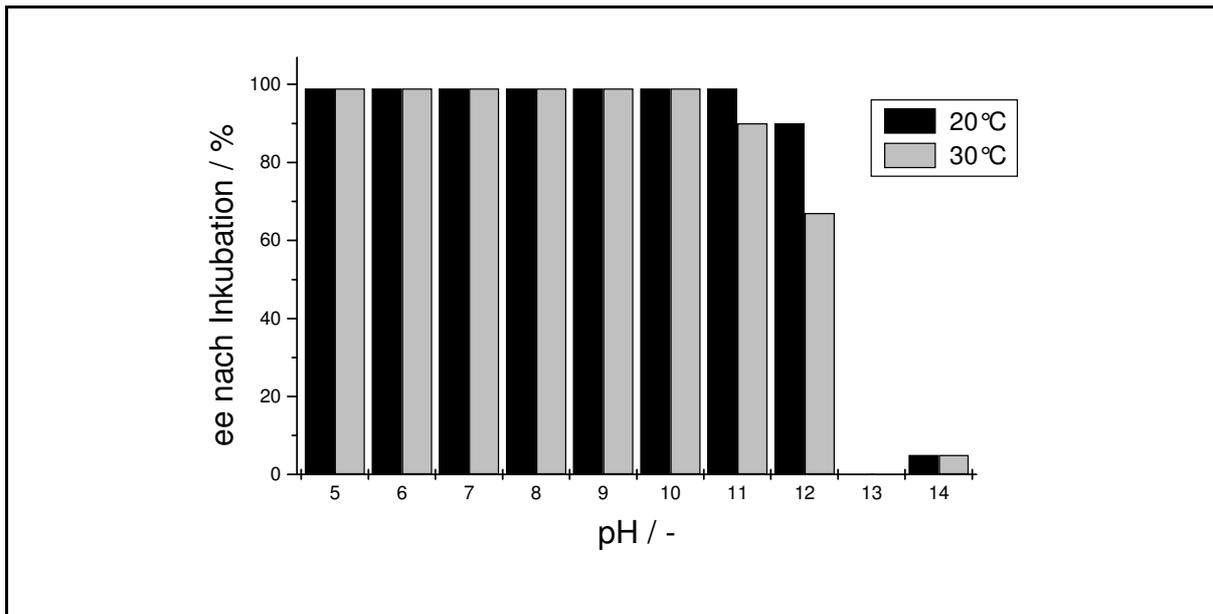


Abbildung 3-13: pH-Stabilität des (2S)-HPP.

3.7 Kapitelzusammenfassung

- Aus einer 200 L-Fermentation des *E. coli* Stamms SG13009 konnten insgesamt 700 g Biofeuchtmasse gewonnen werden. Bezogen auf den Rohextrakt standen insgesamt 31,5 kU BFD (Ligaseaktivität) zur Verfügung.
- Im Rahmen der Arbeit wurde aus wiederholten Enzymaufreinigungen eine Gesamtaktivität von 4725 U BFD-Ligaseaktivität als Lyophilisat hergestellt.
- Bei der Enzymaufreinigung wurden Aufreinigungsfaktoren von bis zu 26 und spezifische Enzymaktivitäten von 7 U/mg erzielt.
- Mehr als 13 g (2S)-HPP mit einem ee > 99 % nach Umkristallisation wurden für nachfolgende reaktionstechnische Untersuchungen synthetisiert.
- Der ee der BFD-katalysierten (2S)-HPP-Synthese ist temperaturabhängig. So lässt sich der ee durch Temperaturniedrigung von 92 % auf 96 % erhöhen. Diese Beobachtung trifft sowohl für die Synthese im Batchbetrieb als auch für den kontinuierlichen Betrieb im EMR zu.
- Der Einfluss von Substituenten auf die BFD-katalysierte C-C-Bindungsknüpfung wurde näher untersucht. In Abhängigkeit vom Substitutionsmuster lassen sich Tendenzen bezüglich der Enantiomerenüberschüsse der gebildeten α -Hydroxyketone aufzeigen.

4 Hydroxyketon-Reduktion

4.1 Darstellung der Referenzsubstanzen

Zum Zwecke der Zuordnung sowie der Entwicklung einer Analytik für die Zielverbindungen wurden Referenzsubstanzen synthetisiert. Für die Darstellung des Gemisches aller Stereoisomeren bot sich die Reduktion des kommerziell erhältlichen 1-Phenylpropandion mit LiAlH_4 an. Hier zeigte sich, dass die 4 Stereoisomere des 1-Phenylpropandiol im Verhältnis 1:1:2:2 gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hier um die entsprechenden Isomere (1*S*, 2*S*), (1*R*, 2*R*), (1*R*, 2*S*) und (1*S*, 2*R*) handelt. Die bevorzugte Bildung der Stereoisomere (1*R*, 2*S*) und (1*S*, 2*R*) ist dem Anschein nach auf das Felkin-Ahn-Modell¹⁵ zurückzuführen: Felkin postulierte, dass die Torsionsspannung (Pitzer-Spannung), die von teilweise ausgebildeten Bindungen ausgeht, einen großen Anteil der Spannung zwischen den vollständig ausgebildeten Bindungen darstellt, selbst wenn der Bindungsgrad im Übergangszustand recht niedrig ist. Diese Hypothese führte zur Annahme eines bevorzugten Übergangszustandes, dessen Konformation sich dadurch auszeichnet, dass sich der sterisch anspruchvollste der α -Liganden (L) orthogonal zur Ebene der Carbonylgruppe und anti zum sich annähernden Nucleophil orientiert. Der sterisch nächst anspruchsvollere Substituent wird dadurch gauche zur Carbonylgruppe orientiert (Abbildung 4-1).

¹⁵ Zur Beschreibung der kinetisch kontrollierten Addition eines Nucleophils an die Carbonylgruppe von chiralen Aldehyden oder Ketonen, die ein der Carbonylgruppe benachbartes stereogenes Zentrum tragen, wurden mehrere Modelle [Cram *et al.*, 1952; Eliel, 1983] entwickelt. Das Felkin-Modell [Cherest *et al.*, 1968] verbessert durch Ahn und Einstein [Ahn *et al.*, 1977] scheint die zufriedenstellendste Übereinstimmung mit der theoretischen Überlegung zu ergeben und ist heute überwiegend anerkannt [Mander, 1998].

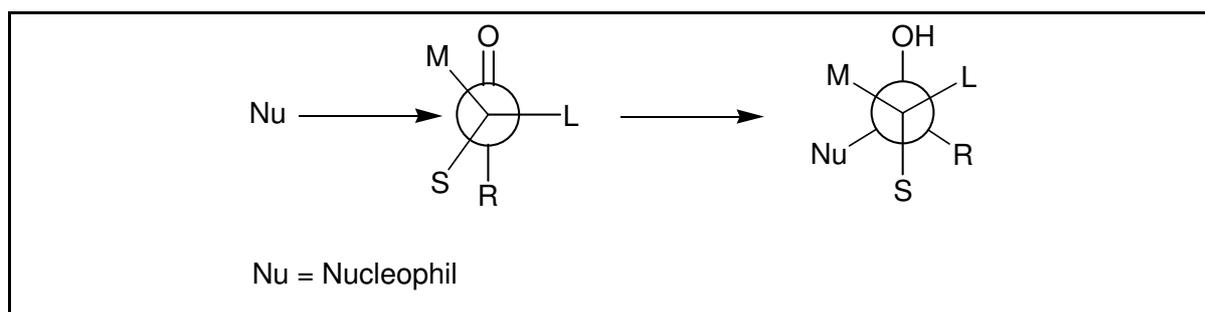


Abbildung 4-1: Felkin-Ahn-Modell zur nukleophilen Addition.

Felkin-Ahn-Modell der Addition eines Nucleophils an die Carbonylgruppe in acyclischen Verbindungen ($L > M > S$ in der Reihenfolge der sterischen Raumerfüllung).

Übertragen auf die Reduktion von Phenylpropandion mit LiAlH_4 , muss zunächst davon ausgegangen werden, dass die beiden Ketofunktionen nacheinander reduziert werden. Nur so ist es überhaupt möglich, dass es zu einer dirigierenden Wirkung kommt, bei der die Konfiguration des zuerst erzeugten stereogenen Zentrums, die Konfiguration des übrig gebliebenen prochiralen Zentrums beeinflussen kann (Fall 1 und 2 in Abbildung 4-2). Abbildung 4-2 zeigt, wie es zu der bevorzugten Bildung der Isomere $(1R,2S)$ und $(1S,2R)$ kommen kann und zwar gleichgültig, in welcher Reihenfolge die Ketofunktionen reduziert werden und welche Konfiguration das erste stereogene Zentrum besitzt. An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass die dargestellten Konformationen in den Übergangszuständen (Angriff des nucleophilen Hydrid-Wasserstoffs) zusätzlich durch die Ausbildung eines Chelats zwischen Carbonylfunktion, Aluminiumkation und Hydroxyfunktion stabilisiert werden.

Eine weitere Zugangsmöglichkeit zu den Zielverbindungen kann durch die säurekatalysierte Ringöffnungsreaktion des entsprechenden Phenylpropenoxids bewerkstelligt werden. Auch hier bot sich der Einsatz des kommerziell erhältlichen und isomerenrein vorliegenden $(1S,2S)$ - und $(1R,2R)$ -Phenylpropenoxids an (Abbildung 4-3).

Jeweils eines der beiden Epoxide liefert nur zwei Stereoisomere des Phenylpropandiols im Verhältnis 3:1, wobei sich die zwei Produktisomere des einen Epoxids von den beiden Produktisomeren des anderen Epoxids unterscheiden. Durch einen Vergleich mit Literaturdaten [Zioudrou *et al.*, 1977; Foltz *et al.*, 1957] konnte ermittelt werden, dass das $(1R,2R)$ -Phenylpropenoxid die Isomere $(1S,2R)$ - und $(1R,2R)$ -Diol liefert, und das $(1S,2S)$ -

Phenylpropenoxid die Isomeren (1*R*,2*S*)- und (1*S*,2*S*)-Diol entstehen lässt. Bei der säurekatalysierten Epoxidhydrolyse lagert sich zunächst ein Proton an den Epoxidsauerstoff an, was zu einer Erhöhung der Polarität der C-O-Bindungen bis hin zur Bindungsspaltung führt.

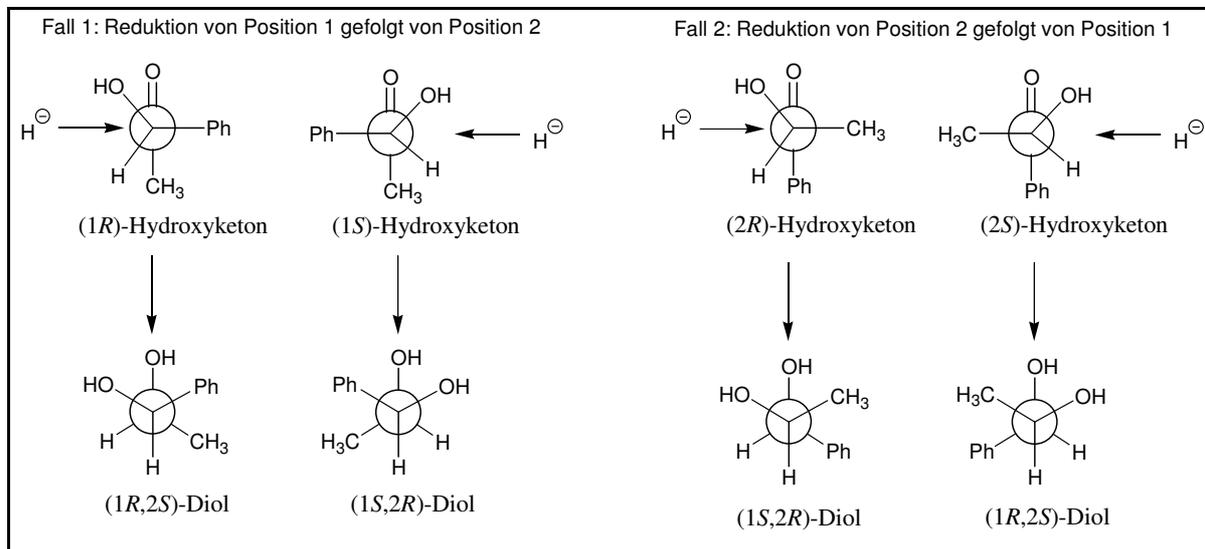


Abbildung 4-2: Erklärung für das Zustandekommen eines Überschusses an den Stereoisomeren (1*R*,2*S*)- und (1*S*,2*R*)-Diol anhand des Felkin-Ahn-Modells.

Analog zur *Markownikov*-Regel [Markownikov, 1870] bei der zweistufig verlaufenden elektrophilen Addition an Alkenen sollte sich bei einer C-O-Bindungsspaltung nach Protonanlagerung das stabilere Carbokation ausbilden. Im vorliegenden Fall wäre das Carbokation am benzyliischen C-Atom (Position 1) sehr viel stabiler als in Position 2. Nun folgt ein nucleophiler Angriff von Wasser von der am wenigsten gehinderten Seite. Die Tatsache, dass nur jeweils zwei Produkte gebildet werden, deutet darauf hin, dass das Carbokation ausschließlich in der Position 2 gebildet wird und nur dort von Wasser nucleophil angegriffen wird (Abbildung 4-3). Offensichtlich befolgt die vorliegende Reaktion das Modell für den bevorzugten Mechanismus ohne Ausnahme.

4.2 Enzym Screening

Für das Screening geeigneter Oxidoreduktasen zur Reduktion der prochiralen Ketofunktion des (2*S*)- und (2*R*)-HPP standen eine Reihe Enzyme aus den Arbeitskreisen *Hummel* und *Kula* als auch kommerziell verfügbare Alkoholdehydrogenasen zur Auswahl. Das zusammengefasste Testergebnis ist der Tabelle 4-1 zu entnehmen. Die rekombinant verfügbare *Lactobacillus brevis*-ADH (*Lb*-ADH) [Hummel, 1997] reduziert sowohl das *S*-

als auch das *R*-Enantiomer des 2-HPP mit nahezu gleicher spezifischer Aktivität. Verglichen mit dem Standardsubstrat Acetophenon wird 2-HPP lediglich mit 5 bis 10 % der Standard-Aktivität reduziert. Die resultierende Hydroxyfunktion besitzt in beiden Fällen eine *S*-Konfiguration. Somit ist der Zugang zu (1*S*,2*S*)- und (1*S*,2*R*)-Diol jeweils ausgehend von (2*S*)- und (2*R*)-HPP möglich. Die kommerziell erhältliche thermophile *Thermoanaerobium species* ADH (*Th.sp.*-ADH auch bekannt als ADH-M oder s-ADH-300¹⁶) reduziert ebenfalls die Ketofunktion beider 2-HPP-Enantiomere. Gleichgültig von welchem 2-HPP-Enantiomeren ausgegangen wird, wird stets die Ketofunktion zur *R*-konfigurierten Hydroxyfunktion reduziert. Somit lässt sich das (1*R*,2*R*)-Diol und (1*R*,2*S*)-Diol jeweils ausgehend von 2*R* und 2*S*-HPP darstellen. Als Resultat erhält man ein Baukastensystem mit komplementären Enzymselektivitäten, die es erlauben, alle vier möglichen Stereoisomere des 1-Phenylpropan-1,2-diols zu synthetisieren [Kihumbu *et al.*, 2002] (Abbildung 4-4).

Die *Candida boidinii*-ADH (CBADH) erzeugt ebenfalls eine *R*-Konfiguration in der Position 1 jedoch mit unzureichender Aktivität. Von der geprüften TBADH [Lamed *et al.*, 1981; Keinan *et al.*, 1986] ist aus der Literatur bereits bekannt, dass Acetophenon, 1-Phenylpropanon und 1-Phenylbutanon keine Substrate für das Enzym darstellen, obwohl das übrige bekannte Substratspektrum des Enzyms vielversprechend erscheint [Keinan *et al.*, 1990]. Die ebenfalls zur Gruppe der sekundären ADH gehörenden Enzyme wie z. B. die READH [Zelinski *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 1993a] und CPCR [Peters *et al.*, 1993b] zeigten keine Aktivität. Eine Ausnahme bildeten neu entwickelte ADHs von der Firma Biocatalytics (E1 und E7), die eine akzeptable Aktivität zeigten. Aufgrund der kostengünstigen Verfügbarkeit der *Lb*-ADH lag es nahe, dieselbe für die Entwicklung eines Reaktorkonzeptes einzusetzen.

Ein ähnlicher Ansatz zur Dioldarstellung könnte von einer C-C-Bindungsknüpfung mit Hilfe der Pyruvatdecarboxylase (PDC) ausgehen. Das PDC-katalysierte Ligaseprodukt aus Acetaldehyd und Benzaldehyd ist das (1*R*)-1-Hydroxy-1-phenylpropanon, auch bekannt als *R*-Phenylacetylcarbinol (oder *R*-PAC), welches im Unterschied zum 2-HPP die zu

¹⁶ Die Kinetik der ADH-M (siehe Anhang) deutet darauf hin, dass sie bereits im Rahmen der Dissertation von Dr. Uhlenbruck [Uhlenbruck, 1994] eingesetzt wurde. Dort wird sie als s-ADH-300 bezeichnet. Nach Anfrage bei *Jülich Fine Chemicals* stellt sich heraus, dass beide Enzyme von *Biocatalytics* stammen. Charakteristisch an der ADH-M- Kinetik sind die sehr niedrigen K_M -Werte und der drastische Aktivitätsabfall bei höheren Ketonkonzentrationen (Substratüberschussinhibierung).

reduzierende Ketofunktion in Position 2 trägt. *Mochizuki et al.* [Mochizuki *et al.*, 1995] haben gezeigt, dass Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenasen enthaltende Hefezellen in der Lage sind, das (1*R*,2*S*)-Diol als Hauptisomer darzustellen. Das Isomergemisch weist die Zusammensetzung: (1*R*,2*S*)-Diol (1*R*,2*R*)-Diol: (1*S*,2*S*)-Diol: (1*S*,2*R*)-Diol = 89:6:5:0 auf. Die Autoren vermuten, dass das intermediär gebildet *R*-PAC überwiegend von einem L-spezifischen Enzym zum (1*R*,2*S*)-Diol (89 %) und teilweise von einem D-spezifischen Enzym zum (1*R*,2*R*)-Diol (6 %) reduziert wird. Das *R*-PAC würde überdies in geringem Maße zum *S*-PAC racemisieren und in analoger Weise von dem L- und D-Enzym zum (1*S*,2*S*)-Diol (5 %) und (1*S*,2*R*)-Diol (<1 %) reduziert werden. Problematisch bei einer schrittweisen Synthese mit PDC stellt sich die Neigung des PAC zur Oxidation und Racemisierung während der Aufarbeitung dar [Mochizuki *et al.*, 1995]. Ferner ist das *S*-Enantiomer des PAC auf enzymatischem Wege bisher noch nicht in hohen Enantiomerenüberschüssen zugänglich [Pohl *et al.*, 1998]. Die aufgeführten Schwierigkeiten lassen den Einsatz der PDC für die Diolsynthese unvorteilhaft erscheinen. Nichtsdestoweniger konnte von einer technischen Probe des *R*-PAC¹⁷ ausgehend - im Wesentlichen mit Benzylalkohol verunreinigt - ein vollständiger Umsatz zum (1*R*,2*R*)-Diol unter Verwednung der *Lb*-ADH demonstriert werden (siehe auch Anhang D).

Tabelle 4-1: ADH-Screening Ergebnis.

Alkoholdehydrogenase	<i>S</i> -spezifisch		<i>R</i> -spezifisch	
	Aktivität ¹⁸	de	Aktivität	de
<i>Lactobacillus brevis</i> ¹⁹	0,98 U/mg	98-99 %		
<i>Thermoanaerobium spec.</i> (ADH-M)			1,35 U/mg	99 %
Ketoreduktase 01			2,62 U/mg	96 %
Ketoreduktase 02	0,04 mU/mg			
Ketoreduktase 03	0,09 mU/mg			
Ketoreduktase 05	0,02 mU/mg			
Ketoreduktase 07	2,05 U/mg	98-99 %		
<i>Candida boidinii</i>			0,25 U/mg	99 %
<i>Thermoanaerobium brockii</i>		keine Aktivität		
<i>Candida parapsilosis</i>		keine Aktivität		

¹⁷ freundlicherweise von der BASF AG zur Verfügung gestellt.

¹⁸ Aktivitäten gemessen bei 30 °C bis auf ADH-M bei 40 °C.

¹⁹ Rohextrakt

Cellulomonas spec.-GDH

keine Aktivität

Saccharomyces cerevisiae

keine Aktivität

Rhodococcuss erythropolis

keine Aktivität

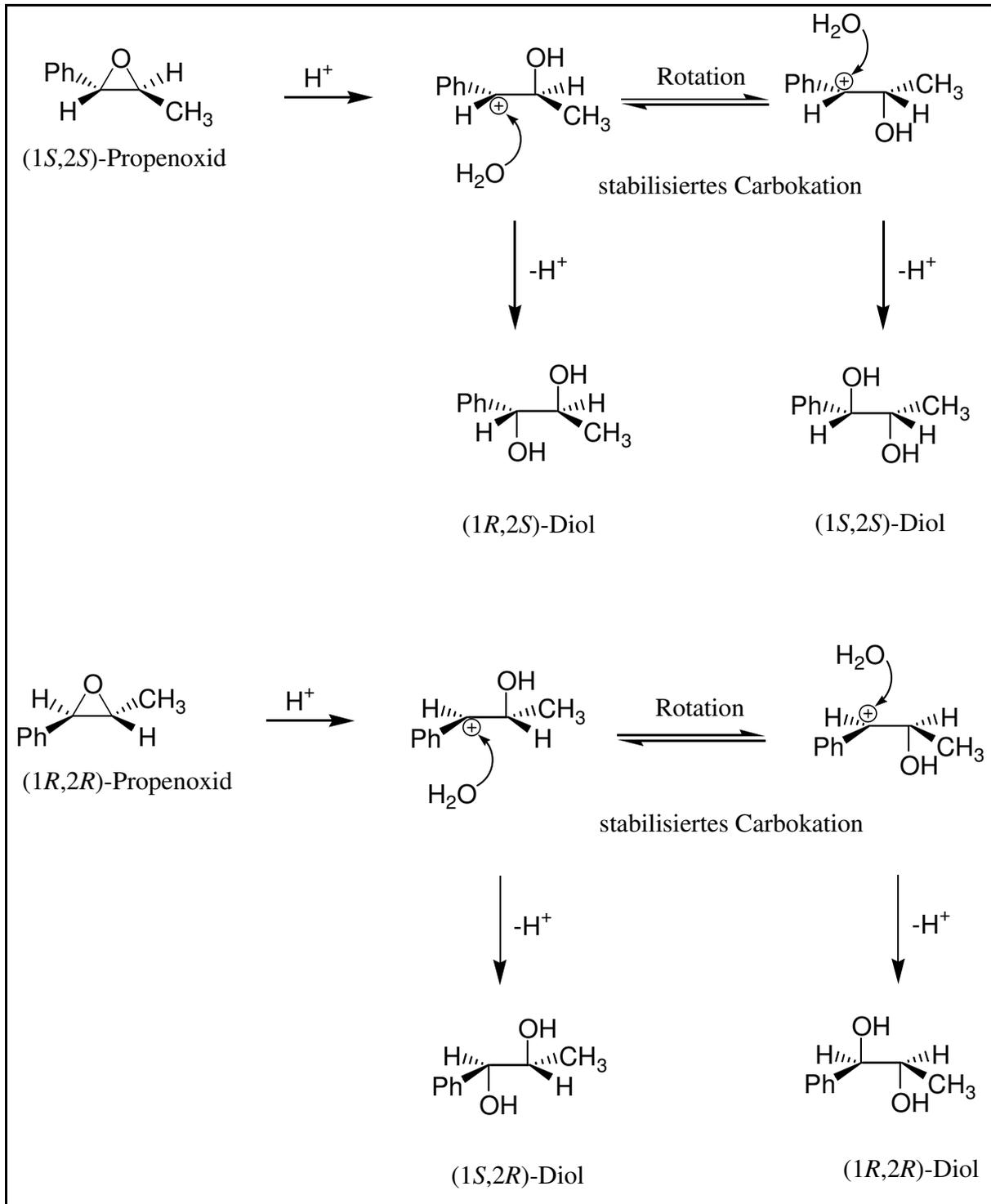


Abbildung 4-3: Säurekatalysierte Epoxidhydrolyse.

4.3 Biotransformationen mit ausgewählten Alkoholdehydrogenasen

Die Reduktion der beiden 2-HPP Enantiomere mit *Lb*-ADH gelingt sowohl mit einem substratgekoppelten System (*Lb*-ADH/2-Propanol) als auch mit einem enzymgekoppelten System bestehend aus einer Formiatdehydrogenase (FDH) und Natriumformiat. Die Nebenprodukte der Regenerierungssysteme lassen sich aufgrund ihrer Flüchtigkeit problemlos nach oder während der Reduktion entfernen und stellen somit keine Verunreinigung dar. Aufgrund der günstigeren Kinetik des enzymgekoppelten Systems mit FDH und der Möglichkeit die Cofaktorregenerierungsrate unabhängig von der Reduktionsrate beeinflussen zu können, wurde die Cofaktorregenerierung bevorzugt mit FDH/Natriumformiat durchgeführt.

Bei Verwendung der ADH-M für die Reduktion der 2-HPP-Enantiomere muss eine Reaktionstemperatur ab 40 °C gewählt werden, um eine nennenswerte Reduktionsaktivität zu erreichen. Die hohe Temperatur verbietet jedoch den Einsatz der temperatur empfindlichen FDH. Nichtsdestotrotz konnte nach Kinetikmessungen ermittelt werden, dass die substratgekoppelte NADPH-Regenerierung (ADH-M/2-Propanol) eine um den Faktor 8 höhere spezifische Aktivität besitzt als die Reduktionsreaktion.

Es wurden präparative Ansätze der 1-Phenylpropan-1,2-diol- Stereoisomere im Maßstab von 150 mg bis 10 g durchgeführt. Die Ausbeuten der Reduktionsreaktionen lagen zwischen 85 und 94 % und die Gesamtausbeuten ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd lagen zwischen 81 und 90 %. Vor und nach der Aufarbeitung betrug der Diastereomerenüberschuß der gebildeten Diole zwischen 98 und 99 % (siehe Abbildung 4-4).

Im Rahmen des SFB 380 - *Asymmetrische Synthesen mit biologischen und chemischen Methoden* konnte der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Salzer am Institut für Anorganische Chemie an der RWTH-Aachen 6 g des (1*S*,2*S*)-Diols und 10 g des (1*S*,2*R*)-Diols zur Verfügung gestellt werden. Prof. Dr. Salzers Arbeitsgruppe beschäftigt sich unter anderem mit der Synthese von optisch-aktiven Metallkomplexen. Die zur Verfügung gestellten Diole stellen somit chirale Vorläufermoleküle für die Synthese optisch aktiver Metallkomplexliganden dar.

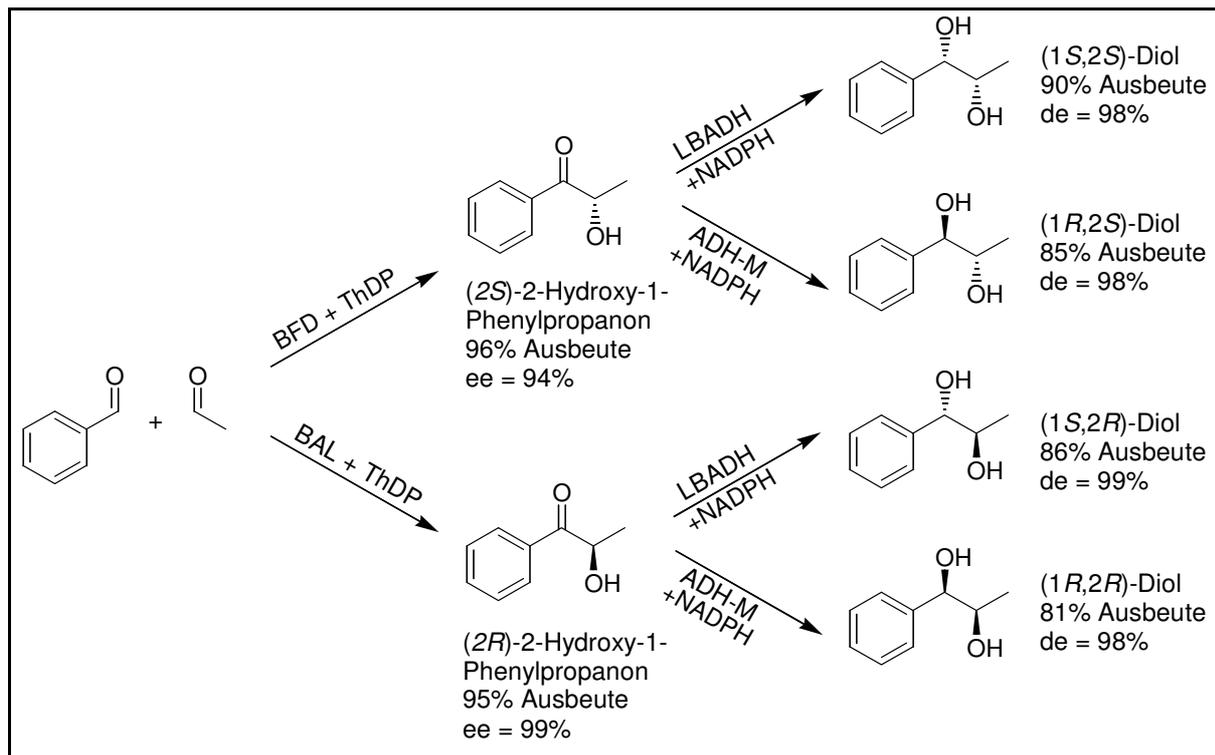


Abbildung 4-4: Schema zur Synthese der vier möglichen Stereoisomere des 1-Phenylpropan-1,2-diols.



Abbildung 4-5: Bild der synthetisierten Stereoisomere des Phenylpropanediols.

4.4 Charakterisierung der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase

4.4.1 pH-Abhängigkeit der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase-Aktivität

In Stufen von 0,5 pH-Werteinheiten wurde zwischen pH 5 und 9 (2. Pufferbereich des Phosphatpuffers; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) die Abhängigkeit der *Lb*-ADH-Aktivität bezüglich der Reduktion von (2S)-HPP bestimmt (Abbildung 4.6). Jede Messung wurde zweifach durchgeführt und mit einer Blindprobe (ohne Substrat) bei dem jeweiligen pH-Wert verglichen, um mögliche Verfälschungen durch NADPH-Abbau auszuschließen. Eine stetige Aktivitätszunahme von pH 9 (0 U/mL) bis pH 5 (90 U/mL) wird beobachtet. Eine ähnliche Tendenz ist bei der *Lb*-ADH-pH-Abhängigkeit für die Acetophenonreduktion zu beobachten, welche ebenfalls ab pH 9 bis pH 6,5 ansteigt, danach jedoch abfällt [Riebel, 1996]. Aufgrund der Verschiedenheit der Substrate ist jedoch ein genauer Vergleich nicht zulässig.

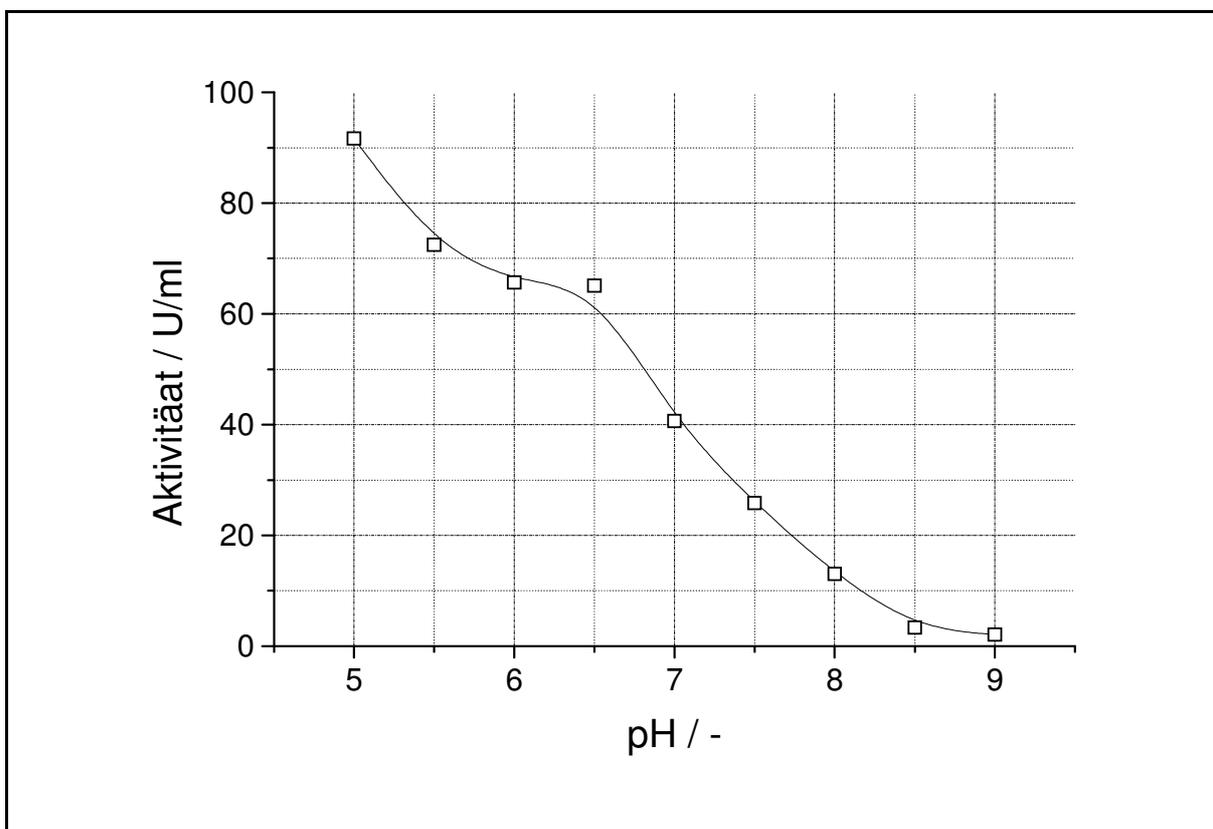


Abbildung 4-6: *Lb*-ADH-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Werts.

10 mM (2S)-HPP; 0,1 mM NADPH, 50 mM Phosphatpuffer; 2,5 mM MgSO_4 ; 25 °C.

4.4.2 Temperaturabhängigkeit der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase-Aktivität

Abbildung 4-7 gibt die Abhängigkeit der Enzymaktivität der *Lb*-ADH von der Temperatur wieder. Aus der Auftragung des natürlichen Logarithmus der spezifischen Aktivität gegen $1/T$ lässt sich aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie berechnen. Für die Reduktion von (2*S*)-HPP zum (1*S*,2*S*)-Diol mit der *Lb*-ADH ergibt sich eine Aktivierungsenergie von $28,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Grundlage der Berechnung ist der Ansatz von *Arrhenius*, der den Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

mit:	k	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante
	A	s^{-1}	Frequenzfaktor
	E_A	J mol^{-1}	Aktivierungsenergie
	R	$\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	allgemeine Gaskonstante; 8,31441
	T	K	absolute Temperatur

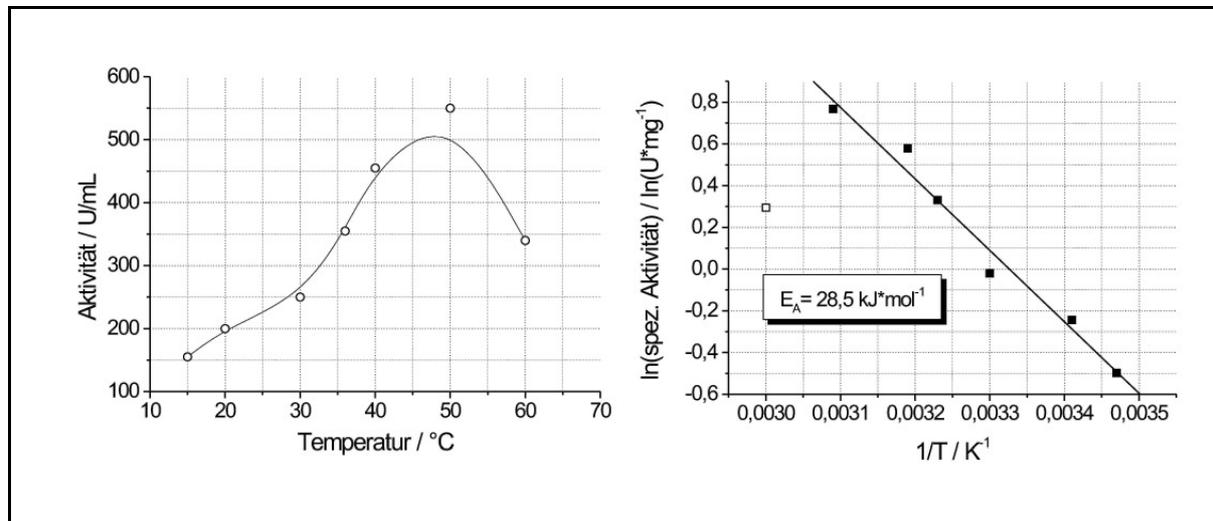


Abbildung 4-7: *Lb*-ADH-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur.

25 mM (2*S*)-HPP; 0,1 mM NADPH, 50 mM Phosphatpuffer; pH 7, 2,5 mM MgSO_4 .

