

# **Enzymkatalysierte C-C Knüpfung**

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur Synthese pharmazeutischer  
Intermediate**

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**

zur  
Erlangung des Grades

Doktor-Ingenieur  
(Dr.-Ing.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 04.06.2008

von Sven Kühl

aus Göppingen

Referent: Prof. Dr. Wandrey  
Korreferent: Prof. Dr. Kunz  
Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2009  
Erscheinungsjahr: 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*Den Gipfel im Auge, wandeln wir gerne auf der Ebene.  
(Johann Wolfgang von Goethe)*

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Wandrey für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Übernahme der Erstkorrektur.
- Herrn Prof. Dr. Kunz, Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Bonn für die freundliche Übernahme des Koreferats.
- Dr. Stephan Lütz für die wissenschaftliche Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Hinweise bei der Durchführung und Schreiben dieser Arbeit.
- PD. Dr. Martina Pohl, Prof. Dr. M. Müller, Prof. Dr. A. Liese für die ständige Offenheit für Fragen und zahlreichen sachkundigen Ratschläge.
- Dr. Thomas Stillger für die Anregungen zu Beginn der Arbeit.
- Dr. Eric von Lieres und Stefan Noack für die Unterstützung bei der Analyse und Aufbereitung der Daten.
- Prof. Dr. Vasic-Racki, Prof. Dr. Bruno Zelic für die Unterstützung bei der Entwicklung des kinetischen Modells und die freundliche Aufnahme in Zagreb.
- Lukas Ebel, Hjalmar Kühl, Falk Hildebrand für die intensive und kritische Durchsicht meiner Arbeit.
- Der Arbeitsgruppe Technische Biokatalyse für die herzliche Aufnahme und die umfangreiche Unterstützung während meiner Zeit in Jülich. Ganz besonders Heike Offermann für die vielen praktischen Tipps und ihren unermüdlichen Einsatz für Ordnung, was ein kontinuierliches Arbeiten erst ermöglichte. Weiterhin danke ich Lilia Härter, Roman Bucerius, Denise Herzog, Daniela Zehentgruber, Christina Kohlmann, Kirsten Schroer, Tina Kubitzki, Anna Siudak für ihre Kollegialität und wertvollen Beiträge zu dieser Arbeit.
- Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH und des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.
- Dem SFB 380 für die finanzielle Unterstützung der Arbeit
- Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern für die Ermöglichung und die umfassende Unterstützung dieses Studiums.
- Almaz für den bedingungslosen Rückhalt und ihre Hilfe beim Abfassen dieser Arbeit.

Heidelberg, im Mai 2008

Sven Kühl

## Enzymkatalysierte C-C Knüpfung

### Reaktionstechnische Untersuchungen zur Synthese pharmazeutischer Intermediate

In dieser Arbeit werden Möglichkeiten untersucht, durch enzymkatalysierte asymmetrische C-C Knüpfung, relevante pharmazeutische Intermediate zu synthetisieren. Das Ziel ist es die Synthese unterschiedlicher Produkte durch die Benzaldehydlyase (BAL) reaktionstechnisch zu charakterisieren. Anschließend werden die erhaltenen Daten zur Auswahl und Optimierung geeigneter Reaktorkonzepte verwendet und die Produkte im Gramm-Maßstab hergestellt.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Kopplung von teilweise substituierten aromatischen Aldehyden zu Benzoin(derivaten) untersucht. Aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten werden die kinetischen Parameter der ausgewählten Reaktionen bestimmt und anschließend durch Simulation verschiedener Reaktionsverläufe ergänzt.

Die Substrate und Produkte der BAL sind gering wasserlöslich. Es werden daher geeignete Reaktionsbedingungen untersucht die Löslichkeit der Reaktanden sowie die Substratverfügbarkeit zu verbessern. Die Untersuchungen werden im Hinblick auf technologische Anforderungen unter realen Bedingungen durchgeführt. Somit werden die Enzymstabilität und dafür relevante Faktoren wie Temperatur und Phasengrenzflächen untersucht und in der Simulation berücksichtigt. Für die Benzoin synthese im Zwei-Phasensystem eignet sich das Substrat als organische Phase. Die Produktabtrennung durch gezielte Kristallisation ist für die Benzoin synthese die Methode der Wahl [100]. Aus den Reaktoren werden mit hoher Enantioselektivität (> 99 %) (R)-Benzoin, (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin als Produkte im Gramm-Maßstab erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die enzymkatalysierte Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon-derivaten (HPP) aus aromatischen und aliphatischen Aldehyden charakterisiert. Zunächst wird eine geeignete Analytik zur Untersuchung des Reaktionsverlaufes entwickelt und das als Substrat benötigte Methoxyacetaldehyd synthetisiert. Die für die Arbeit ausgewählten Reaktionen werden reaktionstechnisch charakterisiert. Die erhaltenen kinetischen Parameter werden anhand von Reaktorläufen im Satzreaktor, membrangestützten Zwei-Phasensystem und im kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor überprüft. Aus den realisierten Reaktoren werden die Produkte (R)-3-Chlor-HPP, (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP und (R)-3,3-Dimethoxy-HPP im Gramm-Maßstab erhalten. Für (R)-3-Chlor-HPP wird die Folgesynthese zum pharmazeutisch wirksamen Hydroxybupropion gezeigt.

Diese Arbeit liefert ausführliche Informationen über die enantioselektive C-C Knüpfung mittels enzymatischer Katalyse. Etablierte chemische Verfahren werden für die Enzymkatalyse zu einem technologischen Konzept zusammengeführt, welches auf unterschiedlich substituierte Produkte übertragbar ist. Die Simulation der Prozessabläufe auf Basis der empirischen Modellbildung trägt entscheidend zum Verständnis des Gesamtprozesses bei.

## Enzyme catalysed C-C bond formation

### Reaction engineering for the synthesis of pharmaceutical intermediates

This thesis investigates feasibilities to synthesise relevant pharmaceutical intermediates by enzyme catalysed asymmetric C-C bond formation. Therefore the synthesis of several products formed by the Benzaldehyde lyase (BAL) are characterised by means of reaction engineering. Subsequent the resulting data are used for choosing and optimizing appropriate reactor concepts and the preparation of the products on a gram scale.

The first part of this work deals with the coupling of partially substituted aromatic aldehydes to Benzoin (-derivatives). The kinetic parameters of the chosen reactions are determined by initial rate measurement and completed by simulation of various reactor experiments.

The substrates and products of the BAL are low soluble in water. Hence suitable reaction conditions are studied to improve the solubility of the reactants and the availability of the substrate during the reaction. The investigations are conducted with respect to the specific technological requirements under realistic conditions. Consequently the stability of the enzyme and crucial factors like temperature and phase interfaces are investigated and included into the simulation. For the synthesis of Benzoin (-derivatives) a two-phase-system with the substrate as organic phase is shown to be a suitable approach. The separation of the product by well directed crystallisation is the method of choice [100]. From the reactor experiments (R)-Benzoine, (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoine and (R)-3-Methoxy-2'-chloro-benzoine are obtained with high enantioselectivity (> 99 %) on a multi gram scale.

In the second part of the thesis characterises the enzyme catalysed synthesis of 2-Hydroxy-1-phenylpropanone-derivatives (HPP) starting from aromatic and aliphatic aldehydes. In a first step an analytic method for the investigation of the reaction progress is developed and the required substrate Methoxyacetaldehyde is synthesised. Thereafter the selected reactions are characterised by means of reaction engineering. The obtained kinetic parameters are confirmed with experiments in batch reactor, membrane based two-phase-system and in the continuous enzyme-membrane-reactor. The realised reactors supply the products (R)-3-Chloro-HPP, (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP and (R)-3,3-Dimethoxy-HPP on a gram scale. For (R)-3-Chloro-HPP a follow-up synthesis to the pharmaceutical active Hydroxybupropion is shown.

This dissertation contains comprehensive information on the enantioselective C-C bond formation by enzymatic catalysis. Classical chemical processes are combined for the enzyme catalysis to a technological concept, which is applicable for the synthesis of various substituted products. The simulation of the reaction progress, based on an empirical model development, is an essential contribution to the understanding of the whole process.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>CHIRALE PRODUKTE.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	BENZOINE UND 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONE.....	4
<b>2.2</b>	<b>BIOKATALYSE - ENZYME IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE.....</b>	<b>8</b>
2.2.1	BIOKATALYSE.....	8
2.2.2	ANWENDUNG VON ENZYMEN IN TECHNISCHEN PROZESSEN.....	10
2.2.3	THIAMINDIPHOSPHAT ALS KOFAKTOR.....	11
2.2.4	THIAMINDIPHOSPHAT ABHÄNGIGE ENZYME.....	14
2.2.5	DIE BENZALDEHYDLYASE.....	16
2.2.6	VERWENDUNG VON COSOLVENTIEN.....	20
<b>2.3</b>	<b>KINETIK.....</b>	<b>22</b>
2.3.1	ENZYMKINETIK.....	22
2.3.2	SIMULATION.....	23
2.3.3	THERMODYNAMISCHES GLEICHGEWICHT.....	25
<b>2.4</b>	<b>VERFAHRENS- UND REAKTIONSTECHNISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>25</b>
2.4.1	REAKTOREN.....	27
2.4.2	SCHWER LÖSLICHE SUBSTANZEN.....	29
2.4.3	BIOKATALYSE IN ZWEIPHASENSYSTEMEN.....	31
2.4.4	FEST-FLÜSSIGTRENNUNG.....	34
<b>3</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>37</b>
4.1.1	GERÄTE.....	37
4.1.2	CHEMIKALIEN.....	37
<b>4.2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>38</b>
4.2.1	ANALYTIK.....	38
4.2.2	BEREITSTELLUNG VON SUBSTRATEN UND REFERENZEN.....	42
4.2.3	AUFARBEITUNG DER BAL.....	43
4.2.4	VERSUCHE IM SATZREAKTOR.....	44
4.2.4.1	Kinetik.....	44
4.2.4.2	Homogener Satzreaktor.....	45
4.2.4.3	Präparativer Satzreaktor.....	45
4.2.4.4	Synthese Bupropion.....	45
4.2.4.5	Fed-Batch Reaktor mit Feststoffabtrennung.....	45
4.2.5	VERSUCHE IM ZWEIPHASENSYSTEM.....	46
4.2.5.1	Heterogene Satzreaktoren.....	46
4.2.6	KONTINUIERLICHER REAKTOR.....	47

4.2.7	SIMULATIONEN.....	47
4.2.7.1	Simulation im Satzreaktor.....	48
4.2.7.2	Simulation im Zweiphasensystem.....	49
4.2.7.3	Simulation im Enzym-Membran-Reaktor.....	50
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>KINETIK UND THERMODYNAMIK DER BENZOINSYNTHESE .....</b>	<b>51</b>
5.1.1	KINETIK.....	51
5.1.1.1	Allgemeine Anmerkung.....	51
5.1.1.2	Bildung und Spaltung von ( <i>R</i> )-Benzoin.....	52
5.1.1.3	Einfluss des Lösungsmittels.....	53
5.1.1.4	Bildung und Spaltung von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin.....	55
5.1.1.5	Bildung und Spaltung von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin.....	56
5.1.2	THERMODYNAMISCHES GLEICHGEWICHT UND SELEKTIVITÄT .....	62
5.1.2.1	( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin.....	62
5.1.2.2	Die Selektivität der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin.....	64
5.1.2.3	( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin.....	66
5.1.2.4	Zusammenfassung.....	69
<b>5.2</b>	<b>WAHL DES REAKTIONSSYSTEMS ZUR BENZOINSYNTHESE.....</b>	<b>71</b>
5.2.1	HOMOGENES REAKTIONSSYSTEM.....	71
5.2.2	SIMULATION DER BENZOINSYNTHESE .....	71
5.2.3	KRISTALLISATION .....	72
5.2.4	HETEROGENES REAKTIONSSYSTEM.....	74
5.2.4.1	Zwei-Phasensystem.....	74
5.2.4.2	Lösungsmittel als zweite Phase.....	76
5.2.4.3	Stabilität der BAL im Zwei-Phasensystem.....	78
5.2.4.4	Substrat als zweite Phase .....	81
5.2.4.5	Präparative Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin.....	82
5.2.4.6	Maximale Katalysatorausnutzung.....	83
5.2.4.7	Präparative Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	84
5.2.4.8	Synthese ohne Cosolvens.....	85
5.2.4.9	Zusammenfassung: Reaktionssystem.....	86
<b>5.3</b>	<b>REAKTORKONZEPT ZUR SYNTHESE VON BENZOINEN .....</b>	<b>86</b>
5.3.1	SYNTHESE VON ( <i>R</i> )-BENZOIN.....	86
5.3.2	SYNTHESE VON ( <i>R</i> )-3,3'-DIMETHOXY-BENZOIN .....	88
5.3.2.1	Produktaufarbeitung von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	88
5.3.2.2	Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin im Fed-Batch Reaktor .....	89
5.3.2.3	Zusammenfassung ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	91
5.3.3	SYNTHESE VON ( <i>R</i> )-3-METHOXY-2'-CHLOR-BENZOIN.....	92
5.3.3.1	Produktaufarbeitung von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	92
5.3.3.2	Fed-Batch Reaktor zur Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	93
5.3.3.3	Betrieb des Fed-Batch Reaktors.....	94



5.3.3.4	Zusammenfassung: Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	96
<b>5.4</b>	<b>SYNTHESE VON 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONEN .....</b>	<b>97</b>
5.4.1	AUSWAHL DER REAKTIONEN .....	97
5.4.2	SYNTHESE DER SUBSTRATE UND ANALYTIK .....	97
5.4.2.1	Substratsynthesen .....	97
5.4.2.2	Analytik .....	99
5.4.3	KINETIK .....	99
5.4.3.1	Kinetik der Bildung von ( <i>R</i> )-1-(3-Chlorphenyl)-2-hydroxypropanon .....	100
5.4.3.2	Kinetik der Bildung von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon .....	104
5.4.3.3	Kinetik der Bildung von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon .....	109
5.4.3.4	Zusammenfassung Kinetik .....	112
5.4.4	DARSTELLUNG VON 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONEN IM SATZREAKTOR .....	114
5.4.4.1	Erweiterung der Simulation zur Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen .....	118
5.4.4.2	Zusammenfassung: Satzreaktor zur Darstellung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen .....	120
5.4.5	MEMBRANGESTÜTZTES ZWEI-PHASENSYSTEM .....	120
5.4.5.1	Verteilungskoeffizienten .....	121
5.4.5.2	Untersuchung des Stofftransports .....	123
5.4.5.3	Die Stabilität der BAL im Prozess .....	124
5.4.5.4	Synthese von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon im Zwei-Phasensystem .....	125
5.4.5.5	Zusammenfassung membrangestütztes Zwei-Phasensystem .....	132
5.4.6	DARSTELLUNG VON 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONEN IM ENZYM-MEMBRAN-REAKTOR .....	132
5.4.6.1	Kontinuierliche Synthese von ( <i>R</i> )-1-(3-Chlorphenyl)-2-hydroxypropanon .....	132
5.4.6.2	Kontinuierliche Synthese von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon .....	134
5.4.6.3	Kontinuierliche Synthese von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon .....	136
5.4.6.4	Zusammenfassung: Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen im Enzym-Membran- Reaktor .....	137
5.4.7	FOLGECHEMIE FÜR 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONE .....	137
5.4.8	ZUSAMMENFASSUNG 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONE .....	139
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>141</b>
<b>6.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER BENZOINSYNTHESE .....</b>	<b>141</b>
<b>6.2</b>	<b>SYNTHESE VON BENZOINEN .....</b>	<b>144</b>
6.2.1	SIMULATION UND UNTERSUCHUNG DES REAKTIONSSYSTEMS .....	144
6.2.2	STEIGERUNG DER SUBSTRATKONZENTRATION .....	146
6.2.3	REAKTOR MIT FESTSTOFFABTRENNUNG .....	148
<b>6.3</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANON-SYNTHESE .....</b>	<b>152</b>
6.3.1	SUBSTRATSYNTHESEN UND ANALYTIK .....	152
6.3.2	KINETIK .....	153
<b>6.4</b>	<b>SYNTHESE VON 2-HYDROXY-1-PHENYLPROPANONEN .....</b>	<b>156</b>
6.4.1	SATZREAKTOR .....	156
6.4.2	ZWEI-PHASENSYSTEM .....	157
6.4.3	ENZYM-MEMBRAN-REAKTOR .....	163

## Inhaltsverzeichnis

---

6.4.4	FOLGECHEMIE .....	165
7	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>166</b>
8	<b>LITERATUR.....</b>	<b>169</b>

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Glyceraldehyd .....	3
Abbildung 2.2: Reaktionsmechanismus der Kreuz-Benzoin Kondensation [99] .....	4
Abbildung 2.3: Synthese eines entzündungshemmend wirkenden Thiazolderivates unter Verwendung eines unsymmetrischen Benzoin [8, 11, 104] .....	5
Abbildung 2.4: Ausgewählte Reaktionen der Benzoin synthese [44] .....	6
Abbildung 2.5: Mögliche Anwendung von 2-Hydroxyketonen zur Synthese pharmakologisch aktiver Wirkstoffe .....	7
Abbildung 2.6: Synthese und Folgechemie von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonderivaten .....	8
Abbildung 2.7: Verteilung der industriell verwendeten Enzymmenge auf die Anwendungsgebiete ...	10
Abbildung 2.8: Markt der industriell eingesetzten Enzyme Ende der 90er [15] .....	11
Abbildung 2.9: Synthese von Ephedrin .....	11
Abbildung 2.10: Strukturformel von Thiamindiphosphat .....	12
Abbildung 2.12: Umpolung des Carbonyl-Kohlenstoffes durch Entstehung eines Enamins 4a Carbanions 4b .....	13
Abbildung 2.13: nucleophiler Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff von Benzaldehyd, Bildung von Benzoin .....	13
Abbildung 2.14: Postulierter Reaktionsmechanismus der BAL .....	14
Abbildung 2.15: Reaktion der Transketolase .....	14
Abbildung 2.16: Kristallstruktur der Benzaldehydlyase [130] .....	17
Abbildung 2.17: BAL-katalysierte HPP-Bildung .....	17
Abbildung 2.18: Reaktionswege (nummeriert) der HPP-Synthese am Beispiel der Bildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon aus Benzaldehyd und Acetaldehyd .....	18
Abbildung 2.19: Einfluss des pH-Wertes auf Stabilität und Aktivität von Benzaldehydlyase [183] ...	19
Abbildung 2.20: Lagerstabilität der BAL bei 4°C [183] .....	21
Abbildung 2.21: Allgemeiner Ablauf einer chemischen Reaktion .....	25
Abbildung 2.22: Kenngrößen der reaktionstechnischen Prozessentwicklung [117] .....	26
Abbildung 2.23: Vergleich Satzreaktor (Links), Zulaufverfahren (Mitte) und kontinuierlicher Reaktorbetrieb (Rechts) .....	27
Abbildung 2.24: Schema eines kontinuierlichen Membranreaktors .....	29
Abbildung 2.25: Prinzip eines wässrig-organischen Zweiphasensystems .....	32
Abbildung 4.1: Standardgeraden für HPLC bei 254nm. ....	41
Abbildung 5.1: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-Benzoin in Abhängigkeit der Konzentration von Benzaldehyd .....	52
Abbildung 5.2: Bildungsgeschwindigkeit von Benzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration von ( <i>R</i> )-Benzoin .....	53
Abbildung 5.3: Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-Benzoin in unterschiedlichen Reaktionsmedien .....	54
Abbildung 5.4: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	55
Abbildung 5.5: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Methoxybenzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration an ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	56
Abbildung 5.6: Reaktionsschema der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	57
Abbildung 5.7: Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	58
Abbildung 5.8: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in Abhängigkeit der Konzentration an 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd .....	58
Abbildung 5.9: Spaltung von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	59

Abbildung 5.10: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration an ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	60
Abbildung 5.11: Synthese von ( <i>R</i> )-2,2'-Dichlor-benzoin .....	60
Abbildung 5.12: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-2,2'-Dichlor-benzoin in Abhängigkeit der Konzentration an 2-Chlorbenzaldehyd .....	61
Abbildung 5.13: Spaltung von ( <i>R</i> )-2,2'-Dichlor-benzoin.....	61
Abbildung 5.14: Oxidation von Benzoin zu Benzil .....	61
Abbildung 5.15: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	63
Abbildung 5.16: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	64
Abbildung 5.17: Prozentualer Anteil der gebildeten Produkte je Ansatz .....	65
Abbildung 5.18: Reaktionsschema und die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	66
Abbildung 5.19: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	67
Abbildung 5.20: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	68
Abbildung 5.21: Simulation der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichungen .....	72
Abbildung 5.22: Anpassung der Reaktion unter Einbeziehung der Kristallisation und Enzymaktivität .....	74
Abbildung 5.23: Maximale Löslichkeiten in verschiedenen Medien .....	75
Abbildung 5.24: Verteilungskoeffizienten Benzoin und Benzaldehyde .....	76
Abbildung 5.25: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	77
Abbildung 5.26: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	78
Abbildung 5.27: Einfluss der thermischen Desaktivierung auf die BAL .....	79
Abbildung 5.28: Temperaturstabilität der BAL mit Substrat.....	79
Abbildung 5.29: Reaktor zur Untersuchung der Enzymstabilität .....	80
Abbildung 5.30: Halbwertszeit der Benzaldehydlyase in Zwei-Phasensystemen mit verschiedenen Grenzflächen.....	80
Abbildung 5.31: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	82
Abbildung 5.32: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin ohne Cosolvens....	85
Abbildung 5.34: Aufarbeitungsprotokolle zur Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin mit und ohne MTBE .....	89
Abbildung 5.35: Schema des Fed-Batch Reaktors.....	89
Abbildung 5.36: Fed-Batch Reaktor zur Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	90
Abbildung 5.37: Im Fed-Batch Reaktor synthetisiertes ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin.....	91
Abbildung 5.38: Schematische Darstellung einer Filterkerze .....	92
Abbildung 5.39: Enzymverbleib während der Filtration .....	93
Abbildung 5.40: Produktaufarbeitungsalgorithmus zur Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	93
Abbildung 5.41: Schema des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin	94
Abbildung 5.42: Enzymaktivität während des Reaktorbetriebs.....	95
Abbildung 5.43: Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan .....	97
Abbildung 5.44: Periodatspaltung von Glycerinmethylether.....	98
Abbildung 5.45: Kontinuierliche Extraktionsanlage .....	98
Abbildung 5.46: Derivatisierung von Aldehyden mit Dimecon.....	99
Abbildung 5.47: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,3'-Dichlor-benzoin aus 3-Chlorbenzaldehyd ....	101
Abbildung 5.48: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Chlorbenzaldehyd aus ( <i>R</i> )-3,3'-Dichlor-benzoin ....	102