4.4.3 Stabilität der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase

4.4.4 Stabilität in Gegenwart von Reaktanden

Um den Einfluss der voraussichtlichen Reaktionsbedingungen (Temperatur und Substrate) auf die Stabilität der *Lb*-ADH zu untersuchen, wurde das Enzym den entsprechenden Bedingungen in Inkubationsversuchen ausgesetzt. Abbildung 4-8 zeigt eine deutliche Desaktivierung der *Lb*-ADH durch das Substrat. Diese Feststellung liefert ein weiteres Argument für den EMR-Einsatz als Produktionsapparatur, in der unter Auslaufbedingungen eine niedrige Substratkonzentration vorliegt.

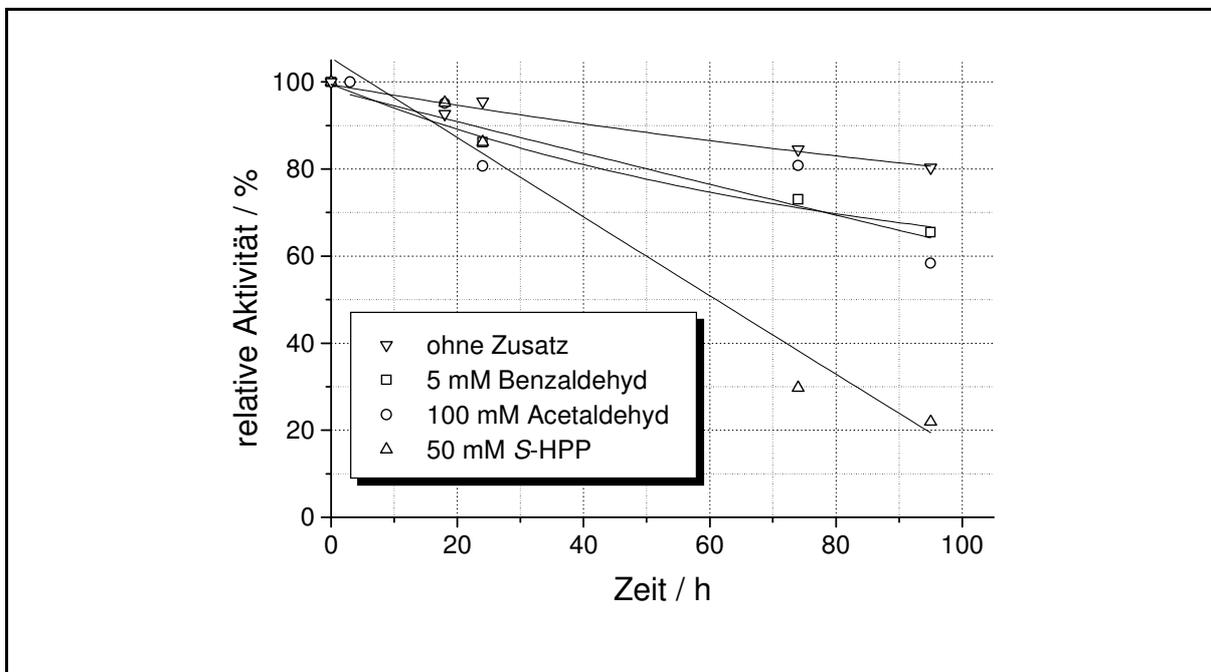


Abbildung 4-8: *Lb*-ADH-Aktivität in Gegenwart der Substrate.

Es wurde geprüft, ob der Desaktivierung durch das Substrat mit Stabilisatoren entgegengewirkt werden könnte. Abbildung 4-9 zeigt das Ausmaß der stabilisierenden Wirkung von Zusatzstoffen. Mit einem 10 %igen Glycerinzusatz kann die Halbwertszeit auf knapp 3 Tage angehoben werden und damit auf die Hälfte der Halbwertszeit des freien Enzyms. Eine geringe Stabilisierung geht von BSA aus, welches für die Vorbelegung der EMR-Membranen verwendet wird.

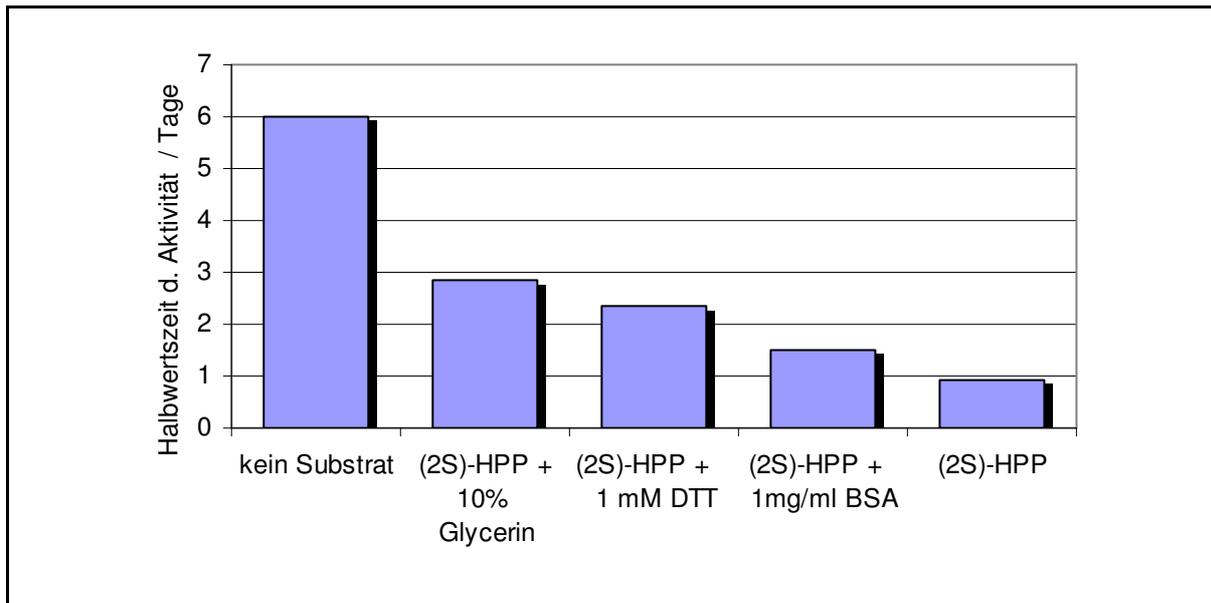


Abbildung 4-9: Halbwertszeiten der *Lb*-ADH-Aktivität in Gegenwart von Stabilisatoren.

4.4.5 pH-Stabilität

Abbildung 4-10 zeigt die pH-Stabilität der *Lb*-ADH anhand der Halbwertszeit der Aktivität. Die Stabilität um pH 6 und 7 ist deutlich höher (Faktor 2,8 bis 4,4) als bei pH 8.

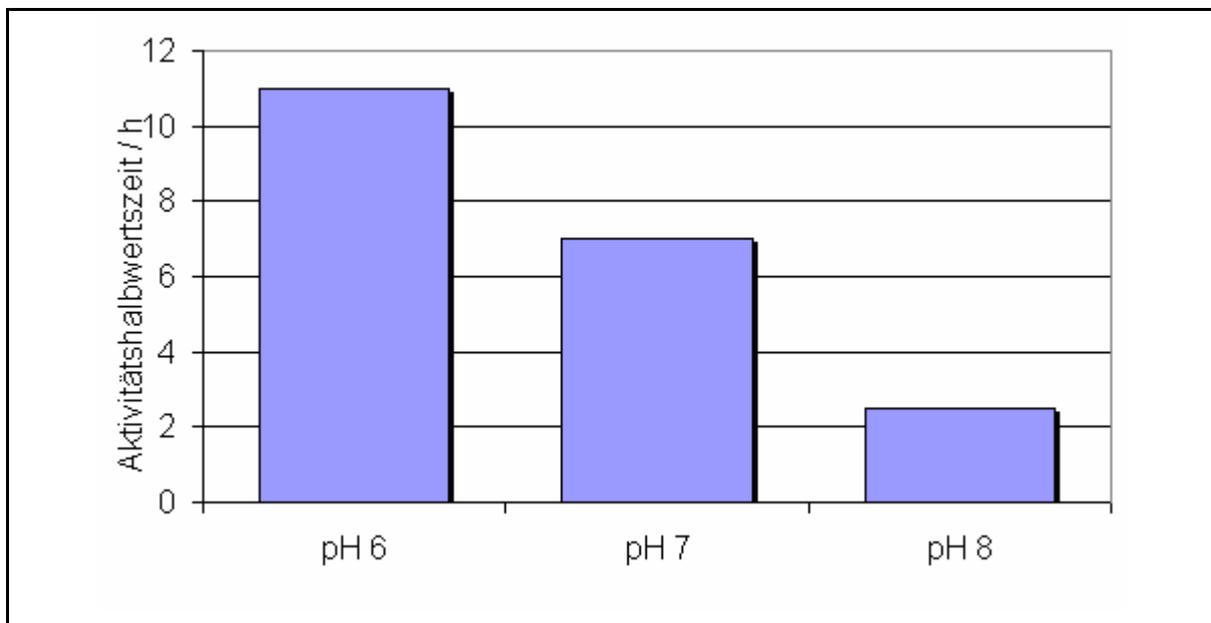


Abbildung 4-10: pH-Stabilität der *Lb*-ADH: 50 mM KPi-Puffer; 30 °C.

4.4.6 Temperaturstabilität

In Abbildung 4-11 sind die Halbwertszeiten der *Lb*-ADH bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen dargestellt. Bei der Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C kann die Halbwertszeit bis zu 40 Tage betragen.

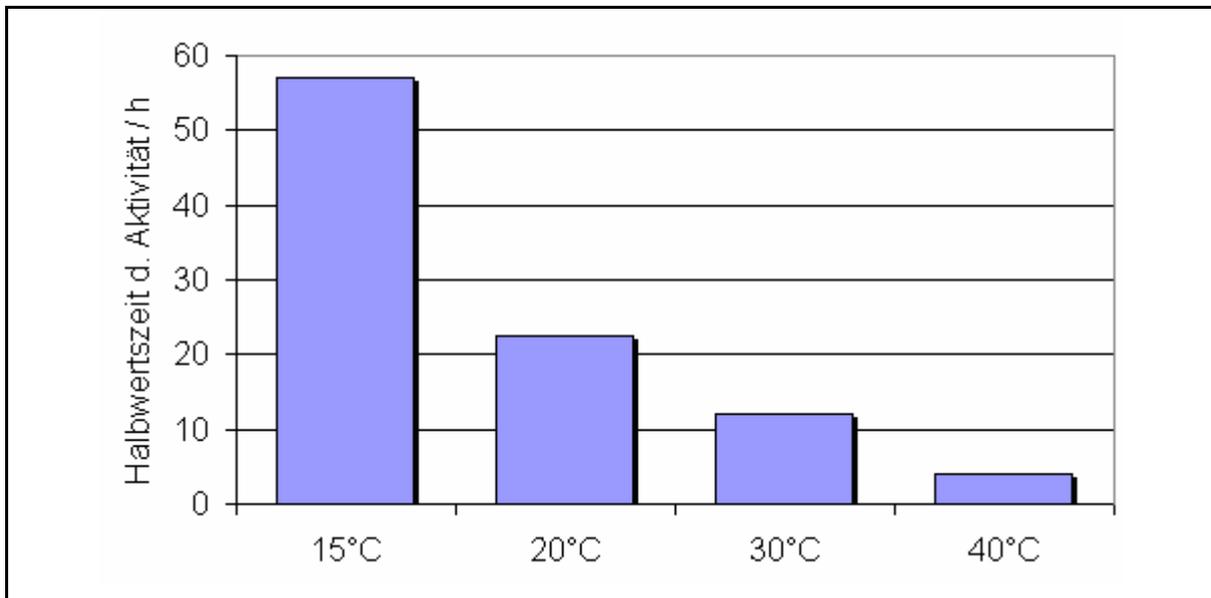


Abbildung 4-11: Temperaturstabilität der *Lb*-ADH.

Bedingungen: 1:50-Verdünnung eines *Lb*-ADH-Rohextrakts in KPi-Puffer; pH 7; ohne Zusätze.

4.4.7 Bestimmung der Kinetik

Auf der Grundlage der Kinetik, der für die Reduktion in Frage kommenden Einzelreaktionen, können Aussagen über eine geeignete Reaktionsführung und Reaktorwahl getroffen werden. Die Bestimmung der kinetischen Parameter v_{max} und K_M beruhen im Folgenden auf dem Modell von *Michaelis* und *Menten* [Michaelis *et al.*, 1913] mit den darin enthaltenen Vereinfachungen:

- i) Es wird angenommen, dass am Anfang der Reaktion (Bedingungen unter denen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gemessen werden) die Gesamtzymmenge aus der Summe freier Enzymmoleküle (E) und der Enzym-Substrat-Komplex-Moleküle (ES) besteht. Die Gesamtzymkonzentration $[E_{Ges}]$ ist dann gegeben durch:

$$[E_{Ges}] = [E] + [ES]$$

Gleichung 4-2

- ii) Aufgrund der katalytischen Eigenschaft der Enzyme, sind die eingesetzten Enzymmengen klein im Vergleich zum Substrat (Die eingesetzten Substratkonzentrationen liegen im Micro- bis Millimolarbereich während die Enzymkonzentrationen im nanomolaren Bereich oder tiefer liegen). Es wird daher angenommen, dass die Substratkonzentration die Enzymkonzentration bei weitem übertrifft:

$$[S] \gg [E_{Ges}] \quad \text{Gleichung 4-3}$$

- iii) Unter *steady-state*-Bedingungen und zu Reaktionsbeginn ist die Konzentration des freien Enzyms und die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplex konstant und stehen im Gleichgewicht miteinander:

$$\frac{d[E]}{dt} = \frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \text{Gleichung 4-4}$$

- iv) Es wird angenommen, dass die Menge des Produkts [P], das im Verhältnis zu den Konzentrationen an Enzym, Enzym-Substrat-Komplex und Substrat gebildet wird, so gering ist, dass die Annäherung gilt:

$$[P] = 0 \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Ausgehend von diesen Annahmen werden die Ausdrücke für die verwendeten Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik hergeleitet.

Die kinetischen Parameter der Michaelis-Menten Doppelsubstratkinetik wurden durch Anpassung der kinetischen Gleichungen an die Messwerte mittels nicht linearer Regression berechnet. Als Hilfsmittel für die Anpassung des Modells an die Messwerte diente das Datenauswertung- und Simulationsprogramm *ScientistTM* (MS-WindowsTM Version 2.0, Micromath, U.S.A). Eine Gewichtung der Messwerte fand nicht statt. Die errechneten Standardabweichungen und der Vergleich der gemessenen Werte mit den angepassten Kurvenverläufen gestattet die Bestimmung der Anpassungsgüte. Die zu grundlegenden

Messwerte wurden über Anfangsreaktionsgeschwindigkeits-Messungen ermittelt. Die Messungen erfolgten photometrisch unter Verfolgung der Änderung der Extinktion des Cofaktors NAD(P)H bei 340 nm über die Dauer der Messung.

Neben der Untersuchung der Kinetik der *Lb*-ADH-katalysierten (2*S*)-HPP Reduktion ist die Untersuchung der *Lb*-ADH-Kinetik bezüglich vorkommender Verunreinigungen im Auslauf des (2*S*)-HPP-Produktionsreaktors von Vorteil. Es kommen nicht umgesetzte bzw. nach einem zwischengeschalteten Extraktionsschritt noch vorhandene Mengen an Benzaldehyd und Acetaldehyd in Betracht. Benzaldehyd und Acetaldehyd sind Substrate der *Lb*-ADH. Die Gegenwart dieser Verunreinigungen erhöht zum einen die Gesamtketonkonzentration und erniedrigt zum anderen die verfügbare Cofaktormenge für die Hauptreduktionsreaktion. In welchem Ausmaß die (2*S*)-HPP-Reduktion durch Verunreinigungen beeinflusst wird soll die Kinetik derselben beantworten helfen.

4.4.7.1 Kinetik der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase katalysierten (2*S*)-Hydroxy-1-phenylpropanon Reduktion

Für die *Lb*-ADH-katalysierte Reduktion von (2*S*)-HPP lautet die Gleichung der Doppelsubstratkinetik wie folgt:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{HPP}]}{K_{M,\text{HPP}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{Diol}]}{K_i}\right) + [\text{HPP}]} \cdot \frac{[\text{NADPH}]}{K_{M,\text{NADPH}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{NADP}]}{K_{i,\text{NADP}}}\right) + [\text{NADPH}]} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

mit: HPP = (2*S*)-Hydroxyphenylpropanon
 Diol = (1*S*,2*S*)-Phenylpropan-1,2-diol

Die im Nenner eingebrachten Terme dienen der Bestimmung der Produktinhibierung. Die berechneten kinetischen Parameter sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst. Aus den Daten und der Abbildung 4-12 geht hervor, dass der Einfluss des Diol-Produktes als Inhibitor nicht signifikant ist, im Gegensatz zum Einfluss des oxidierten Cofaktors NADP. Eine schnelle - im Vergleich zur Hauptreaktion - und kontinuierliche Regenerierung des reduzierten Cofaktors kann unter Produktionsbedingungen einen Anstieg der NADP-Konzentration über ein signifikantes Maß verhindern. Somit kann seine inhibierende Eigenschaft auf ein Minimum reduziert werden.

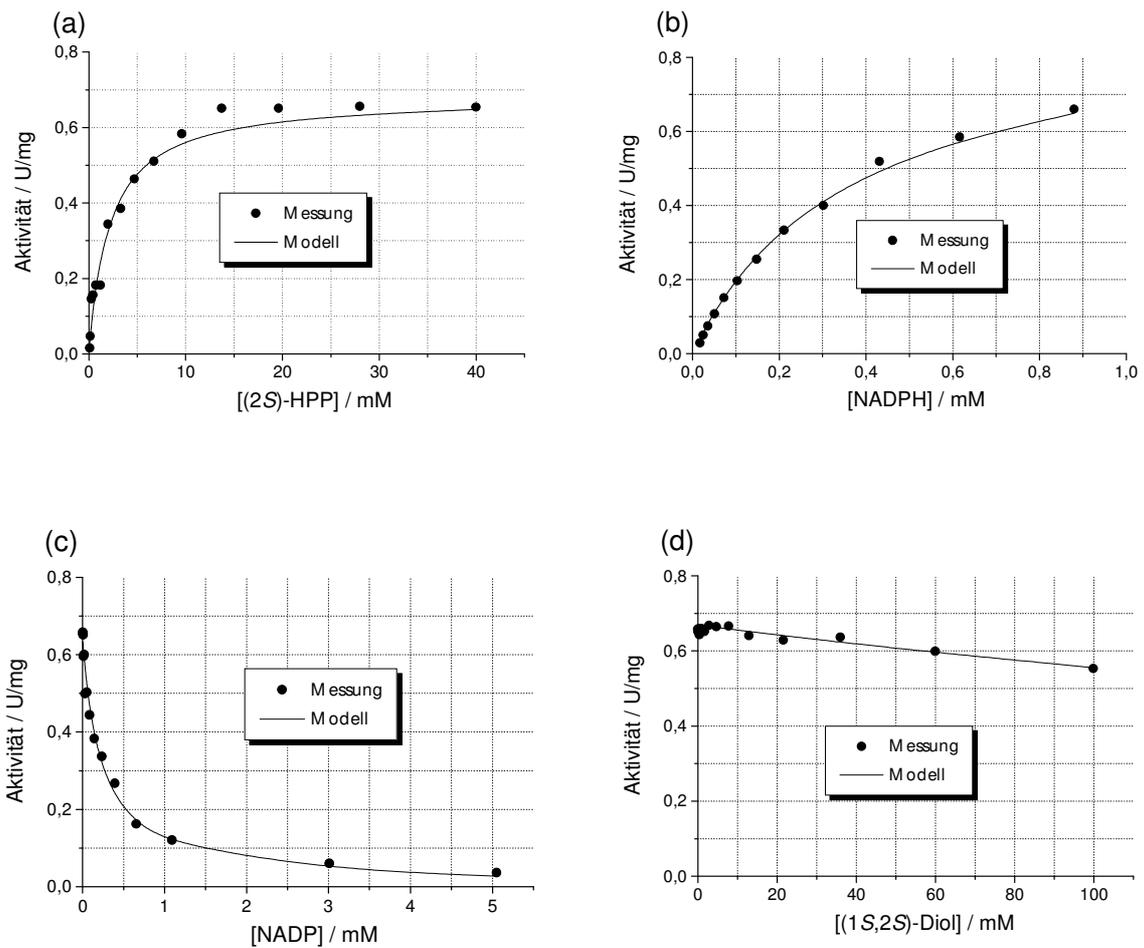


Abbildung 4-12: Kinetik der *Lb*-ADH-katalysierten (2S)-HPP Reduktion bei 30 °C.
 a) 0,83 mM NADPH b) 30,50 mM (2S)-HPP c) 0,98 mM NADPH, 18,07 mM (2S)-HPP d) 30,50 mM (2S)-HPP, 0,98 mM NADPH.

Tabelle 4-2: Parameter der *Lb*-ADH-katalysierten Reduktion von (2S)-HPP.

Parameter	Einheit	Größe	Standardabweichung
v_{max}	U/mg	0,98	0,02
$K_{M(2S)-HPP}$	mM	2,09	0,16
$K_{M\ NADPH}$	mM	0,37	0,03
$K_{i,NADP}$	mM	0,06	0,01
$K_{i,Diol}$	mM	31,4	6,67

4.4.7.2 Kinetik der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase katalysierten Acetaldehyd Reduktion

Für die *Lb*-ADH-katalysierte Reduktion von Acetaldehyd lautet die Gleichung der Doppelsubstratkinetik wie folgt:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[AA]}{K_{M,AA} \cdot \left(1 + \frac{[EtOH]}{K_{i,EtOH}}\right) + [AA]} \cdot \frac{[NADPH]}{K_{M,NADPH} \cdot \left(1 + \frac{[NADP]}{K_{i,NADP}}\right) + [NADPH]} \quad \text{Gleichung 4-7}$$

mit: AA = Acetaldehyd
 EtOH Ethanol

Wie im vorangegangenen Abschnitt dient der im Nenner eingebrachte Term der Bestimmung der Produktinhibierung. Hier ist sowohl eine Inhibierung durch den oxidierten Cofaktor NADP als auch durch das Reduktionsprodukt Ethanol zu verzeichnen.

Tabelle 4-3: Parameter der *Lb*-ADH-katalysierten Reduktion von Acetaldehyd.

Parameter	Einheit	Größe	Standardabweichung
v_{\max}	U/mg	18,03	1,22
$K_{M, Acetaldehyd}$	mM	4,64	0,60
$K_{M;NADPH}$	mM	0,34	0,06
$K_{i, NADP}$	mM	0,10	0,01
$K_{i,Ethanol}$	mM	2,01	0,31

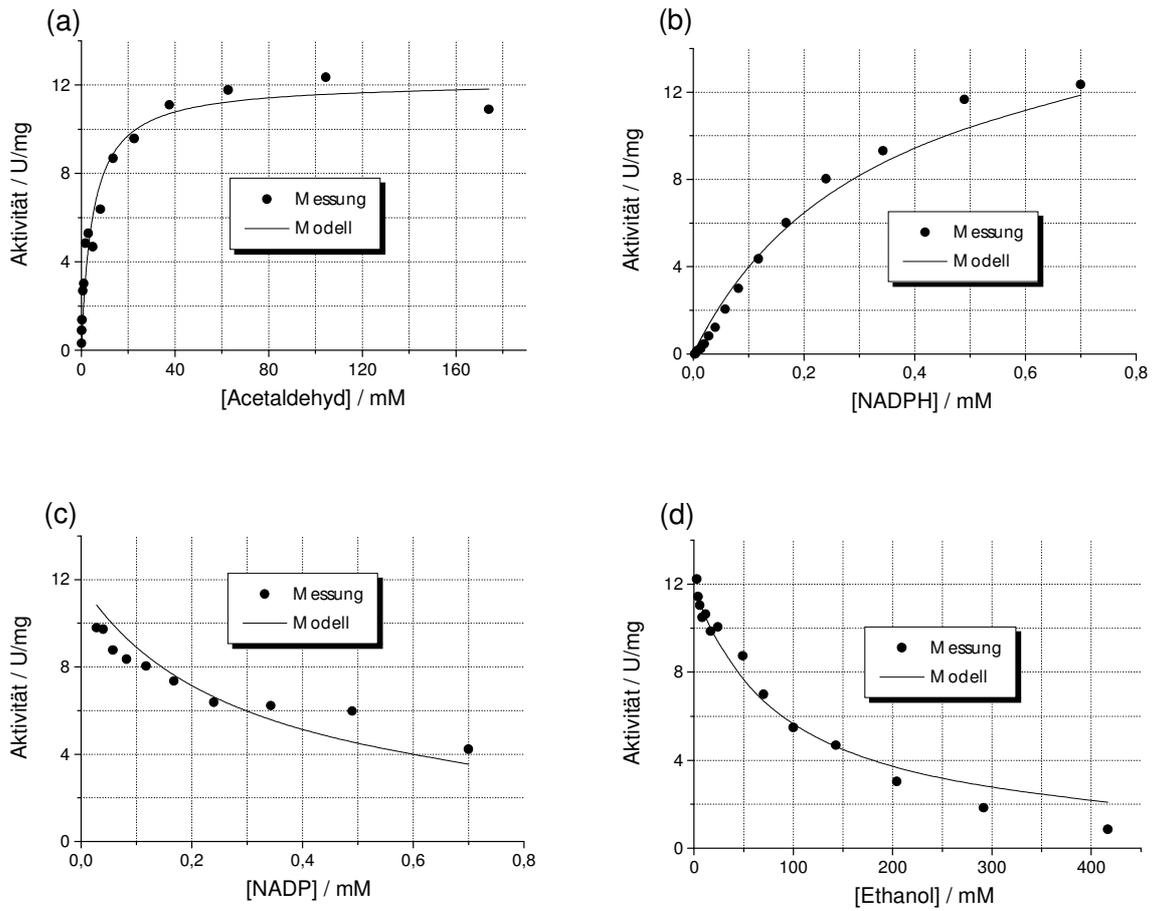


Abbildung 4-13: Kinetik der *Lb*-ADH-katalysierten Acetaldehyd-Reduktion bei 30 °C.
 a) 0,70 mM NADPH b) 200 mM Acetaldehyd c) und d) 200 mM Acetaldehyd, 0,70 mM NADPH.

4.4.7.3 Kinetik der *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase katalysierten Benzaldehyd Reduktion

Für die *Lb*-ADH-katalysierte Reduktion von Benzaldehyd lautet die Gleichung der Doppelsubstratkinetik wie folgt:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[BA]}{K_{M,BA} \cdot \left(1 + \frac{[EtOH]}{K_{i,EtOH}}\right) + [BA]} \cdot \frac{[NADPH]}{K_{M,NADPH} \cdot \left(1 + \frac{[NADP]}{K_{i,NADP}}\right) + [NADPH]} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

mit: BA = Benzaldehyd
 EtOH Ethanol

Aufgrund der nicht signifikanten Inhibierung durch Benzylalkohol wird der entsprechende Term in der Gleichung für die Benzaldehydkinetik nicht einbezogen. Nur ein geringer inhibierender Einfluss geht von NADP aus.

Tabelle 4-4: Parameter der *Lb*-ADH-katalysierten Reduktion von Benzaldehyd.

Parameter	Einheit	Größe	Standardabweichung
v_{\max}	U/mg	4,51	0,54
$K_{M, \text{Benzaldehyd}}$	mM	7,64	0,87
$K_{M, NADPH}$	mM	0,83	0,16
$K_{i, NADP}$	mM	1,44	0,25
$K_{i, \text{Benzylalkohol}}$	mM	vernachlässigbar	

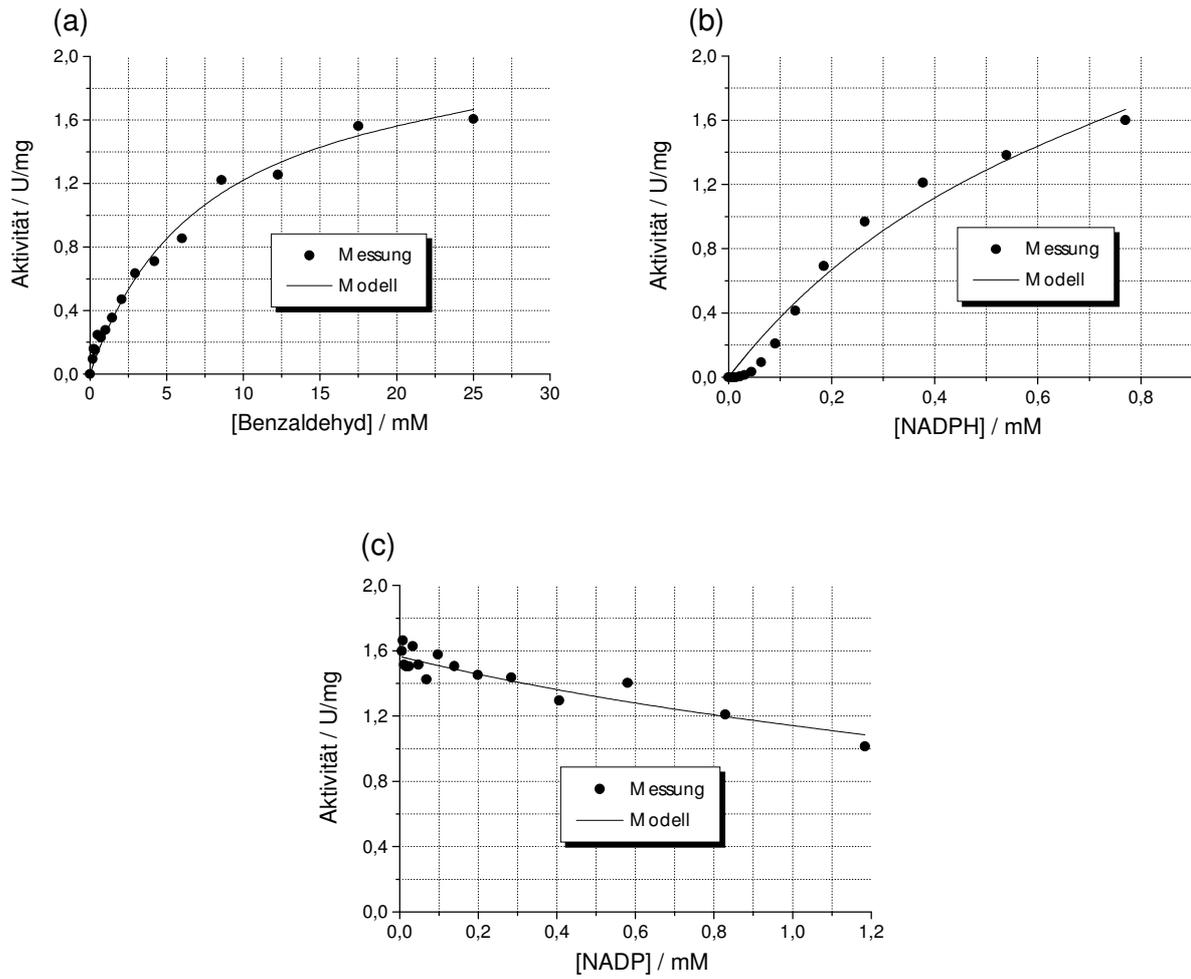


Abbildung 4-14: Kinetik der *Lb*-ADH-katalysierten Benzaldehyd-Reduktion bei 30 °C. 0,77 mM NADPH b) 25 mM Benzaldehyd c) und d) 23 mM Benzaldehyd, 0,71 mM NADPH.

4.5 Cofaktorregenerierung

4.5.1 Kinetik der substratgekoppelten Cofaktorregenerierung / *Lactobacillus brevis*-Alkoholdehydrogenase katalysierte 2-Propanoloxidation

Für die *Lb*-ADH-katalysierte Oxidation von 2-Propanol lautet die Gleichung der Doppelsubstratkinetik wie folgt:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[2 - \text{PrOH}]}{K_{M, 2-\text{PrOH}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{Aceton}]}{K_{i, \text{Aceton}}} \right) + [2 - \text{PrOH}]} \cdot \frac{[\text{NADP}]}{K_{M, \text{NADP}} + [\text{NADP}]} \quad \text{Gleichung 4-9}$$

mit: 2-PrOH = 2-Propanol

Der Term für die Inhibierung durch NADPH wurde aufgrund des vernachlässigbaren Einflusses von NADPH nicht einbezogen.

Abbildung 4-15 c) zeigt eine signifikante Inhibierung durch Aceton. Der Wert für v_{\max} liegt in der Größenordnung des v_{\max} -Wertes der *Lb*-ADH-katalysierten (2*S*)-HPP-Reduktion. Diese Feststellungen lassen den Einsatz dieses Regenerierungssystems unvorteilhaft erscheinen.

Tabelle 4-5: Parameter der *Lb*-ADH-katalysierten 2-Propanol-Oxidation.

Parameter	Einheit	Größe	Standardabweichung
v_{\max}	U/mg	1,20	0,04
$K_{M, 2\text{-Propanol}}$	mM	6,08	1,08
$K_{M, \text{NADPH}}$	mM	0,15	0,02
$K_{i, \text{NADP}}$	mM	0,12	0,02
$K_{i, \text{Benzylalkohol}}$	mM	vernachlässigbar	

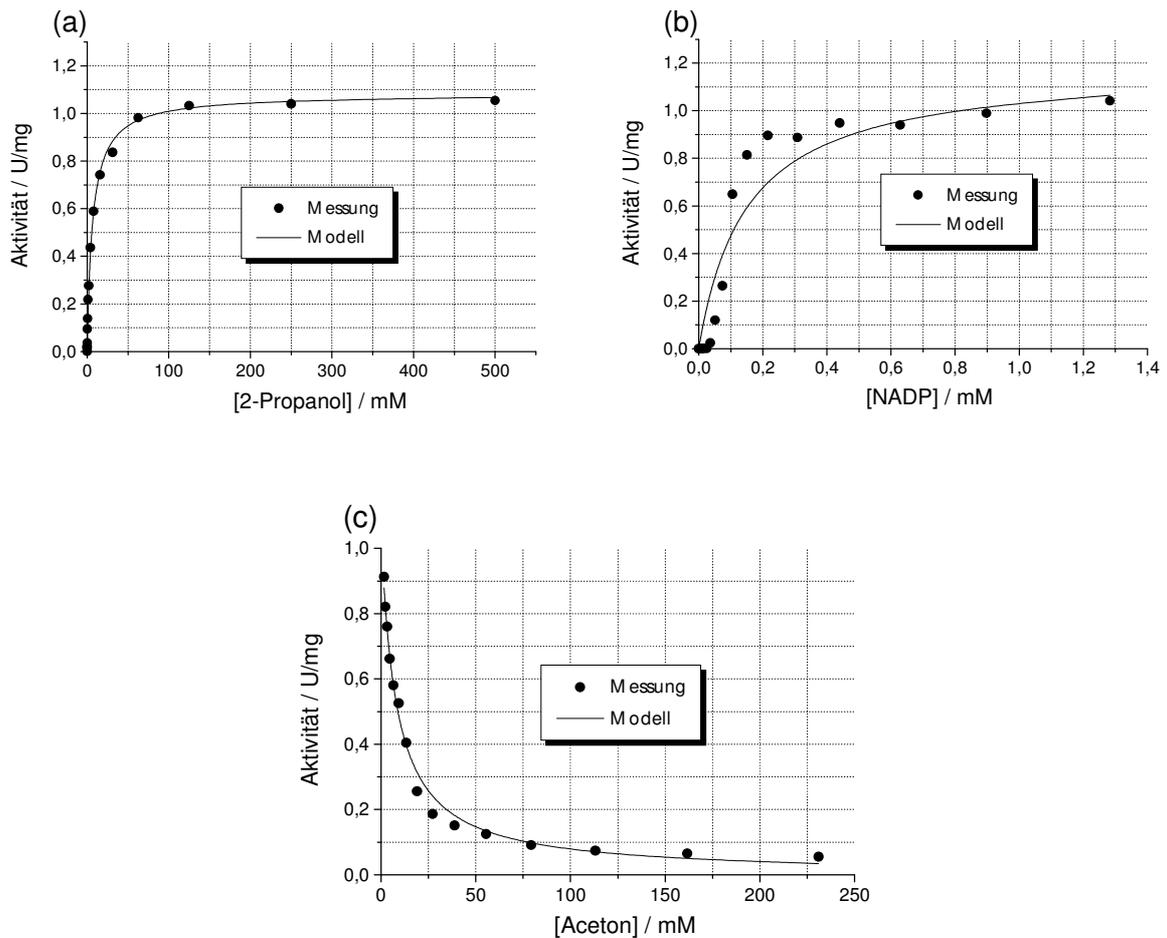


Abbildung 4-15: Kinetik der *Lb*-ADH-katalysierten 2-Propanol-Oxidation bei 30 °C.
 a) 1,28 mM NAD^+ b) 421 mM 2-Propanol c) 388 mM 2-Propanol 1,19 mM NADP^+ .

4.5.2 Kinetik der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung / Formiatdehydrogenase katalysierte NADP-Reduktion

Die durch die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* katalysierte Reaktion kann vereinfacht aufgrund der hohen Gleichgewichtskonstante als quasi irreversibel betrachtet werden. Aufgrund dieser Annahme im Zusammenhang mit dem Umstand, dass sich das gebildete CO_2 unter Normalbedingungen dem System entzieht und ferner CO_2 kein Substrat der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* ist, wird die folgende Geschwindigkeitsgleichung für die Reaktion gewählt:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[Formiat]}{K_{M,Formiat} + [Formiat]} \cdot \frac{[NADP]}{K_{M,NADP} \cdot \left(1 + \frac{[NADPH]}{K_{i,NADPH}}\right) + [NADP]} \quad \text{Gleichung 4-10}$$

Wie in Abbildung 4-16 c) dargestellt, ist die inhibierende Wirkung von NADPH nicht stark ausgeprägt.

Tabelle 4-6: Parameter der FDH-katalysierten Reduktion von NADP.

Parameter	Einheit	Größe	Standardabweichung
v_{\max}	U/mg	1,21	0,02
$K_{M, NADP^+}$	mM	0,30	0,03
$K_{M, HCOONa}$	mM	21,8	2,70
$K_{i, NADPH}$	mM	0,06	0,01

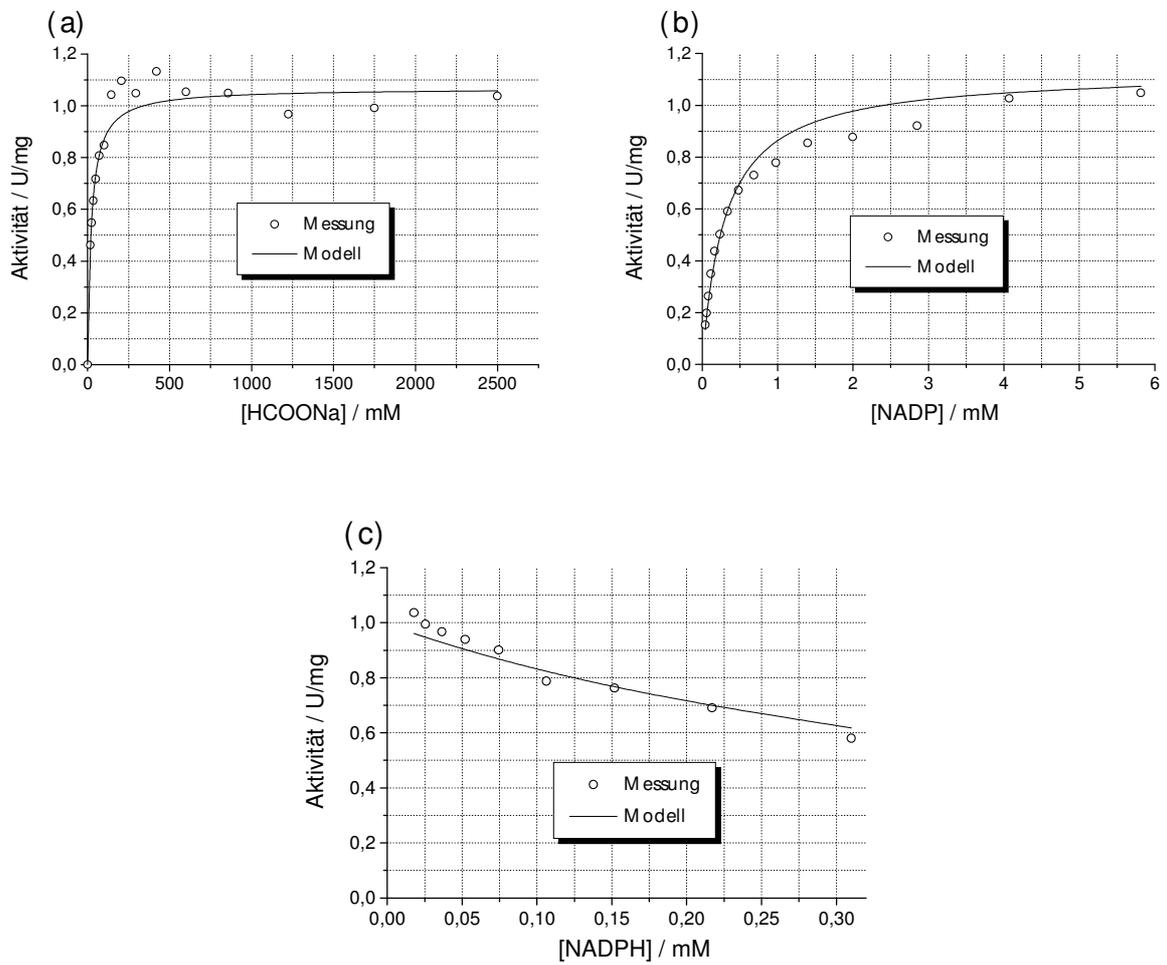


Abbildung 4-16: Kinetik der FDH-katalysierten NADP-Reduktion bei 30 °C.

a) 2,2 mM NADP⁺ b) 300 mM HCOONa c) 2,2 mM NADP⁺ und 300 mM HCOONa.

4.5.3 Cofaktorstabilität

Von dem eingesetzten Cofaktor NADPH ist bekannt, dass es in wässriger Lösung bei Raumtemperatur zerfällt. Aus diesem Grund werden gerade bei empfindlichen photometrischen Messungen Blindproben angefertigt, um Verfälschungen der Ergebnisse durch den Cofaktorzerfall auszuschließen. Neben der Temperaturabhängigkeit beeinflusst der pH-Wert und die Ionen-Spezies die Stabilität des Cofaktors. Die pH-Wertabhängigkeit der Stabilität wurden für die in Frage kommenden Reaktionsbedingungen untersucht. Da sich keine nennenswerten Vorteile durch einen Pufferwechsel abzeichneten, wurden die Cofaktorstabilitätsmessungen - wie auch die übrigen Stabilitätsmessungen - in Phosphatpuffer durchgeführt. Abbildung 4-17 gibt die pH-Stabilität von NADPH wieder. Je niedriger der pH-Wert des Phosphatpuffers desto geringer die Halbwertszeit des NADPH. Die gemessenen Halbwertszeiten stimmen weitgehend mit den Literaturdaten überein [Chenault *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1981].

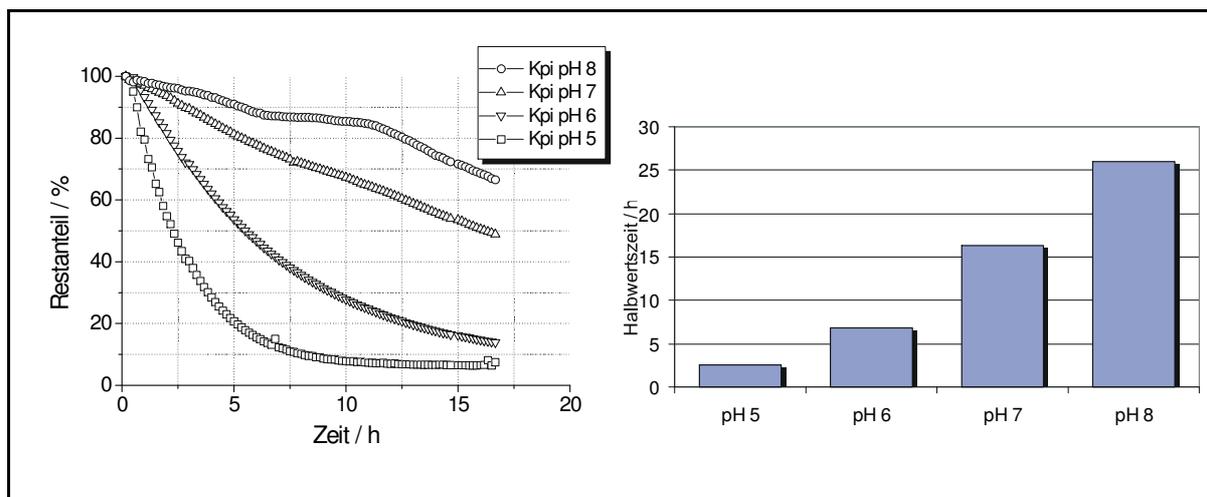


Abbildung 4-17: NADPH-pH-Stabilität: 0,77 mM NADPH, 50 mM KPi-Puffer; 25 °C.

4.6 Batch-Versuche

In Abbildung 4-18 sind 3 Batch-Verläufe bei verschiedenen FDH-Konzentrationen mit den entsprechenden Simulationskurven abgebildet. Die Simulationskurven beruhen auf den gemessenen kinetischen Parametern. Die Desaktivierung der beteiligten Enzyme und der Zerfall des Cofaktors wurden bei der Simulation nicht berücksichtigt. Es fällt auf, dass die

Messpunkte mit der jeweiligen Modellkurve lediglich bis zu einem Umsatz von ca. 80 % übereinstimmen. Ab 80 % Umsatz lässt bei allen Batch-Versuchen die Produktbildungsgeschwindigkeit gegenüber dem Modell etwas nach, so dass in allen drei Fällen nach 150 min lediglich ein 95 %iger Umsatz erreicht wird, obwohl das Modell vollständige Umsätze bereits bei 90 min (6,12 U/mL FDH), 105 min (3,06 U/mL FDH) bzw. 128 min (1,52 U/mL FDH) vorhersagt. Eine Kombination aus Enzymdesaktivierung und Cofaktorzerfall könnte die nachlassende Produktbildungsgeschwindigkeit im Bereich hoher Umsätze erklären. Aufgrund der nur geringfügigen Abweichungen im oberen Umsatzbereich kann der Vergleich von Experiment und Modell als zufriedenstellend angesehen werden.

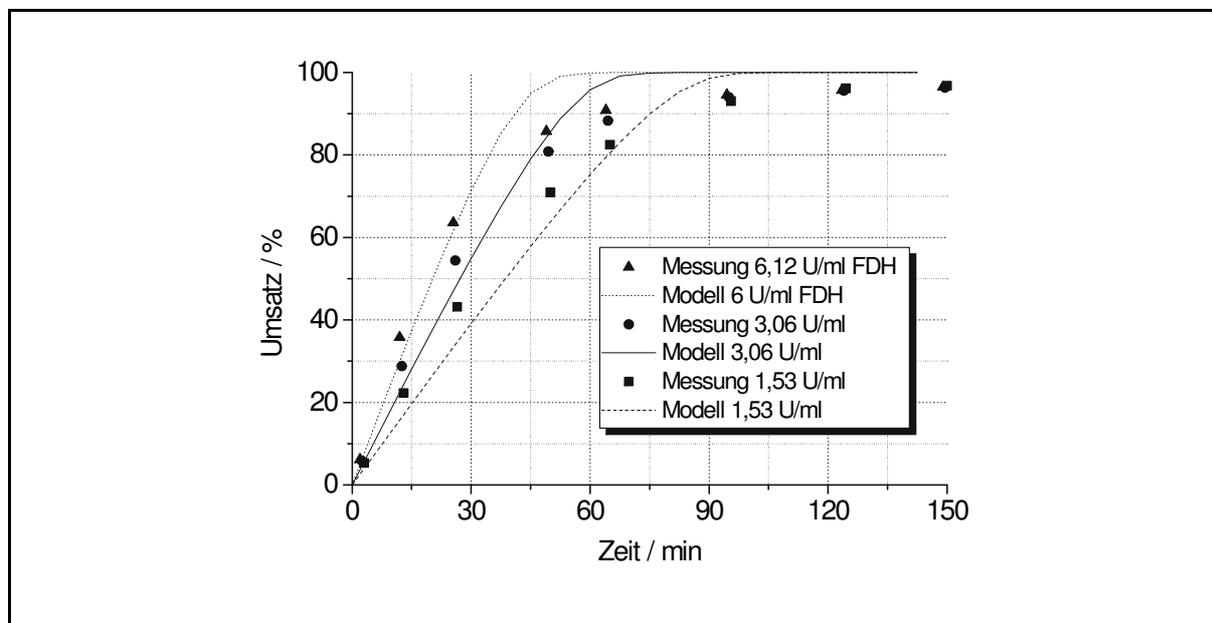


Abbildung 4-18: (2S)-HPP-Reduktion im Batch und als Simulation.

10 mM HPP; 300 mM Natrium Formiat; 0,1 mM NADP; 50 mM KPi-Puffer; 4 g/L *Lb*-ADH (0,98 U/mg); pH 7,0; 25 °C.

Mit dem Modell lassen sich Batch-Simulationen durchführen, um u.a. für die Produktivität das günstigste Enzymverhältnis bei gegebener Cofaktorkonzentration und konstanter Enzymmenge zu ermitteln. Abbildung 4-19 a) und b) zeigen simulierte Umsätze bei jeweils 0,1 und 0,4 mM NADP. Das FDH-/ADH-Enzymverhältnis wurde dabei in Stufen zwischen 0,003 und 339 variiert. Die Variation des Enzymverhältnisses hat zur Folge, dass die jeweiligen Umsatzkurven unterschiedliche Werte nach 30 min bzw. 60 min erreichen. Werden nun die nach 30 bzw. 60 min erreichten Umsätze den Enzymverhältnissen wie in Abbildung 4-19 c) gegenübergestellt, lässt sich das optimale Enzymverhältnis bei gegebener

Cofaktorkonzentration abschätzen. Im Falle des vorliegenden FDH/ADH-Systems liegt das Optimum bei ca. 1:1. Abbildung 4-19 c) vermittelt auch einen Hinweis in wie weit eine Cofaktor-Erhöhung eine Produktivitätssteigerung erwarten lässt.

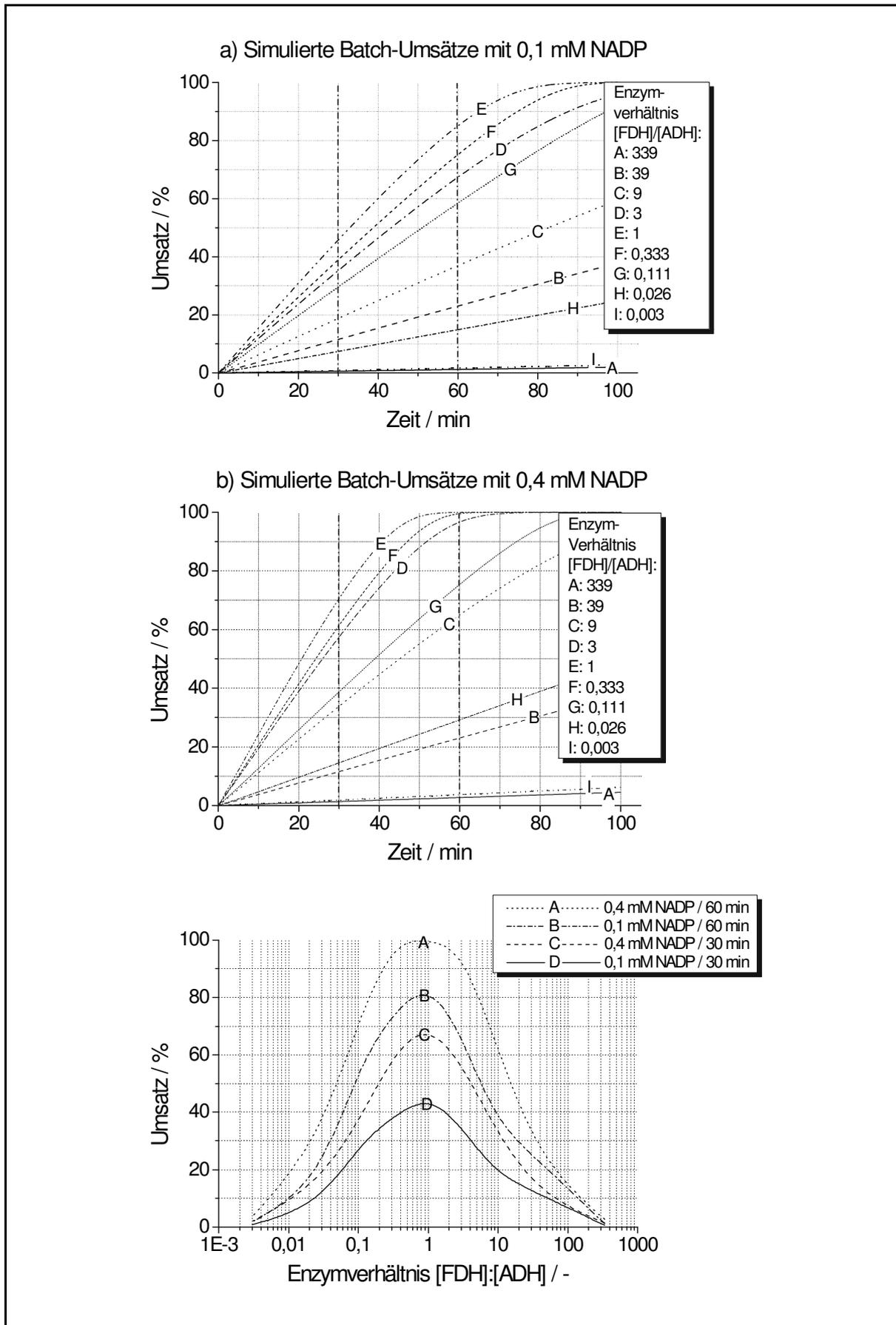


Abbildung 4-19: Batch-Simulation zur Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses.

Aufgrund der Tatsache, dass die *Lb*-ADH im Stande ist, in einem Ein-Enzymsystem (substrat gekoppelt) unter Verwendung von 2-Propanol den Cofaktor NADPH zu regenerieren, wurde diese Möglichkeit in Betracht gezogen und in Hinblick auf ihre Produktivität untersucht. Nach der Bestimmung der kinetischen Parameter des *Lb*-ADH/2-Propanol-Regenerierungssystems (siehe 4.5.1) wurden Produktions-Versuche im Batch durchgeführt. Unter Verwendung vergleichbarer Konzentrationen an *Lb*-ADH erreichte das zwei-Enzymsystem (FDH/*Lb*-ADH) nahezu vollständigen Umsatz in nur 1/25 der Zeit, welche das Substrat-gekoppelte System (2-Propanol-gekoppelte Regenerierung) benötigt hat (Vergleiche Abbildung 4-18 und Abbildung 4-20). Das entsprechende Modell für die 2-Propanol-gekoppelte Regenerierung sagt jedoch eine wesentlich kürzere Reaktionszeit voraus, die im Bereich von 1-2 Stunden liegt. Diese beträchtliche Diskrepanz kann mit den bisher gemessenen Daten nicht erklärt werden.

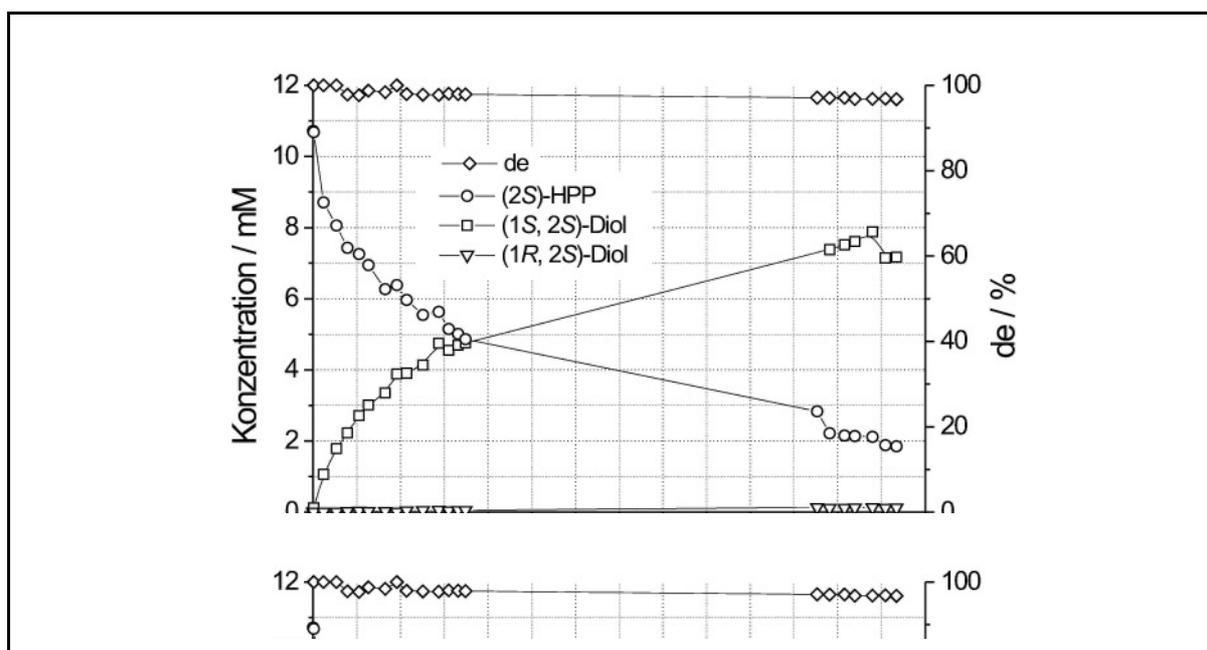


Abbildung 4-20: 2-Propanol gekoppelte 2S-HPP-Reduktion.

10 mM (2S)-HPP; 1 mM NADP; 300 mM 2-Propanol; 100 mM KPi-Puffer;
2,4 U/mL *Lb*-ADH; 25 °C.

Im Hinblick auf die Durchführung der (2S)-HPP Reduktion in einem kontinuierlichen Gesamtprozess in dem vor allem Restmengen an Acetaldehyd zu erwarten sind, wurde der mögliche Einfluss dieser Verunreinigung untersucht. Abbildung 4.6 zeigt drei Batchverläufe in denen eine Acetaldehydanfangskonzentration von 0, 50 und 100 mM eingestellt wurde.

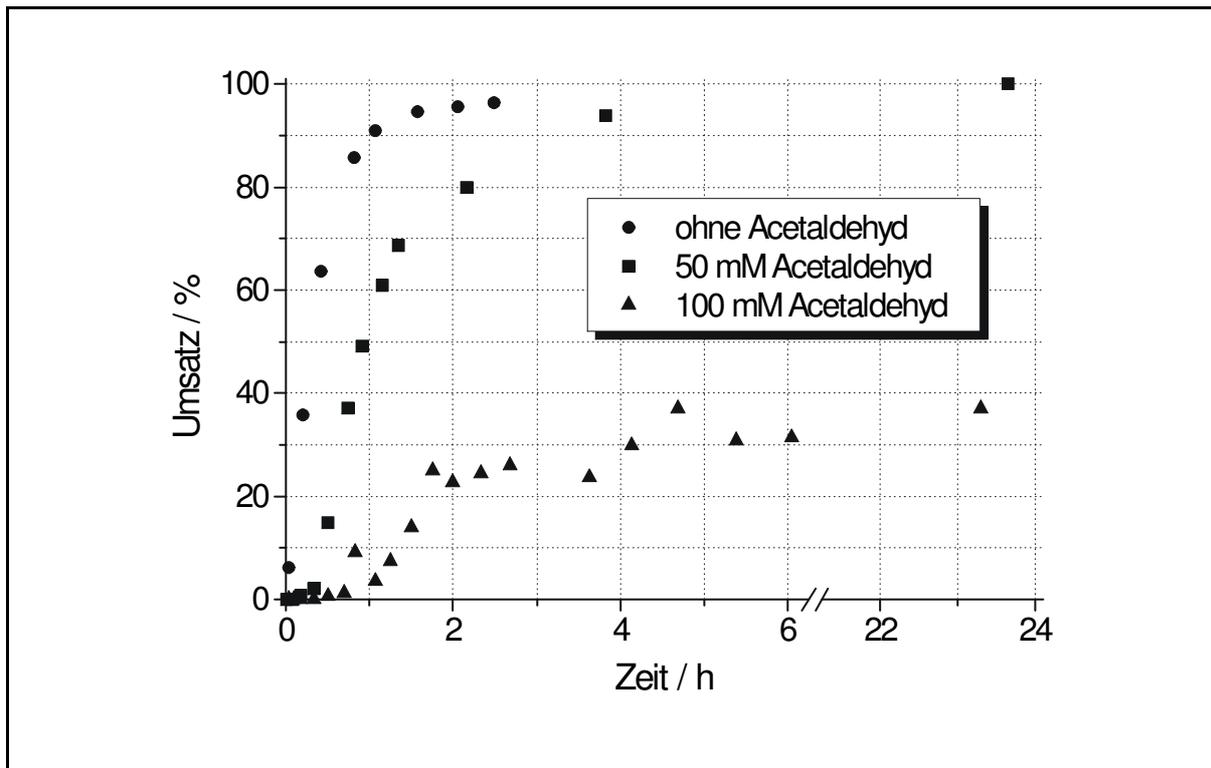


Abbildung 4-21: Einfluss von Acetaldehyd auf die (2S)-HPP-Reduktion.

Bedingungen: 300 mM Natriumformiat; 0,1 mM NADP; 50 mM; KPi-Puffer; pH 7.0; 2,5 mM MgSO₄; T = 21 °C; 10,1 U/mL ADH; 6,12 U/mL FDH.

Während eine Restkonzentration von 50 mM Acetaldehyd die Reduktion des HPP um ca. 2 h verzögert führt die höhere 100 mM Acetaldehydkonzentration zu einem Erliegen der Reaktion bei ca. 35 % Umsatz. Hier wird erneut die Notwendigkeit für eine vorherige Acetaldehyd-Entfernung deutlich. Die Vermutung lag nahe, dass eine vollständige Enzymdesaktivierung Ursache für den geringen Umsatz nach 100 min ist. Bei anschließenden Reduktionsversuchen in Gegenwart von Acetaldehyd wurden deshalb die Enzymaktivitäten während des Batches verfolgt. Zu beobachten war eine moderat verlaufende Enzymdesaktivierung, bei der mindestens 50 % der jeweils ursprünglich eingesetzten Enzymaktivität nach 90 min noch vorhanden war. Die Menge der verfügbaren Aktivität in diesem Zeitraum hätte für einen vollständigen Umsatz des (2S)-HPP ausreichen müssen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine nichtkompetitive oder allosterische Hemmung der *Lb*-ADH und/oder FDH durch den Acetaldehyd oder das in der Reduktion entstandene Ethanol als Ursache in Frage kommt (siehe Abbildung 4-22).

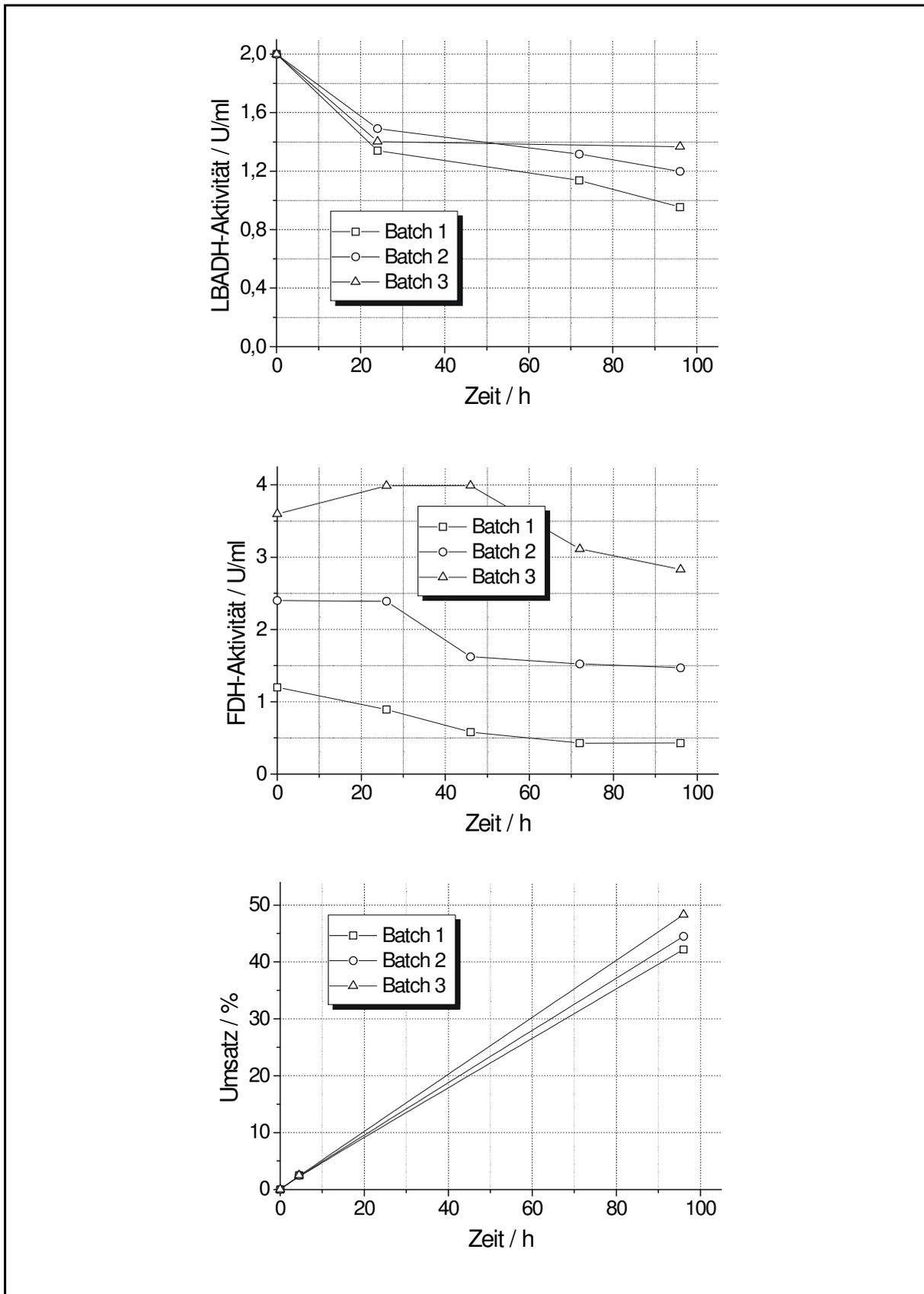


Abbildung 4-22: Umsatz- und Enzymaktivitätsverlauf bei der (2S)-HPP-Reduktion in Gegenwart von Acetaldehyd.
10 mM HPP; 50 mM Acetaldehyde; 0,1 mM NADP⁺.

4.7 Kapitelzusammenfassung

- Die Diol-Isomerenverteilung bei der chemischen Reduktion von Phenylpropandion mit LiAlH_4 lässt sich mit dem Felkin-Ahn Modell erklären - ein Indiz für die richtige Isomerenzuordnung.
- Die Diol-Isomerenverteilung bei der sauren Epoxidhydrolyse lässt sich ebenfalls mechanistisch erklären - eine weitere Hilfe für die richtige Zuordnung der Isomeren der Zielverbindung.
- Ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd lassen sich alle Stereoisomere des 1-Phenylpropan-1,2-diols in hoher Ausbeute und optischer Reinheit mit Hilfe der Lyasen BFD und BAL sowie den Alkoholdehydrogenasen *Lb*-ADH und ADH-M darstellen.
- Die Enzymkinetik aller Komponenten, die an der Reduktionsreaktion zum Diol beteiligt sind, wurde bestimmt.
- Die Stabilität des reduzierten Cofaktors NADPH hängt im Wesentlichen vom pH-Wert ab. Die Pufferspezies spielt für die NADPH-Stabilität eine untergeordnete Rolle.
- Als NADPH-Regenerierungssystem ist das enzymgekoppelte System (mit FDH/Natriumformiat) dem substratgekoppelten System (*Lb*-ADH/2-Propanol) vorzuziehen.
- Bei der (2*S*)-HPP-Reduktion liegt eine gute Übereinstimmung zwischen dem Experiment und dem kinetischen Modell vor.
- Bei der Acetaldehyd-Reduktion liegt keine gute Übereinstimmung zwischen dem Experiment und dem kinetischen Modell vor.
- Anhand der Kinetik der FDH und *Lb*-ADH wurde ein Produktivitätsmaximum bei einem Enzymverhältnis von $[\text{FDH}]/[\textit{Lb}\text{-ADH}] = 1$ ermittelt.

5 Kontinuierliche Reduktionsversuche

5.1 Einleitung

Um die Multikatalysatorsysteme effektiv einsetzen zu können, wurde der in Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2 gezeigte Reaktoraufbau gewählt. Im ersten Enzym-Membran-Reaktor wird die BFD retentiert. Das gebildete (2*S*)-HPP und ein Überschuss an Acetaldehyd (100-300 mM) verlassen den Reaktor. Der Einsatz eines Überschusses an Acetaldehyd wird durch den hohen $K_{M:Acetaldehyd}$ -Wert von 175 mM für die BFD-katalysierten C-C-Bindungsknüpfung bedingt. Da Acetaldehyd auch ein Substrat der *Lb*-ADH ist, welches eine um den Faktor 19 höhere spezifische Aktivität (1138 U/mL) als (2*S*)-HPP (60 U/mL) bei vergleichbarem K_M -Wert aufweist, muss dieses zuvor abgetrennt werden. Zu diesem Zweck wurde eine kontinuierliche Extraktionsmethode mit Stickstoff in einem Phasenkontaktor gewählt. Die Verwendung einer günstigeren Druckluftquelle anstelle von Stickstoff kam aufgrund der Oxidationsneigung des 2-HPP zum Phenylpropandion nicht in Frage²⁰. Zu der wesentlich an Acetaldehyd und Benzaldehyd abgereicherten Reaktionslösung wird vor Eintritt in den zweiten Enzym-Membranreaktor NADP⁺ und Natriumformiat dosiert. Durch den späten Zusatz von NADP⁺ wird die Verweilzeit des Cofaktors im Reaktorsystem auf ein Minimum gehalten, und somit fallen Zerfallsprozesse des Cofaktors nicht ins Gewicht. Im zweiten Enzym-Membran-Reaktor wird die enantioselektive Reduktion der freien Oxo-Funktion durch die *Lb*-ADH katalysiert. Der Cofaktor wird mit der NADP-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* regeneriert.

Vorteilhaft am vorliegenden gekoppelten kontinuierlichen Betrieb ist die integrierte Aufarbeitung des Zwischenproduktes sowie die integrierte Abtrennung der Reaktorausläufe vom Katalysator. Weiterhin sind im Vergleich zu einem Batchverfahren höhere Raum-Zeit-Ausbeuten möglich. Sowohl bei der BFD- als auch bei der *Lb*-ADH-katalysierten Reaktion liegt ein desaktivierender Einfluss des Substrates vor. Bei hohen Umsätzen im EMR

²⁰ Farblose wässrige 2-HPP-Lösungen entwickeln binnen weniger Tage einen Gelbstich beim Stehen an der Luft. In geschlossenen Gefäßen wird dieser Prozess verzögert.

(Auslaufbedingungen) bleibt die Konzentration des Substrates niedrig, wodurch der desaktivierende Einfluß des jeweiligen Substrates minimiert wird.

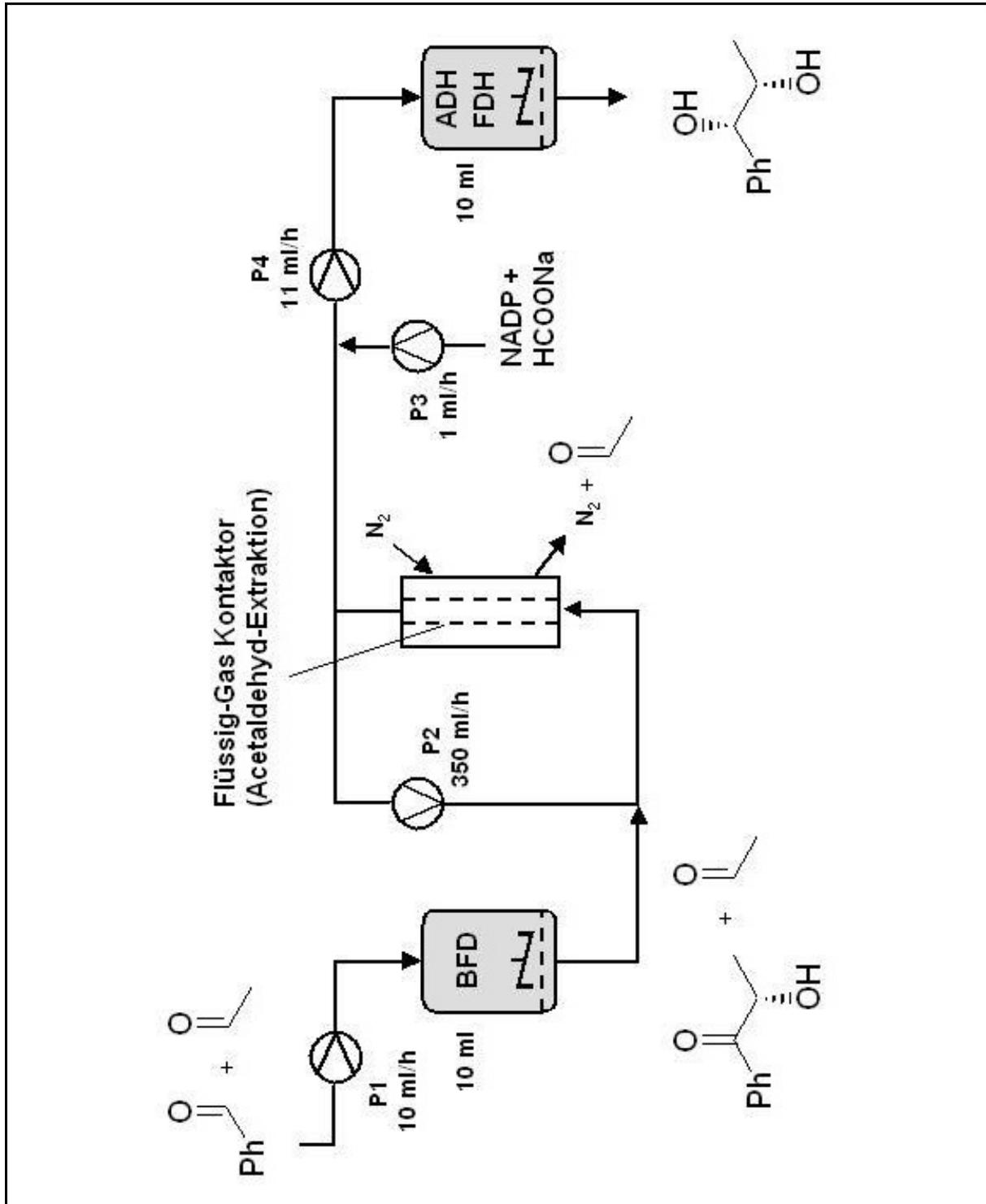


Abbildung 5-1: Schema des Reaktoraufbaus.