Abbildung 5.49: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP aus ( <i>R</i> )-3,3'-Dichlor-benzoin und Acetaldehyd .....	103
Abbildung 5.50: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP aus 3-Chlorbenzaldehyd und Acetaldehyd .....	104
Abbildung 5.51: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-4,4'-Dimethoxy-benzoin aus 4-Methoxybenzaldehyd .....	105
Abbildung 5.52: Bildungsgeschwindigkeit von 4-Methoxy-Benzaldehyd aus ( <i>R</i> )-4,4'-Dimethoxy-benzoin .....	106
Abbildung 5.53: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-HPP aus ( <i>R</i> )-4,4'-Dimethoxy-benzoin und Methoxyacetaldehyd.....	107
Abbildung 5.54: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-HPP aus 4-Methoxy-Benzaldehyd und Methoxyacetaldehyd (I).....	108
Abbildung 5.55: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-HPP aus 4-Methoxy-Benzaldehyd und Methoxyacetaldehyd (II) .....	108
Abbildung 5.56: Benzoinbildung in bei verschiedenen Konzentrationen von Dimethoxyacetaldehyd ....	110
Abbildung 5.57: Geschwindigkeit der Benzaldehydbildung in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd .....	111
Abbildung 5.58: Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP aus Benzoin und Dimethoxyacetaldehyd .....	112
Abbildung 5.59: Reaktionsweg der Bildung von HPP-Derivaten .....	115
Abbildung 5.60: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP im Satzreaktor.....	116
Abbildung 5.61: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-HPP im Satzreaktor .....	116
Abbildung 5.62: Reaktionsverlauf der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP im Satzreaktor.....	117
Abbildung 5.63: Simulation der ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP im Homogenen System mit dem erweiterten Modell.....	119
Abbildung 5.64: Lösungsmittelresistenter Hohlfaserkontaktor mit X-50 Membran von Celgard .....	121
Abbildung 5.65: Verteilungskoeffizienten für Benzoin und Benzaldehyde .....	122
Abbildung 5.66: Verteilungskoeffizienten der aliphatischen Aldehyde .....	122
Abbildung 5.67: Extraktion von Benzaldehyd aus der wässrigen Phase in die organische Phase .....	123
Abbildung 5.68: Extraktion von Benzoin aus der wässrigen Phase in die organische Phase .....	124
Abbildung 5.69: Stabilität der BAL.....	125
Abbildung 5.71: Verlauf ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese in der wässrigen Phase.....	127
Abbildung 5.72: Verlauf ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese in organischer Phase .....	128
Abbildung 5.73: Sensitivitätsanalyse: Änderung der ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP-Konzentration .....	130
Abbildung 5.74: Sensitivitätsanalyse: Änderung der Benzaldehydkonzentration .....	130
Abbildung 5.75: Konzentration an ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP bei der Synthese im kontinuierlichen Membranreaktor .....	133
Abbildung 5.76: MTBE als Cosolvens .....	134
Abbildung 5.77: Inhibierung der BAL durch Methanol und Methoxyacetaldehyd (aus Hydrolyse) ....	135
Abbildung 5.78: Synthese von ( <i>R</i> )-3,4'-Dimethoxy-HPP im kontinuierlichen Membranreaktor.....	136
Abbildung 5.79: Synthese von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP im kontinuierlichen Membranreaktor .....	137
Abbildung 5.80: Synthese von Hydroxybupropion .....	138
Abbildung 6.5: Vergleich <i>ttn</i> mit der Volumetrischen Produktivität .....	147
Abbildung 6.6: Fed-Batch Reaktor zur Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	149
Abbildung 6.7: Mit Hilfe des Fed-Batch Reaktor synthetisiertes ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ....	149
Abbildung 6.9: Membrangestütztes Zwei-Phasensystem.....	158

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1:	Verzeichnis der Symbole.....	XV
Tabelle 1.2:	Verzeichnis der Indizes .....	XVI
Tabelle 1.3:	Verzeichnis der Abkürzungen .....	XVII
Tabelle 2.1:	Systematik der Grundoperationen [199] .....	26
Tabelle 2.2:	Bei enzymatischen Prozessen eingesetzte Substratkonzentrationen [110].....	30
Tabelle 2.3:	Fest-Flüssigtrennung durch Filtration .....	34
Tabelle 5.1:	Einfluss des Cosolvens auf die Bildungsgeschwindigkeit von ( <i>R</i> )-Benzoin.....	54
Tabelle 5.2:	Die kinetischen Parameter der Bildung von 3-( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	59
Tabelle 5.3:	Berechnete Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen.....	67
Tabelle 5.4:	Theoretische Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen .....	68
Tabelle 5.5:	Übersicht der kinetischen Parameter .....	69
Tabelle 5.6:	Übersicht der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten .....	70
Tabelle 5.7:	Bestimmtheitsmaß der Simulation des Satzreaktors .....	72
Tabelle 5.8:	Parameter der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	73
Tabelle 5.9:	Ergebnisse des Satzreaktor-Versuches zur Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin .....	83
Tabelle 5.10:	Ergebnisse des Satzreaktor-Versuches zur Bestimmung der maximalen Katalysatorausnutzung.....	83
Tabelle 5.11:	Größen des Satzreaktors der Synthese von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	84
Tabelle 5.12:	Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von ( <i>R</i> )-Benzoin .....	87
Tabelle 5.13:	Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin..	91
Tabelle 5.14:	Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Darstellung von ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin .....	95
Tabelle 5.15:	Kinetische Parameter der HPP-Synthese .....	113
Tabelle 5.16:	Durch Anpassung an Satzreaktoren optimierte kinetische Parameter .....	118
Tabelle 5.17:	Parameter der Synthese von ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP .....	120
Tabelle 5.18:	Parameter zur Simulation der ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese im Zwei-Phasensystem .....	129
Tabelle 5.19:	Herstellungskosten Bupropion .....	138
Tabelle 5.20:	Herstellungskosten für die biotechnologische Synthese von Hydroxybupropion .....	139
Tabelle 6.1:	Übersichtstabelle der durchgeführten Reaktorexperimente zur Benzoin synthese .....	151
Tabelle 6.2:	Ergebnisse der Experimente im EMR und Zwei-Phasensystem .....	164

## Symbole und Abkürzungen

Tabelle 1.1: Verzeichnis der Symbole

Symbol	Wert, Einheit	Größe
A	dm <sup>2</sup>	Fläche
C	mmol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup>	Kristallisationsrate
c <sub>x</sub>	mmol L <sup>-1</sup>	Konzentration der Komponente X
D	dm <sup>2</sup> min <sup>-1</sup>	Stofftransportkoeffizient
ee	-	Enantiomerenüberschuss; engl. <i>enantiomeric excess</i> . Definition: $ee [\%] = 100 \frac{[x(R)-x(S)]}{[x(R)+x(S)]}$ mit x(R), x(S) = Stoffmengenanteil des (R)- bzw. des (S)-Enantiomers
E	mg ml <sup>-1</sup>	Enzymkonzentration
g	-	Gewichtungsfaktor in der Kristallisation (Wert: 1-2,5)
Ha	-	Hatta-Zahl
J	m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	Diffusionskonstante
K	mmol L <sup>-1</sup>	Reaktionskonstante, Gleichgewichtskonstante
k	l min <sup>-1</sup> , 1 d <sup>-1</sup>	Geschwindigkeitskonstante
M	mmol dm <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup>	Molarer Stofftransport
P	-	Verteilungskoeffizient
pH	log	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration [-log (H <sup>+</sup> )]
R	8,314 J (mol·K) <sup>-1</sup>	allgemeine Gaskonstante
r <sup>2</sup>	-	Bestimmtheitsmaß, Pearsonscher Korrelationskoeffizient
RZA	g (L·d) <sup>-1</sup>	Raum-Zeit-Ausbeute
Θ	-	Anzahl der Verweilzeiten
S		Substrat
t	min, h, d	Zeit
T	°C, K	Temperaturangabe in Grad Celsius bzw. Kelvin
U	μmol min <sup>-1</sup>	Einheit der Enzymaktivität, unit
UpM	min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
v	mmol min <sup>-1</sup>	Reaktionsgeschwindigkeit
X		Komponente X

**Tabelle 1.2: Verzeichnis der Indizes**

<b>Index</b>	<b>Bedeutung</b>
1/2	Halbwert
1	Reaktion 1: Bildung von Benzoin(derivaten) aus Benzaldehyd(derivaten)
2	Reaktion 2: Spaltung von Benzoin(derivaten) in Benzaldehyd(derivate)
3	Reaktion 3: Bildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon-Derivaten aus Benzoin(derivaten) und aliphatischem Aldehyd
4	Reaktion 4: Bildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon -Derivaten aus Benzaldehyd(derivaten) und aliphatischem Aldehyd
AA	aliphatischer Aldehyd
act	aktive Form
BA	Benzaldehyd(derivat)
BZ	Benzoin(derivat)
c	Kristallisation
ALD	Acetaldehyd(derivat)
DALD	Dimethoxyacetaldehyd
deact	inaktive Form
des	Desaktivierung
diff	Diffusion
HPP	2-Hydroxy-1-phenylpropanon(derivat)
I	Inhibierung
M	Michaelis-Menten
MALD	Methoxyacetaldehyd
max	maximal
P	Verteilungskoeffizient
S	Solubilisierung
X	Komponente X



**Tabelle 1.3: Verzeichnis der Abkürzungen**

Abkürzung	Bedeutung
ALD	Acetaldehyd (und Derivate)
BA	Benzaldehyd(derivat)
BSA	Bovines serum albumin (Rinderserumalbumin)
BZ	Benzoin(derivate)
CSTR	Continuously stirred tank reactor
DALD	Dimethoxyacetaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
EA	Aktivierungsenergie
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
ES	Enzym-Substrat-Komplex
FF	Fast flow (Q-Sepharose FF)
GA	Genetischer Algorithmus
GF	Gelfiltration
HPP	2-Hydroxy-1-phenylpropanon(derivat)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat
MALD	Methoxyacetaldehyd
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NF	Nanofiltration
Ni-NTA	Nickel <sup>2+</sup> -nitrilotriacetic acid
NMR	Kernspinresonanz, nuclear magnetic resonance
PEG	Polyethylenglykol
S	Substrat
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEA	Triethanolamin
ThDP	Thiamindiphosphat
TPi	Theoretical plates, Anzahl der theoretischen Böden
<i>ttn</i>	total turnover number
UF	Ultrafiltration
TEA	Triethanolamin



## 1 Einleitung

Seit geraumer Zeit wird die Wirkung von Enzymen und Mikroorganismen von Menschen in verschieden Verfahren genutzt. Erste Verfahren kamen lange vor der Entdeckung von Mikroorganismen zur Anwendung. Beispiele dafür sind die etwa 7.000 Jahre alte Erzeugung von Käse mit Kälberlab oder die schon bei den alten Ägyptern bekannte Herstellung von Brot und Bier unter Verwendung von Hefe. Diese frühen Verfahren beruhen auf der Wirkung von Enzymen. Der Begriff „Enzym“ leitet sich vom griechischen Wort für Hefe ab (gr: ενζυμο: en-"in" und -zyme "Hefe").

1858 wurde von Traube zunächst nur vermutet, dass ein spezielles Protein der Hefe die Fermentation bewirkt [195]. Buchner bewies schließlich durch eine zellfreie Alkohol-Fermentation mit Zymase aus einem Hefe-Extrakt die Existenz von Enzymen [22]. Diese Entdeckung wurde 1907 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. 1926 gelang Sumner mit der Kristallisation von Urease aus Sojabohnenmehl [190] der Nachweis, dass es sich bei Enzymen zumeist um Proteine handelt (Nobelpreis für Chemie 1946).

Seit Mitte der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wird die Produktion von Enzymen durch Fortschritte auf dem Gebiet der Biotechnologie entscheidend erleichtert [69]. So finden Enzyme inzwischen weitverbreitet Anwendung in der Herstellung von Lebensmitteln, Pharmazeutika und Agrochemikalien. Durch technische Evolution können die Proteineigenschaften gezielt variiert werden. Dadurch kann die hohe Selektivität von Enzymen für die gezielte Herstellung von Fein- und Spezialchemikalien vorteilhaft genutzt werden [41, 188]. Eine grundlegende Eigenschaft für die Funktion von Wirkstoffen auf molekularer Ebene ist die Chiralität. Oft besitzt bei der Herstellung von Pharmazeutika nur ein Enantiomer des Wirkstoffes die gewünschte biologische Wirkung. Das führt zu verringerter Wirkstoffdichte und kann bis hin zu unerwünschten und schädlichen Nebenwirkungen reichen. Aufgrund dieser Erkenntnis sollen chirale Wirkstoffe enantiomerenrein hergestellt werden [189]. Darüber hinaus werden seit 1996 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) enantiomere Wirkstoffe nur noch in enantiomerenreiner Form zugelassen. Daraus ergibt sich eine große Bedeutung von Enzymen als enantioselektive Katalysatoren [184, 185].

Der wichtigste Vorteil gegenüber Synthesemethoden der klassisch organischen Chemie ist die hohe Stereoselektivität mit der Enzyme üblicherweise arbeiten [14]. Das Maß für die Stereoselektivität ist der Enantiomerenüberschuss (*ee*). Viele enzymatische Synthesen erreichen *ee*-Werte größer als 99 %. Enantiomere zeigen zwar die gleiche Konstitution, können jedoch unterschiedliche physiologische Eigenschaften besitzen. Die pharmazeutische Industrie ist deshalb darauf bedacht, enantiomerenreine Arzneimittel auf den Markt zu bringen [56].

Weitere Vorteile der enzymatischen gegenüber der klassisch organischen Synthese sind die hohe Spezifität, meist milde Reaktionsbedingungen und dadurch umweltfreundlichere Prozesse [17]. Allerdings sind die Substratspektren der Enzyme beschränkt. Durch das Arbeiten unter den milden Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu ist die Löslichkeit vieler Substrate niedrig [14].