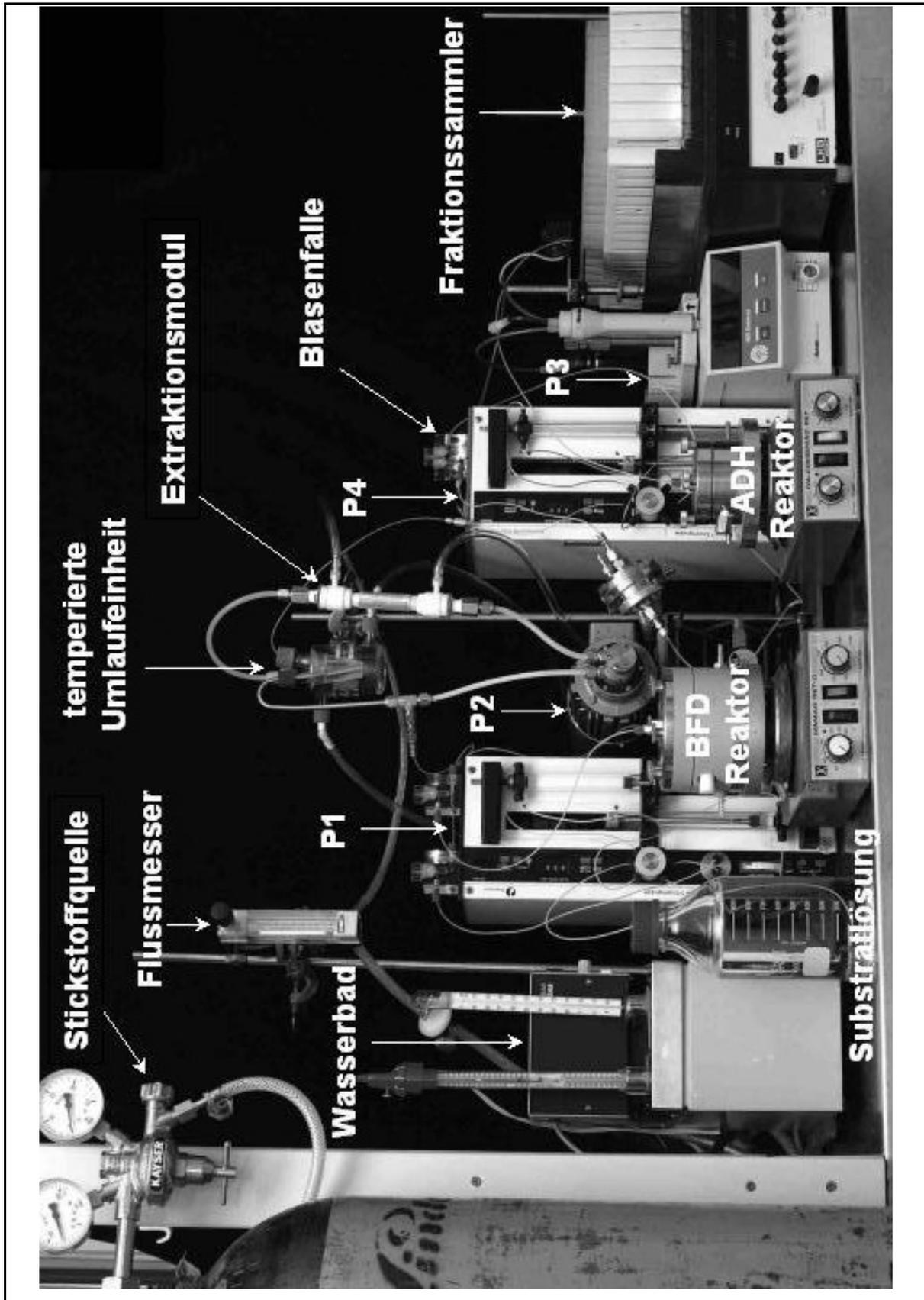


Abbildung 5-2: Bild des Reaktoraufbaus.

5.2 Kontinuierliche (2S)-Hydroxy-1-Phenylpropanon Reduktion

In einem Vorversuch zur kontinuierlichen Produktion von (1S,2S)-Diol wurde zunächst nur die kontinuierliche Synthese von (1S,2S)-Diol ausgehend von (2S)-HPP untersucht. Es galt einzuschätzen, inwieweit sich die Bedingungen aus Batch-Versuchen auf eine kontinuierliche Produktion übertragen lassen (Abschätzung der einzustellenden Enzym- und Cofaktormenge bei ausgewähltem Substratdurchsatz). So sollte ermittelt werden, welche Raum- Zeit-Ausbeuten bei der Diolproduktion zu erwarten sind. Die Diolproduktion sollte bei möglichst niedrigem Cofaktorverbrauch (hohe Werte für die ttn bezogen auf NADP) unter Verwendung einer Substrat- und Cofaktor-durchlässigen YM 10 Membran erfolgen. Im ersten Reaktorlauf wurde zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der aufgebauten Apparatur eine hohe Enzymmenge verwendet (1,6 U/mL FDH und 4,0 U/mL *Lb*-ADH). Im Reaktor wurde ein Verhältnis von 1:10 für die Cofaktor- / Substratkonzentration eingestellt (Abbildung 5-3). Die Verweilzeit der Substratlösung wurde anfänglich auf $\tau = 2$ h eingestellt und nach 19 h auf $\tau = 1$ h und schließlich nach 45 h Betriebszeit auf $\tau = 0,5$ h reduziert. Der Umsatz blieb ohne nachträgliche Enzymzugabe bis 59 h Betriebszeit (64 Verweilzeiten) auf einem hohen Niveau zwischen 94 und 100 %. Unter den gewählten Bedingungen betrug die zugehörige ttn 4,75; 9,50 bzw. 19,0. Der bis 37 h ermittelte de des gebildeten (1S,2S)-Diols betrug durchschnittlich 98,4 %. Die Raum-Zeit-Ausbeute für die drei eingestellten Verweilzeiten 2, 1 und 0,5 h betrug 19,2; 38,5 bzw. 76,9 g L⁻¹d⁻¹.

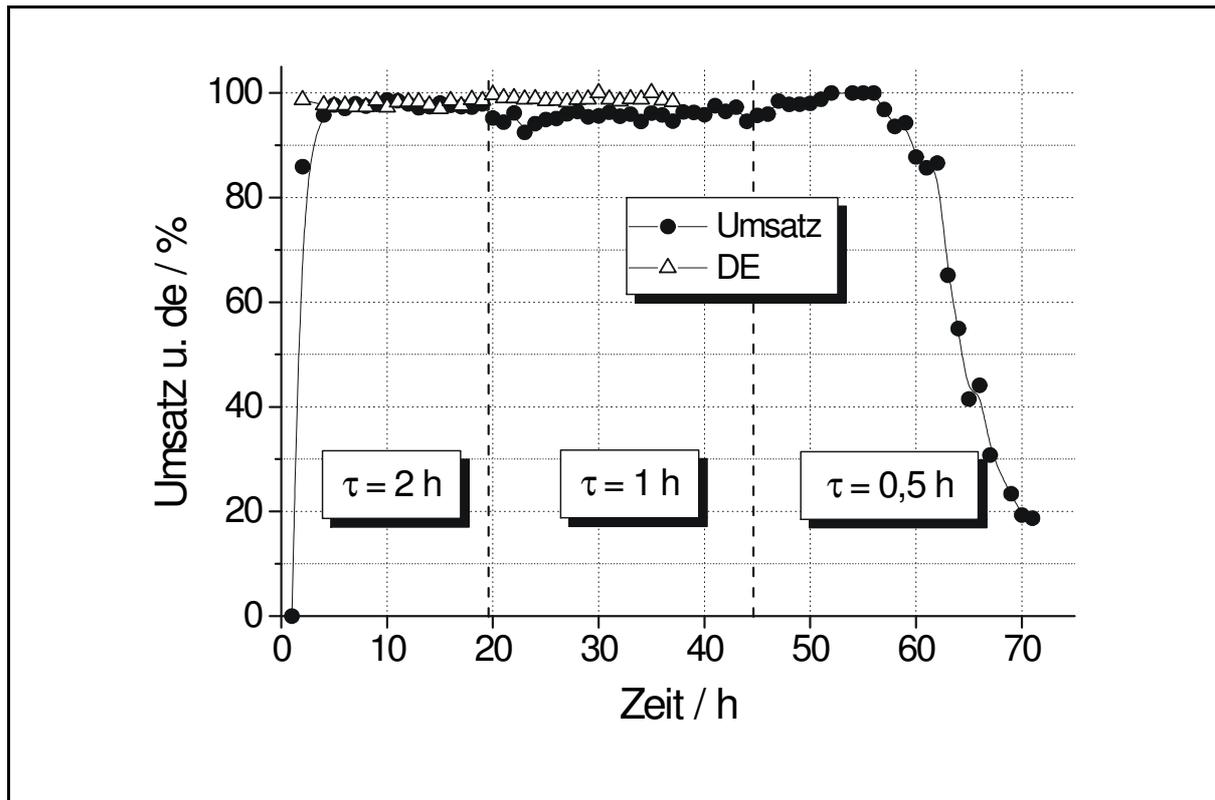


Abbildung 5-3: Kontinuierliche (2S)-HPP-Reduktion im 10 mL EMR mit YM 10 Membran.

Konzentration und Fluss der Stammlösungen: (2S)-HPP = 11 mM bei 5 bzw. 10 u. 20 mL/h; NADP = 11 mM bei 0,5 bzw. 1,0 u. 2,0 mL/h; HCOONa = 3 M bei 0,5, 1 u. 2 mL/h; T = 20 °C.

Eine Verbesserung der ttn wurde nachfolgend angestrebt. Zu diesem Zweck wurde das Verhältnis Cofaktor-/Substratkonzentration auf 1:100 im Reaktor eingestellt. Bis auf das geringere Verhältnis der Cofaktor-/Substratmenge lagen vergleichbare Bedingungen im Hinblick auf den ersten Reaktorlauf vor. Nach der Anlaufphase stellte sich ein Umsatz von 75 % ein. Der zugehörige ttn-Wert von 75 muss als Maximalwert für die eingesetzte Enzymmenge (3 U/mL FDH und 3 U/mL ADH) und der verwendeten YM 10 Membran betrachtet werden. Nur eine teilweise oder vollständige Aufhebung des vorliegenden cofaktorlimitierten Zustandes, z. B. durch Membranrückhaltung des Cofaktors [Ikemi, 1990; Ndietyky *et al.*, 1994; Ndietyky *et al.*, 1994], verspricht eine Aussicht auf Verbesserung der ttn.

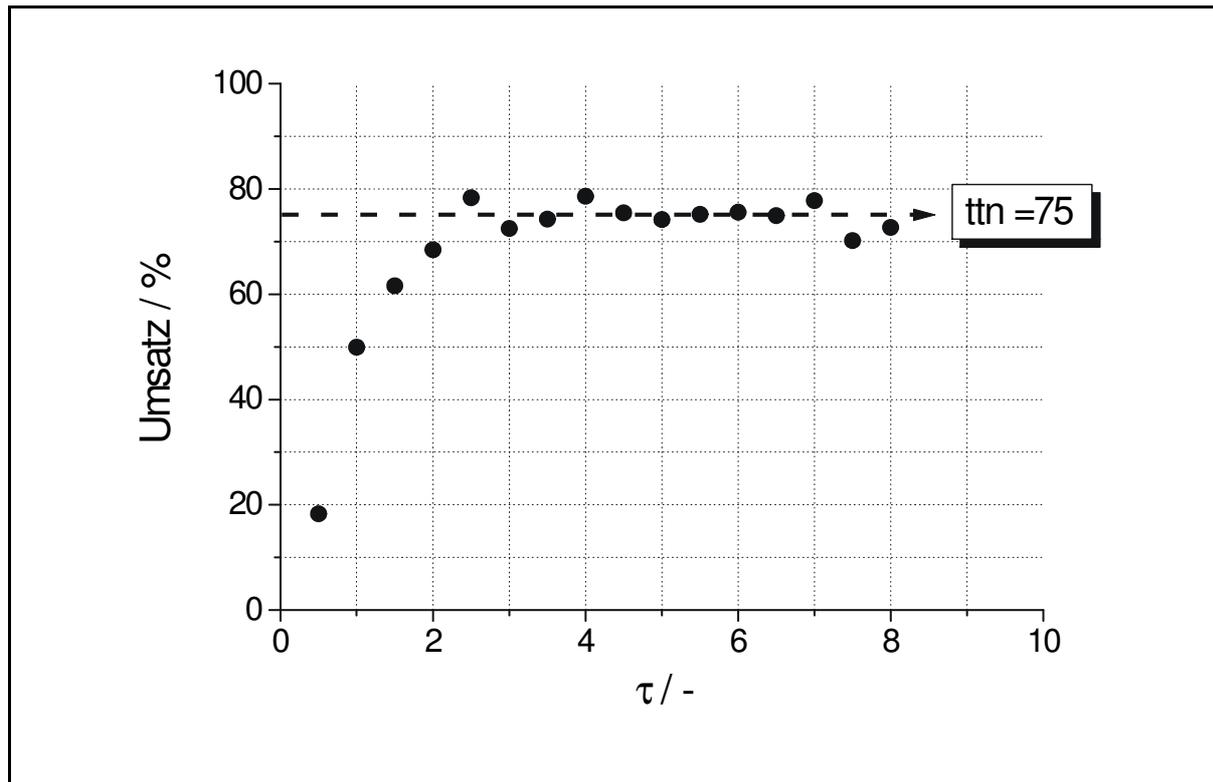


Abbildung 5-4: Kontinuierliche (2S)-HPP-Reduktion unter Cofaktorlimitierten Bedingungen.

Bedingungen: 10 mL EMR; Substratfluss = 10 mL/h; NADPH Feed = 0,1 mM; (2S)-HPP Feed = 8,91 mM; T = 25 °C; 50 mM KPi-Puffer; 3 U/mL *Lb*-ADH und 3 U/mL FDH im EMR.

Der Einsatz einer YC 05 Membran mit einer nominellen Molekulargewichtsausschlussgrenze (*cut-off*) von 500 Da sollte als Verbesserungsmöglichkeit untersucht werden. In Abbildung 5-5 sind theoretische Ausspülkurven in Abhängigkeit der Retention einer Membran vergleichend dargestellt. Im Idealfall sollte ein Retentionswert um 0,99 und höher vorliegen, um eine nennenswerte Rückhaltung der betrachteten Verbindung über mehrere Verweilzeiten zu gewährleisten. Nichtsdestoweniger, kann bereits ein geringer Retentionswert (z. B. ab 0,80) das Ausspülen einer Substanz verzögern. Im vorliegenden Fall stünde der Cofaktor dem System länger zur Verfügung.

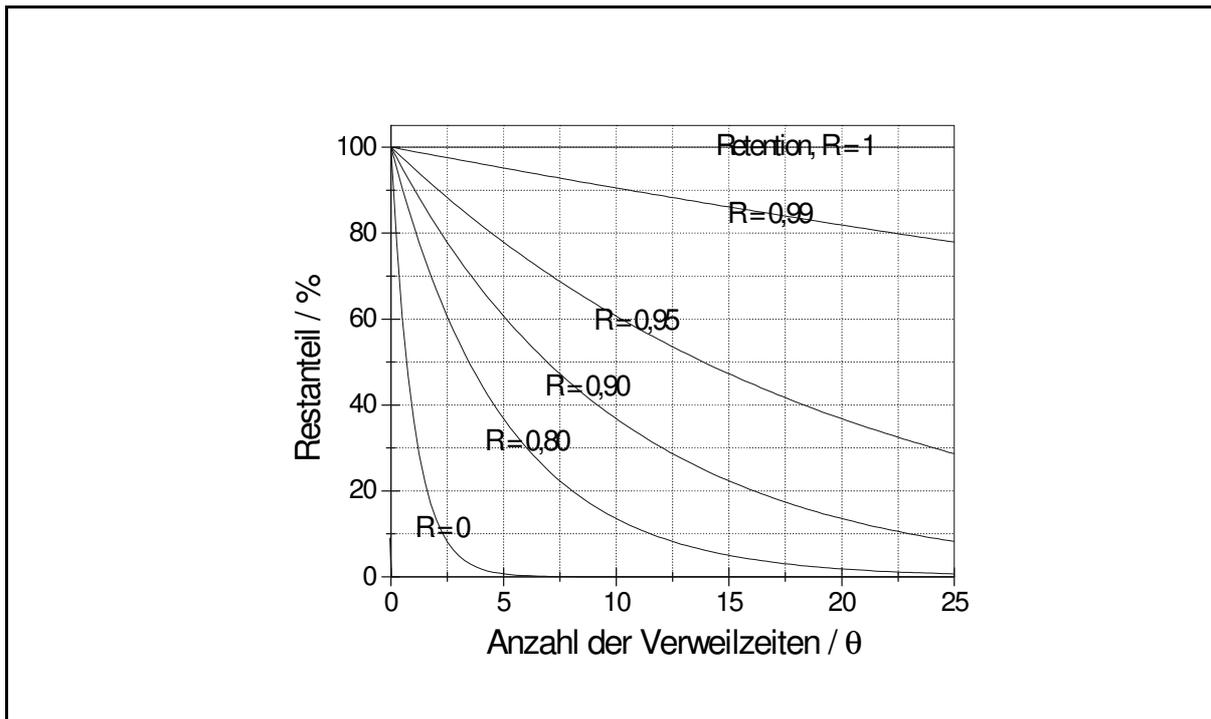


Abbildung 5-5: Vergleich der Ausspülkurven bei verschiedenen Retentionen.

Bei der YC 05 Membran handelt es sich um eine hydrophile Cellulose Acetat Membran mit der niedrigsten Ausschlussgrenze im Sortiment der Ultrafiltrationsmembranen der Firma *Millipore GmbH*²¹. Den Herstellerangaben zufolge, ist die Membran unter anderem für das Aufkonzentrieren niedermolekularer Peptide, Kohlenhydrate und Nukleotide in wässriger Lösung geeignet. Um das tatsächliche Retentionsverhalten der Membran bezogen auf NADP(H) zu untersuchen, wurde die in Abbildung 5-6 schematisch dargestellten Apparatur zur Retentionsmessung bei stationärem Gleichgewicht aufgebaut. Die YC 05 Membran wurde in einen 10 mL Membranreaktor eingebaut. Ein Kreislauf bestehend aus Pumpe, Blasenfalle mit Septum, Membranreaktor und Schlauchverbindungen wurde aufgebaut, in dem 30 mL Pufferlösung zirkulierten. Über die Blasenfalle wurde eine einmalige NADPH Dosierung vorgenommen. Über einen Zeitraum von 27 h (27 Zyklen) wurde die NADPH-Konzentration auf der Retentat- und Permeatseite der Membran verfolgt.

21 (Millipore Katalog 2003, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach, Deutschland)

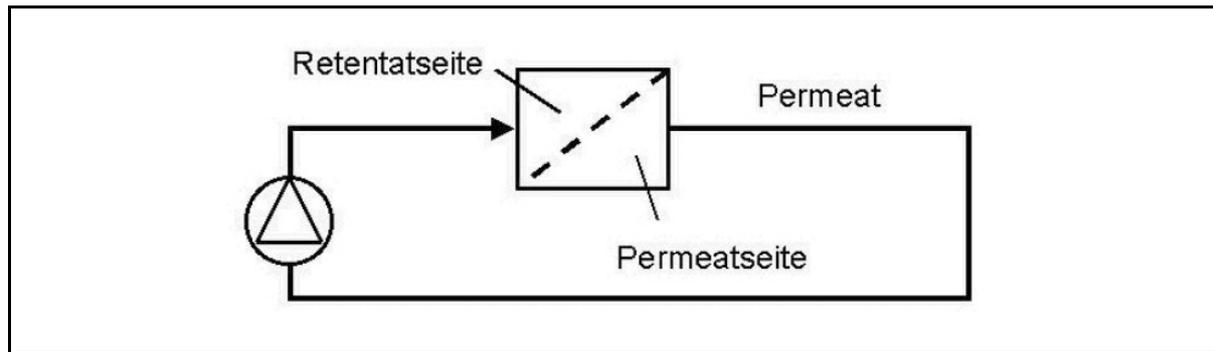


Abbildung 5-6: Schematisch Darstellung der Retentionsmessung.

Im Laufe mehrerer Zyklen stellt sich allmählich ein Gleichgewicht ein, bei dem die NADPH-Konzentration in der Retentat- bzw. Permeatseite konstant bleibt. In diesem Fall ist der NADPH-Stoffmengenfluss durch die Membran gleich dem Stoffmengenfluss in die Retentatseite. Die Retention lässt sich dann mit der folgenden Formel bestimmen:

$$R = 1 - \frac{c_{Permeat}}{c_{Retentat}} \quad \text{Gleichung 5-1}$$

mit R = Retention

$c_{Permeat}$ = Konzentration des Permeats in mol/L

$c_{Retentat}$ = Konzentration des Retentats in mol/L

Aufgrund der geringen Halbwertszeit des Cofaktors von ca. 13 Stunden musste auf eine längere Betriebszeit und damit eine zuverlässigere Bestimmung der Retention verzichtet werden. Ferner wurde eine höhere Flussrate gewählt, als später für einen Produktionslauf geplant wäre, um eine ausreichende Zyklenzahl für eine Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten. Abbildung 5-7 zeigt drei Messzeiten, bei denen die Retention nach Gleichung Gleichung 5-1 bestimmt wurde. Die nach 7, 13 und 26 Verweilzeiten bestimmte Retentionen von jeweils 0,99; 0,99 und 0,94 deuteten auf einen akzeptablen Wert für die Reduktion in einem kontinuierlich betriebenen EMR hin. Die Erfolg versprechenden Retentionswerte der YC05-Membran gaben Anlass zur Durchführung eines kontinuierlichen Reduktionsversuches mit derselben. Abbildung 5-8 zeigt den Umsatz-Zeit-Verlauf bei Dosierungen des Cofaktors in periodischen Pulsen in Zusammenhang mit einer konstanten Grunddosierung. Die konstante Grunddosierung von 0,01 mM NADP wurde ab 50 h auf 0,02 erhöht und ab 76 h auf 0,06 mM erhöht. Die überlagerten 0,2 mM NADP Pulse sorgten

für einen Umsatzanstieg, der - bis auf den letzten Puls - binnen 24 h auf den Ausgangswert zurückging.

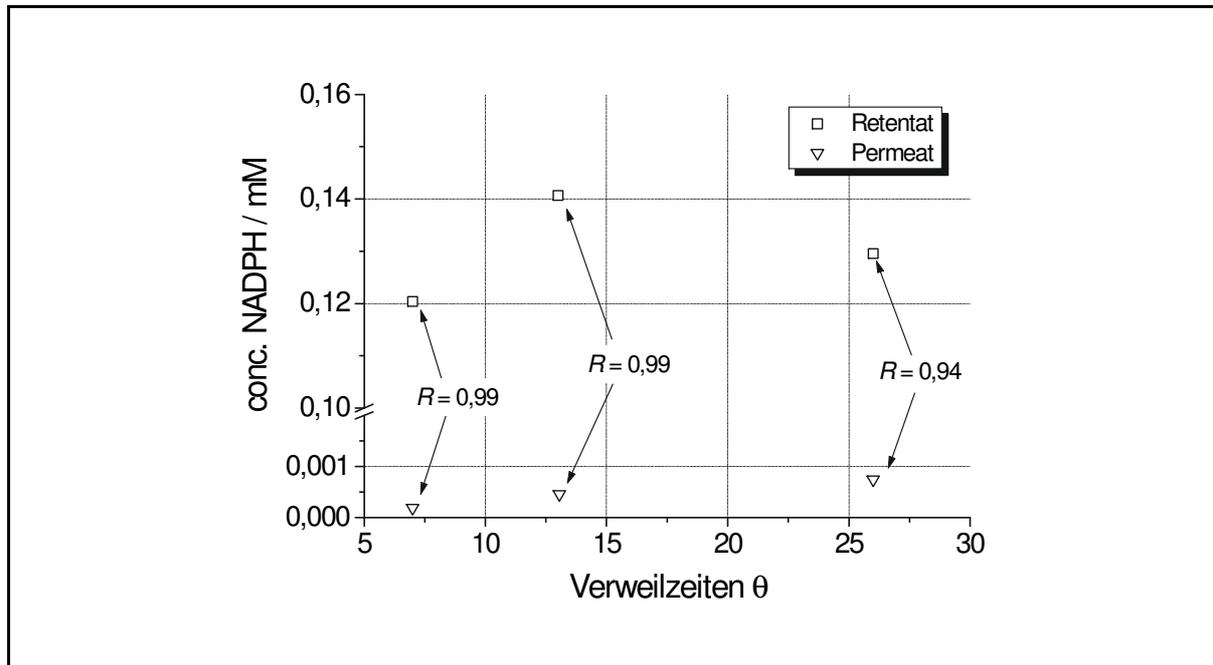


Abbildung 5-7: Retentionsmessung einer YC05-Membran.

Bedingungen: 10 mL Edelstahl EMR; Fluss = 40 mL/h; Temp. = 25 °C;
YC05 Membran vorbelegt mit 60 mg BSA; Druck = 7,0-9,7 bar.

Verglichen mit den theoretischen Ausspülkurven in Abbildung 5.5 müsste im vorliegenden Experiment von einer Retention um $R = 0,8$ ausgegangen werden. Aus dem Umsatz und der eingesetzten Cofaktormenge berechnet sich die t_{tn} über alle Verweilzeiten zu 118. Im Bereich des annähernd konstanten Umsatzes (nach dem letzten NADP Puls) berechnet sich die t_{tn} zu 91. Unter der Annahme weiterer Umsatzkonstanz ab 120 h würde sich die t_{tn} einem Wert von 100 nähern.

Der beschriebene Einsatz der YC05 Membran stellt einen Ansatz zur Verbesserung der t_{tn} mit cofaktorrückhaltender Membranen in Aussicht. Aus zeitlichen Gründen wurden jedoch die nachfolgend beschriebenen gekoppelten Reaktoransätze mit einer YM10-Membran durchgeführt.

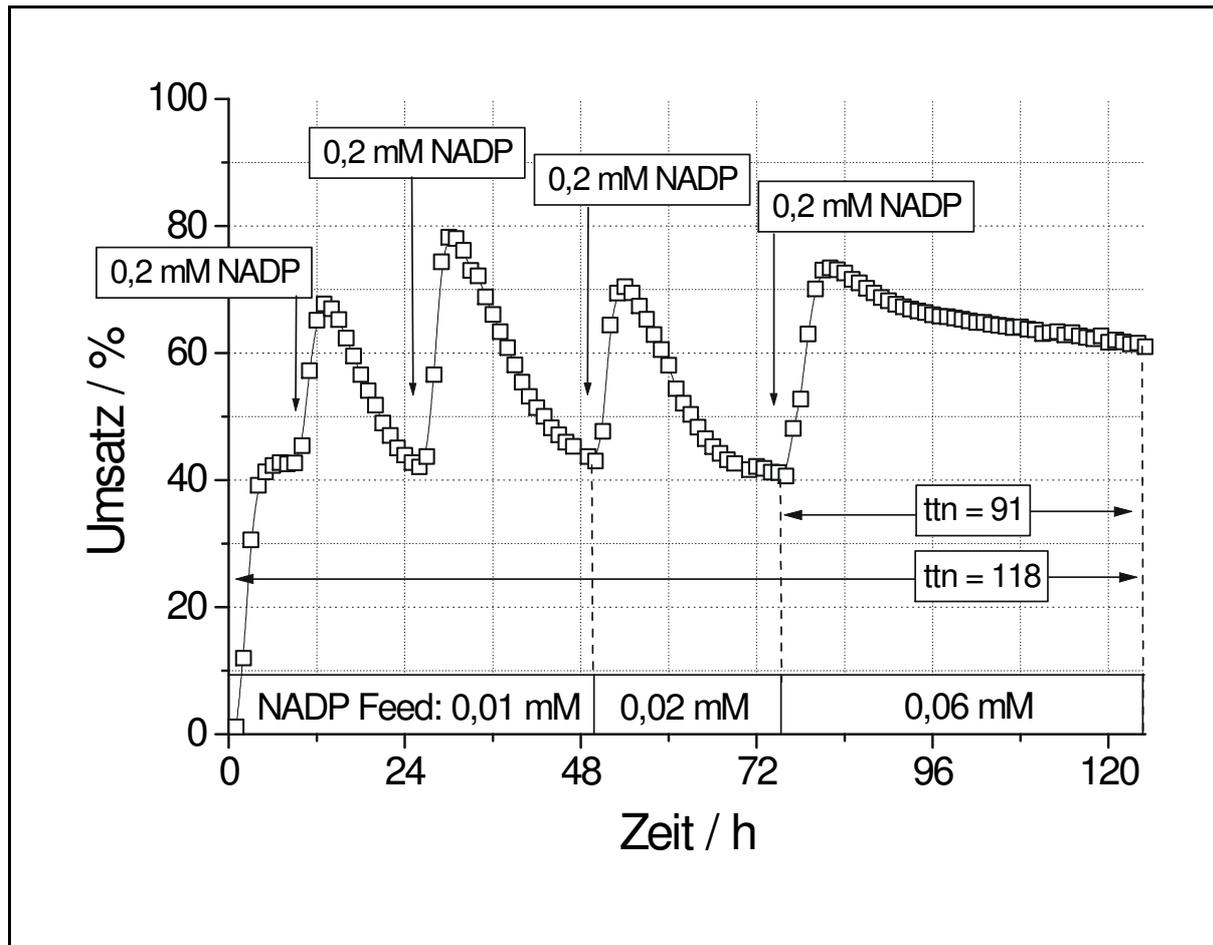


Abbildung 5-8: Kontinuierliche Reduktion im EMR mit cofaktorrückhaltender YC05-Membran.

Bedingungen: 10 mL YC05-Membran-Reaktor; Fluss = 10 mL/h; 10 mM (2S)-HPP; 300 mM Na-Formiat; 50 mM KPi-Puffer; pH 7,0; T = 25 °C; 0,5 mM ThDP; 2,5 mM MgSO₄; 10,1 U/mL ADH; 3,8 U/mL FDH.

5.3 Extraktionsmöglichkeiten für Acetaldehyd

5.3.1 Physikalische Methoden

Die Liqui-Cell-Membran-Kontaktoren ermöglichen es, flüchtige Stoffe von einem wässrigen Strom zu entfernen oder darin dispersionsfrei aufzulösen. Die Hohlfasermembran in dem Hohlfasermodule ist wasserabstoßend (hydrophob). Somit kann die wässrige Phase unter moderaten Überdruckbedingungen nicht durch die Poren dringen. Durch Anlegen eines etwas höheren Drucks an den wässrigen Strom relativ zum Gasstrom, kann die Gas-Flüssigkeits-Grenzfläche in den Poren fixiert werden. An dieser Grenzfläche findet der Stoffaustausch gelöster Substanzen zwischen Flüssig- und Gasphase statt. Vorteilhaft bei diesem Verfahren, im Gegensatz zu anderen konventionellen dispersiven Methoden wie z. B. gepackten Kolonnen, ist die konstante Grenzfläche über einen sehr breiten Bereich der Durchflussraten. Ferner ließe sich eine Systemvergrößerung anhand angegebener Porenflächen unterschiedlicher Modulgrößen besser berechnen. Schließlich ermöglicht die Beschaffenheit sowie die Anordnung der Holfasern in dem Modul ein großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, wodurch die Abmessung eines Membran-Kontaktor-Systems für eine vorgegebene Leistung gering gehalten werden kann. Prinzipiell sollte kein konvektiver Fluss durch die Poren vorliegen, wie es bei anderen Membranverfahren der Fall ist. Vielmehr muss die Membran als Grenzflächenstabilisator betrachtet werden, die die flüssige Phase und die Gasphase in direkten dispersionslosen Kontakt miteinander bringt. Der Stofftransport zwischen den beiden Phasen wird vom Partialdruck der Gasphase und der wässrigen Phase bestimmt. Für die Extraktion von Stoffen wird ein Vakuum oder ein Strip-Gasstrom oder beides (siehe Anhang) in der Lumenseite (für mini-Modul in der Außenseite) der Hohlfaser angelegt. Der wässrige Strom liegt an der Außenseite (für mini-Modul in der Lumenseite) der Hohlfaser. Der Partialdruck des Gases wird herabgesetzt, um das in der wässrigen Phase gelöste Gas zu entfernen (Abbildung 5-9). In Extraktionsversuchen mit dem Liqui-Cel-Modul, wie in Abbildung 5.10 dargestellt, konnte eine selektive Extraktion von Acetaldehyd und Benzaldehyd in Gegenwart von (2S)-HPP erreicht werden. Bei einer Verweilzeit von 3 h in der Extraktionseinheit wurde ein Restanteil von 100 % 2-Hydroxypropiophenon, 24 % Benzaldehyd und 4 % Acetaldehyd gefunden. Um eine nahezu vollständige Entfernung des Acetaldehyds innerhalb von 2 h zu erreichen, wurde aus

Einzelmessungen mit Hilfe einer Musterlösung aus den zuletzt genannten Komponenten eine Mindestflussrate von 30 L/h für den

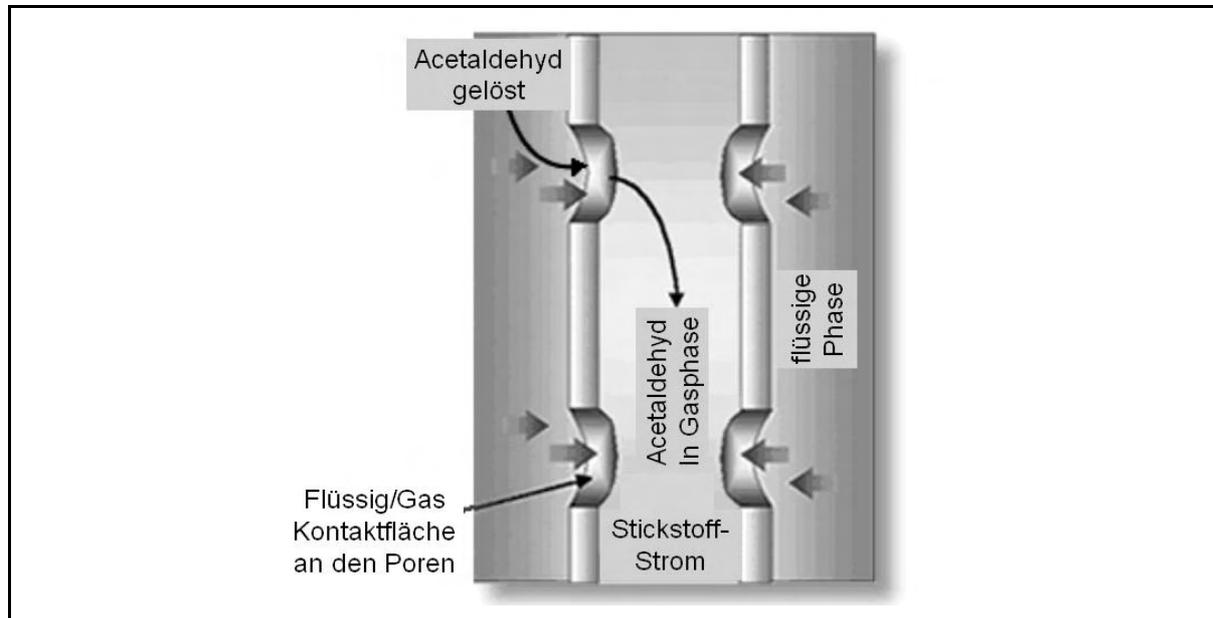


Abbildung 5-9: Funktionsprinzip des Liqui-Cel-Extraktionsmoduls

Stickstoffstrom und ein Mindestumlaufstrom der wässrigen Phase von 150 mL/min ermittelt. Wie sich im späteren Prozessbetrieb herausstellte, wurden die in den Vorversuchen bestimmten Extraktionsleistungen nicht erreicht. Für Acetaldehyd stellten sich Extraktionswerte von durchschnittlich 25 % (Restanteil) ein anstelle der in den Vorversuchen erreichten 4 %. Dies gab Anlass, nach Alternativen zur Membranmodul gestützten Extraktion zu suchen. Es folgte der Versuch einer destillativen Extraktion mit einer herkömmlichen Rotationsverdampfer-Apparatur. Wie in Abbildung 5-11 dargestellt, konnte unter Verwendung einer großen Fläche (1L-Kolben bei maximaler Umdrehungszahl) und einer geringen Menge an Produktgemischlösung (10 mL) eine der Modulextraktion vergleichbaren Extraktionsleistung und Selektivität erreicht werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die destillative Extraktion die robustere Methode wäre.

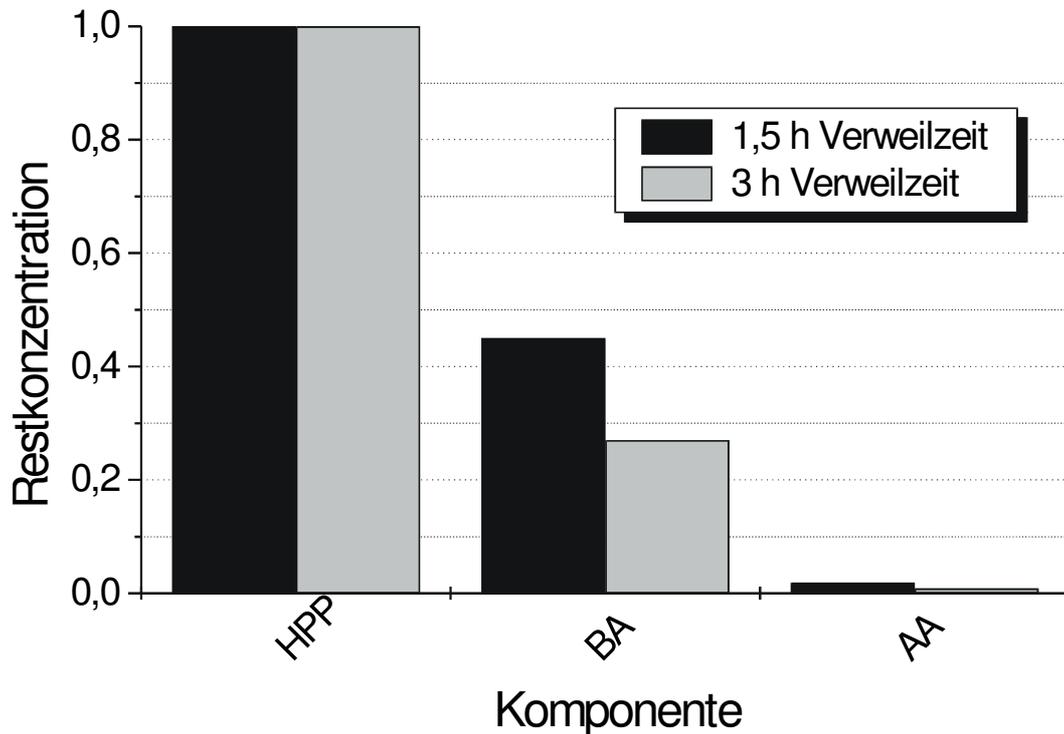
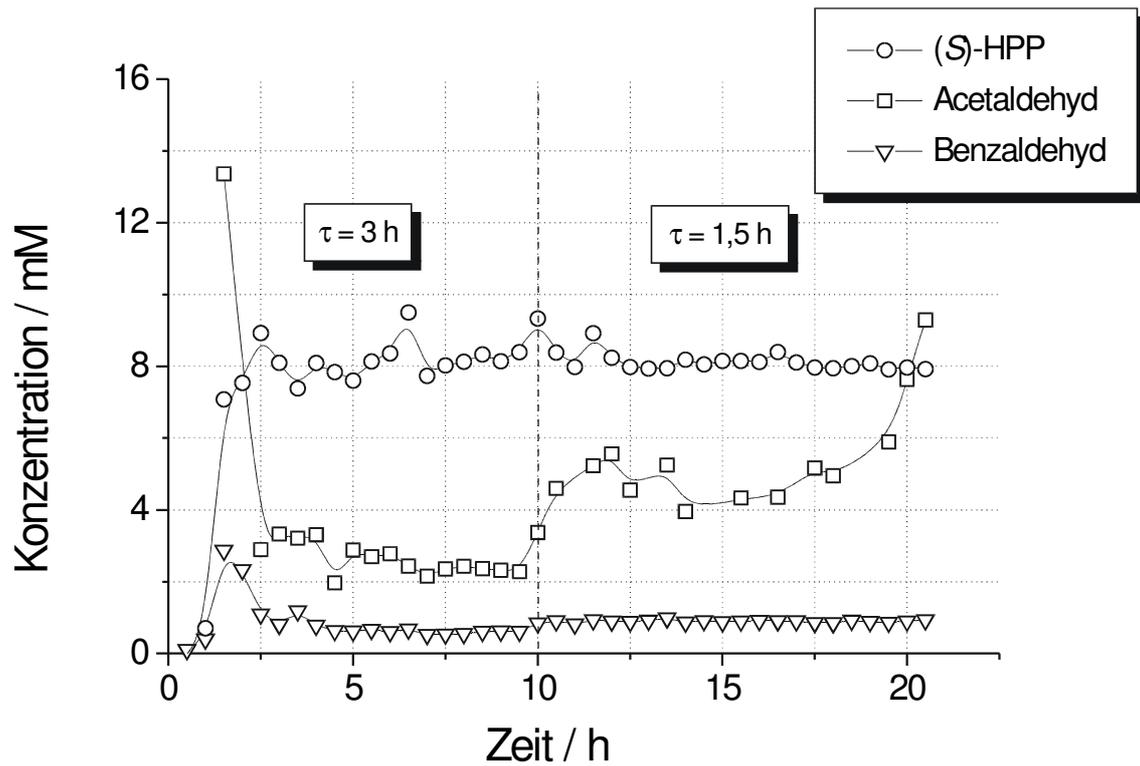


Abbildung 5-10: Extraktionsleistung des Liqui-Cel-Moduls; Anfangskonzentrationen.

Bedingungen: 8 mM (2S)-HPP; 2 mM Benzaldehyd und 162 mM Acetaldehyd; 37 °C; 50 mM KPi-Puffer pH 7; N₂-Fluss = 0,5 L/min; Umlauf = 350 mL/min.

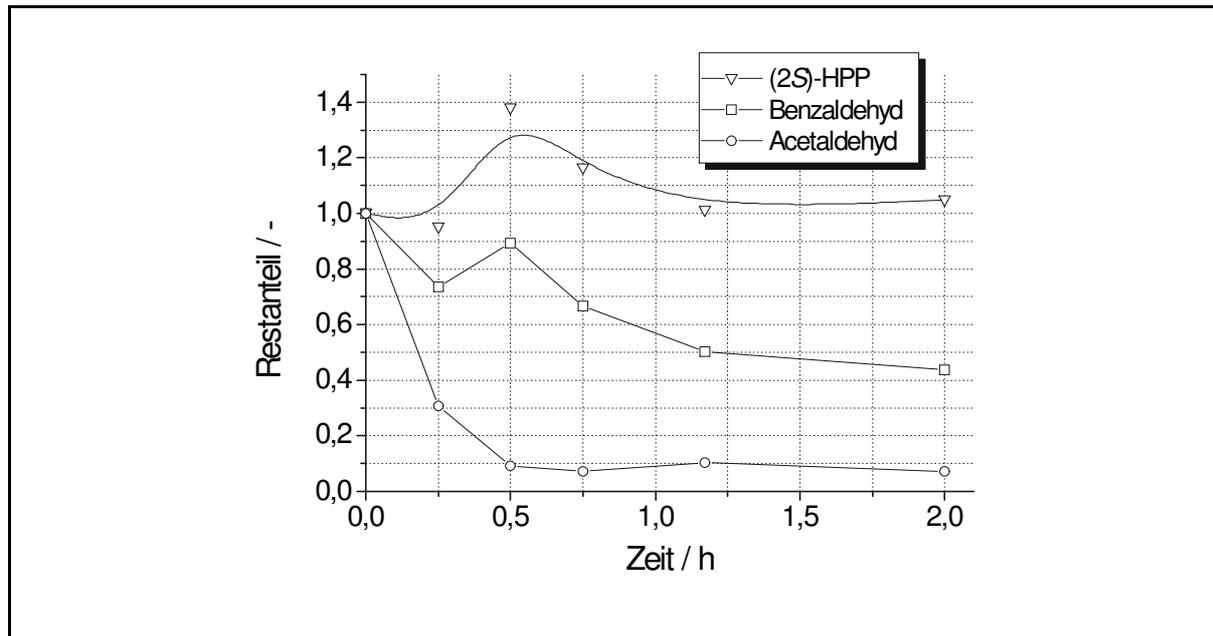


Abbildung 5-11: Destillative Extraktion.

Bedingungen: 11,7 mM (2S)-HPP; 4 mM Benzaldehyd und 250 mM Acetaldehyd; 50 mM KPi-Puffer pH 7; T = 40 °C; Druck = 130 mbar.

5.3.2 Chemische Methoden

Mögliche chemische Methoden der Acetaldehyd-Entfernung könnten auf der Derivatisierung des Acetaldehyds beruhen, wie sie auch für die qualitative und quantitative Analyse von Aldehyden durchgeführt wird [Shriner *et al.*, 1964]. Als Beispiel sei hier die Umsetzung des Acetaldehyds zum 2,4-Dinitrophenylhydrazon, Semicarbazon, Oxim oder Kondensation mit Dimedon oder SO₂ [Lea *et al.*, 2000] zu nennen. Problematisch sind jedoch die für Enzyme unverträglichen Derivatisierungsbedingungen sowie der Eintrag von Verunreinigungen in das Reaktionssystem. Vielversprechend erschien die Verwendung von SO₂, das mehr als 99 % Acetaldehyd (z. B. in Wein) bindet [Lea *et al.*, 2000; Würdig, 1989]. Schwefeldioxid kann in Form der käuflich erhältlichen schwefligen Säure eingesetzt werden. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass tatsächlich sämtliche Spuren von Acetaldehyd durch Komplexierung an SO₂ gebunden werden. Zudem ist die *Lb*-ADH unter den Bedingungen der Komplexbildung stabil. Stabilitätsuntersuchungen mit der FDH führten jedoch zu deren sofortiger Desaktivierung.

5.4 Gekoppelte kontinuierliche Produktionsversuche

Im ersten gekoppelten Reaktorversuch wurde eine NADPH- Konzentration im ADH/FDH-Reaktor von 1 mM eingestellt, um zunächst eine Cofaktorlimitierung zu vermeiden. Bei einer Verweilzeit von 1 h konnte das (1*S*,2*S*)-Diol bei einem durchschnittlichen Umsatz im ADH/FDH-Reaktor von 80 % und mit einem d_e von 90 % und einer Raum- Zeit-Ausbeute von $30 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ produziert werden (Abbildung 5.12). Der d_e -Wert von 90 % resultiert aus einer Enantioselektivität von 92 % für die Bildung des intermediären (2*S*)-HPP und 98 % für die Diastereoselektivität der Reduktion. Die Acetaldehydkonzentration wurde mit Hilfe eines Extraktionsmoduls auf durchschnittlich 25 % des eingesetzten Wertes (von 200 auf 50 mM Acetaldehyd) herabgesetzt. Der Umsatz aus dem 1. Reaktor wurde durch regelmäßige Enzymdosierung zwischen 70 und 95 % gehalten²². Der Fluss durch den 10 mL EMR betrug 10 mL/h (10 mM Benzaldehyd, 200 mM Acetaldehydstammlösung). Der Fluss durch den 2. Reaktor betrug 10 mL/h und der Zufluss des Cofaktors 1 mL/h (10 mM NADP Stammlösung). Im Durchschnitt ist demnach 1 mL Flüssigkeit pro Stunde im Umlaufmodul verloren gegangen, was jedoch nicht nachteilig ist - höhere Substratkonzentrationen können z. B. durch höhere Enzymmengen im Reduktionsreaktor begegnet werden. Im zweiten gekoppelten-Reaktorversuch wurde eine NADP- Konzentration im ADH/FDH- Reaktor von 0,1 mM eingestellt. Somit wäre eine maximale theoretische ttn (bezogen auf NADP für das Produkt) von 100 bei vollständigem Umsatz zu erwarten. Tatsächlich erreichte der Umsatz im ADH/FDH-Reaktor lediglich einen Maximalwert von 42 %. Bezogen auf das Produkt, welches eine durchschnittliche Konzentration von 3,32 mM zwischen 25 und 52 h aufweist resultiert eine ttn (NADP) von 33,2. Der Wert von 33,2 entspricht 44 % dessen, was mit einer YM10-Membran maximal zu erwarten wäre. Die Ursache des niedrigen ttn für NADP ist primär in der unzureichenden Extraktion von Acetaldehyd zu suchen. Im Gegensatz zu den Voruntersuchungen mit dem Extraktionsmodul wird der Acetaldehydgehalt von 250 mM auf nur 37-50 mM (ca. 20 %) und nicht bis auf 4 % reduziert. Somit steht der Cofaktor nicht ausschließlich der Hauptreaktion zur Verfügung, sondern auch der Reduktion des unerwünschten Acetaldehyds. Folglich enthält der Auslauf des ADH/FDH-Reaktors durchschnittlich 31 mM nicht umgesetzten Acetaldehyds und 9,6 mM Ethanol. Weiterhin wurden noch durchschnittlich 1,5 mM Benzaldehyd im Auslauf gefunden.

²² Da es sich um einen Vorversuch gehandelt hat, um das Zusammenspiel aller Reaktorkomponenten unter Produktionsbedingungen zu testen, wurde auf eine regelmäßige Probennahme des BFD- und Umlaufreaktors verzichtet.

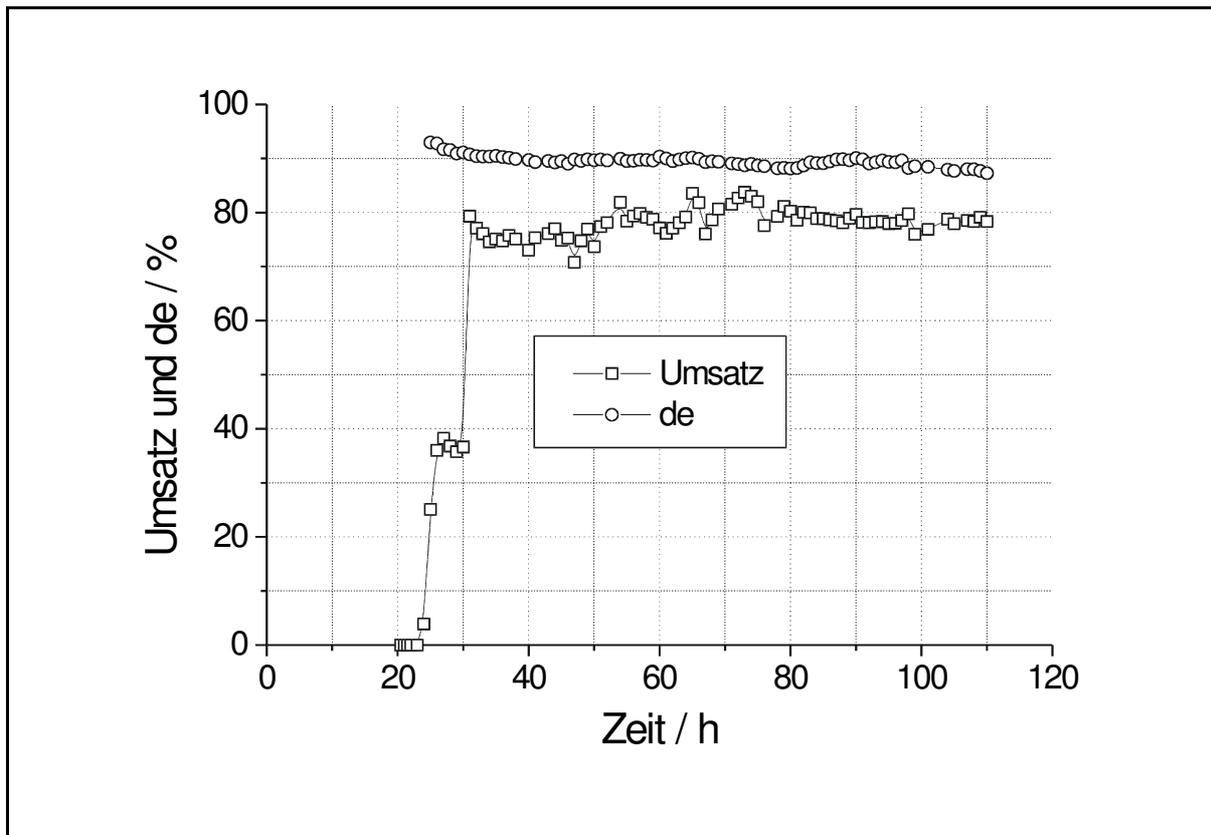


Abbildung 5-12: Erster gekoppelter Reaktorlauf.

BFD-Reaktoreinlauf: 11 mM Benzaldehyd, 150 mM Acetaldehyd, $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Fluss = 10 mL/min; Umlaufeinheit: N_2 -Fluss = 1 L/min; 350; $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$; ADH/FDH-Reaktor: $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$; YM-10 Membran.

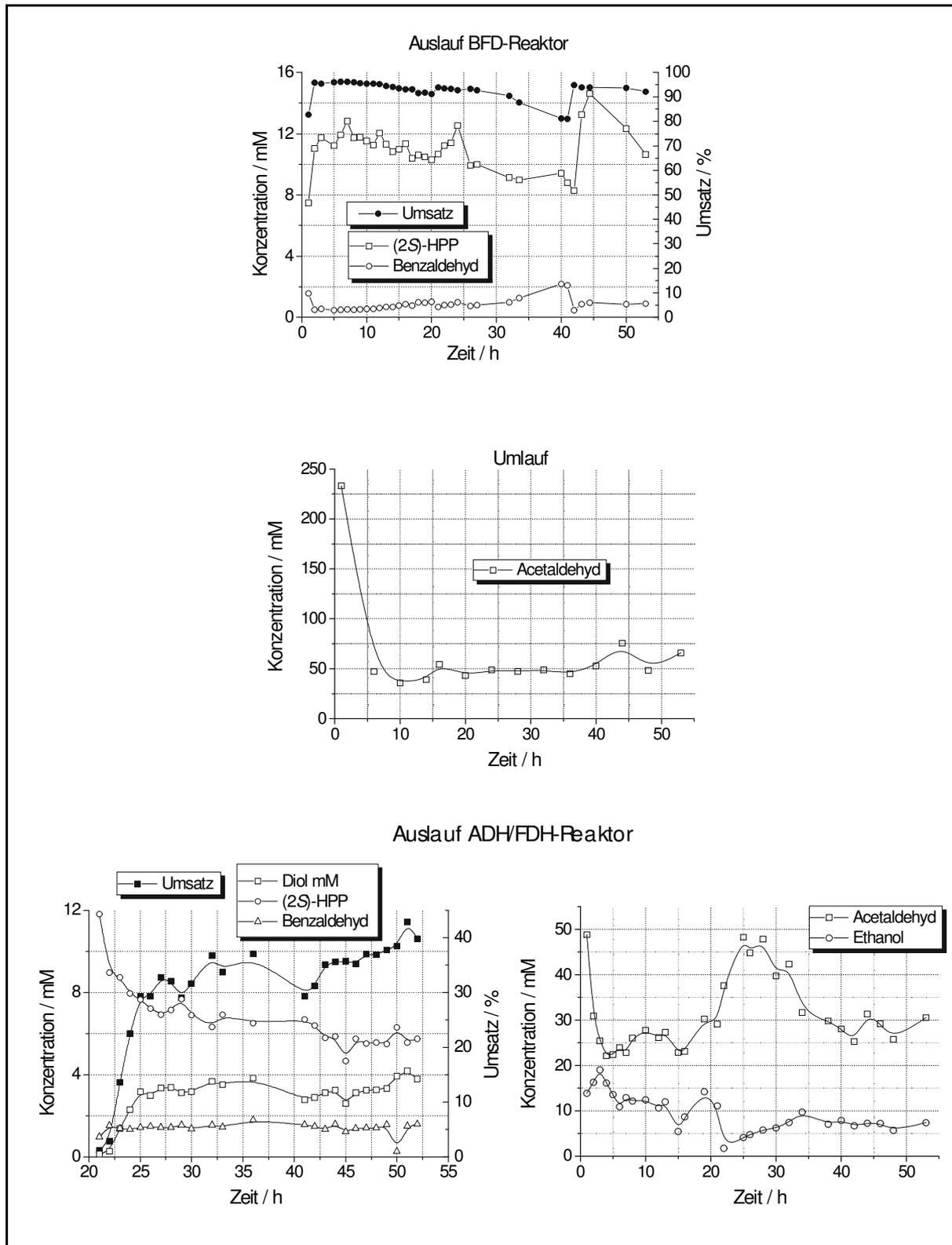


Abbildung 5-13: Zweiter gekoppelter Reaktorlauf.

BFD-Reaktoreinlauf: 12 mM Benzaldehyd, 250 mM Acetaldehyd, $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Fluss = 10 mL/h, YM-10 Membran; Umlaufeinheit: N_2 -Fluss = 60 L/h; wässrig = 350 mL/min; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; ADH/FDH-Reaktor: 2 U/mL FDH; 1 U/mL *Lb*-ADH; $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$; Fluss = 10 mL/h; YM-10 Membran.

In Bezug auf den ADH/FDH-Reaktor zeigt der Vergleich des Experiments mit dem Modell eine gute Übereinstimmung (Abbildung 5-14). Im Anhang ist das in *Scientist* eingegebene Modell abgebildet. Wird von einer vollständigen Acetaldehyd-Extraktion ausgegangen (Acetaldehydkonzentration im ADH/FDH-Reaktor = 0), so liegt der Umsatz von 82 % in einem Bereich, der dem im Einzelexperiment in Abbildung 5.4 ermittelten Wert von 75 % sehr nahe kommt. Unter der Maßgabe eine ttn von mindestens 1000 zu erreichen, um einen wirtschaftlichen, kontinuierlichen, technischen Betrieb zu gewährleisten, müsste die Enzymmenge um den Faktor 10 erhöht werden (30 U/mL anstatt 3 U/mL). Die hohe Proteinkonzentration bei dieser Aktivität - wie im gelartigen Rohextrakt der *Lb*-ADH - würde jedoch zu einer Membranverstopfung führen und könnte auch Löslichkeitsprobleme hervorrufen. Praktikabler erscheint deshalb eine Verweilzeiterhöhung um den Faktor 10 (Erhöhung von 1 auf 10 h), um einen ttn Anstieg auf 1000 zu erzielen. An dieser Stelle wird deutlich, dass der kontinuierliche Betrieb im Vergleich zum Batch nur dann zu einer sinnvollen Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute führt, falls Maßnahmen ergriffen werden können, die akzeptable Durchflußraten (ca. 1 Stunde und weniger) und gleichzeitig hohe Cyclenzahlen bezüglich des Cofaktors erlauben. Eine höhere Reduktionsaktivität verbunden mit niedrigeren K_M -Werten für Cofaktor und Substrat hätten den gleichen Effekt.

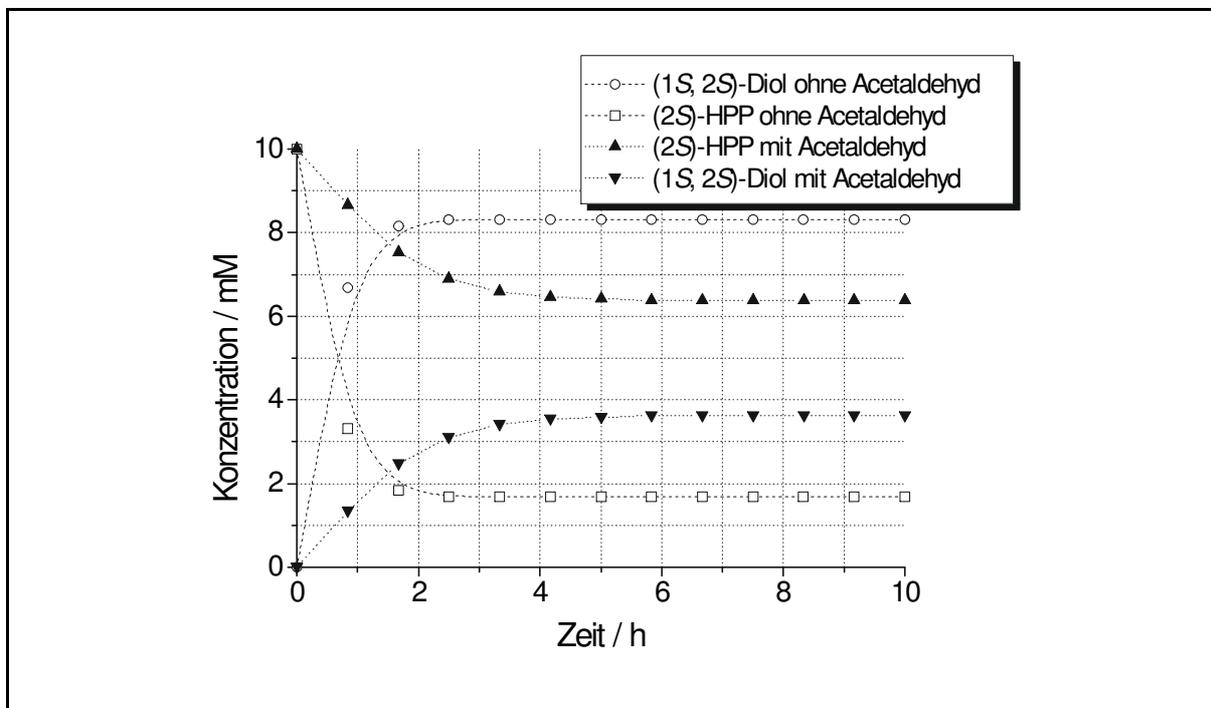


Abbildung 5-14: EMR-Simulation mit und ohne Acetaldehyd-Restkonzentration.
 Simulationsbedingungen: 2 U/mL FDH; 1 U/mL *Lb*-ADH; 10 mM (2S)-HPP; 300 mM NaCOOH; 50 mM Acetaldehyd (gefüllte Datenpunkte); NADPH = 0,1 mM; τ = 60 min.

5.5 Kapitelzusammenfassung

- Ein Prozessaufbau für die kontinuierlich Produktion von (1*S*,2*S*)-Diol ausgehend von Benzaldehyd und Acetaldehyd konnte realisiert werden.
- Exemplarisch wurde demonstriert, wie unter Verwendung einer Cofaktorretentierenden Membran (z.B. YC05-Membran) die ttn bezüglich des Cofaktors erhöht werden kann.
- Ansatzweise wurde gezeigt, dass neben der Verwendung eines Extraktionsmoduls für die intermediäre Aldehydextraktion eine destillative Extraktion ebenfalls in Frage käme.
- Vorteilhaft am vorliegenden gekoppelten kontinuierlichen Betrieb sind das Fehlen einer zwischengeschalteten Aufarbeitung sowie der proteinfreie Auslauf.
- Anhand der im Kapitel 4 ermittelten Kinetik ist eine Beschreibung des Umsatzverlaufs für beide Teilreaktionen im EMR in Gegenwart und ohne Acetaldehyd möglich.

6 Diskussion und Ausblick

Eine Diskussion der Ergebnisse wurde bereits in den einzelnen Kapiteln vorgenommen. Hier soll eine übergreifende Diskussion der Ergebnisse stattfinden und Perspektiven sollen aufgezeigt werden.

6.1 Substratspektrum der Enzyme

Der Versuch das Substratspektrum der *Lb*-ADH auf substituierte α -Hydroxyketone (F-, Cl-, Br-, Methoxy-) auszudehnen war bis auf geringe Umsätze mit 4-Fluor-1-phenyl-2-hydroxy-propanon wenig erfolgreich - vermutlich eine Folge des erhöhten sterischen Anspruchs der Substituenten. Dennoch kann Angesichts der Vielfalt der noch nicht gescreenten ADHs nicht ausgeschlossen werden, dass ein Substrat-Katalysator-Paar für substituierte α -Hydroxyketone existiert. Somit wäre eine Folgechemie durch Kettenverlängerung am substituierten Phenylring gegeben.

Positiv ist der Reduktionsversuch des in technischer Qualität (im Wesentlichen mit Benzylalkohol verunreinigt) vorliegenden (*R*)-PAC²³ zum (*1R,2R*)-Diol verlaufen. Somit könnte - zumindest für das (*1R,2R*)-Diol-Isomer - die (noch) teure ADH-M im Schema der Syntheseroute ersetzt werden. Vermutlich ist die *Lb*-ADH auch in der Lage das (*S*)-PAC umzusetzen²⁴, was eine Ergänzung der Werkzeuge für die vorliegende Syntheseroute darstellen würde.

Nachteilig am vorliegenden Baukastensystem ist das eingeschränkte Spektrum der in Frage kommenden Akzeptoraldehyde für die C-C-Bindungsknüpfung. Im Gegensatz zur BFD, die bis auf wenige Ausnahmen nur Acetaldehyd als Akzeptor akzeptiert, konnte das Spektrum der Akzeptoren bei der BAL auf eine Reihe von substituierten Benzaldehyde ausgedehnt werden [Demir *et al.*, 1999]. Es ist jedoch fraglich, ob sich ADHs für die Reduktion der BAL-katalysierten Benzoinen zu den entsprechenden Diolen finden lassen. Die sperrigen Phenylringe würden aller Wahrscheinlichkeit nach eine Biokatalyse verhindern.

²³ freundlicherweise von der BASF-AG zur Verfügung gestellt

²⁴ Bisher ist lediglich ein ee von 50 % bei der enzymkatalysierten (*S*)-PAC-Synthese erzielt worden; persönliche Mitteilung Dr. B. Lingen

Aussichtsreicher und für die Folgechemie interessanter wäre die Reduktion von α -Hydroxyketonen vom Typ des 2-HPP, die aus Benzaldehyd und einem funktionalisierten Acetaldehyd gebildet wären. Dies ist mit vorhandenen BFD-Mutanten jedoch noch nicht gelungen.

6.2 Vergleichende Kostenbetrachtung

Anhand von Katalogpreisen soll an dieser Stelle eine Abschätzung der anfallenden Synthesekosten für die Zielverbindung, (1*S*,2*S*)-Diol, erfolgen. Somit kann einerseits deutlich gemacht werden, wie sich die Gesamtkosten der Enzymkatalyse auf die einzelnen Substrate/Cofaktoren verteilt und andererseits kann das vorliegende biokatalytische Verfahren mit chemischen Methoden verglichen werden. Vereinfachend werden die Kosten für die (Bio-)Katalysatoren nicht berücksichtigt²⁵. Geht man von einem Batchverfahren aus, in dem für die Reduktionsreaktion eine ttn für den Cofaktor von 1000 angenommen werden kann, so würden sich die Kosten für die biokatalytische Produktion von 1 kg Produkt auf 106 Euro belaufen²⁶ (s. Tabelle 6.1). Mit einem Anteil von 67 % tragen die Kosten des Cofaktors NADP zu den Gesamtkosten der Biokatalyse bei. Somit müssen Bestrebungen, um eine deutliche Kostenminimierung zu erreichen, zwangsläufig an der Optimierung der Cofaktorregenerierung anknüpfen.

Ausgehend von Phenylpropandion würden - unter der Annahme einer 100 %igen Selektivität und Ausbeute - bei der asymmetrischen Hydrierung [Toukoniitty *et al.*, 2001] mindestens 850 Euro²⁷ für 1 kg der Zielverbindung anfallen. Es sei bemerkt, dass der für die Umsetzung erforderliche Katalysator nicht kommerziell erhältlich ist. Geht die Darstellung von 1-Phenylpropen oder (1*S*,2*S*)-Phenylpropenoxid aus, so sind noch höhere Mindestkosten erforderlich. Da sich der Preis der letztgenannten Ausgangsverbindungen von kleinen Mengen um 25 g ableitet, ist ein genauer Vergleich nicht möglich. In der Regel

²⁵ Die verwendeten Biokatalysatoren liegen rekombinat vor und können, im Gegensatz zu synthetischen Katalysatoren, preiswert in einem fermentativen Prozess hergestellt werden. Würden die Katalysatorkosten ebenfalls in die Kostenrechnung einbezogen, so würde sich der Kostenvorteil des enzymatischen Verfahrens weiter verbessern.

²⁶ Für Acetaldehyd, Benzaldehyd, ThDP und Natriumformiat wurden Fluka Preise für die größte Packungsgröße gewählt. Für NADP wurde der *Jülich Fine Chemicals*-Katalogpreis für die größte Packungsgröße gewählt.

²⁷ Aldrich Katalogpreis für 5 kg Packung = 4250 Euro.

beträgt der Preis für Lieferungen in kg-Maßstab nur noch 10 % des angegebenen Katalogpreises. Selbst in diesem Fall wäre das chemische Verfahren um das 8,5 bis 100-fache teurer. Vor allem der Preis für die enantiomerenreine Ausgangsverbindung (1*S*,2*S*)-Phenylpropenoxid, vermittelt einen Eindruck von den zu erwartenden hohen Katalysatorkosten der übrigen chemischen Synthesealternativen. Eine Zusammenfassung der Synthesewege- und Kosten zeigt Abbildung 6-1.

Tabelle 6-1: Kostenvergleich.

Biokatalyse:

Verbindung	stöchiometr.-Faktor	Preis pro mol	Kosten für 1 kg
Acetaldehyd	3	1,07 Euro	21,10 Euro
Benzaldehyd	1	1,11 Euro	7,30 Euro
NADP ⁺	0,001	10.837,30 Euro	71,23 Euro
ThDP	0,0025	1.428,48 Euro	2,34 Euro
Natriumformiat	0,3	2,07 Euro	4,08 Euro
Gesamtkosten:			106,05 Euro

chem. Synthese:

Rohstoff	stöchiometr.-Faktor	Preis pro mol	Kosten für 1 kg ²⁸
Phenylpropandion	1	130 Euro	850 Euro
Phenylpropen	1	1.378 Euro ²⁹	9054 Euro ²⁹
im kg-Maßstab ca.:		138 Euro	ca. 905 Euro
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-Phenylpropenoxid	2	8.097 Euro ²⁹	106.393 Euro ²⁹
im kg-Maßstab ca.:		ca. 810 Euro	ca. 10.639 Euro

²⁸ entspricht 6,57 mol.

²⁹ Aldrich-Katalogreise abgeleitet von kleinen Packungsgrößen um 25 g.

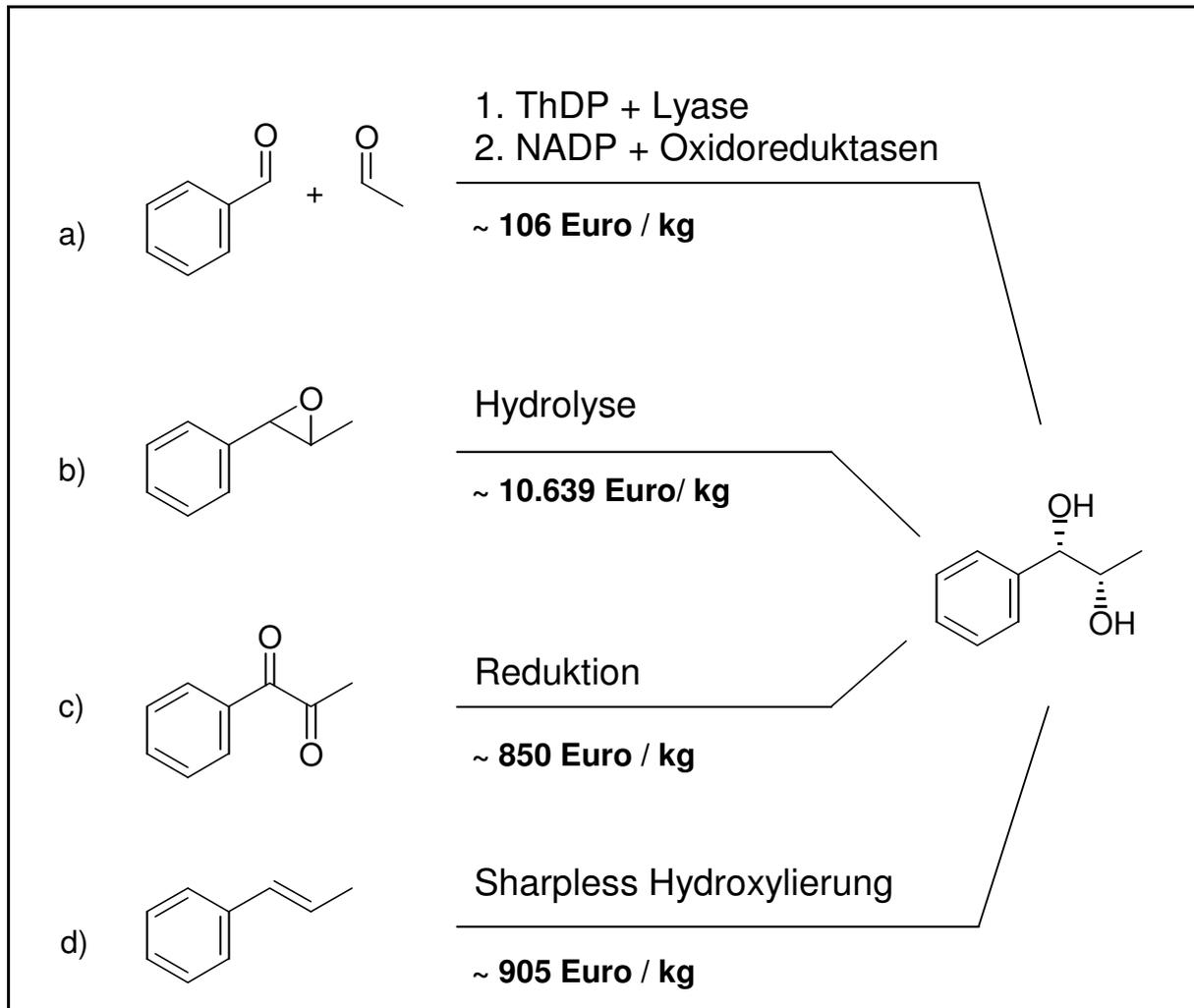


Abbildung 6-1: Schema zur Kostenbetrachtung.

6.3 Möglichkeiten der ttn Erhöhung

Die Versuche zur kontinuierlichen Reduktion haben gezeigt, dass die Cofaktorrückhaltung mittels einer geeigneten Membran mit geringem nominellen *cut-off* wesentlich zur Erhöhung der ttn bei gegebener Raum-Zeit-Ausbeute beitragen kann. Das gleiche Prinzip der Cofaktorrückhaltung könnte durch verbesserte Immobilisierungstechniken verfolgt werden:

- i) Für EMRs eignet sich die Methode der künstlichen Molekulargewichtsvergrößerung des Cofaktors durch große Einheiten wie Polyethylenglykol (PEG; Molekulare Masse = 20.000 g/mol) [Bückmann *et al.*, 1989; Bückmann *et al.*, 1981; Vasic-Racki *et al.*, 1989; Steckhan *et al.*, 1990], Polyethylenimin [Wykes *et al.*, 1972] oder Dextran [Malinauskas *et al.*, 1978].

Der molekulargewichtsvergrößerte Cofaktor bleibt gelöst und wird vollständig zurückgehalten. Unter Umständen lassen sich hiermit Membranen mit höheren Ausschlussgrenzen einsetzen, um höhere Substratdurchflussraten zu erzielen unter Vermeidung hoher Transmembrandrücke. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen zur Cofaktorregenerierung- bzw. Rückhaltung stand kein polymervergrößertes NADP zur Verfügung. Die Möglichkeit der Erzeugung von PEG-NADP aus PEG-NAD mit Hilfe einer Kinase und ATP wurde in Betracht gezogen, scheiterte jedoch aufgrund des Fehlens einer geeigneten Kinase.