Industrielle Anwendung finden bisher meist hydrolytisch aktive Enzyme wie Lipasen, Esterasen oder Proteasen [86, 163, 188]. Das Potential von Biokatalysatoren und mögliche Anwendungen reichen jedoch weit darüber hinaus [92]. Beispielsweise können Reaktionen, die mit

herkömmlichen chemischen Methoden schwierig durchzuführen sind, durch neue Prozesse mit Biokatalysatoren realisiert werden. Solche Synthesen sind z.B. die katalytische Decarboxylierung oder die asymmetrische C-C-Knüpfung in wässrigen Medien [52].

## 2 Theoretische Grundlagen

Etwa 90 % aller organischen Verbindungen bestehen aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. Grundsätzlich kann auch jedes andere Element in organische Verbindungen eingebaut werden. Jedoch verfügen, abgesehen von wenigen Ausnahmen, nur Kohlenstoff-Atome über die Fähigkeit zur Isomerie und untereinander Ketten und Ringe zu bilden. Die Mannigfaltigkeit der organischen Verbindungen beruht daher auf der besonderen Struktur des C-Atoms. Somit stellt die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen das Rückgrat der organischen Chemie dar [196].

### 2.1 Chirale Produkte

Zunächst soll auf die Bedeutung der optischen Isomerie, bzw. Chiralität näher eingegangen werden. Der Begriff der Chiralität ist die aus dem griechischen „cheir“ = Hand abgeleitete, von Lord Kelvin bereits 1904 geprägte Bezeichnung für die Eigenschaft eines Objektes, sich von seinem Spiegelbild zu unterscheiden.

Die Chiralität ist für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von organischen Verbindungen von großer Bedeutung. Da praktisch alle physiologisch aktiven Verbindungen und die entsprechenden Rezeptoren chiral sind, wurden zahlreiche, meist spezifische chirale Synthesen entwickelt.

Eine besondere Form der Stereoisomerie ist die Enantiomerie, deren Begriff vom griechischen „enantion“ = Gegenteil abgeleitet wurde. Nach IUPAC-Regel E-4.4 bezeichnet man als enantiomer solche Moleküle oder chiralen Gruppen, die sich zueinander wie Bild zu Spiegelbild verhalten [75]. Abbildung 2.1 zeigt die beiden Enantiomere eines chiralen Moleküls am Beispiel von Glyceraldehyd.

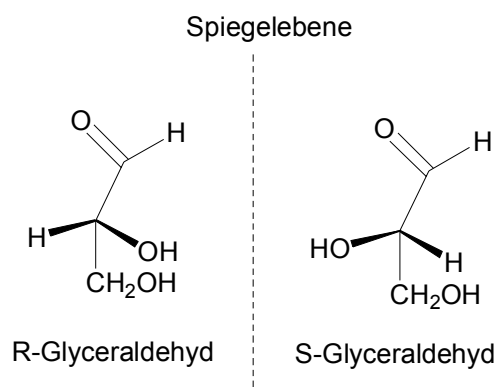


Abbildung 2.1: Glyceraldehyd

Enantiomere unterscheiden sich nur wenig in ihren physikalischen Eigenschaften (z.B. optische Drehung), aber deutlich in ihrer physiologischen, bzw. pharmakologischen oder toxikologischen Wirkung. Auch die Reaktion mit Enzymen und die sensorischen Eigenschaften, wie Geruch und Geschmack von Enantiomeren können sehr verschieden sein. Allerdings sind die genauen Zusammenhänge der Struktur-Wirkungsbeziehungen bisher noch unklar. Anhand der Struktur

kann daher keine Aussage über die mögliche Wirkung einer chiralen Substanz getroffen werden. Bekanntestes Beispiel der Bedeutung von Chiralität für die biologische Wirksamkeit von Substanzen ist der als Schlafmittel unter dem Namen Contergan® vermarktete Wirkstoff Thalidomid [5]. Etwa 50% aller heute im Arzneimittelsektor vermarkteten Wirkstoffe sind chiral [152]. Aufgrund der Erfahrungen der Vergangenheit wird heute vor der Zulassung von chiralen Wirkstoffen die getrennte Untersuchung der Enantiomere verlangt, bzw. die enantiomerenreine Darstellung angeordnet. Diese Vorschriften tragen dazu bei, dass die Kosten für die Entwicklung und Herstellung [120] von neuen Wirkstoffen erheblich gestiegen sind [54]. Zur Gewinnung von Enantiomeren sind zahllose spezifische Synthesen entwickelt worden. Dabei werden wegen ihrer höheren optischen Ausbeuten und Reinheiten (auch Enantiomeren-Überschuss genannt) die sogenannten enantioselektiven, als asymmetrische Synthesen, bevorzugt.

### 2.1.1 Benzoin- und 2-Hydroxy-1-phenylpropanone

Bestimmte Aldehyde dimerisieren unter dem Einfluss eines Katalysators und unter Bildung von aromatischen Acyloinen zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen, wie dem Benzoin [206]. Unter Acyloin-Kondensation versteht man daher die in Gegenwart von Katalysatoren ablaufende Dimerisation von Aldehyden. Bei der Reaktion können manche Aldehyde selektiv als Elektronen abgebender Donor eingehen (wird oxidiert), wie z.B. das 4-Dimethylbenzaldehyd, während andere wiederum nur als Elektronen aufnehmender Akzeptor fungieren (vgl. Abbildung 2.2). Somit können nicht nur symmetrische Benzoin- sondern auch gemischte Benzoin- entstehen.

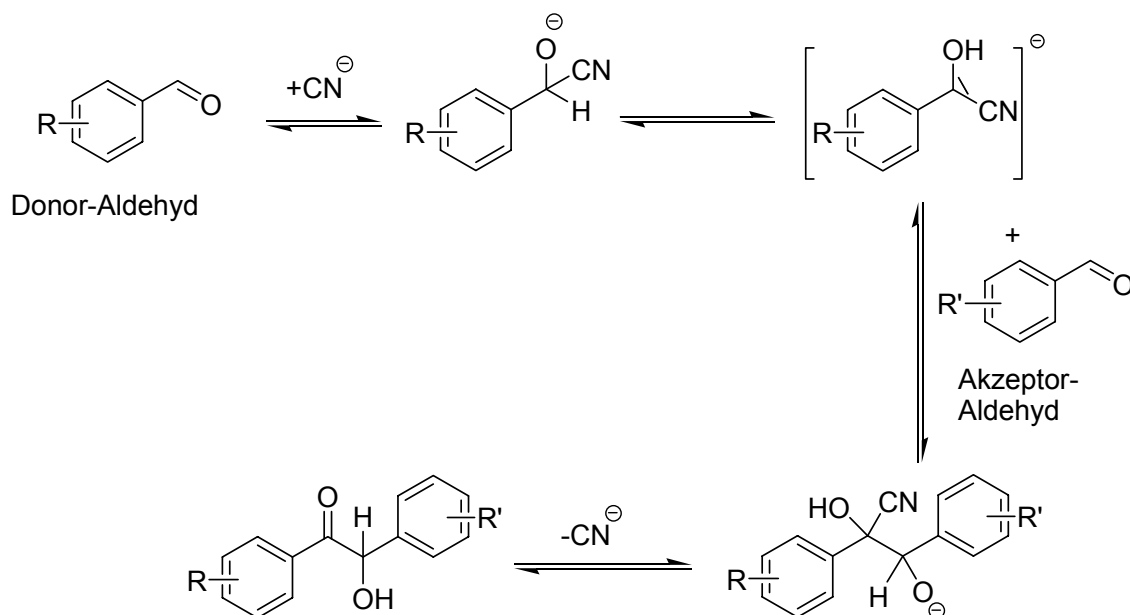


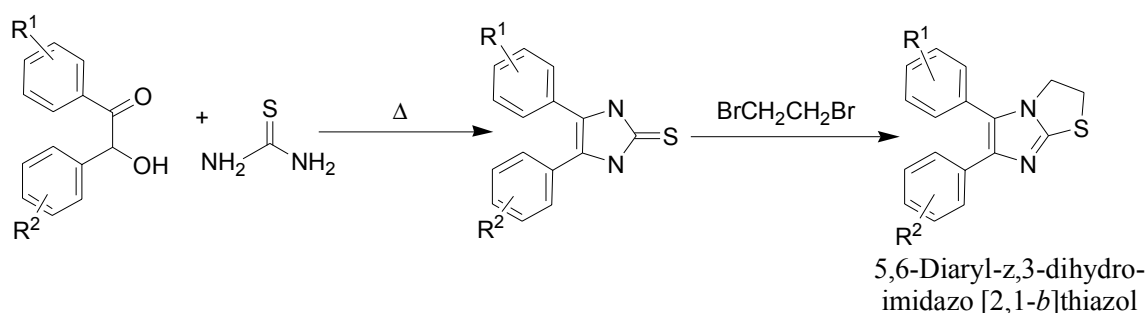
Abbildung 2.2: Reaktionsmechanismus der Kreuz-Benzoin Kondensation [99]

Als Katalysatoren der Aldehyddimerisation eignen sich neben dem Cyanidion besonders Thiazoliums Salze. Das Cyanidion ist ein hochspezifischer Katalysator für die Reaktion von aromatischen Aldehyden und wirkt nacheinander als Nucleophil, Umpolungs-Reagenz und Austrittsgruppe.

Werden die Cyanid-Ionen durch chirale Triazoliums Salze ersetzt, so erfolgt eine asymmetrische Benzoinbildung. [91]. Die dabei entstehenden (*R*)-Benzoinen zeigen jedoch nur einen moderaten Enantiomerenüberschuss (*ee* bis 66 %) bei geringen Ausbeuten (bis zu 22 %) [91]. Durch die Verwendung von chiralen, bicyclischen, Thiazoliums Salzen, kann (*S*)-Benzoin bis zu einem *ee* von 95 % synthetisiert werden [50].

In der organischen Chemie gibt es zahlreiche Beispiele für den Nutzen von symmetrischen Benzoinen [62, 84, 101, 123, 149, 176, 210]. Dagegen ist die Verwendung von gemischten Benzoinen, aufgrund ihrer mangelnden Verfügbarkeit, speziell in enantiomerenreiner Form, wenig verbreitet. Die  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl-Komponente bietet zahlreiche synthetische Möglichkeiten, jedoch finden diese Moleküle bisher fast nur als Baustein für pharmakologisch aktive Substanzen und als photolabile Schutzgruppen Verwendung.

Bei pharmakologisch wirksamen Verbindungen, für deren Synthese unsymmetrische Benzoinen genutzt wurden, handelt es sich vor allem um Entzündungshemmer. Als gemeinsames Strukturelement haben sie einen zweifach aromatisch substituierten fünfgliedrigen Heterozyklus (Abbildung 2.3) [3, 8, 11, 104, 106].



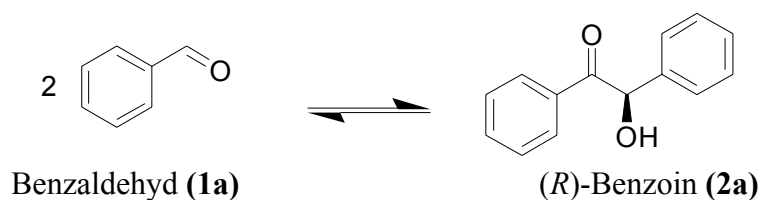
**Abbildung 2.3:** Synthese eines entzündungshemmend wirkenden Thiazolderivates unter Verwendung eines unsymmetrischen Benzoinen [8, 11, 104]

Trotz der vorhandenen biologischen Wirksamkeit wird bisher keine der Verbindungen zur industriellen Herstellung eines pharmazeutischen Präparats eingesetzt. Ebenfalls im Entwicklungsstatus sind Verbindungen, die mit unsymmetrischen Benzoinen dargestellt werden und die auf Blutglucose senkende [113] oder cytotoxische [133] Eigenschaften untersucht werden.