- ii) Der Cofaktor könnte über ein Platzhaltermolekül an die Oberfläche der covalent vernetzten Enzyme (Reduktions- und Regenerationsenzym) oder eines makroskopischen Trägers mit immobilisierten Enzymen gebunden werden. In beiden Fällen wäre es wichtig, dass das Platzhaltermolekül lang genug ist, damit sich der Cofactor frei zwischen den beiden Enzymen (Reduktions- und Regenerationsenzym) bewegen kann. In der Praxis scheinen diese Anforderungen jedoch schwer erfüllbar zu sein [Faber, 2000]. Nicht minder wichtig erscheint die zuverlässige Extraktion des Acetaldehyds. Die eingesetzten Liqui-Cel-Extraktionsmodule haben hinsichtlich Zuverlässigkeit bzw. Reproduzierbarkeit im kontinuierlichen Experiment nicht standgehalten, sodass eine destillative Entfernung eine bessere Wahl gewesen wäre. Dennoch stellt der Einsatz der Module eine einfachere Handhabung der Extraktion sowie eine berechenbarere Möglichkeit der Maßstabsvergrößerung dar.

6.4 Folgechemie

Abbildung 6-2 zeigt einen möglichen Zugang zu interessanten α -Aminoalkoholen auf, ausgehend von den synthetisierten Diolstereoisomeren [Chang *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1999]. Die gezielte Synthese aller Stereoisomere des 1-Amino-1-phenyl-propan-2-ol wäre somit denkbar. Diese Möglichkeit würde bereits vorhandene Methoden zur Synthese des Norephedrins und Analoga (Ephedrin) ergänzen [Klavehn *et al.*, 1934; Nagai *et al.*, 1929; Hoover *et al.*, 1947]. Schließlich ist die dargestellte nucleophile Substitution der Hydroxygruppen nicht allein auf die Azido- bzw. Aminofunktion begrenzt sondern sollte mit anderen gängigen Nucleophilen ausgedehnt werden können.

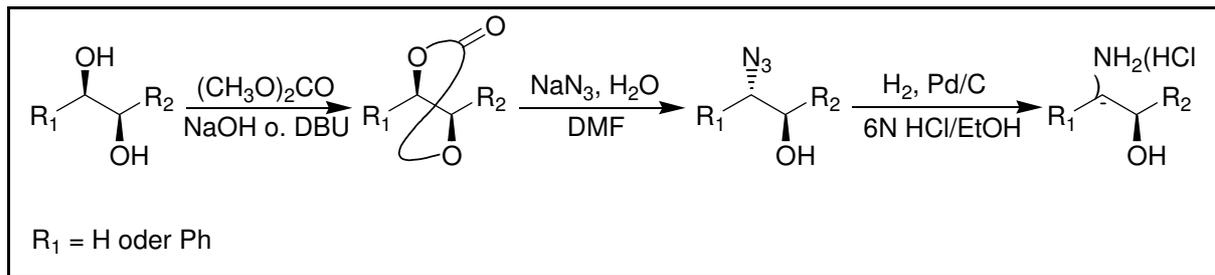


Abbildung 6-2: Schema zur Synthese von 1,2-Aminoalkoholen aus 1,2 Diolen.

7 Zusammenfassung

Optisch aktive vicinale Diole stellen wichtige Vorläufermoleküle für die Synthese pharmazeutisch interessanter Wirkstoffe dar. Im Rahmen der Dissertation konnte eine stereoselektive enzymatische Synthese aller vier möglichen Stereoisomere des vicinalen 1-Phenylpropan-1,2-diols etabliert werden. Ferner wurde am Beispiel eines der Diol-Stereoisomere ein Reaktoraufbau im Labormaßstab entwickelt, der die kontinuierliche Produktion des Diols ermöglicht.

Die Synthese der Diol-Stereoisomere erfolgt in zwei Schritten ausgehend von den preisgünstigen und im Tonnenmaßstab verfügbaren Ausgangssubstanzen Benzaldehyd und Acetaldehyd. Die Reaktionssequenz beginnt mit einer ligasekatalysierten enantioselektiven C-C-Bindungsknüpfung zwischen Benzaldehyd und Acetaldehyd zum 2-Hydroxy-1-phenylpropanon. Die für die Katalyse verantwortlichen thiamindiphosphatabhängigen Enzyme Benzoylformiatdecarboxylase (BFD, EC 4.1.1.7) und Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) katalysieren jeweils das *S*- (92 % ee) bzw. das *R*-Enantiomer (99 % ee) des intermediären α -Hydroxyketons. Die anschließende Reduktion der aufgereinigten und enantiomerenreinen α -Hydroxyketone mit einer *R*- bzw. *S*-selektiven Alkoholdehydrogenase liefert das entsprechende Diol-Stereoisomer in hoher optischer Reinheit (größer 98 % de). Bei den eingesetzten Enzymen handelt es sich um die NADP(H)-abhängigen und kommerziell erhältlichen Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus brevis* (*Lb*-ADH, EC 1.1.1.2) bzw. *Thermoanaerobium species* (*Th*-*sp.*-ADH auch ADH-M, EC 1.1.1.2). Um eine ökonomische Ausnutzung des für die Reduktion benötigten Cofaktors NADP(H) zu gewährleisten, wurden sowohl ein Substrat- als auch ein enzymgekoppeltes Regenerationssystem untersucht und angewandt.

Als Reaktorkonzept wurde ein kontinuierlicher Reaktionsprozess gewählt, um eine optimale Enzymausnutzung und einfachere Aufarbeitung zu gewährleisten. Weiterhin bietet ein kontinuierlicher Prozess die Möglichkeit hoher Raum-Zeit-Ausbeuten. Der Reaktoraufbau besteht aus zwei Enzym-Membran-Reaktoren für die räumliche Trennung der Ligase- und Reduktionsreaktion. Systembedingt ist es erforderlich, dass ein zwischengeschaltetes

Extraktionsmodul für die selektive Entfernung überschüssigen Acetaldehyds aus dem ersten Reaktor sorgt.

Der Inbetriebnahme des Prozesses gingen eingehende reaktionstechnische Untersuchungen voraus, um möglichst günstige Betriebsparameter für den Prozess zu ermitteln. Stabile Prozessläufe konnten über einen Zeitraum von bis zu 90 h (bzw. 90 Verweilzeiten) aufrechtgehalten werden, bei nahezu konstanten Umsätzen zwischen 85-98 % in beiden Reaktoren. Bezogen auf das Endprodukt konnte eine Raum-Zeit-Ausbeute von $30 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt werden.

8 Material und Methoden

8.1 Material

8.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Blasenfalle mit Septum	Werkstätten der FZ-Jülich GmbH, Jülich
Enzym-Membran Reaktor	Werkstätten der FZ Jülich GmbH, Jülich
FPLC	Pharmacia GmbH, Freiburg
Fraktionssammler	Pharmacia GmbH, Freiburg
GC-Säule CP-Chiral-DEX CB	CS-Chromatographie, Düren
Gaschromatograph HP Series 6890	Hewlett Packard Deutschland GmbH, Waldbronn
Glasgeräte	Werkstätten der FZ Jülich GmbH, Jülich
HPLC-Säule Chiralpak AD	Merk, Darmstadt
HPLC-Säule Chiralpak OB	Merk, Darmstadt
HPLC-Säule RP-18 Speedrod	Merk, Darmstadt
Kolbenhubpumpe P500	Pharmacia GmbH, Freiburg
Kontifuge	Heraeus, Hanau
Kryostat	Haake GmbH, Karlsruhe
Laborwaage Analytic AC 210 P	Sartorius AG, Göttingen
Lyophile Lyo Vac GT3	Leybold Heraeus
Massenspektrometer HP Series 5973	Hewlett Packard Deutschland GmbH, Waldbronn
NMR-Gerät Bruker AMX 300	Bruker Analytische Meßtechnik, Karlsruhe
Reaktormembran YM 10/ YC 05	Amicon, Frankfurt
Rotationsverdampfer	Büchi GmbH, Göppingen
Spectrophotometer LS-50 B	Perkin Elmer, Überlingen
Teflonschläuche	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Hersteller
UV-VIS-Spektralphotometer	Schimadzu Europa GmbH, Duisburg
Ultraschallgerät <i>Branson Sonifier</i>	G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vakuumpumpe	Büchi GmbH, Göppingen
pH-Elektrode	Metrohm, Herisau, Schweiz
pH-Meter 691	Metrohm, Herisau, Schweiz

8.1.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Phenylpropenoxid	Aldrich, Steinheim
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-Phenylpropenoxid	Aldrich, Steinheim
2-Propanol	Merck, Darmstadt
4-Hydroxy-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
3-Ethyl-benzaldehyd	Aldrich, Steinheim
4-Propyl-benzaldehyd	Aldrich, Steinheim
4-Ethoxy-benzaldehyd	Aldrich, Steinheim
4-Cyanobenzaldehyde	Sigma, Steinheim
3-Cyanobenzaldehyde	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Acetoxy-benzaldehyd	Aldrich, Steinheim
3-Methyl-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Methyl-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
3-Methoxy-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Methoxy-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
3-Fluor-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
3-Brom-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Fluor-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
3-Chlor-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Brom-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Chlor-benzaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Methoxybenzaldehyd	Aldrich, Steinheim

Chemikalie	Hersteller
Acetaldehyd	Fluka Buchs, Schweiz
Acetonitril	Riedel de Häen, Seelze
Benzaldehyd	Fluka Buchs, Schweiz
Bradford-Reagenz	Biorad, München
Deuteriochloroform	Aldrich, Steinheim
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Imidazol	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60, 40-63 μm	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Fluka, Buchs, Schweiz
NAD ⁺	Biomol, Hamburg
NADP ⁺	Jülich Fine Chemicals, Jülich
Natriumbenzoylformiat	Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ni-NTA auf Agarose-Matrix	Qiagen, Hilden
Phosphorsäure	Fluka, Buchs, Schweiz

8.1.3 Enzym-Membran-Reaktor

Die eingesetzten Enzym-Membran-Reaktoren entsprechen dem Aufbau in Abbildung 8-1 [Kragel *et al.*, 1991]. Es wurde ein Reaktor aus Polyetheretherketon (PEEK) für die C-C-Bindungsknüpfung und einen aus VA-Stahl für die Reduktionsreaktionen eingesetzt. Die Verwendung von PEEK als Reaktormaterial dient der längeren Stabilität der BFD [Greiner, 1999]. Die Substratlösungen für die C-C-Bindungsknüpfung waren aufgrund der hohen Aldehydkonzentrationen autosteril, sodass auf einen vorgeschalteten Sterilfilter verzichtet werden konnte. Für den nachgeschalteten Reduktionsreaktor wurde ein Sterilfilter eingesetzt.

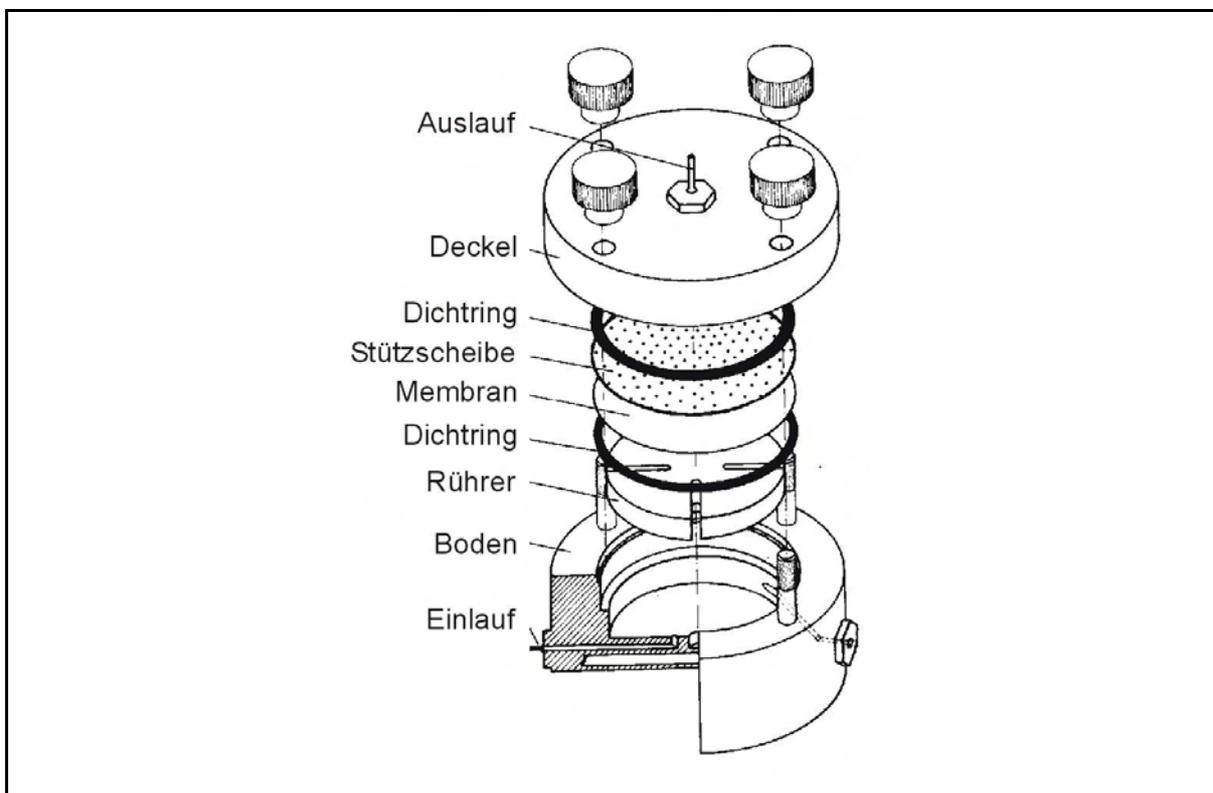


Abbildung 8-1: Explosionszeichnung des Enzymmembranreaktors.

Die Membranen wurden vor der Verwendung 30 min lang in Wasser eingelegt und im Reaktor mit 5 mg/mL BSA vorbelegt. Das System wurde mit der Substratlösung gespült bis Ein- und Auslaufkonzentrationen identisch waren, um Fehlerquellen aufgrund von Spülflüssigkeitsrückstände und eventuellen Absorptionseffekten der eingesetzten Materialien auszuschließen. Die Reaktion wurde durch Injektion der Enzymlösungen in das Septum der vorgeschalteten Blasenfalle gestartet. Alle Reaktoren waren temperierbar. Als Schlauchverbindungsmaterial wurde Teflon eingesetzt.

8.2 Methoden

8.2.1 Bereitstellung der Benzoylformiatdecarboxylase

8.2.2 Fermentation

Die Fermentation von *E. coli* SG13009 zur Produktion der BFD-His₆ erfolgte in einem 300 L Chemap-Bioreaktor in LB-(Luria Bertani)-Medium³⁰. Die Zellkultivierung bis zu 2 L erfolgte in Schüttelkolben. Anschließend wurde eine 20 L Vorkultur in einem Bioreaktor durchgeführt.

1. Vorkultur

Bedingungen:

- 200 mL LB-Medium
- pH 7,5
- Temperatur 37 °C
- angeimpft mit Stammkultur aus –80 °C Stammhaltung
- 50 µg/mL Neomycin
- 100 µg/mL Ampicillin
- Fermentationsdauer 24 h

2. Vorkultur

Bedingungen:

- 2 L LB-Medium
- pH 7,5
- Temperatur 37 °C
- angeimpft mit 200 mL Vorkultur 1
- 50 µg/mL Neomycin
- 100 µg/mL Ampicillin
- Fermentationsdauer 24 h

³⁰ LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 L Millipore-Wasser, mit NaOH auf pH 7,5 titriert.

3. Vorkultur

Bedingungen:

- 20 L LB-Medium
- pH 7,5
- Temperatur 37 °C
- angeimpft mit 2 L Vorkultur 2
- 50 µg/mL Neomycin
- 100 µg/mL Ampicillin
- Rührgeschwindigkeit 500 rpm
- Zuluft 11,6 L/min
- Sauerstoffkonzentration 67,5-99,3 %
- Fermentationsdauer 4 h
-

3. Produktionsfermentation:

Bedingungen:

- - 200 L LB-Medium
- - pH 7,5
- - Temperatur 37 °C
- angeimpft mit 20 L Vorkultur 3
- 50 µg/mL Neomycin
- 100 µg/mL Ampicillin
- Induktion mit IPTG nach 4 h 30 min
- Rührgeschwindigkeit 500 rpm
- Sauerstoffkonzentration 67,5-99,3 %
- Zuluft 100 L/min

Induktionsbedingungen:

- OD600 > 2,3
- Temperatur 25 °C
- IPTG +1 mM
- ThDP +0,1 mM
- MgSO₄ +2,5 mM

- Induktionsdauer 12 h

Für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde mit 4 N Natronlauge und 20 % Phosphorsäure titriert (Laugenverbrauch ca. 0,5 L, Säureverbrauch ca. 0,3 L). Nach 14 h Expressionsdauer bei 25 °C wurde die Fermentationsbrühe auf 5 °C abgekühlt und einer kontinuierlichen Zentrifugation unterworfen. Die Ausbeute betrug 1 kg Feuchtbio­masse.

8.2.2.1 Zellaufschluss

Für einen Standard-Zellaufschluss wurde eine 20 %ige Zellsuspension mit Puffer hergestellt (20 g Zellen und 180 g Pufferlösung). Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Ultraschallgerät (Ultraschall-Desintegrator Sonifier II, Fa. Branson). Über einen Zeitraum von 50 min wurde in Intervallen von 5 min beschallt (5 min an und 5 min aus, output Stufe 7). Die Rosette wurde während des Aufschlusses von außen mit einem Eisbad gekühlt.

8.2.2.2 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Die Reinigung des BFD-His₆-Fusionsproteins aus dem Rohextrakt erfolgte in einem Schritt mittels immobilisierter Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC) [Döbeli *et al.*, 1992]. Bei dem verwendeten Säulenmaterial handelte es sich um einen Ni²⁺-haltigen Chelatbildner (Ni-Nitrilotriessigsäure), an dem das Proteine mit His₆-tag bindet. Nichtbindende Begleitproteine wurden im Durchbruch eluiert, unspezifisch gebundene Proteine mit einem 20 mM Imidazol haltigen Puffer entfernt. Die Elution der BFD-His₆ erfolgte mit 250 mM Imidazol enthaltenden Puffer.

Gelmatrix	Ni-NTA-Agarose
Flussrate	2 mL/min
Aufgegebenes Protein	bis 5 mg des Zielproteins/mL Säulenmaterial
Äquilibrierpuffer	50 mM KPi-Puffer, pH 7,5 ohne Cofaktoren
Waschpuffer	20 mM Imidazol in 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5
Elutionspuffer	250 mM Imidazol in 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5

8.2.2.3 Gelpermeationschromatographie

Im Anschluß an die Reinigung mittels IMAC erfolgte eine Entsalzung mittels Gelfiltration, um das Imidazol zu entfernen. Anschließend wurde das Protein lyophilisiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Säulenmatrix	Sephadex G25, ein mit Agarose vernetztes Dextran
Puffer	10 mM KPi, 2 mM MgSO ₄ , 0,1 mM ThDP, pH 6,0.
Säulenvolumen	950 mL, 5 cm
Probenvolumen	max. 100 mL
Flussrate	max. 20 mL/min

8.2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit der Enzympräparate wurde eine denaturierende SDS-PAGE nach der Methode von *Lämmli* [Lämmli, 1970] durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug $5\text{ }\mu\text{g}$ pro Gelspur. Zur Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung 1:1 mit reduzierendem Puffer (5 % Dithioereitol, 1 % SDS) versetzt und exakt 2 min bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Als Protein-Standard diente der Premixed Standard der Firma Boehringer. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie-Färbung.

Färbelösung:	250 mM Methanol
	100 mL Essigsäure
	650 mL Wasser
	1 g Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung: Färbelösung ohne Coomassie

8.2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976] mit einer Eichkurve aus BSA ($10\text{-}100\text{ }\mu\text{g/mL}$).

8.2.2.6 Bestimmung der Decarboxylaseaktivität

Die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität der BFD-His₆ erfolgte in einem gekoppelten enzymatischen Test [Ulrich, 1970; Weiss *et al.*, 1988]. Hierbei wurde in der enzymatischen Folgereaktion die NADH-abhängige HLADH eingesetzt, welche den entstehenden Benzaldehyd aus der Decarboxylierungsreaktion zum Benzylalkohol reduziert. Die Abnahme des verbrauchten NADH wird photometrisch bei 340 nm verfolgt. Durch einen Überschuss an HLADH wird die Reaktion der Decarboxylase limitierend und somit ist die Abnahme der NADH-Konzentration proportional der Decarboxylaseaktivität.

Testzusammensetzung:

- 700 μL Puffer (50 mM KPi, pH 6,0; 2,5 mM MgSO₄; 0,5 mM ThDP)
- 100 μL Benzoylformiat-Lösung (50 mM, pH 6,0)
- 100 μL NADH-Lösung (3,5 mM)
- 50 μL HLADH (5 U/mL)
- 50 μL BFD-His₆-Enzymlösung

Die Messung erfolgte im Photometer bei 340 nm und 30 °C (5 min vorinkubieren!). Der Enzymtest wurde durch Zugabe von entsprechend verdünnter BFD-Lösung (ca. 1 U/mL) gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 s verfolgt. Die Enzymaktivität berechnet sich nach der Gleichung:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot \frac{V_{\text{ges}}}{V_{\text{probe}} \cdot d \cdot \epsilon_{\text{NADH}}} \cdot f \quad \text{Gleichung 8-1}$$

U = Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

Δ/min = Extinktionsänderung pro Minute (min^{-1})

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

V_{probe} = Probenvolumen (L)

V_{ges} = Gesamtvolumen (L)

ϵ_{NADH} = molarer Extinktionskoeffizient für NADH;

6,22 L $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei $\lambda = 340 \text{ nm}$

f = Verdünnungsfaktor

8.2.2.7 Bestimmung der Ligaseaktivität

Die Ligaseaktivität der BFD wurde durch Verfolgung des Umsatzes von Benzaldehyd bzw. (2*S*)-HPP Mittels HPLC bestimmt. Um im Bereich der Bedingungen für die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit [Bisswanger, 2000] zu bleiben, wurden die Proteinproben hinreichend verdünnt, um zu gewährleisten, dass die Umsätze innerhalb der Messzeit von 15 min unter 10 % blieben. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10 und 15 min wurden Proben entnommen und 1:1 mit einer 15 %igen Perchlorsäurelösung versetzt, um die Reaktion zu stoppen und das Protein zu fällen. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins wurden die Proben vermessen (siehe 8.2.3.3).

Testzusammensetzung:

30 μ L 33 mM Benzaldehydlösung in 100 mM KPi-Puffer, pH 7
460 μ L 300 mM Acetaldehydlösung in 100 mM KPi-Puffer, pH 7
10 μ L Enzymlösung

8.2.3 Analytik

8.2.3.1 Enantiomerenanalytik für (2*S*)- und (2*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon

Der ee wurde mit chiraler Normalphasen HPLC bestimmt:

Stationäre Phase Chiracel OB [Okamoto et al., 1998] mit Vorsäule (l = 25 cm bzw. 5 cm, \varnothing = 0,4 cm)
Mobile Phase *i*-Hexan : 2-Propanol = 80 : 20
Flussrate 0,75 mL/min
Temperatur 25 °C
Detektion UV- / Diodenarray-Detektor bei 203 nm oder 254 nm
Retentionszeiten Benzaldehyd: 12 min
(2*S*)-HPP: 15 min
(2*R*)-HPP: 30 min

8.2.3.2 Enantiomerenanalytik für Phenylpropan-1,2-diol

Bestimmung des Verhältnisses der Stereoisomere mit chiraler Normalphasen-HPLC:

Stationäre Phase Chiracel AD [Okamoto *et al.*, 1998] mit Vorsäule (l = 25 bzw. 5 cm, $\varnothing = 0,4$ cm)

Mobile Phase *i*-Hexan : 2-Propanol = 98 : 2

Flussrate 1 mL/min

Temperatur 40 °C

Detektion UV- / Diodenarray-Detektor bei 203 nm

Retentionszeiten (1*S*,2*S*)-Diol: 42,7 min

(1*S*,2*R*)-Diol: 48,7 min

(1*R*,2*S*)-Diol: 52,5 min

(1*R*,2*R*)-Diol: 57,9 min

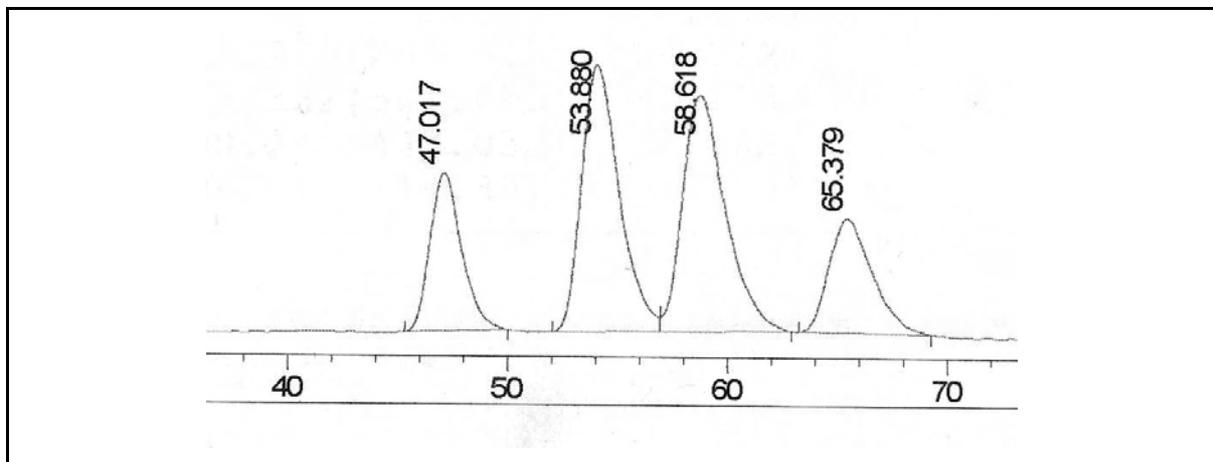


Abbildung 8-2: HPLC-Chromatogramm zur 1,2-Dioltrennung.

Alternative Bestimmung des Verhältnisses der Stereoisomere mittels chiraler GC:

Stationäre Phase CP-Chirasil-DEX CB (25 m x 0,25 mm)

Mobile Phase H₂

Flussrate 4,0 mL/min

Temperaturprogramm 26 min bei 130 °C/min, 50 °C/min, 180 °C für 6 min

Druck 0,5 bar

Detektion FID

Retentionszeiten (1*S*,2*S*)-Diol: 20,0 min

(1*R*,2*R*)-Diol: 21,9 min

(1*S*,2*R*)-Diol: 22,9 min

(1*R*,2*S*)-Diol: 23,9 min

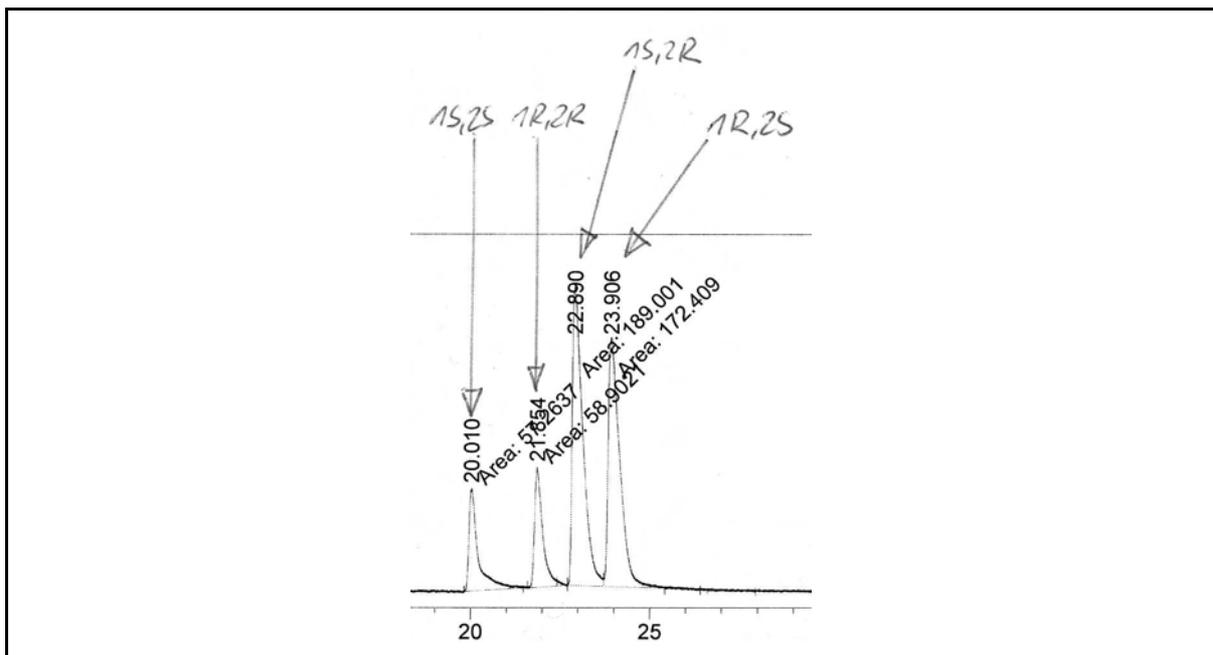


Abbildung 8-3: GC-Chromatogramm zur 1,2-Dioltrennung.

8.2.3.3 Quantitative Analytik für (2S)-2-Hydroxy-1- phenylpropanon und Benzaldehyd

Methode 1:

Die Produktbildung von 2-HPP aus Benzaldehyd wurde mit Umkehrphasen HPLC bestimmt:

Stationäre Phase RP-18-Speedrod (l = 2 cm, Ø = 0,4 cm)

Mobile Phase Wasser : Acetonitril = 80 : 20, + 0,2 % TEA-Puffer (pH 3)

Flussrate 2 mL/min

Temperatur 20 °C

Detektion UV- / Diodenarray-Detektor bei 203 nm oder 254 nm

Retentionszeiten HPP: 3,8 min

Benzaldehyd: 4,3 min

Methode 2

Stationäre Phase RP-18- (l = 25 cm, Ø = 0,4 cm)

Mobile Phase Wasser : Acetonitril = 80 : 20, + 0,2 % TEA-Puffer (pH 3)

Flussrate 0,75 mL/min

Temperatur 20 °C

Detektion UV- / Diodenarray-Detektor bei 203 nm oder 254 nm

Retentionszeiten HPP: 9,5 min

Benzaldehyd: 15,0 min

8.2.3.4 Quantitative Analytik für (2S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon und Phenylpropan-1,2-diol

Die Produktbildung von Diol aus HPP wurde mit Umkehrphasen-HPLC bestimmt:

Stationäre Phase RP-18-Speedrod (l = 2, \varnothing = 0,4 cm)

Mobile Phase Wasser : Acetonitril = 90 : 10, + 0,2 % TEA-Puffer (pH 3)

Flussrate 2 mL/min

Temperatur 20 °C

Detektion UV- / Diodenarray-Detektor bei 203 nm

Retentionszeiten (1S,2S)/(1R,2R)-Diol: 4,4 min

(1R,2S)/(1S,2R)-Diol: 3,8 min

2-HPP: 5,7 min

8.2.3.5 Quantitative Analytik für Acetaldehyd

Der Umsatz bzw. Restgehalt an Acetaldehyd wurde mittels GC bestimmt:

Stationäre Phase Permabond

Mobile Phase H₂

Druck 1,1 bar

Temperaturprogramm 40 °C für 5 min, 25 °C/min bis 180 °C, 180 °C für 5 min

Detektion FID

Retentionszeiten Acetaldehyd: 4 min

8.2.4 Synthesen

8.2.4.1 *rac*-1-Phenyl-1,2-propandiol aus 1-Phenylpropanon

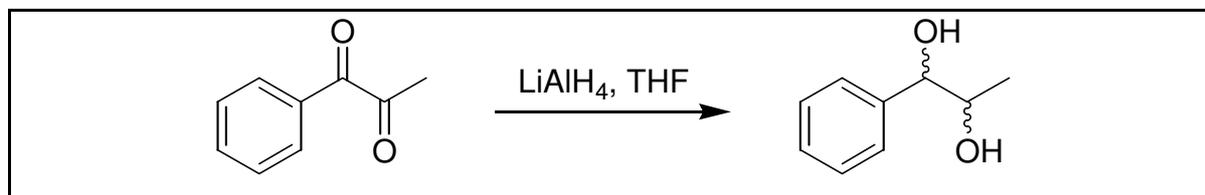


Abbildung 8-4: Reduktion von 1-Phenylpropanon mit LiAlH₄.

In einen 100-mL-Zweihals-Erlenmeyer-Kolben mit Septum, Rückflusskühler und Calciumchloridrohr wurden 271 mg Lithiumaluminiumhydrid (7,15 mmol) in 15 mL abs. THF vorgelegt. Unter ständigem Rühren wurde langsam eine Lösung von 2 g Phenylpropanon (13 mmol) in 6 mL THF mit Hilfe einer Spritze hinzugegeben und mit einem Eisbad gekühlt, um die Reaktion unter Kontrolle zu halten. Nach Beendigung des Zutropfens wurde gerührt und der Umsatzverlauf per DC (Proben vorher mit verd. Schwefelsäure versetzt) bis zum vollständigen Umsatz nach 12 h verfolgt. Danach wurde mit einem Eisbad abgekühlt und unter Rühren vorsichtig zunächst mit Eiswasser versetzt, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten war und anschließend mit so viel 10 %iger Schwefelsäure versetzt, dass sich der gebildete Aluminiumhydroxidniederschlag gerade aufgelöst hatte. Mit einem Scheidetrichter wurde die organische Phase von der wässrigen Phase getrennt und die organische Phase mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter verminderten Druck destilliert. Der gelbe ölige Rückstand wurde über Silicagel mit einem Elutionsgradient von 10-80 % EtOAc in *i*-Hexan säulenchromatographisch gereinigt, so dass ein nahezu farbloses, zähes Öl vorlag, das nach längerem Stehen bei 4 °C auskristallisierte. Ausbeute = 1,62 g *rac*-1-Phenylpropan-1,2-diol (10 mmol, 82 %).

8.2.4.2 (1*R*,2*S*)- und (1*S*,2*S*)-1-Phenyl-1,2-Propandiol aus (1*S*,2*S*)-Phenylpropenoxid

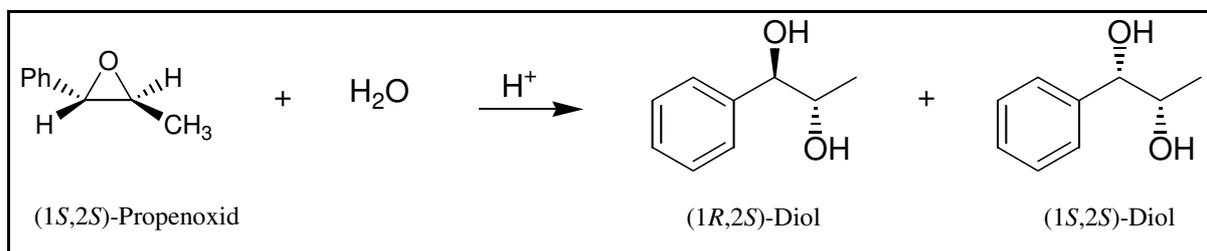


Abbildung 8-5: Hydrolyse von (1*S*,2*S*)-Phenylpropenoxid.

In einem Rundkolben wurden 500 mg Phenylpropenoxid (3,7 mmol) in 25 mL THF gelöst und mit 25 mL 10 %iger Schwefelsäure versetzt. Bei Raumtemperatur wurde 6 h kräftig gerührt, bis vollständiger Umsatz anhand von DC Proben festgestellt wurde [Flotz *et al.*, 1957]. Nach beendeter Hydrolyse wurde mehrmals mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und bei vermindertem Druck destilliert. Es lag ein farbloses Öl vor. Rohausbeute: 546 mg (3,6 mmol, 97 %).

8.2.4.3 (1*S*,2*R*)- und (1*R*,2*R*)-1-Phenyl-1,2-Propandiol aus (1*R*,2*R*)-Phenylpropenoxid

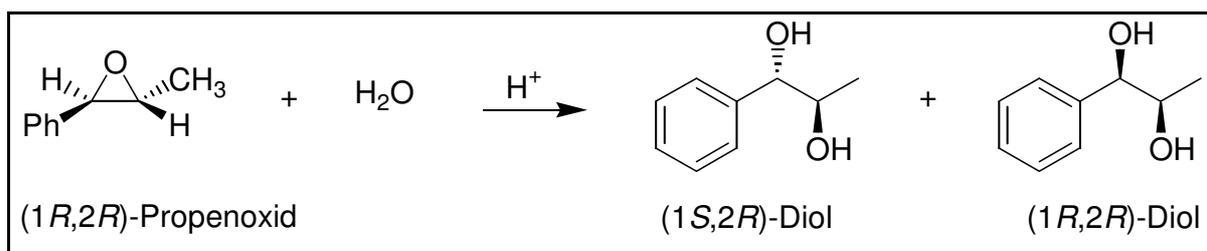


Abbildung 8-6: Hydrolyse von (1*R*,2*R*)-Phenylpropenoxid

Es wurde analog zur Hydrolyse des zuvor beschriebenen Propenoxids verfahren. Rohausbeute: 546 mg (3,6 mmol, 97 %).

8.2.4.4 Darstellung von (2S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon

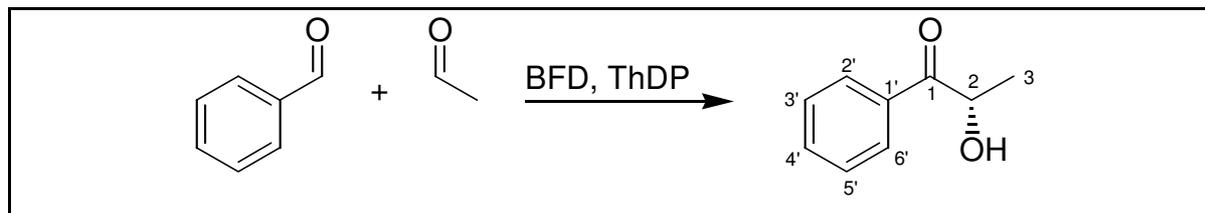


Abbildung 8-7: Darstellung von (2S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon

18,67 g Benzaldehyd (175 mmol) und 66,0 g Acetaldehyd (1500 mmol) wurden in 5 L Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8) gelöst, der ThDP (5,0 g, 11 mmol) und $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g, 2,4 mmol) enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der BFD (114 U) gestartet und 48 h bei RT stehen gelassen. Nach vollendeter Reaktion wurde die BFD mit einer YM 10 Membran in einer *Amicon*-Zelle abfiltriert, um Schaumbildung bei der Produktextraktion zu vermeiden. Das im Eluat befindliche (2S)-HPP wurde mehrmals mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck zu einem gelb-braunen Öl eingeeengt. Das Rohprodukt wurde anschließend durch Umkristallisation aus *i*-Hexan gereinigt. Ausbeute = 25,2 g (96 %), ee >99 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 1,46 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, CH_3); 3,81 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, -OH); 5,18 (1H, qd, H-2); 7,52 (2H, dd, H-1' und H-5'); 7,63 (1H, dd, H-3'); 7,94 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, H-2' und H-4').

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 22,7 (C-3); 69,7 (C-2); 129,1 (C-3' und C-5'); 129,3 (C-2' und C-6'); 133,6 (C-1'); 134,4 (C-4'); 202,8 (C-1).

$[\alpha]_D^{20} = -86$ ($c = 2$; CHCl_3), {Lit. [Iding *et al.*, 2000]: $[\alpha]_D^{25} = -79,2$ ($c = 0,016$; CHCl_3) für ee = 95 %}.

Massenspektrometrie: $m/z = 51$ (10 %, C_4H_3^+); 77 (34 %, C_6H_5^+); 105 (100 %, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+ = \text{C}_7\text{H}_5\text{O}^+$); 135 (1 %, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+ = \text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2^+$); 151 (1 %, $[\text{M}+1]^+$).

Elementaranalyse: berechnet: C 71,98 %; H 6,71 %.

gefunden: C 71,42 %; H 6,59 %.

8.2.4.5 Darstellung von (1S,2S)-1-Phenylpropan-1,2-diol

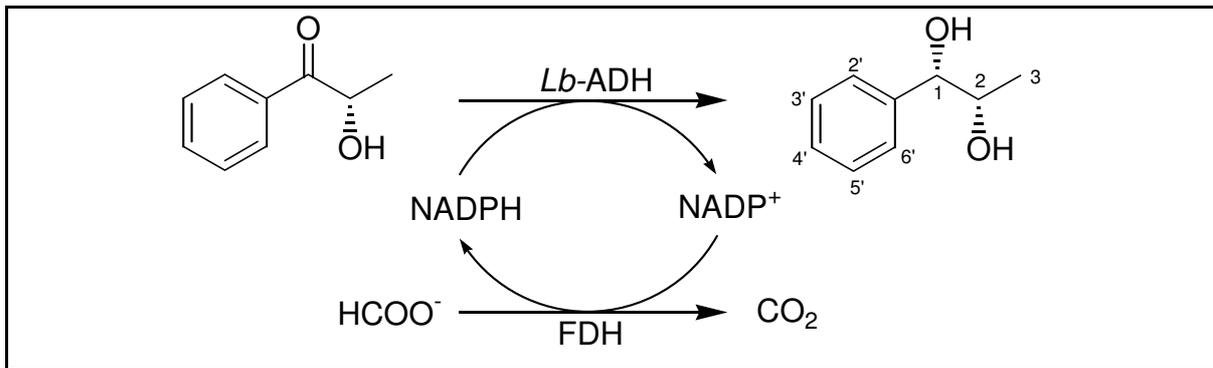


Abbildung 8-8: *Lb*-ADH-katalysierte (2S)-HPP Reduktion.

983 mg (2S)-HPP (6,5 mmol) wurden in 250 mL Phosphat Puffer (100 mM, pH 7) gelöst, der 4,08 g (60,1 mmol) Natriumformiat und 0,5 g (0,6 mmol) NADP⁺ enthielt. 6,2 U FDH (0,025 U/mL) wurden zur gerührten Substratlösung gegeben, die bei 20 °C temperiert wurde. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 U (0,04 U/mL) *Lb*-ADH gestartet. Ein Umsatz von über 94 % wurde nach 24 h erreicht. Das gelöste Enzym wurde mit einer YM10-Membran in einer *Amicon*-Zelle abfiltriert. Das Filtrat wurde mit NaCl gesättigt und viermal mit 50 mL Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt, unter Verwendung eines Elutionsgradienten von 10-80 % EtOAc in *i*-Hexan. Ausbeute = 936 mg (94 %), de = 98 %.

¹H-NMR (300 Hz, CDCl₃) δ (ppm): 0,85 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, -CH₃); 3,67 (1H, dq, *J* = 6,4 Hz, H-2); 3,50-4,10 (2H, br, -OH); 4,15 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, H-1); 7,10-7,25 (5H, m, arom.-H).

^{13}C -NMR (75 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 18,9 (C-3); 72,4 (C-2); 79,7(C-1); 127,2 (C-2' u. C-6'); 128,2 (C-4'); 128,6 (C-3' u. C-5'); 141,3 (C-1')³¹.

$[\alpha]_D^{20} = +54,3$ ($c = 1,9$; CHCl_3), {Lit. [Bortolini *et al.*, 1997]: $[\alpha]_D^{20} = +55,9$ ($c = 1,9$; CHCl_3), [Takeshita *et al.*, 1992]: $[\alpha]_D^{21} = +45,0$ ($c = 2,4$; CHCl_3) für ee = 89 %}.

8.2.4.6 Darstellung von (1*R*,2*S*)-1-Phenylpropan-1,2-diol

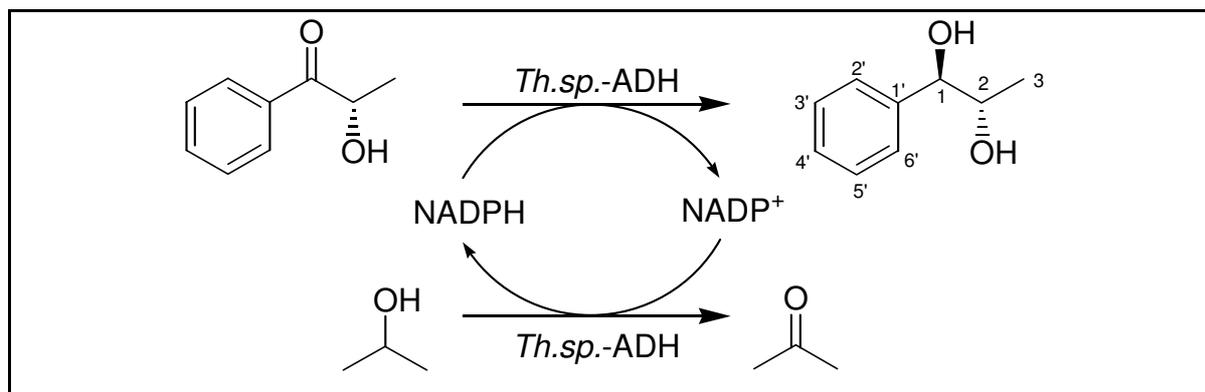


Abbildung 8-9: *Th.sp.*-ADH -katalysierte (2*S*)-HPP Reduktion.

150 mg (2*S*)-HPP (1 mmol) wurden in 100 mL Phosphatpuffer gelöst (100 mM, pH 8), der 766 μL 2-Propanol (10 mmol), 0,08 mg NADP^+ (0,1 mmol) und 15 mg DTT (0,08 mmol) enthielt. Durch Zugabe von 7,5 U *Th.sp.*-ADH³² (0,075 U/mL) erfolgte der Start der Reaktion. Ein Umsatz von 92 % wurde nach 24 h erreicht. Nach beendeter Reaktion wurde das gelöste Enzym mit einer YM10-Membran in einer *Amicon*-Zelle abfiltriert. Das Filtrat wurde mit NaCl gesättigt und 4 mal mit 50 mL Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt, unter Verwendung eines Elutionsgradienten von 10-80 % EtOAc in *i*-Hexan. Ausbeute = 135 mg (89 %), de = 98 %.

³¹ Bei der Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale handelt es sich um einen Vorschlag, bei dem sowohl die Inkrementenmethode für NMR-Verschiebungen zu Hilfe genommen wurde, als auch die beobachtete Intensität der Signale berücksichtigt wurde. Die angegebene Zuordnung beruht nicht auf einem CH-Kopplungsexperiment.

³² 1 U *Th.sp.*-ADH reduziert 1 μmol (2*S*)-HPP zum (1*S*,2*S*)-Diol in der Minute bei 40°C und pH 8.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 1,08 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 2,0-2,9 (2H, br); 3,95 (1H, m); 4,65 (1H, d, $J = 4,3$ Hz); 7,30 (5H, m, arom.-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 17,7 (C-3); 71,7 (C-2); 77,9 (C-1); 127,0 (C-2' u. C-6'); 128,3 (C-4'); 128,8 (C-3' u. C-5'); 140,7 (C-1').

$[\alpha]_D^{20} = -29,9$ ($c = 2,4$; CHCl_3) {Lit. [Kreutz *et al.*, 1997]: $[\alpha]_D^{20} = -35$ ($c = 1$; CHCl_3), Lit. [Takeshita *et al.*, 1992]: $[\alpha]_D^{25} = -38,5$ ($c = 2,2$; CHCl_3) für ee = 95 %}.

8.2.4.7 Darstellung von (1*S*,2*R*)-1-Phenylpropan-1,2-diol

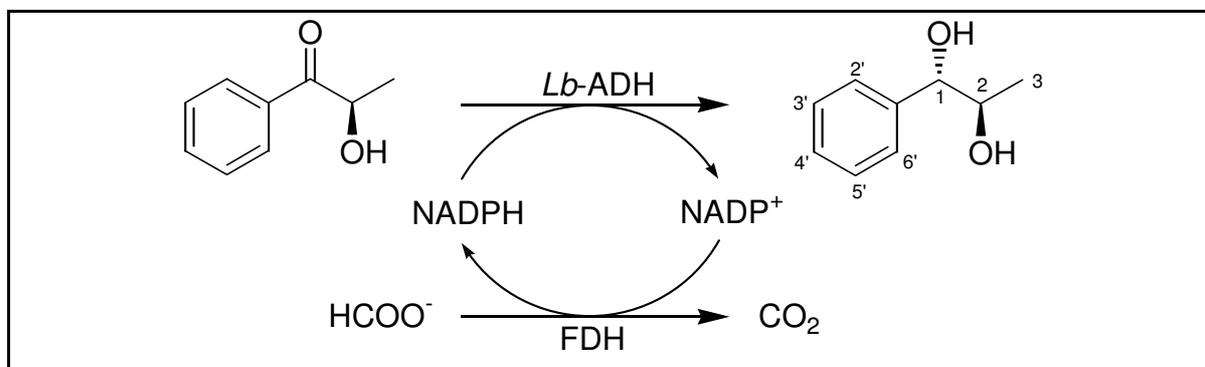


Abbildung 8-10: *Lb*-ADH-katalysierte (2*R*)-HPP Reduktion.

200 mg (2*R*)-HPP (1,3 mmol) wurden in 50 mL Phosphat Puffer (100 mM, pH 7) gelöst, der 0,82 g (12,0 mmol) Natriumformiat und 0,1 g (0,12 mmol) NADP enthält. 1,24 U FDH (0,025 U/mL) wurden zur gerührten Substratlösung gegeben, deren Temperierung bei 20 °C erfolgte. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 U (0,04 U/mL) *Lb*-ADH gestartet. Ein Umsatz von über 94 % wurde nach 24 h erreicht. Das gelöste Enzym wurde mit einer YM 10 Membran in einer *Amicon*-Zelle abfiltriert. Das Filtrat wurde mit NaCl gesättigt und 4 mal mit 50 mL Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt, unter Verwendung eines Elutionsgradienten von 10-80 % EtOAc in *i*-Hexan. Ausbeute = 184 mg (91 %), de = 99 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 1,0 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 3,10 (2H, br); 3,9 (1H, m); 4,6 (1H, d, $J = 4,0$ Hz); 7,3 (5H, m, arom.-H).

^{13}C -NMR (75 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 17,7 (C-3); 71,7 (C-2); 77,9 (C-1); 127,0 (C-2' u. C- 6'); 128,3 (C-4'); 128,8 (C-3' u. C-5'); 140,7 (C-1').

Massen-Spektrometrie $m/z = 51$ (10 %, C_4H_3^+); 77 (25 %, C_6H_5^+); 107 (70 %, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$ bzw. $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^+$); 152 (<1 %, M^+).

Elementaranalyse: berechnet: C 71,03 % H 7,95 %
 gefunden: C 69,73 %; H 7,80 %

$[\alpha]_D^{20} = +36,1$ ($c = 2,52$; CHCl_3), {Lit. [Takeshita *et al.*, 1992]: $[\alpha]_D^{20} = +37,2$ ($c = 3,4$; CHCl_3) für ee = 93 %, Lit. [Zioudrou *et al.*, 1977]: $[\alpha]_D^{22} = +33,0$ ($c = 3,2$; CHCl_3)}.

8.2.4.8 Darstellung von (1*R*,2*R*)-1-Phenylpropan-1,2-diol

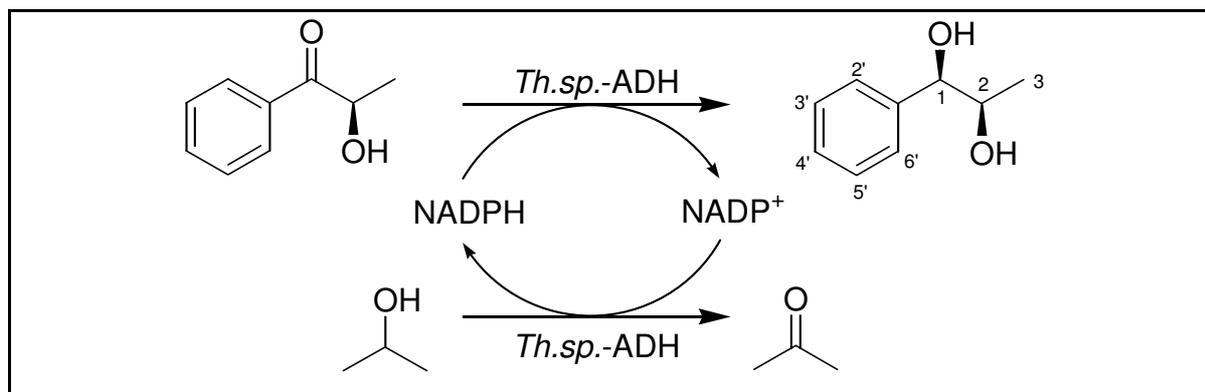


Abbildung 8-11: *Th.sp.*-ADH-katalysierte (2*R*)-HPP Reduktion

150 mg (2*R*)-HPP (1 mmol) wurden in 100 mL Phosphatpuffer gelöst (100 mM, pH 8), der 766 μL 2-Propanol (10 mmol), 0,08 mg NADP⁺ (0,1 mmol) und 15 mg DTT (0,08 mmol) enthielt. Durch Zugabe von 7,5 U *Th.sp.*-ADH (0,075 U/mL) wurde die Reaktion gestartet. Ein Umsatz von 92 % wurde nach 24 h erreicht. Nach beendeter Reaktion wurde das gelöste Enzym mit einer YM10-Membran in einer *Amicon*-Zelle abfiltriert. Das Filtrat wurde mit NaCl gesättigt und viermal mit 50 mL Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt, unter Verwendung

eines Elutionsgradienten von 10-80 % EtOAc in *i*-Hexan. Ausbeute = 129 mg (85 %), de = 98 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 1,0 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3) 3,13 (2H, br); 3,82 (1H, dt,); 4,32 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 7,30 (5H, m, arom.-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 Hz, CDCl_3) δ (ppm): 18,8 (C-3); 72,3 (C-2); 79,5 (C-1); 126,9 (C-2' u. C-6'); 128,2 (C-4'); 128,5 (C-3' u. C-5'); 141,1 (C-1').

Massenspektrometrie: $m/z = 51$ (6 %, (C_4H_3^+)); 77 (22 %, C_6H_5^+); 107 (83 %, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$ bzw. $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^+$); 152 (<1 %, M^+).

$[\alpha]_D^{20} = -51,3$ ($c = 3,5$; CHCl_3); {Lit. [Bortolini *et al.*, 1998]: $[\alpha]_D^{20} -55,9$ ($c = 1,9$; CHCl_3), Lit. [Takeshita *et al.*, 1992]: $[\alpha]_D^{18} = -45,5$ ($c = 3,3$; CHCl_3) für ee = 90 %}.

8.2.4.9 Analytik *para*-substituierter α -Hydroxyketone

(S)-1-(4-Bromphenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 42 %; ee 87 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 11,5 min; t_R (R) = 14,4 min; GC-MS: $t_R = 9,6$ min; m/z (%): 232 (0,4) $[\text{M}]^+$, 185 (100) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$, 157 (38) $[\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}]^+$, 75 (22) $[\text{C}_6\text{H}_3]^+$, 50 (15) $[\text{C}_4\text{H}_2]^+$.

(S)-1-(4-Chlorphenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 85 %; ee = 86 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 10,9 min; t_R (R) = 14,7 min; GC-MS: $t_R = 8,9$ min; m/z (%): 184 (1,0) $[\text{M}]^+$, 139 (100) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$, 111 (27) $[\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}]^+$, 75 (14) $[\text{C}_6\text{H}_3]^+$, 51 (3,5) $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$.

(S)-1-(4-Cyanophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 89 %; ee = 74 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 37,9 min; t_R (R) = 52,4 min; GC-MS: $t_R = 9,7$ min; m/z (%): 175 (0,2) $[\text{M}]^+$, 130 (100) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$, 103 (74) $[\text{C}_7\text{H}_5\text{N}]^+$, 76 (22) $[\text{C}_6\text{H}_4]^+$, 51 (14) $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$.

(2S)-(4-Ethylphenyl)-2-hydroxy-1-propanon: Umsatz = 96 %; ee = 91 %; HPLC (Chiralcel OB; *i*-Hexan/2-Propanol = 9:1, Fluss: 0,75 mL/min; 25 °C): t_R (S) = 10,2 min; t_R (R) = 19,7 min; GC-MS: m/z (%): 178 (1) $[\text{M}]^+$, 163 (1,4), 133 (100), 105 (59), 89 (17), 79 (57), 63 (10), 51 (14).

(S)-1-(4-Fluorophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 69 %; ee 90 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 11,6 min; $t_R(R)$ = 18,1 min; GC-MS: t_R = 7,6 min; m/z (%): 168 (0,4) [M]⁺, 123 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 95 (31) [C₆H₄F]⁺, 75 (9,7) [C₆H₃]⁺, 51 (1,6) [C₄H₃]⁺.

(S)-2-Hydroxy-1-(4-methylphenyl)-propanon: Umsatz = 65 %; ee 91 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 10,8 min; $t_R(R)$ = 19,6 min; GC-MS: t_R = 8,6 min; m/z (%): 164 (0,4) [M], 119 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 91 (77) [C₇H₇]⁺, 65 (32) [C₅H₅]⁺, 51 (4,8) [C₄H₃]⁺.

(2S)-(4-Difluoromethoxyphenyl)-2-hydroxy-1-propanon: Umsatz = 98 %; ee = 91,1 %; HPLC (Chiralcel OB) $t_R(S)$ = 21,9 min; $t_R(R)$ = 38,1 min; GC-MS: m/z (%): 201 (4) [M]⁺, 171 (100), 143 (38), 121 (13), 104 (11), 95 (46), 77 (21), 65 (27), 51 (14).

(S)-2-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-propanon: Umsatz = 11 %; ee 92 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 15,6 min; $t_R(R)$ = 21,2 min; GC-MS: t_R = 10,3 min; m/z (%): 166 (3,1) [M]⁺, 121 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 93 (16) [C₆H₅O]⁺, 77 (5,0) [C₆H₅]⁺, 65 (13) [C₅H₅]⁺, 51 (1,5) [C₄H₃]⁺.

(S)-2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-propanon: Umsatz = 23 %; ee = 92 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 20,2 min, $t_R(R)$ = 30,2 min; GC-MS: t_R = 9,7 min; m/z (%): 180 (7,3) [M], 135 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 107 (19) [C₇H₇O]⁺, 92 (21) [C₆H₄O]⁺, 77 (30) [C₆H₅]⁺, 64 (10) [C₅H₄]⁺, 51 (4,8) [C₄H₃]⁺.

8.2.4.10 Analytik *meta*-substituierter α -Hydroxyketone

(S)-1-(3-Bromophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 68 %; ee 96 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 12,5 min, $t_R(R)$ = 19,0 min; GC-MS: t_R = 9,5 min; m/z (%): 232 (1,6) [M]⁺, 185 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 157 (40) [C₆H₄Br]⁺, 75 (23) [C₆H₃]⁺, 51 (8,1) [C₄H₃]⁺.

(S)-1-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 94 %; ee 94 %; HPLC (Chiralcel OB): $t_R(S)$ = 10,9 min, $t_R(R)$ = 17,2 min; GC-MS: t_R = 8,9 min; m/z (%): 184 (1,5) [M]⁺, 139 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 111 (44) [C₆H₄Cl]⁺, 75 (26) [C₆H₃]⁺, 50 (9,8) [C₄H₂]⁺.

(S)-1-(3-Cyanophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 95 %; ee 92 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 39,8 min, t_R (R) = 56,59 min; GC-MS: t_R = 9,8 min; m/z (%): 175 (1,9) [M], 47 (39) [M-CO], 130 (87) [M-C₂H₅O], 103 (100) [C₇H₅N], 76 (22) [C₆H₄], 51 (11) [C₄H₃].

(S)-1-(3-Fluorophenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 100 %; ee 87 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 10,7 min; t_R (R) = 14,6 min; GC-MS: t_R = 7,5 min; m/z (%): 168 (0,4) [M], 123 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 95 (55) [C₆H₄F]⁺, 75 (22) [C₆H₃]⁺, 51 (4,1) [C₄H₃]⁺.

(S)-2-Hydroxy-1-(3-methylphenyl)-propanon: Umsatz = 99 %; ee 97 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 9,9 min; t_R (R) = 19,3 min; GC-MS: t_R = 8,1 min; m/z (%): 164 (0,5) [M]⁺, 119 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 91 (77) [C₇H₇]⁺, 65 (29) [C₅H₅]⁺, 51 (4,8) [C₄H₃]⁺.

(S)-1-(3-Acetoxyphenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 80 %; ee >99 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 38,1 min; t_R (R) = n.b.; GC-MS: t_R = 10,1 min; m/z (%): 208 (1,2) [M]⁺, 165 (34) [M-C₂H₃O]⁺, 163 (44) [M-C₂H₅O]⁺, 121 (100) [C₈H₉O]⁺, 95 (23) [C₅H₃O₂]⁺, 93 (21) [C₆H₅O]⁺, 77 (8,1) [C₆H₅]⁺, 65 (13) [C₅H₅]⁺, 50 (1,6) [C₄H₂]⁺.

(S)-1-(3-Ethoxyphenyl)-2-hydroxy-propanon: Umsatz = 91 %; ee 97 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 14,6 min; t_R (R) = 35,0 min; GC-MS: t_R = 9,7 min; m/z (%): 194 (25) [M], 149 (100) [M-C₂H₅O], 121 (60) [C₈H₉O], 95 (19) [C₅H₃O₂], 92 (12) [C₆H₄O], 77 (23) [C₆H₅], 65 (27) [C₅H₅], 50 (3,2) [C₄H₂].

(S)-2-Hydroxy-1-(3-hydroxyphenyl)-propanon: Umsatz = 62 %; ee 92 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 12,9 min; t_R (R) = 14,4 min; GC-MS: t_R = 10,0 min; m/z (%): 166 (9,7) [M]⁺, 121 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 95 (42) [C₅H₃O₂]⁺, 93 (35) [C₆H₅O]⁺, 77 (25) [C₆H₅]⁺, 65 (26) [C₅H₅]⁺, 51 (4,0) [C₄H₃]⁺.

(S)-2-Hydroxy-1-(3-methoxyphenyl)-propanon: Umsatz = 94 %; ee 96 %; HPLC (Chiralcel OB): t_R (S) = 17,8 min; t_R (R) = 32,7 min; GC-MS: t_R = 9,3 min; m/z (%): 180 (26) [M]⁺, 135 (100) [M-C₂H₅O]⁺, 107 (59) [C₇H₇O]⁺, 92 (31) [C₆H₄O]⁺, 77 (45) [C₆H₅]⁺, 64 (17) [C₅H₄]⁺, 51 (4,8) [C₄H₃]⁺.

unsubstituiert (siehe auch 8.2.4.4) (S)-2-Hydroxy-1-phenyl-propanon: Umsatz = 95 %, ee 92 %; HPLC (RP-C18): t_R = 12,2 min (2-HPP); t_R = 18,3 min (benzaldehy- de); HPLC

(Chiralcel OB): t_R (*S*) 13,4 min; t_R (*R*) 21,4 min, GC-MS: $t_R = 7,7$ min; m/z (%): 150 (0,2) $[M]^+$, 135 (1,3) $[M-CH_3]^+$, 105 (100) $[C_7H_5O]^+$, 77 (57) $[C_6H_5]^+$, 51 (17) $[C_5H_3]^+$.

9 Literatur

Ahlberg P (2001) The nobel prize in chemistry 2001 - advanced information. Technical report, The Royal Swedish Academy of Sciences.

Ahn NT, Einstein O (1977) *Nouveau Journal de Chime - New Journal of Chemistry*, 1, 61 ff.

Arnold FH (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409, 253-257.

Ashton PR, Fyfe MCT, Hickingbottom SK, Stoddart JF, Williams DJ (1998) Hammett correlations 'beyond the molecule'. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 2*, 10, 2117-2128.

Bisswanger H (2000) *Enzymkinetik - Theorie und Methoden* Wiley-VCH, Weinheim.

Bornscheuer UT, Pohl M (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 137-143.

Bortolini O, Casanova E, Fantin G, Medici A, Poli S, Hanau S (1998) Kinetic resolution of vic-diols by bacillus stearothermophilus diacetyl reductase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 9, 647-651.

Bortolini O, Fantin G, Fogagnolo M, Giovannini PP, Guerrini A, Medici A (1997) An easy approach to the synthesis of optically active vic-diols: A new single-enzyme system. *Journal of Organic Chemistry*, 62, 1854-1856.

Bowlus SB, Katzenellenbogen JA (1974) Aluminium hydride reduction of α -ketols. ii. additional evidence for conformational flexibility in the transition state. *Journal of Organic Chemistry*, 39, 3309-3314.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Bückmann AF, Carrea G (1989) Synthesis and application of water-soluble macromolecular derivatives of the redox coenzymes nad(h), nadp(h) and fad. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 39, 97-152.

- Bückmann AF, Kula MR, Wichmann R, Wandrey C (1981)** An efficient synthesis of high molecular weight nad(h)-derivatives suitable for continuous operation with coenzyme depending enzyme systems. *Journal of Applied Biochemistry*, 3, 301-315.
- Burley SK (1985)** Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. *Science*, 229, 23-28.
- Carrea G, Riva S (2000)** Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angewandte Chemie*, 112, 2312-2341.
- Carver FJ, Hunter CA, Livingstone DJ, McCabe JM, Seward EM (2002)** Substituent effects on edge-to-face aromatic interactions. *Chemistry - A European Journal*, 8, 2847-2859.
- Chang HT, Sharpless KB (1996)** A practical route to enantiopure 1,2-aminoalkohols. *Tetrahedron Letters*, 37, 3219-3222.
- Chenault HK, Simon ES, Whitesides GM (1988)** Cofactor regeneration for enzyme-catalyzed synthesis. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6, 221-270.
- Chenault HK, Whitesides GM (1987)** Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14, 147-197.
- Cherest M, Felkin H (1968)** Torsional strain involving partial bonds. The steric course of the reaction between allyl magnesium bromide and 4-t-butyl-cyclohexanone *Tetrahedron Letters*, 9, 2205-2208.
- Cho GY, Ko SY (1999)** Expanding synthetic utilities of asymmetric dihydroxylation reaktion: Conversion of syn-diols to syn-amino alkohols. *Journal of Organic Chemistr*, 64, 8745-8747.
- Choudary MB, Chowdari NS, Madhi S, Kantam ML (2001)** A trifunctional catalyst for the synthesis of chiral diols. *Angewandte Chemie*, 113, 4755-4759.
- Corsby J (1992)** Chirality in industry - an overview. In A. N. Collins, G. N. Sheldrake, and J. Corsby, editors, *Chirality in Industry*, pages 1-66. Wiley, Chichester.
- Cram DJ, Abd Elhafez FA (1952)** Studies in stereochemistry. x. the rule of "steric control of asymmetric induction" in the syntheses of acyclic systems. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 5828-5835.
- Csuk R, Glänzer BI (1991)** Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry.

Chemical Reviews, 91, 49-97.

D'Ans J, Lax E (1996) *Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Band 2: Organische Verbindungen*, Band 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, 4. Auflage 1983.

Demir A, Dünnwald T, Iding H, Pohl M, Müller M (1999) Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 4769-4774.

Demir A, Pohl M, Janzen E, Müller M (2001) Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatik kinetik resolution via c-c bond cleavage. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions 1*, 633-635.

Demir AS, Sesenoglu O, Eren E, Hosrik B, Pohl M, Janzen E, Kolter D, Feldmann R, Dünkemann P, Müller M (2002) Enantioselective synthesis of α -hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed c-c bond formation reaction. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 344, 96-103,.

Denis JN, Correa A, Green AE (1990) An improved synthesis of the taxol side chain and of rp 56976. *Journal of Organic Chemistry*, 55, 1957-1959.

Döbeli H, Hochuli E (1992) Metal chelate resins.

Eliel EL (1983) Asymmetric synthesis. In M. J. D., editor, *Applications of Cram's Rule: Addition of Achiral Nucleophiles to Chiral Substrates*, 2, 125, Academic, New York.

Eriksson T, Björkman S, Roth B, Fyge Å, Höglund P (1995) Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, 7, 44-52.

Evans DA (1982) Studies in asymmetric synthesis. the development of practical chiral enolate synthons. *Aldrichimica Acta*, 15, 23-32.

Exner O (1978) *Correlation Analysis in Chemistry - Recent Advances*. Plenum, New York.

Faber K (2000) *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, New York..

Foltz CM, Witkop B (1957) The stereochemistry of the 1-phenyl-1,2-propanediols and of α -isoephedrine. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 201-205.

Fry AJ, Sobolov SB, Leonida MD, Voivodov KI (1994) Electroenzymatic synthesis (regeneration of nadh coenzyme): Use of nafion ion exchange films for immobilization

of enzyme and redox mediator. *Tetrahedron Letters*, 35, 5607-5610.

Gala D, DiBenedetto DJ, Clark JE, Murphy BL, Schumacher DP, Steinman M (1996)

Preparations of antifungal sch 42427/sm 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral α -hydroxy arylketones. *Tetrahedron Letters*, 37, 611-614.

Greiner L (1999) *Reaktionstechnik der Benzoylformiatdecarboxylase*. Diplomarbeit, Universität Bonn.

Gunsalus IC, Gunsalus CF, Stanier RY (1953) The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. *Journal of Bacteriology*, 66, 538-542.

Hammett LP (1935) Some relations between reaction rates and equilibrium constants. *Chemical Reviews*, 17, 125-136.

Hammett LP (1937) The effect of structure upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives *Journal of the American Chemical Society*, 59, 96-103.

Hansch C, Leo A (1979) *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Wiley Interscience, New York.

Hasson MS, Muscate A, McLeish MJ, Polovnikova LS, Gerlt JA, Kenyon GL, Petsko GA, Ringe D (1998) The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6 Å resolution: Diversity of catalytic residues in thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Biochemistry*, 37, 9918-9930.

Hegemann GD (1966) Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by pseudomonas putida. *Journal of Bacteriology*, 91, 1155-1160.

Hilthorst R, Laane C, Veeger C (1982) Photosensitized production of hydrogen by hydrogenase in reversed micells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 79, 3927-3930.

Hoover FW, Hass, HB (1947) Synthesis of 2-amino-1-phenyl-1-propanol and its methylated derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, 12, 506-509.

Hummel W (1997) New alcohol dehydrogenase for the synthesis of chiral compounds. In *Advances in biochemical engineering, biotechnology*, 58, 145-184.

Iding H, Dünnwald T, Greiner L, Liese A, Müller M, Siegert P, Grötzinger J, Demir A, Pohl M (2000) Benzoylformate decarboxylase from pseudomonas putida as stable

catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones. *European Journal of Chemistry*, 6, 1483-1495.

Ikemi M (1990) Sorbitol production in charged membrane bioreactor with coenzyme regeneration system: I. selective retainment of nadp(h) in a continuous reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 149-154.

IUBMB (1992) *Enzyme Nomenclature*. Academic Press Inc., San Diego.

Jung G, Beck-Sickinger AG (1992) Multiple peptide synthesis methods and their applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 31, 367-386.

Keinan E, Hafeli EK, Seth KK, Lamed R (1986) Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from *thermoanaerobium brockii*. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 162-169.

Keinan E, Seth KK, Lamed R, Ghirlando R, Singh SP (1990) Thermostable enzymes in organic synthesis, 4. tbadh-catalyzed preparation of bifunctional chirons. total synthesis of s-(+)-z-tetradec-5-en-13-olide. *Biocatalysis*, 3, 57-71.

Kihumbu D, Stillger T, Hummel W, Liese A (2002) Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 1069-1072.

Kim MJ, Choi GB, Kim JY, Kim HJ (1995) Lipase-catalyzed transesterification as a practical route to homochiral acyclic anti-1,2-diols. a new synthesis of (+)- and (-)-endobrevicomin. *Tetrahedron Letters*, 36, 6253-6256.

Klavehn W, Hildebrandt G (1934) Manufacture of laevo-1-phenyl-2-methylaminopropanol-1.

Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409, 241-245.

Kobayashi S, Endo M, Nagayama S (1999) Catalytic asymmetric dihydroxylation of olefins using a recoverable and reusable polymer-supported osmium catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 11229-11230.

Koike T, Murata K, Ikariya T (2000) Stereoselective synthesis of optically active α -hydroxy ketones and anti-1,2-diols via asymmetric transfer hydrogenation of unsymmetrically substituted 1,2-diketones. *Organic Letters*, 2, 3833-3836.

Kolb HC, Van Nieuwenhze MS, Sharpless KB (1994) Catalytic asymmetric

- Kragl U, Peters J, Wandrey C, Kula MR (1991)** Enzymmembranreaktor.
- Kragl U, Vasic-Racki D, Wandrey C (1992)** Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen. *Chemie Ingenieur Technik*, 64, 499-509.
- Kreutz OC, Moran PJS, Rodrigues JAR (1997)** Baker's yeast reduction of (e)-1-phenyl-1,2-propanedione 2-(o-methyloxime). a key step for a (-)-norephedrine synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 2649- 2653.
- Kubinyi H (1993)** *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches in*, volume 1 of *Methods and Principles in Medical Chemistry*. VCH, Weinheim.
- Kunieda N, Nokami J, Kinoshita M (1992)** Substituent effect on the enantiofacedifferentiating reaction of (r)-[lithiomethyl p-tolyl sulfoxide] with *m*- or *p*-substituted acetophenones. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 65, 526 ff.
- Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C (1987)** Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 81-87.
- Lam KP, Hui AHF, Jones JB (1986)** Enzymes in organic synthesis. 35. stereoselective pig liver esterase catalyzed hydrolyses of 3-substituted glutarate diesters. optimization of enantiomeric excess via reaction conditions control. *Journal of Organic Chemistry*, 51, 2047-2050.
- Lamed RJ, Zeikus JG (1981)** Novel nadp-linked alcohol-aldehyd/keton oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochemical Journal*, 195, 183-190.
- Lämmlli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lea AGH, Ford GD, Fowler S (2000)** Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 105-112.
- Leonida MD (2001)** Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 345-369.
- Lide DR (2003)** *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Cleveland, Ohio, 84th edition.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2000)** *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.

- Mak TCW, Chan KS, Zhang HX (1996)** Enantioselectivity increases with reactivity: Electronically controlled asymmetric addition of diethylzinc to aromatic aldehydes catalyzed by a chiral pyridylphenol. *Journal of Organic Chemistry*, 61, 8002-8003.
- Malinauskas AA, Kulis JJ (1978)** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14, 706 ff.
- Mander LN (1998)** *Stereoselektive Synthese*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Markovnikov VV (1870)** *Annalen der Chemie-Justus Liebig*, 153, 228-259.
- Matsushima A, Fujita T, Nose T, Shimohigashi Y (2000)** Edge-to-face ch/pi interaction between ligand phe-phenyl and receptor aromatic group in the thrombin receptor activation. *Journal of Biochemistry*, 128, 225-232.
- Mertens R, Greiner L, Ban ECD, Haaker HBCM, Liese A (2003)** Practical applications of hydrogenase i from pyrococcus furiosus for nadph generation and regeneration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 24-25, 39-52.
- Michaelis L, Menten ML (1913)** Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369.
- Mochizuki N, Hiramatsu S, Sugai T, Ohta H, Morita H, Itokawa H (1995)** Improved conditions for the produktion and characterization of 1-arylpropane-1,2-diols and related compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59, 2282-2291.
- Morita Y, Furui H, Yoshii H, Matsuno R, Kometami T (1994)** Nadp(h) regeneration using ethanol as an energy source in baker's yeast-mediated bioreduction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 13-16.
- Moussou P, Archelas A, Baratti J, Furstoss R (1998)** Microbiological transformations. 38. clues to the involvement of a general acid activation during hydrolysis of para-substituted styrene oxides by a soluble epoxide hydrolase from syncephalastrum racemosum. *Journal of Organic Chemistry*, 63, 3532-3537.
- Mukaiyama T, Shiina I, Iwadare H, Saitoh M, Nishimura T, Ohkawa N, Sakoh H, Nishimura K, Tani YI, Hasegawa M, Yamada K, Saitoh K (1999)** Asymmetric total synthesis of taxol(tm). *Chemistry - A European Journal*, 5, 121-161.
- Nagai WN, Kanao S (1929)** Über die Synthese der isomeren Ephedrine und ihrer Homologen. *Annalen der Chemie - Justus Liebig*, 470, 157-182.
- Nicolaou KC, Dai WM, Guy RK (1994)** Chemie und biologie von taxol. *Angewandte*

Chemie, 106, 38-69.