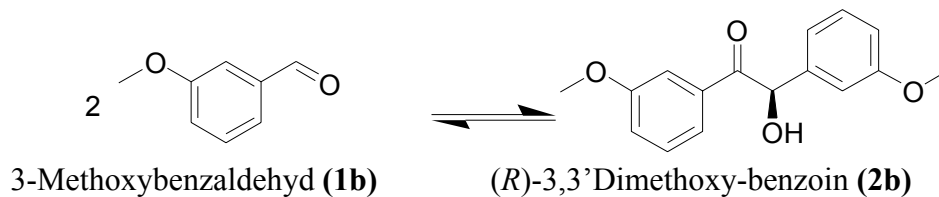
In der Lebensmittelindustrie dient Benzoin als Antioxidans [201] und bei der Synthese zahlreicher Verbindungen wurden unsymmetrische Benzoinen bereits erfolgreich als photolabile Schutzgruppen eingesetzt. Hierzu gehören kurzkettige Nucleotidsequenzen [139, 141] (Abbildung 2.3) ebenso wie Aminosäuren [25, 137], Alkohole [140], Carboxylate [107, 154] und Phosphate [31]. Für diese Synthesen werden auch enantiomerenreine Benzoinen eingesetzt, wobei die chirale Information z.B. bei der asymmetrischen Phosphorylierung von Alkoholen genutzt wird [142].

Aufgrund der Bedeutung der Benzoinen werden im Rahmen dieser Arbeit die in Abbildung 2.4 gezeigten Benzoinensynthesen eingehend charakterisiert und untersucht.

Synthese des unsubstituierten Benzoin:



Synthese des symmetrisch substituierten (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin:



Synthese des unsymmetrisch substituierten (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin:

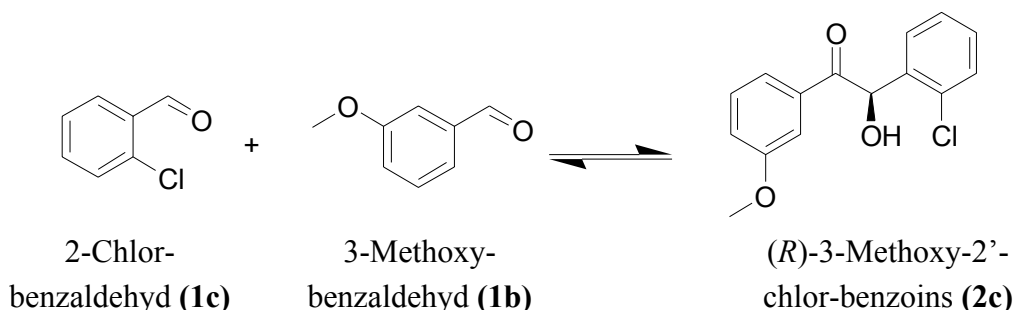


Abbildung 2.4: Ausgewählte Reaktionen der Benzoin synthese [44]

Werden Thiazolium-Salze zur Katalyse der Acyloin-Kondensation eingesetzt, können auch aliphatische Aldehyde umgesetzt werden. Durch die Kondensation von aliphatischen und aromatischen Aldehyden entstehende 2-Hydroxy-1-phenylpropanone (HPP) können als Synthesebausteine für vielfältig relevante Wirkstoffe dienen (Abbildung 2.5; nach [53, 57, 83, 87, 109, 126, 128, 181]).



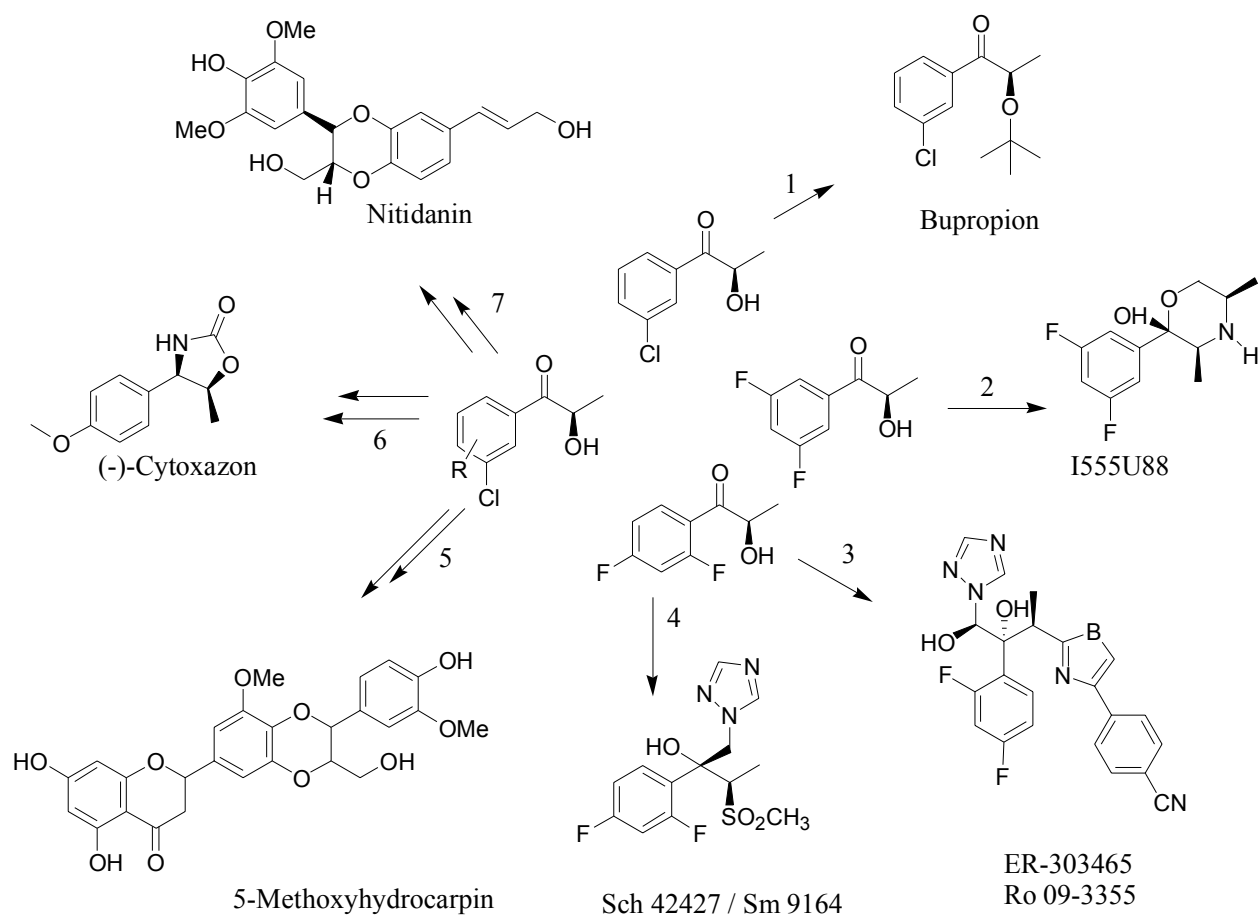


Abbildung 2.5: Mögliche Anwendung von 2-Hydroxyketonen zur Synthese pharmakologisch aktiver Wirkstoffe

Aufgrund der Relevanz der HPPs für zahlreiche Folgesynthesen wurden die in Abbildung 2.6 gezeigten HPP-Synthesen ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit umfassend charakterisiert. Auch mögliche Folgereaktionen sind dargestellt.

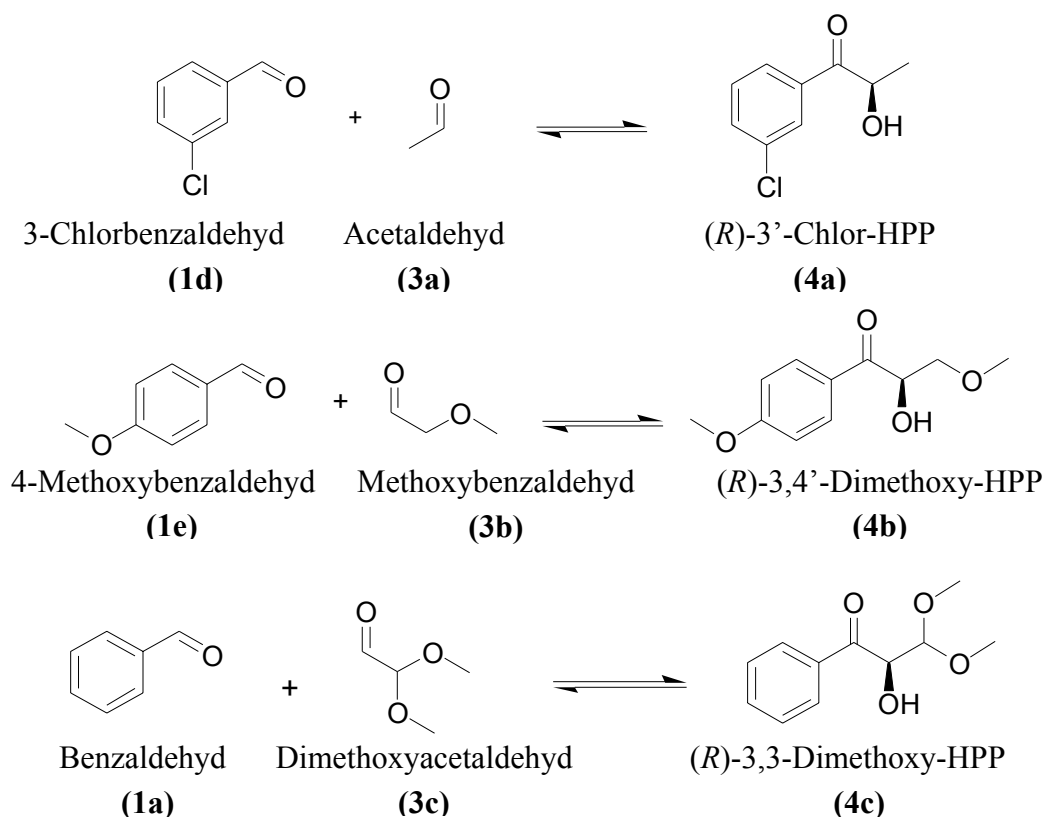


Abbildung 2.6: Synthese und Folgechemie von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonderivaten

Für Folgesynthesen ist (*R*)-3-Chlor-HPP synthetisch interessant, da es als Vorläufer von Bupropion (vgl. Abbildung 2.4), das als Wirkstoff im Fertigarzneimittel Zyban<sup>®</sup> (Glaxo Wellcome) enthalten ist, verwendet werden kann. Dabei handelt es sich um einen ursprünglich als Antidepressivum entwickelten Wirkstoff, der inzwischen erfolgreich zur Raucherentwöhnung eingesetzt wird [33, 53, 72, 82]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Bupropion entzündungshemmend wirkt und sexuelle Dysfunktion bei Frauen positiv beeinflusst [20, 58]. (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP hingegen stellt eine synthetische Vorstufe bei der Synthese des Antiallergikums (-)-Cytozaxon dar, wie Abbildung 2.6 zeigt [83].

## 2.2 Biokatalyse - Enzyme in der organischen Synthese

### 2.2.1 Biokatalyse

Unter der Biokatalyse versteht man die Stoffumwandlung chemischer Substanzen durch Enzyme [17]. Die Biokatalyse kann in zwei Bereiche unterteilt werden: In den Einsatz isolierter Enzyme und in die Ganzzellbiotransformation, der Transformation eines Stoffes durch Enzyme in ganzen Zellen, also *in vivo*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz eines isolierten Enzyms untersucht.

Der Begriff „Katalyse“ wurde 1836 erstmalig von Berzelius eingeführt. Enzyme sind biochemische Katalysatoren, die die Einstellung von chemischen Gleichgewichten beschleunigen, ohne diese zu verschieben, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen. Die enzymatische Katalyse ist von besonderem Interesse, da Enzyme im Vergleich zu rein

chemischen Katalysatoren einige Vorteile bieten. Enzyme bewirken die Katalyse bei milden Bedingungen und benötigen nicht die bei manchen chemischen Reaktionen erforderlichen extremen Bedingungen (hohe Temperaturen, Druck, etc.).

Aufgrund ihrer Herkunft aus lebenden Zellen sind physiologische Bedingungen in einer wässrigen Umgebung optimal. Im Idealfall benötigt man für eine Reaktion kein Lösungsmittel, aber wenn ein Lösungsmittel unvermeidlich ist, dann hat Wasser bedeutende Vorteile [178]. Dies bedeutet nicht nur eine geringere Umweltbelastung, sondern ist aufgrund niedrigerer Kosten für Lösungsmittel auch von wirtschaftlicher Relevanz.

In der klassischen organischen Chemie müssen bezüglich des Katalysatordesigns große Bemühungen unternommen werden, um Enantiomerenüberschüsse zu erzielen [186]. Dagegen katalysieren Enzyme viele Reaktionen von Natur aus hoch enantioselektiv, bei gleichzeitig hoher Chemo- und Regioselektivität<sup>1</sup>. Dies ermöglicht Synthesen mit geringer Bildung von Nebenprodukten bis hin zu gleichzeitiger Verwendung mehrerer Enzyme in einer Mehrschrittsynthese [207]. Im Gegensatz dazu sind chemische Katalysatoren untereinander häufig inkompatibel und somit für Mehrschrittsynthesen ungeeignet. Eine Herausforderung bei Biokatalysatoren ist dagegen die häufig begrenzte Verträglichkeit mit organischen Lösungsmitteln.

Durch reaktionstechnische Maßnahmen, wie Membranverfahren oder Immobilisierung, wird versucht Enzyme für den Einsatz mit organischen Lösungsmitteln nutzbar zu machen, indem insbesondere die Mikroumgebung der Enzyme beeinflusst wird. Ein anderer Ansatz ist dagegen das „Protein engineering“ wobei, z.B. durch Mutagenese, die Struktur und somit die Funktion und Selektivität von Enzymen zunächst im wässrigen System optimiert wird [163].

Damit die Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrens in einen industriellen Produktionsprozess zur Darstellung von enantiomerenreinen Produkten umgesetzt wird spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Zunächst müssen die Kosten für Edukt und den Katalysator niedrig sein. Weiterhin müssen bei einer geringen Anzahl an Reaktionsschritten hohe chemische und optische Ausbeuten bei hoher Raum-Zeit-Ausbeute realisiert werden können [177].

Enzyme werden nach Reaktionsart, die sie katalysieren, in sechs Klassen unterteilt. Diese Unterscheidung beruht auf der von International Union of Pure and Applied Chemistry [75] und Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) veröffentlichten „Enzyme Nomenclature“.

- Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen.
- Transferasen katalysieren den Transfer eines Molekülfragments von einem Donor zu einem geeigneten Akzeptor. Ausgenommen sind Enzyme, auf die die Klassifizierung von 1, 3 oder 4 zutrifft.
- Hydrolasen katalysieren die hydrolytische Spaltung einer Bindung.
- Lyasen katalysieren die nicht hydrolytische Spaltung einer Bindung.
- Isomerasen katalysieren Isomerisierungen und Transferreaktionen innerhalb eines Moleküls.

---

<sup>1</sup> Chemoselektivität: Bevorzugung einer funktionellen Gruppe  
Regioselektivität: Bevorzugung einer bestimmten Region im Molekül

- Ligasen katalysieren die Bildung einer kovalenten Bindung unter Energieaufwand (Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP)).

Diese Klassen werden sukzessive weiter unterteilt nach der Art der Bindung, auf die sie wirken, und nach ihrem jeweiligen Kofaktor.

## 2.2.2 Anwendung von Enzymen in technischen Prozessen

Die industrielle Anwendung von Enzymen hat im Laufe der letzten Jahre stark zugenommen, allein im Zeitraum von 1995 bis 2000 nahm der geschätzte Wert der weltweit industriell verwendeten Enzyme von einer Milliarde auf 1,5 Milliarden US-Dollar zu [86].

Etwa sechzig Prozent der industriell verwendeten Enzyme werden in technischen Anwendungen für Waschmittel, Textilien und zur Herstellung von Alkohol eingesetzt (siehe Abbildung 2.8). Bei den meisten dieser industriell genutzten Enzyme handelt es sich um Proteasen, Cellulasen sowie Amylasen. In der organischen Synthese werden am häufigsten Hydrolasen und Oxidoreduktasen eingesetzt [13, 51].

Etwa dreißig Prozent der insgesamt verwendeten Enzymmenge werden in der Lebensmittelindustrie in einer Vielzahl verschiedener Anwendungen eingesetzt. Bedeutend ist dabei die Spaltung von Stärke zu Zuckern; hier hat der Einsatz von Enzymen die bisherige Verwendung von starken Säuren ersetzt [77, 160]. Außerdem ermöglicht die Selektivität der Enzyme eine genaue Steuerung des Verzuckerungsprozesses und damit definierte Eigenschaften des produzierten Zuckersirups.

Abbildung 2.7 zeigt weiterhin, dass zehn Prozent der Enzyme in der Futtermittelindustrie eingesetzt werden. So kann der Zusatz von Enzymen unter anderem zu einer besseren Futtermittelverwertung führen. Beispielsweise kam es nach dem Auftreten der Bovinen Spongiformen Encephalopathie (BSE) in England zu einem Verbot der Verfütterung von Tiermehl, bis dato die Hauptphosphorquelle in der Tiernahrung. Der Zusatz des Enzyms Phytase ermöglicht nun eine bessere Phosphatverwertung durch Abbau der im Futter erhaltenen Phytinsäure und sichert damit die Versorgung der Tiere mit Phosphor [155].

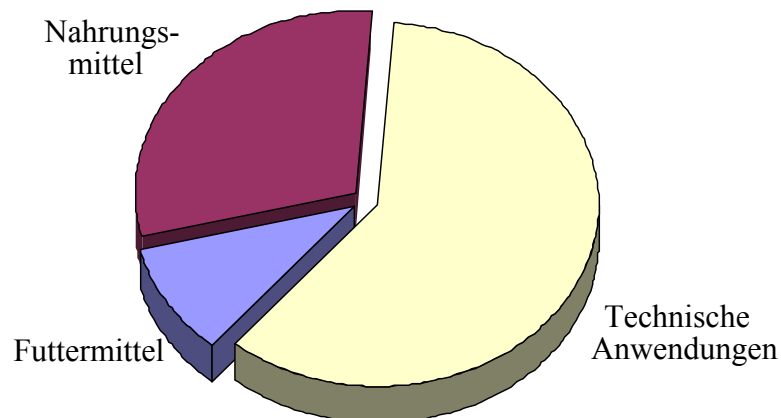


Abbildung 2.7: Verteilung der industriell verwendeten Enzymmenge auf die Anwendungsgebiete

Einen Überblick über die vielfältigen industriellen Anwendungsbereiche für enzymatische Prozesse gibt Abbildung 2.8. Enzyme kommen in der Lebensmittelindustrie, der Textilindustrie, bei der Erzeugung von Chemikalien und Feinchemikalien und natürlich auch bei der Herstellung von Arzneimitteln zum Einsatz [17].

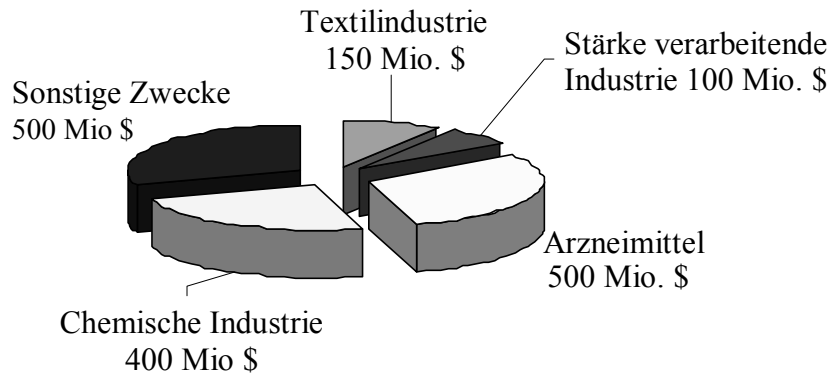


Abbildung 2.8: Markt der industriell eingesetzten Enzyme Ende der 90er [15]

Ein Beispielprozess der enzymatischen Synthese, die im industriellen Maßstab durchgeführt wird, ist die Bildung der Vorstufe von Ephedrin, L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) durch die Pyruvatdecarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1). Das aktuelle Herstellungsverfahren geht auf Neuberg zurück [134] (Abbildung 2.9).

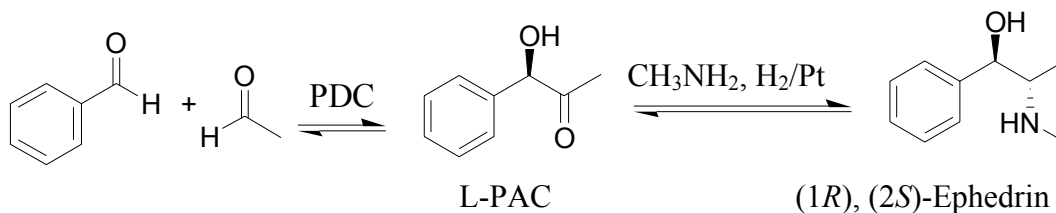


Abbildung 2.9: Synthese von Ephedrin

Dabei handelt es sich um eine Ganzzellbiotransformation (*Saccharomyces cerevisiae*), die mit hoher Enantioselektivität abläuft (*ee* 97%) [78]. Durch eine reduktive Aminierung wird anschließend (1R, 2S)-Ephedrin gebildet.

### 2.2.3 Thiamindiphosphat als Kofaktor

Thiamin (Vitamin B1) ist ein Bestandteil von vielen pflanzlichen Geweben, wie Keimen oder Getreideschalen; in tierischen Geweben liegt es überwiegend als Thiamindiphosphat (ThDP) vor (Abbildung 2.10). ThDP ist die Kofaktorform von Thiamin und wird von zahlreichen Enzymen als Kofaktor genutzt [143]. Vorrangig katalysieren ThDP-abhängige Enzyme die Bildung und Spaltung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen.

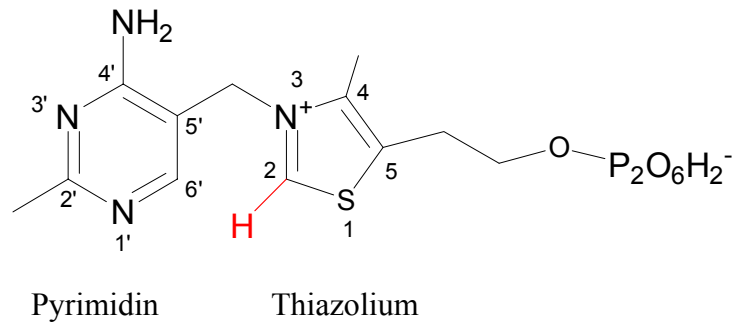


Abbildung 2.10: Strukturformel von Thiamindiphosphat

Das Thiamindiphosphat besteht aus einem Thiazoliumring, der über eine Methylengruppe mit einem Pyrimidinring verbunden ist. Durch Abspaltung des verhältnismäßig aciden Protons (rot in Abbildung 2.10) am C2 des Thiazoliumrings bildet sich als reaktive Form des ThDP, ein Carbanion. Auf diesem Prinzip beruht der Katalysemechanismus zahlreicher ThDP-abhängiger Enzyme, die in einer Vielfalt von Lebewesen vorkommen.

Die Pyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.1), ein Schlüsselenzym der alkoholischen Gärung, katalysiert die nicht oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> [108]. Multienzymkomplexe wie die Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1) oder die  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase (EC 1.2.4.2) dienen der oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxosäuren und der Übertragung von Acylresten auf CoA. Der  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplex des Zitronensäurezyklus katalysiert die Synthese von Succinyl-CoA [153] und der Pyruvatdehydrogenase-Komplex die Synthese von Acetyl-CoA. Bei der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin ist die Acetolactatsynthase (EC 4.1.3.18) von besonderer Bedeutung, da sie die Vorstufen dieser Aminosäuren 2-Acetolactat bzw. 2-Aceto-2-hydroxybutyrat synthetisiert [136, 162]. Hingegen ist am Phenylalaninkatabolismus die Phenylpyruvatdecarboxylase (EC 4.1.1.43) beteiligt [32].

Die Katalyse durch Enzyme, die ThDP als Kofaktor nutzen, läuft vermutlich stets nach dem gleichen Mechanismus ab, der am Beispiel der Benzoinkondensation erläutert werden soll [159] [143]:

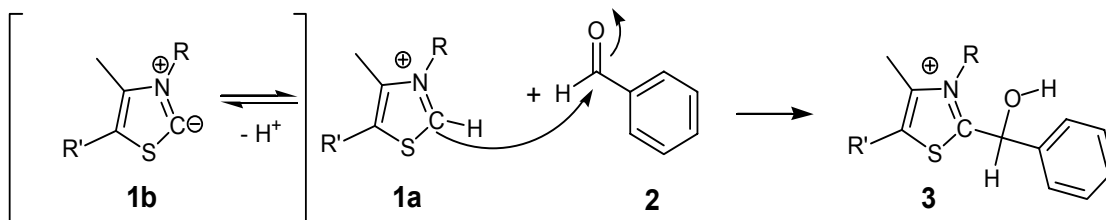


Abbildung 2.11: nucleophiler Angriff des ThDP an den Carbonyl-Kohlenstoff von Benzaldehyd

Durch die Deprotonierung des Kohlenstoff C-2 am Thiazoliumrings liegt an diesem Kohlenstoff eine negative Partialladung vor, wie die mesomeriestabilisierte vorliegende Ylid-Form **1b** verdeutlicht. Dieser Kohlenstoff kann nun nucleophil den Carbonyl-Kohlenstoff des Benzaldehyds **2** angreifen, es bildet sich ein Hydroxybenzyl-ThDP **3**.