Nidetzky B, Neuhauser W, Haltrich D, Kulbe KD (1994) Continuous regeneration of nad(h) by coupled aldose reductase and glucose dehydrogenase in a charged ultrafiltration membrane reactor. In I. o. C. Engineers, editor, *Biotechnology '94. Proceedings of the Conference on Applied Biocatalysis at the 2nd UK Congress of Biotechnology*, 14-16, Brighton, U.K, ICHHEME.

Nidetzky B, Schmidt K, Neuhauser W, Haltrich D, Kulbe KD (1994) Application of charged ultrafiltration membranes in continuous enzyme-catalysed processes with coenzyme regeneration. In ed. Pyle, D. L., editor, *Separation for Biotechnology 3*, 351-357. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Okamoto Y, Yashima E (1998) Chromatographische enantiomerentrennung an polysaccharidderivaten. *Angewandte Chemie*, 110, 1072-1095.

Palucki M, Finney NS, Pospisil PJ, Güler ML, Ishida T, Jacobsen EN (1998) The mechanistic basis for electronic effects on enantioselectivity in the (salen)mn(iii)-catalyzed epoxidation reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 948-954.

Pedragosa-Moreau S, Archelas A, Furstoss R (1996) Microbiological transformations 32: Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxide derivatives. *Tetrahedron*, 52, 4593-4606.

Peters J, Minuth T, Kula MR (1993b) A novel nadh-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from candida parapsilosis, Purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 950-957.

Peters J, Zelinski T, Minuth T, Kula MR (1993a) Synthetic applications of the carbonyl reductases isolated from *candida parapilosis* and *rhodococcus erythropolis*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 4, 1683-1692.

Pham T, Phillips RS (1990) Effects of substrate structure and temperatur on the stereospecificity of secondary alcohol dehydrogenases from thermoanaerobacter ethanolicus. *Journal of the American Chemical Society*, 112, 3629-3632.

Pohl M, Siegert P, Mesch K, Bruhn H, Grötzinger J (1998) Active site mutants of pyruvate decarboxylase from zymomonas mobilis. a site-directed mutagenesis study of 1112, i472, i476, e473 and n482. *European Journal of Biochemistry*, 257, 538-546.

- Rasor P (2000)** Immobilized enzymes in enantioselective organic synthesis. In De Vos DE, Vankelecom IFJ, Jacobs PA (editors) *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Reetz MT (2001b)** Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren. *Angewandte Chemie*, 113, 292-320.
- Reetz MT, Jaeger KE (2000)** Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution. *Chemistry - A European Journal*, 6, 407-412.
- Reetz MT, Waldvogel R, Goddard R (1997)** Substituent effects in the rhodium-catalyzed hydroformylation of olefins using bis(diarylphosphino)methylamino ligands. *Tetrahedron Letters*, 38, 5967-5970.
- Reetz MT, Wilensek S, Zha D, Jaeger KE (2001a)** Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 40, 3589-3591.
- Riebel B (1996)** *Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuer mikrobieller NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen*. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Roberts SM (1999)** Preparative biotransformations. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1*, 1-21.
- Ruppert EA (1988)** Very efficient reduction of nad(p)^+ with formate catalysed by cationic rhodium complexes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1150-1151.
- Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula MR, Tischkov VI, Egorov AM, Wandrey C, Kragl U (1996)** A novel, efficient regenerating method of nadph using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters*, 37, 1377-1380.
- Servi S (1990)** Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. *Synthesis*, 1-25.
- Sheldon RA (1993)** *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*. Marcel Dekker, New York.
- Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY (1964)** *The systematic identification of organic compounds: a laboratory manual* 5th edition, Wiley, New-York.
- Sih CJ, Abushanab E, Jones JB (1977)** Biochemical procedures in organic synthesis.

Annual Reports in Medicinal Chemistry, 12, 298.

St. Clair N, Navia MA (1992) Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 7314-7316.

St. Clair N, Wang YF, Margolin AL (2000) Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (clec) of alcohol dehydrogenase. *Angewandte Chemie*, 112, 388-391.

Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Thömmes J, Wandrey C (1990) Kontinuierliche Erzeugung von NADH aus NAD⁺ und Formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten homogenkatalysator in einem Membranreaktor. *Angewandte Chemie*, 102, 445-447.

Stillger T (2004) *Reaktionstechnik der BAL*. PhD thesis, Bonn.

Stinson SC (1998) Counting on chiral drugs. *Chemical and Engineering News*, 76, 83.

Strauss UT, Felfer U, Faber K (1999) Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100Tetrahedron: *Asymmetry*, 10, 107-117.

Takehita M, Sato T (1989) Synthesis of optically active 1-phenyl-1,2-propanediol by baker's yeast. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1085-1086.

Takehita M, Yaguchi R, Akutsu N (1992) Enzymatic preparation of chiral 1-phenylglycidols and 1-phenyl-1,2-propanediols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 3, 1369-1372.

Tischkov VI, Galkin AG, Fedorchuk VV, Savitsky PA, Rojkova AM, Gieren H, Kula MR (1999) Pilot scale production and isolation of recombinant nad⁺- and nadp⁺-specific formate dehydrogenase. *Biotechnology and Bioengineering*, 64, 187-193.

Toukoniitty E, Mäki-Arvela P, Kuzma M, Villela A, Neyestanaki AK, Salmi T, Sjöholm R, Leino R, Laine E, Murzin DY (2001) Enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1,2-propanedione. *Journal of Catalysis*, 204, 281-291.

Ueki SI, Watanabe K, Koshihara T, Nakamura M, Oh-ishi K, Yasufuku Y, Miyazawa T (1999) Lipase-catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy)propionic acids in organic solvents: substituent effect controlling enantioselectivity toward racemic acids. *Biotechnology Letters*, 21, 865-868.

Uhlenbrock K (1994) *Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthesen - dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch-wässrigen Zwei-Phasen-System*. Dissertation,

Universität Bonn.

- Ullrich J (1970)** Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, ec 4.1.1.1.) assay of thiamin pyrophosphate. *Methods in Enzymology*, 18, 109-115
- Vasic-Racki D, Jonas M, Wandrey C, Hummel W, Kula MR (1989)** Continuous (r)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 31, 215-222.
- Watanabe K, Koshiha T, Yasufuku Y, Miyazawa T, Ueji S (2001)** Effects of substituent and temperature on enantioselectivity for lipase-catalysed esterification of 2-(4-substituted phenoxy) propionic acids in organic solvents. *Bioorganic Chemistry*, 29, 65-76.
- Weijers CAGM (1997)** Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by rhodotorula glutinis. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 639-647.
- Weiss PM, Garcia GA, Kenyon GL, Cleland WW, Cook PF (1988)** Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ¹³C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry*, 27, 2197-2205.
- Wong CH, Whitesides GM (1981)** Enzyme-catalyzed organic synthesis: Nad(p)h cofactor regeneration by using glucose 6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from leuconostoc mesenteroides. *Journal of the American Chemical Society*, 103, 4890-4899.
- Würdig G (1989)** *Behandlung des Weines mit schwefliger Säure*, Chemie des Weines, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Wykes JR, Dunnill P, Lilly MD (1972)** *Biochimica et Biophysica Acta*, 286, 260-268.
- Yang D, Yip YC, Chen J, Cheung KK (1998)** Significant effects of nonconjugated remote substituents in catalytic asymmetric epoxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 7659-7660.
- Zelinski T, Peters J, Kula MR (1994)** Purification and characterization of a novel carbonyl reductase isolated from rhodococcus erythropolis. *Journal of Biotechnology*, 33, 283-292.
- Zelinski T, Waldmann H (1997)** Quervernetzte Enzymkristalle (CLECS) – effiziente und stabile Biokatalysatoren für die präparative organische Chemie. *Angewandte Chemie*, 109, 746-748.

Zioudrou C, Chrysochou P (1977) Asymmetric synthesis with r- α -hydroxypropionaldehyde - temperature dependence of the diastereomeric product ratio. *Tetrahedron*, 33, 2103-2108.

Anhang A

Substratspektrum der BFD

Substratspektrum der BFD (siehe Tabelle 3-3) erweitert um die Substituenten-Konstanten σ und MR sowie den Werten für $\log([S]/[R])$.

Tabelle A.1: Variation des Produkt-Enantiomerenüberschusses in Abhängigkeit des Substituenten am Benzaldehyd.

Subst.	ee_{para}	$\log([S]/[R])_{para}$	σ_{para}	ee_{meta}	$\log([S]/[R])_{meta}$	σ_{meta}	MR
Br	87	1,17	0,23	96	1,69	0,39	8,88
Cl	86	1,12	0,23	94	1,15	0,37	6,03
CN	74	0,83	0,66	92	1,38	0,56	6,33
Et	91	1,33	-0,13	-	-	-	-
F	90	1,27	0,06	87	1,16	0,34	0,92
H	92	1,38	0,00	92	1,38	0,00	1,03
Me	91	1,20	-	97	1,81	-0,07	5,65
OAc	-	-	-	99	2,30	0,39	12,47
OCHF ₂	91	1,33	0,12	-	-	-	-
OEt	-	-	-	97	1,18	0,10	12,47
OH	92	1,38	-0,37	92	1,38	0,12	2,85
O <i>i</i> Pr	-	-	-	99	2,30	0,10	17,06
OMe	92	1,38	-0,27	96	1,69	0,10	7,87
OPh	-	-	-	99	2,30	0,25	27,68

$ee_{para/meta}$ = ee des *para*- bzw. *meta*- substituierten Produktes, $\log([S]/[R])_{meta/para}$ = Wert abgeleitet aus $ee_{para/meta}$, $\sigma_{meta/para}$ = Hammett Substituentenkonstanten, MR = Molare Refraktivität

Anhang B

Schemata für unterschiedliche Stripp-Modi

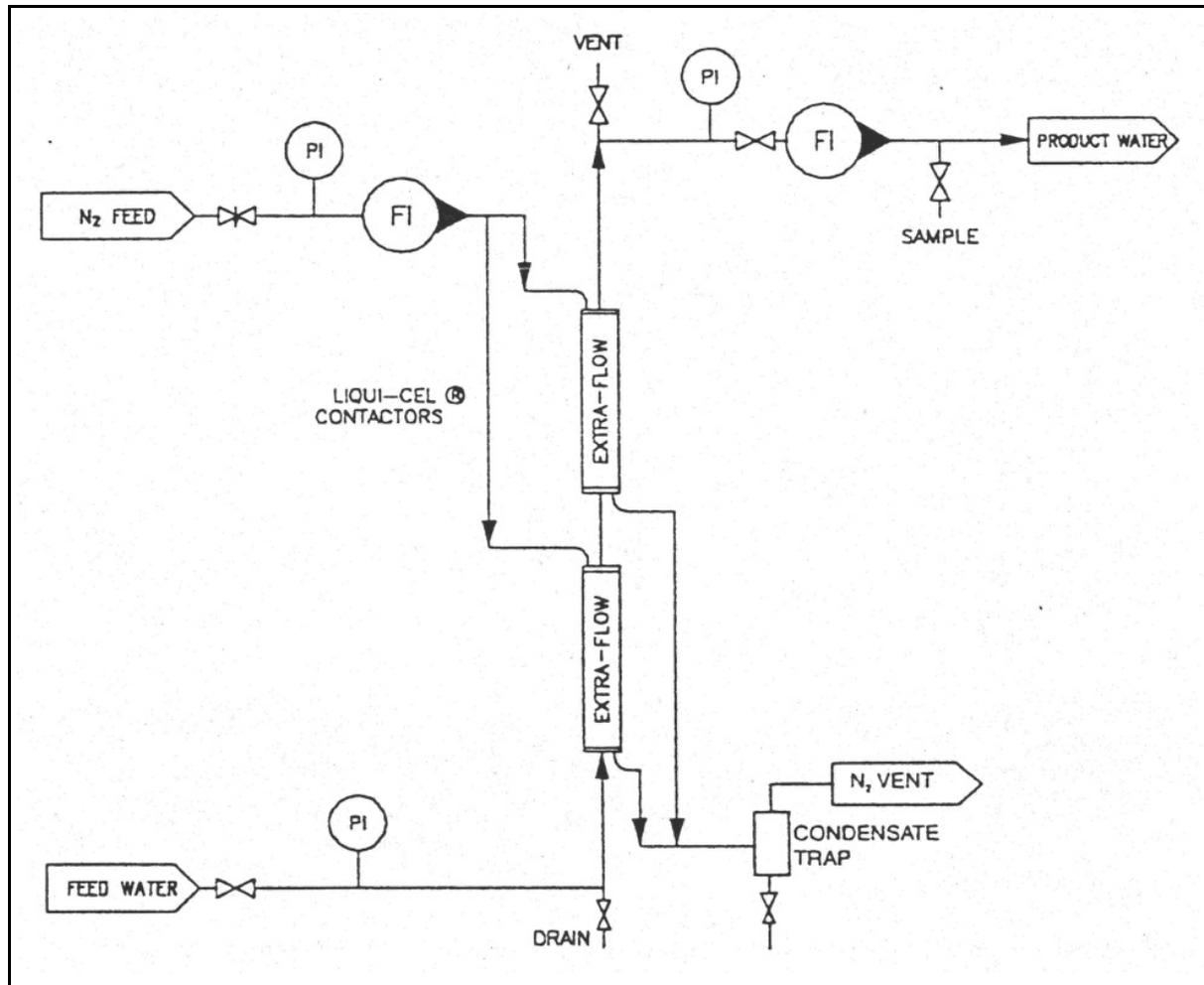


Abbildung B.1: Schema für die Extraktion mit Stripgas [Schema aus dem Produkthandbuch].

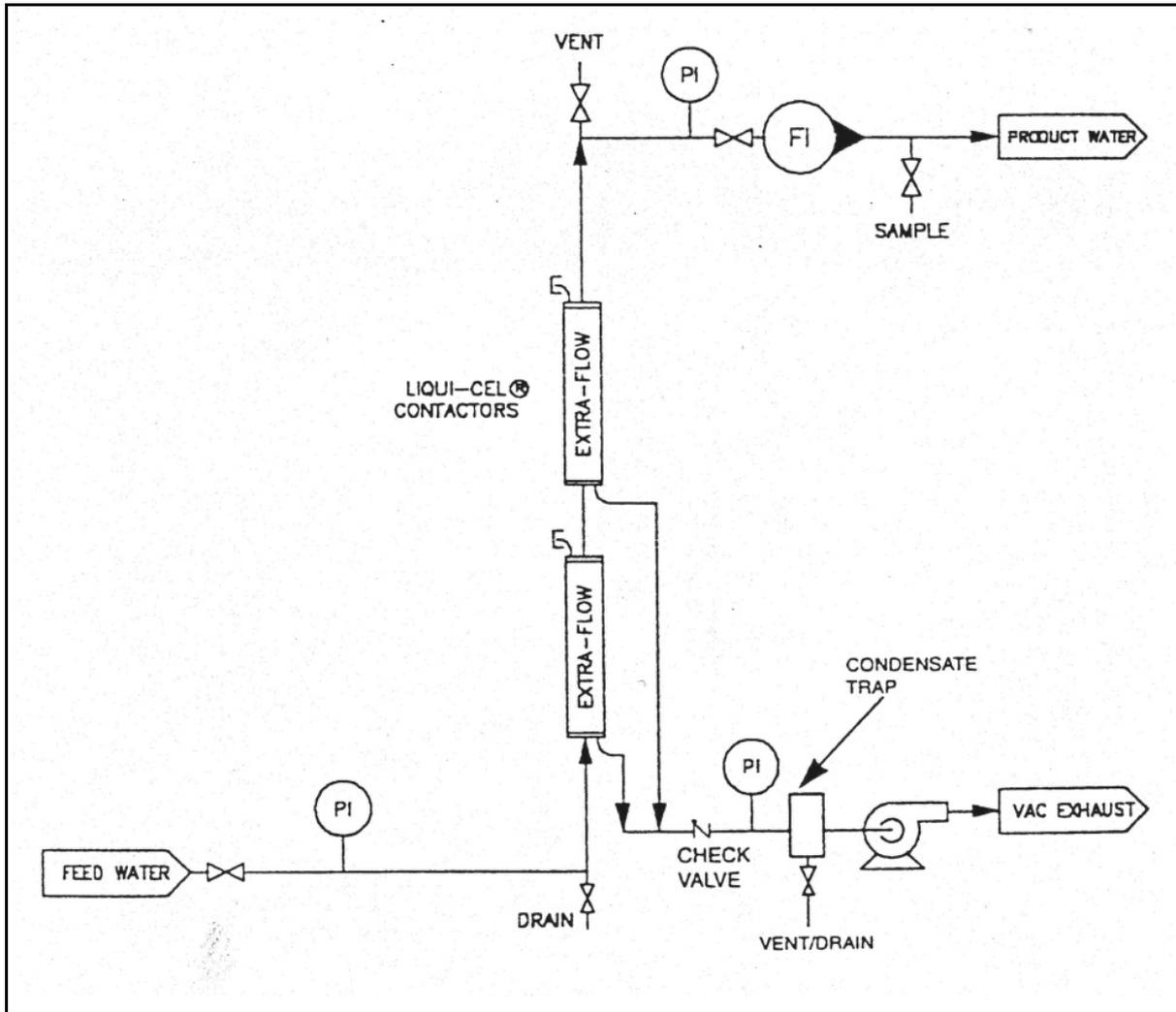


Abbildung B.2: Schema für die Extraktion mit Vakuum allein [Schema aus dem Produkthandbuch].

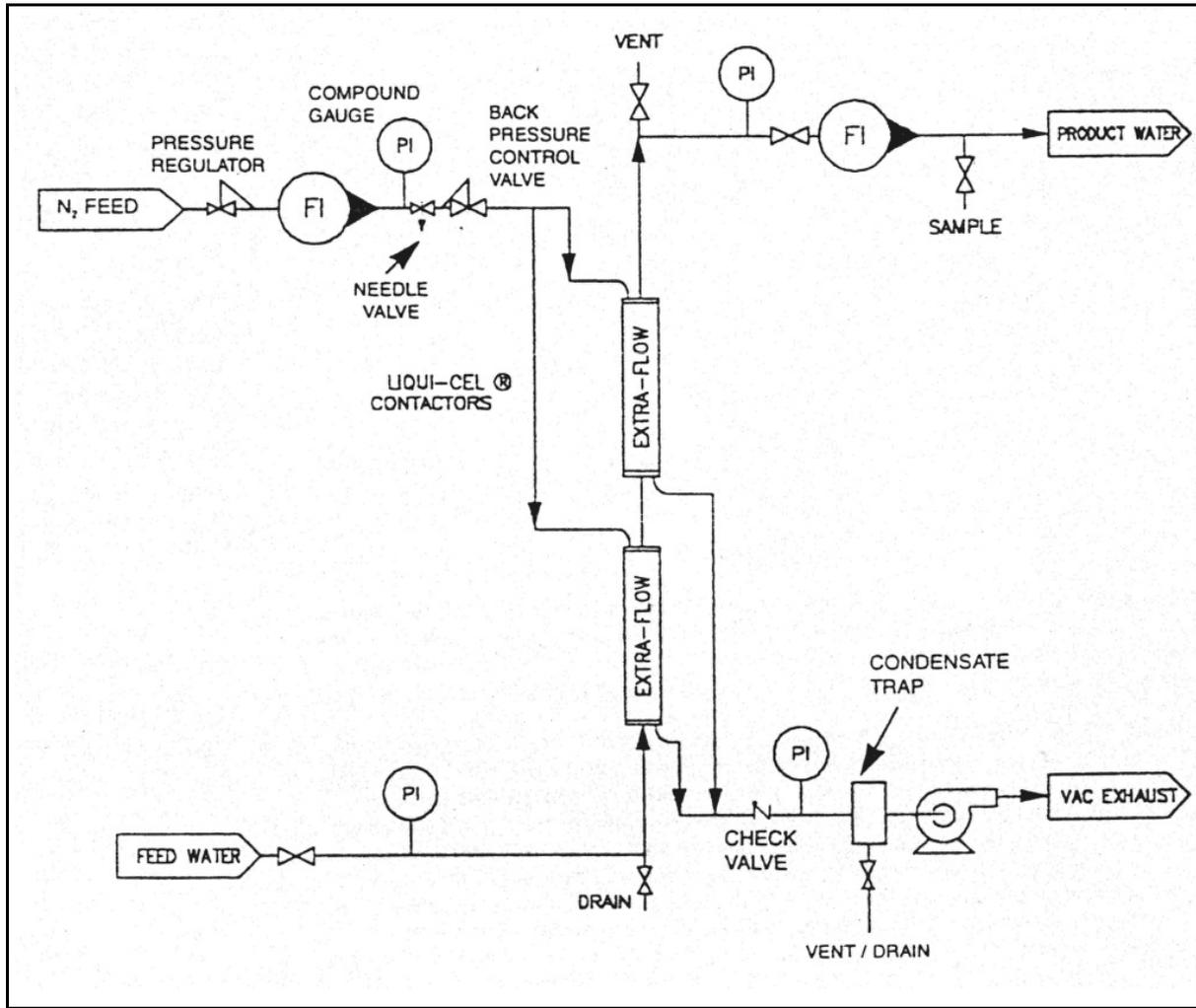


Abbildung B.3: Schema für die Extraktion mit Stripgas-unterstütztem Vakuum [Schema aus dem Produkthandbuch].

Anhang C

ADH-M Kinetik

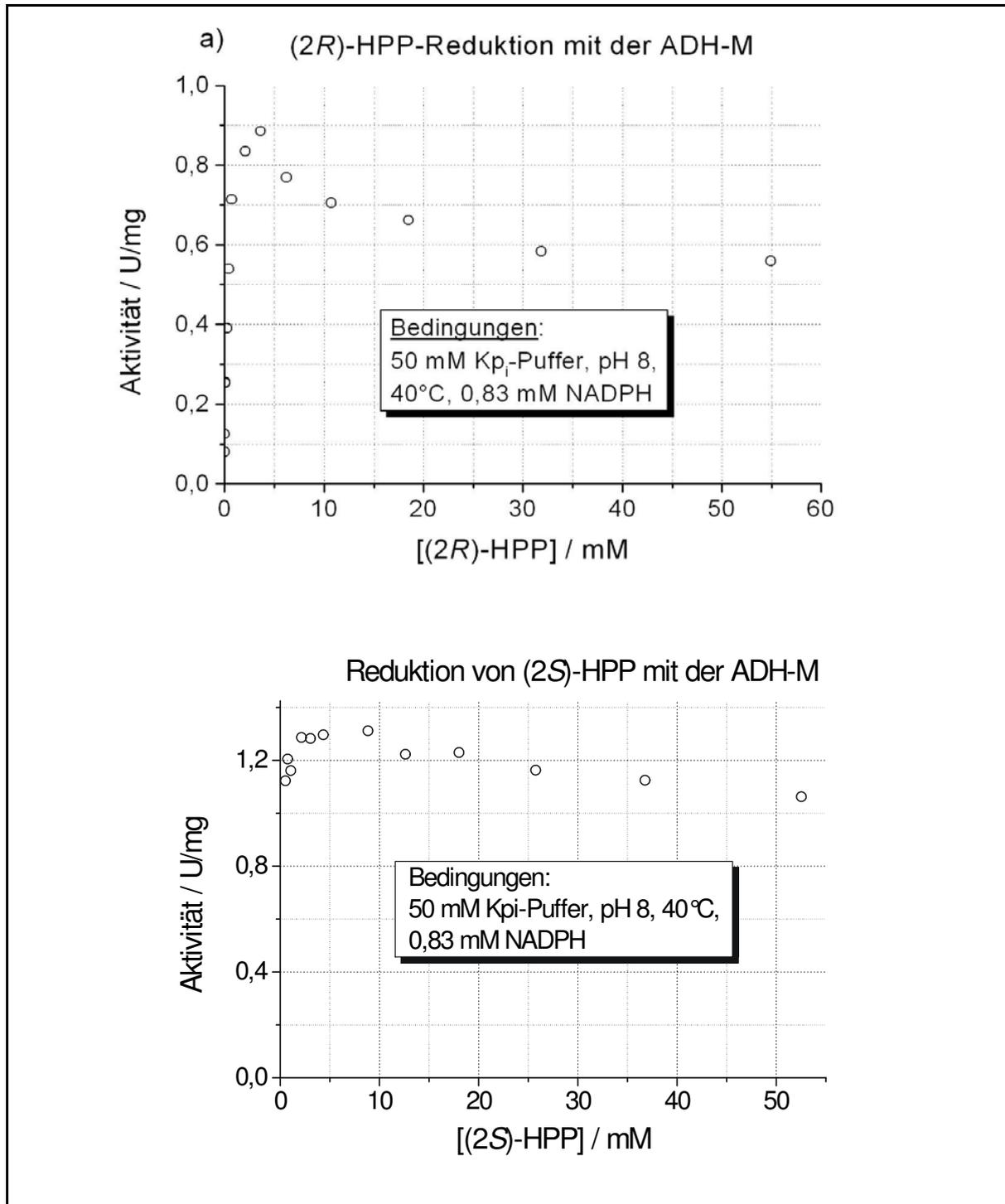


Abbildung C.1: a) Kinetik der (2R)-HPP-Reduktion mit ADH-M; $v_{max} = 0,90 \pm 0,05$ U/mg, $K_M = 0,21 \pm 0,04$ U/mg b) Kinetik der (2S)-HPP-Reduktion mit ADH-M; $v_{max} = 1,35 \pm 0,02$ U/mg, $K_M = 0,1 \pm 0,02$ mM.

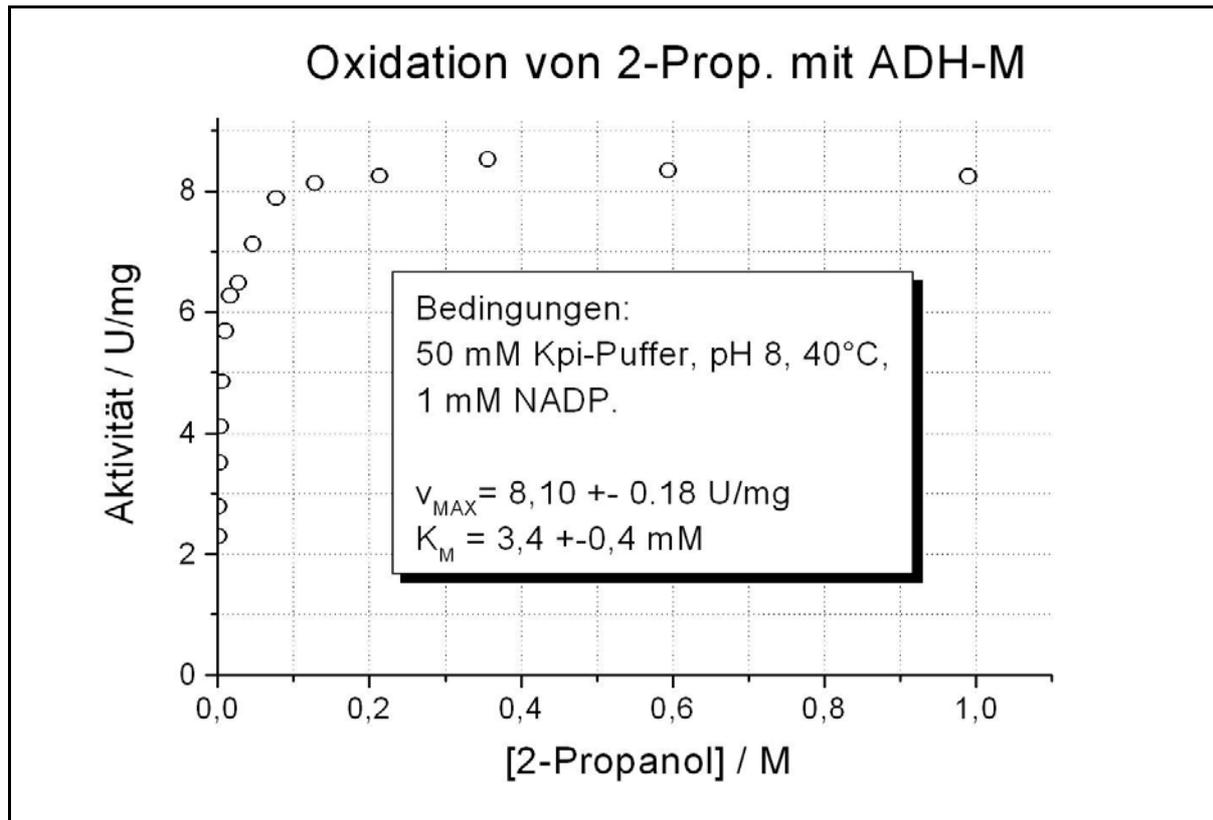


Abbildung C.2: Kinetik der 2-Propanoloxidation mit ADH-M; $v_{\text{max}} = 8,10 \pm 0,18 \text{ U/mg}$,
 $K_{\text{M}} = 3,4 \pm 0,4 \text{ mM}$.

Anhang D

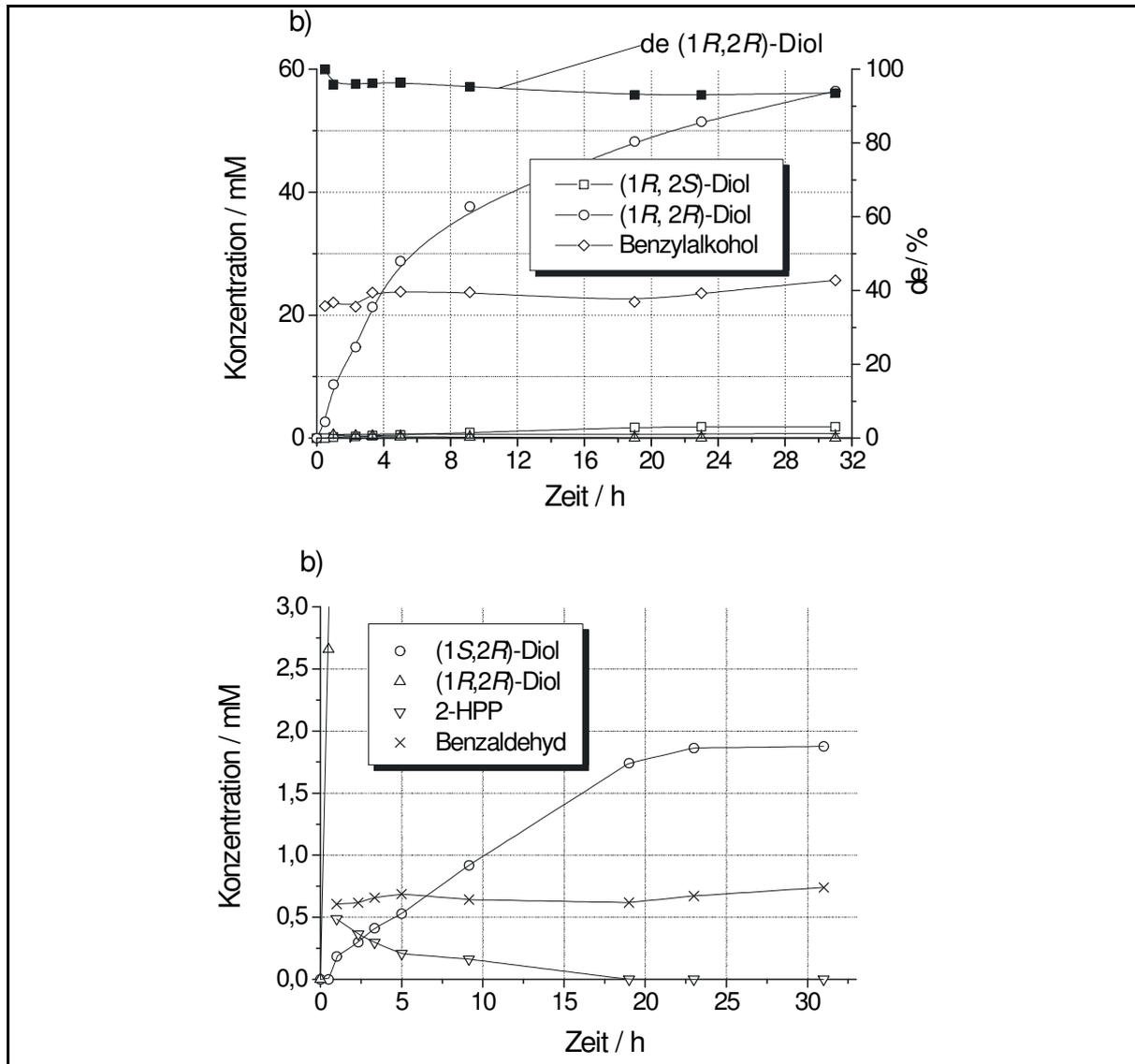
(R)-PAC-Reduktion zum *(1R, 2R)*-Diol

Abbildung D.1: *(R)*-PAC³³-Reduktion mit der *Lb*-ADH zum *(1R,2R)*-Diol. Bedingungen: 50 mM KPi-Puffer; pH 7; 25 °C; 0,4 mM NADPH; 56 mM *(R)*-PAC; 300 mM HCOONa; 0,265 U/mL FDH; 0,3 U/mL *Lb*-ADH (bezogen auf HPP-Aktivität).

³³ Die Verbindung liegt in technischer Qualität vor und ist das erst Zwischenprodukt bei der Herstellung von Ephedrin. Der als Hauptverunreinigung vorliegende Benzylalkohol entsteht in einer Nebenreaktion im ersten biokatalytischen Prozessschritt aus Benzaldehyd.

Anhang E

Scientist sheet für EMR-Modellierung

// EMR Simulationsmodell LbADH/FDH In Gegenwart von Acetaldehyd
// inkl Inhibierung der ADH durch NADP

//vfdh= Reaktionsgeschwindigkeit der FDH
//vadh_hpp= Reaktionsgeschwindigkeit der Lb-ADH bez. hpp Reduktion
//vadh_aa= Reaktionsgeschwindigkeit der Lb-ADH bez. aa Reduktion
//nadp= Ox. Cofaktor (NADP)
//nadph= Red.Cofaktor (NADPH)
//form= Natriumformiat
//aa= Acetaldehyd
//hpp= S-HPP
//diol= (1S,2S)-Diol
//adhc= Lb-ADH Konzentration
//fdhc= FDH Konzentration
//kma= Km Formiat von FDH
//kmb= Km NADP von FDH
//kmc= Km HPP von Lb-ADH Reaktion
//kmd= Km NADPH von HPP Reaktion mit Lb-ADH
//kme= Km Acetaldehyd von Lb-ADH Reaktion
//kmf= Km NADPH von Acetaldehyd Reaktion mit Lb-ADH
//kia= Ki_NADPH von FDH
//kib= Ki_NADP von HPP Reaktion mit Lb-ADH
//kic= Ki_SSDIOL von HPP Reaktion mit Lb-ADH
//kid= Ki_NADP von Acetaldehydreaktion mit Lb-ADH
//kie= Ki_EtOH von Acetaldehydreaktion mit Lb-ADH

DepVars: vfdh, vadh_hpp, vadh_aa, aa, hpp, diol, EtOH, nadp, nadph, form

IndVars: t

Params: kma, kmb, kmc, kmd, kme, kmf, kia, kib, kic, kid, kie

Params: fdhc, adhc, vmfdh, vmaa, vmhpp,

Params: nadp0, nadph0, form0, aa0, hpp0, diol0, EtOH0

$vfdh = fdhc * vmfdh * (nadp / (kmb * (1 + (nadph / kia)) + nadp)) * (form / (kma + form))$
 $vadh_hpp = adhc * vmhpp * (hpp / (kmc * (1 + (diol / kic)) + hpp)) * (nadph / (kmd * (1 + (nadp / kib)) + nadph))$
 $vadh_aa = adhc * vmaa * (aa / (kme * (1 + (EtOH / kie)) + aa)) * (nadph / (kmf * (1 + (nadp / kid)) + nadph))$

$nadp' = ((nadp0 - nadp) / \tau) - vfdh + vadh_hpp + vadh_aa$
 $form' = ((form0 - form) / \tau) - vfdh$
 $nadph' = ((nadph0 - nadph) / \tau) + vfdh - vadh_hpp - vadh_aa$
 $aa' = ((aa0 - aa) / \tau) - vadh_aa$
 $hpp' = ((hpp0 - hpp) / \tau) - vadh_hpp$
 $diol' = ((diol0 - diol) / \tau) + vadh_hpp$
 $EtOH' = ((EtOH0 - EtOH) / \tau) + vadh_aa$

//Kinetische Parameter der Enzym-Reaktionen U/mg oder [(in U/mL bzw mM)]:

vmfdh = 1.21

vmhpp = 0.98

vmaa = 18.03

kma = 21.8

kmb = 0.3

kmc = 2.09

kmd = 0.37

kme = 4.64

kmf = 0.34

kia = 0.06

kib = 0.06

kic = 31.39

kid = 0.1

kie = 2.02

// Konzentrationen / mM

nadp=0.1

nadph=0

form=300

aa=50

hpp=10

diol=0

EtOH=0

nadp0=0.1

nadph0=0

form0=300

aa0=50

hpp0=10

diol0=0

EtOH0=0

tau = 60

//Enzymmenge in mL/mL

fdhc = 2

adhc= 1

t = 0

.....