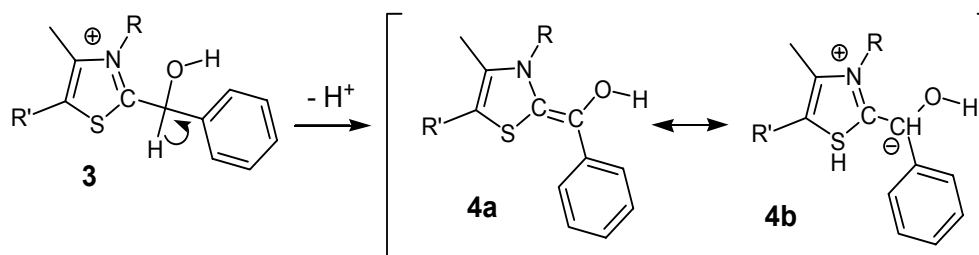


Abbildung 2.12: Umpolung des Carbonyl-Kohlenstoffes durch Entstehung eines Enamins **4a** Carbanions **4b**

Die Abspaltung eines Protons ergibt das Enamin **4a** beziehungsweise das Carbanion **4b**. Der ehemals elektrophile Carbonyl-Kohlenstoff wurde dadurch umgepolt. Der somit aktivierte Aldehyd kann durch die vorliegende negative Partialladung nucleophil den Carbonyl-Kohlenstoff eines Akzeptor-Benzaldehydmoleküls angreifen. Ein Benzoinmolekül **6** entsteht unter Rückbildung des Thiamindiphosphats.

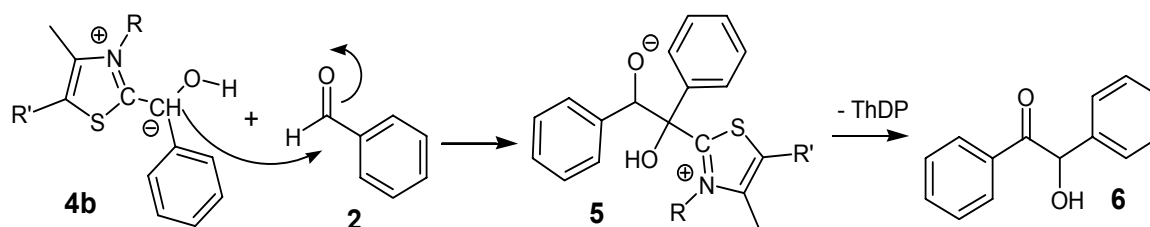


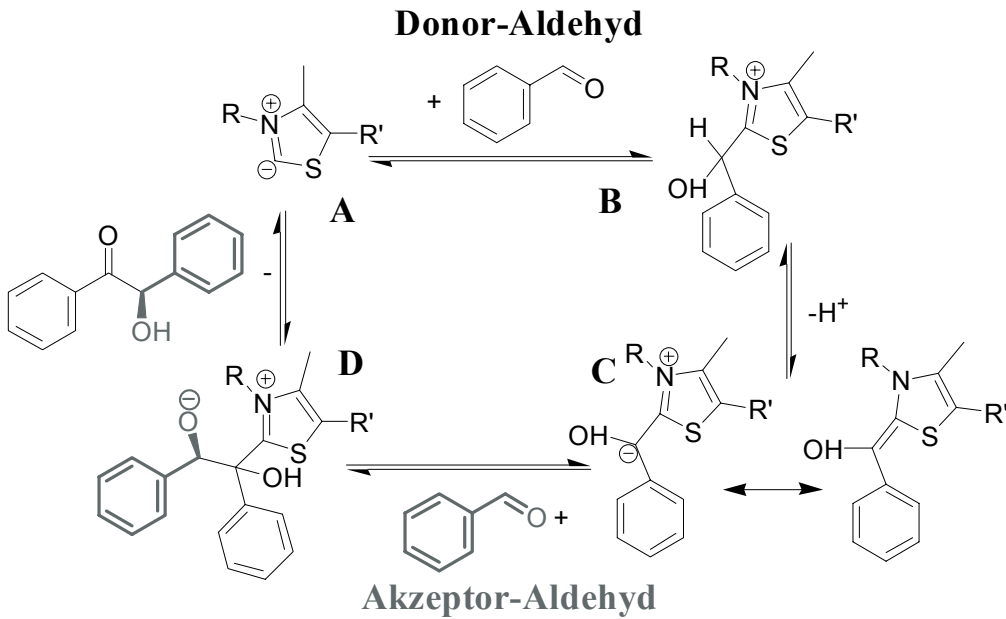
Abbildung 2.13: nucleophiler Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff von Benzaldehyd, Bildung von Benzoin

Der Mechanismus von Reaktionen, die durch ThDP-abhängige Enzyme katalysiert werden, wird von Jordan in einem Übersichtsartikel ausführlicher dargestellt und diskutiert [80].

Weiterhin kann bei der Synthese von Benzoin, ausgehend von zwei Molekülen Benzaldehyd, grundsätzlich zwischen dem Donor-Aldehyd und dem Akzeptor-Aldehyd unterschieden werden [44]. Als Donor wird dabei der Aldehyd bezeichnet, der im erhaltenen Produkt die Struktureinheit mit der Carbonyl-Funktion bildet. Als Akzeptor wird derjenige Aldehyd bezeichnet, der im erhaltenen Produkt die Struktureinheit mit der Hydroxy-Funktion formt.

Nach dem selektiven Donor-Akzeptor-Konzept kann substituierten oder unsubstituierten aromatischen Aldehyden generell eine Tendenz zugeordnet werden, als Donor oder Akzeptor zu reagieren. Jedoch schließt dies ein umgekehrtes Reaktionsverhalten nicht aus. Als Ursache der Chemoselektivität kommt die ausschließliche Umsetzung eines der beiden aktivierten Aldehyde mit dem Akzeptor oder alternativ die ausschließliche Umsetzung einer der beiden Akzeptoren mit dem aktivierten Donor-Aldehyd in Frage. Es besteht auch die Möglichkeit einer energetisch bedingten selektiven Bildung nur eines der beiden möglichen aktivierten Aldehyde aus dem Donor-Aldehyd und dem Katalysator.

Das selektive Donor-Akzeptor-Konzept nimmt lediglich Bezug auf die Konstitution der unsymmetrischen Produkte, nicht aber auf den Bildungsmechanismus. Abbildung 2.14 veranschaulicht den postulierten Reaktionsmechanismus der BAL.



**Abbildung 2.14: Postulierter Reaktionsmechanismus der BAL**

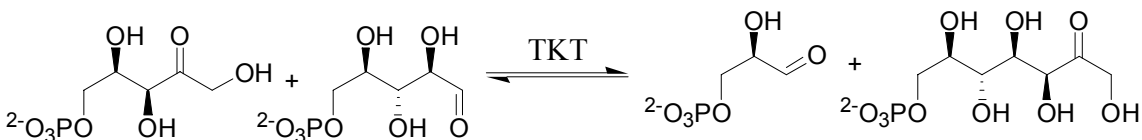
A: Thiamindiphosphat Ylid-Form, B: Hydroxybenzyl-ThDP, C: Carbanion bzw. Enamin des Hydroxybenzyl-ThDP, D: 1,2-Dihydroxy-1,2-Diphenylethyl-ThDP

Beim postulierten Reaktionsmechanismus liegt das Thiamindiphosphat im ersten Schritt in der Ylid-Form vor (**A**). Das C-Atom des ThDP, das eine negative Partialladung trägt, greift das Carbonyl-C des Benzaldehyds (Donor) nukleophil an (**B**). Durch eine Deprotonierung entsteht ein Enamin bzw. ein Carbanion (**C**), das über einen weiteren nukleophilen Angriff am Carbonyl-C des zweiten Benzaldehyds (Akzeptor) weiterreagiert (**D**) und (*R*)-Benzoin bildet.

Verschiedene TPP-abhängige Enzyme benutzen den beschriebenen Mechanismus und werden im folgenden Kapitel näher dargestellt.

## 2.2.4 Thiamindiphosphat abhängige Enzyme

Die **Transketolase** (TKT) katalysiert die reversible Übertragung einer Hydroxy-Acetaldehydgruppe von einem Ketosedonor auf einen Aldoseakzeptor. Durch die Übertragung einer C<sub>2</sub>-Einheit wird das Kohlenstoffgerüst des Donors, unter Ausbildung eines weiteren Chiralitätszentrums, verlängert [193]. In zahlreichen Organismen ist die TKT somit an Reaktionen im Pentosephosphatweg beteiligt [161] (Abbildung 2.15).



**Abbildung 2.15: Reaktion der Transketolase**

Die Transketolase ist für verschiedene chemoenzymatische Reaktionen von Interesse und wird zu diesem Zweck aus Spinat, Hefe oder rekombinanten *E.coli*-Stämmen isoliert. Das Enzym zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus. Durch die Umsetzung von  $\alpha$ -



Hydroxypyruvat als C<sub>2</sub>-Donor ist eine irreversible Reaktionsführung möglich. Dieser Schritt wird für die Synthese verschiedener Ausgangssubstanzen für Folgesynthesen verwendet. Beispiele sind der Aromastoff Furanel [64], das Pheromone  $\alpha$ -exo-Brevicomin [132] oder der Glucosidaseinhibitor Fagomin [167].

Das Enzym setzt nur Hydroxyaldehyde in 2R Konfiguration als Akzeptoren um, wohingegen (S)-2-Hydroxyaldehyde nicht umgesetzt werden, wodurch die kinetische Racematspaltung von 2-Hydroxyaldehyden möglich ist [47].

Die **Dihydroxyaceton Synthase** (DHAS) oder Formaldehyd TKT katalysiert den Transfer einer C<sub>2</sub>-Gruppe von Xylulose-5-Phosphat auf Formaldehyd, dem ersten Metabolit im oxidativen Abbau von Methanol. Das Enzym wurde aus der methylotrophen Hefe *Candida boidinii* und dem Bakterium *Acinobacter* sp. DSM 3038 isoliert und akzeptiert zahlreiche nicht-natürliche Substrate. So konnten mit DHAS C<sup>13</sup>-markierte Moleküle, wie 1,3-<sup>13</sup>C-dihydroxyaceton und 1,3-<sup>13</sup>C-dihydroxyacetonphosphat hergestellt werden.

Die **1-Desoxyxylulose-5-phosphat-Synthase** (DXPS) wurde aus *E.coli* isoliert und katalysiert die Bildung von 1-Desoxyxylulose(-5-phosphat). In diese Ligasereaktion gehen als Substrate Glyceraldehyd(phosphat) und Pyruvat unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung ein.

Die **Pyruvatdecarboxylase** (PDC) ist ein weit verbreitetes ThDP abhängiges Enzym, das eine zentrale Rolle beim Übergang der Glykolyse in die alkoholische Gärung spielt. Durch nicht oxidative Decarboxylierung katalysiert die PDC in ihrer Hauptreaktion den Abbau von Pyruvat zu Acetaldehyd, der durch die Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert wird. Als Nebenreaktion katalysiert die PDC die Carboligation, wobei der durch Decarboxylierung aktivierte Acetaldehyd auf einen Akzeptor-Aldehyd übertragen wird. Wird Benzaldehyd als Akzeptor eingesetzt entsteht als Produkt Phenylacetetylcarbinol (PAC = (R)-1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon). Diese Reaktion wurde bereits 1921 als biotechnologisches Verfahren unter Verwendung von Benzaldehyd, Glucose und Hefe zur Herstellung von L-Ephedrin genutzt (vgl. Abbildung 2.9) [134].

Das durch Carboligation gebildete (R)-PAC wird in einer zweistufigen Folgesynthese zu Ephedrin bzw. Pseudoephedrin umgesetzt. Ephedrin und Pseudoephedrin dienen der Behandlung von bronchialen Krankheiten. Die Herstellung von (R)-PAC ist das erste Verfahren, bei dem ein ThDP-abhängiges Enzym im industriellen Maßstab eingesetzt wird.

Die **Benzoylformiatdecarboxylase** (BFD) ist Teil des Mandelsäure-Biosynthesewegs und wurde bisher in den Bakterien *Acinetobacter calcoaceticus* [6] *Pseudomonas aeruginosa* [7] und *Pseudomonas putida* [65, 66] gefunden.

Die BFD katalysiert in ihrer Hauptreaktion die Decarboxylierung von Benzoylformiat (Benzoylameisensäure) zu Benzaldehyd. Großes synthetisches Potential des Enzyms liegt in einer Nebenreaktion, in der eine C-C-Knüpfung, entsprechend der Acyloin-Kondensation, katalysiert wird. Ausgehend von Benzaldehyd als Donor und Acetaldehyd als Akzeptor, wird (S)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon mit hohem Enantiomerenüberschuss, von über 98 % synthetisiert [150, 205].

Von der BFD werden unterschiedlich substituierte Aromaten und Heteroaromaten sowie aliphatische und ungesättigte Aldehyde als Donor akzeptiert. Als Akzeptor-Aldehyd ist lediglich Acetaldehyd geeignet, womit Aliphaten nur eingeschränkt als Akzeptormoleküle umgesetzt werden [45, 73]. Ausgehend von zwei aromatischen Aldehyden werden durch Carboligation Benzoinderivate erhalten [36], wobei für das unsubstituierte Benzoin ein Enantiomerenüberschuss von 99% des (*R*)-Enantiomers beobachtet wird.

Die **Benzaldehydlyase** (BAL) ist ebenfalls ein ThDP-abhängiges Enzym und wird im Rahmen dieser Arbeit eingehend charakterisiert. Die BAL wird im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

### 2.2.5 Die Benzaldehydlyase

Die Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38), die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist ein rekombinantes Enzym, das als Hexahistidin – Fusionsprotein in *Escherichia coli* (*E.coli* SG 13009/BAL<sub>His</sub>) überexprimiert wurde. Ursprünglich wurde die Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I isoliert, einem Bakterium, das in Holzresten einer Zellulosefabrik gefunden wurde [60]. Durch die Benzaldehydlyase ist das Bakterium in der Lage, auf Holzresten bzw. auf Medien zu wachsen, die Benzoin als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthalten [59]. Die BAL katalysiert die Spaltung der Acyloinbindung von 2-Hydroxyketonen (z.B. Benzoin), wodurch zwei Aldehyde freigesetzt werden. Diese werden dann vermutlich im  $\beta$ -Ketoacidweg, dem für aromatische Verbindungen gemeinsamen Stoffwechselweg, metabolisiert [180].

Die durch die BAL katalysierte Spaltung der Hydroxyketone Benzoin und Anisoin in die korrespondierenden Aldehyde wurde zunächst als irreversibel beschrieben [59], bis schließlich mit der C-C-Bindungsbildung die Umkehrung der Reaktion gezeigt wurde [38]. Aus zwei Molekülen Benzaldehyd als Substrat wird durch Carboligation, entsprechend der Selbstkondensation von Benzoin, ein Molekül Benzoin als Produkt erhalten.

Die Konfiguration des stereogenen Zentrums am enzymkatalytisch synthetisierten Benzoin ist als *R* beschrieben und dabei wird eine hohe Enantioselektivität beobachtet (*ee* > 99%).

Der Reaktionsmechanismus der BAL ist bisher noch nicht genau entschlüsselt. Auf Grundlage der Katalyse von anderen ThDP-abhängigen Enzymen [143, 159] wird ein Mechanismus vorgeschlagen [37], der in Abbildung 2.14 am Beispiel der Benzoin synthese gezeigt ist und in Kapitel 2.2.3 eingehend beschrieben wird. Die in Kapitel 2.2.3 dargestellte Hypothese für den Reaktionsmechanismus wird durch die Erkenntnisse aus der Untersuchung der Kristallstruktur der Benzaldehydlyase (Abbildung 2.16) unterstützt [130].

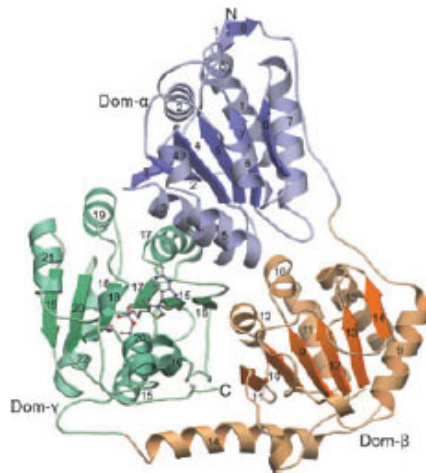


Abbildung 2.16: Kristallstruktur der Benzaldehydlyase [130]

Durch die Analyse der Kristallstruktur konnte weiterhin gezeigt werden, dass das *S*-Enantiomer des Benzoin im aktiven Zentrum auf zahlreiche sterische Hindernisse trifft, was die hohe Stereospezifität der BAL erklärt. Dagegen unterliegen Substituenten am aromatischen Ring des Aldehyds substrats im aktiven Zentrum praktisch keiner sterischen Hinderung [130].

Dies wurde bereits in früheren Untersuchungen umfassend dargelegt [43]. Die BAL verfügt insbesondere bei den aromatischen Aldehyden, die in die Benzoinbildung eingehen, über ein beachtliches Substratspektrum. Es werden einfach und mehrfach substituierte Aldehyde sowie unterschiedliche Substituenten in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position akzeptiert. Durch den Einsatz verschiedenartig substituierter Aldehyde sind auch unsymmetrisch substituierte Benzoinen zugänglich [44].

Neben aromatischen Aldehyden werden auch aliphatische Aldehyde als Substrate akzeptiert. Produkt dieser Carbolygation ist ein (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon (HPP). Als aliphatische Substrataldehyde werden kurzkettige Moleküle wie Acetaldehyd oder methoxylierte Derivate umgesetzt. So führt beispielsweise die Kopplung von Benzaldehyd mit Acetaldehyd zum (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropanon (Abbildung 2.17).

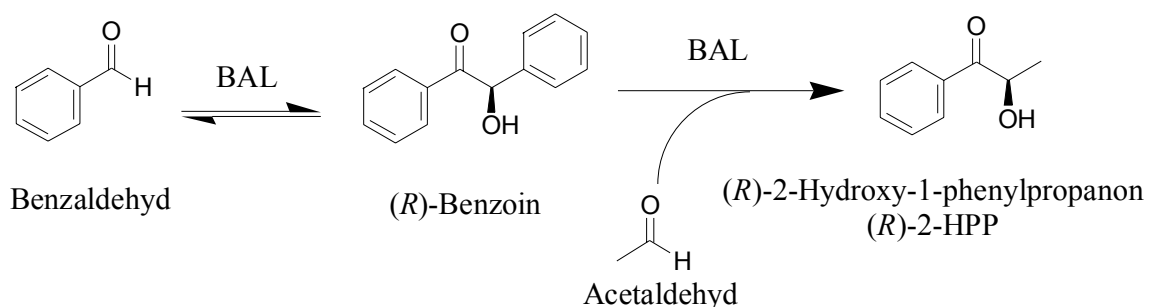
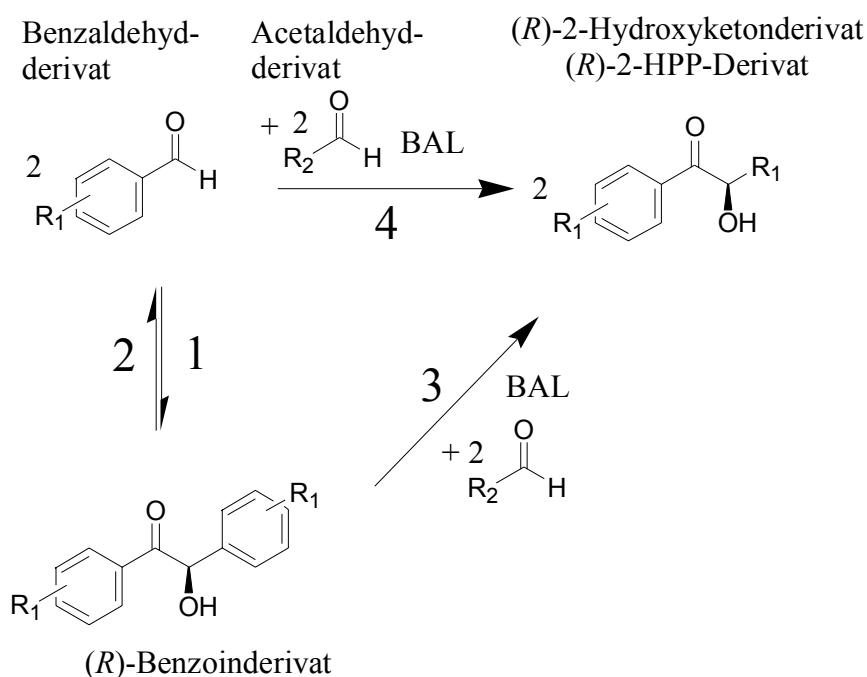


Abbildung 2.17: BAL-katalysierte HPP-Bildung

Charakteristisch für die BAL-katalysierte Carboligation zwischen einem aliphatischen und aromatischen Aldehyd ist die intermediäre Bildung des Benzoinderivats aus der Selbstkondensation des aromatischen Aldehyds. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei der HPP-Bildung um eine Konkurrenzreaktion der Benzoinbildung handelt, ob sie eine Folgereaktion des Benzoins mit Acetaldehyd darstellt, oder ob beide Reaktionen an der Produktbildung beteiligt sind. Durch eine erhöhte Konzentration des aliphatischen Aldehyds ist es möglich, das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion zu beeinflussen und eine quantitative Umsetzung zum HPP-Derivat zu erzielen [40]. Die möglichen Reaktionswege veranschaulicht die Abbildung 2.18.



**Abbildung 2.18:** Reaktionswege (nummeriert) der HPP-Synthese am Beispiel der Bildung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon aus Benzaldehyd und Acetaldehyd

Da die HPP-Bildung bei einem Überschuss an aliphatischem Aldehyd das thermodynamisch begünstigte Produkt ist [40], wird angenommen, dass nur bei der Benzoinbildung die Rückreaktion relevant ist (Reaktion 1 und 2). Reaktion 4 beschreibt die direkte Bildung des HPPs aus den Substraten von Benzaldehyd und Acetaldehyd. Reaktion 3 stellt die Folgereaktion des intermediär gebildeten Benzoins mit dem aliphatischen Aldehyd dar.

Bei der HPP-Synthese werden zahlreiche verschiedene Einfach-, und Mehrfach-Substitutionen am aromatischen Donoraldehyd in allen Positionen akzeptiert, sodass vielfältige HPP-Derivate zugänglich sind. Bei Substituenten in *ortho*-Position können die Ausbeuten geringer sein als bei Substitution in *meta*- oder *para*-Position [39, 40].

Für die enantioselektive Synthese kann neben der Ligaseaktivität (bindungsknüpfend) der BAL auch ihre Lyaseaktivität (bindungsspaltend) genutzt werden. So wird bei Einsatz von racemischen Benzoinderivat als Substrat in Gegenwart eines Acetaldehydderivats nur das (*R*)-Enantiomer zum (*R*)-HPP-Derivat umgesetzt. Das (*S*)-Enantiomer des Substratbenzoin wird dagegen nicht umgesetzt und bleibt zurück. Die Umsetzung von racemischen Benzoin mit

Acetaldehyd weist für (*S*)-Benzoin und das synthetisierte (*R*)-HPP eine hohe Enantioselektivität ( $ee > 99\%$ ) auf [40].

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die BAL ein hohes Potential hat, da sie eine Vielzahl von Reaktionen katalysiert und die Produkte beispielsweise als pharmazeutische Intermediate verwendet werden können (vgl. Kapitel 2.1.1). Neben der Untersuchung des Substratspektrums erfolgte auch eine Charakterisierung geeigneter Reaktionsbedingungen und des Reaktionsmediums. So ist zum Beispiel die Wahl des pH-Werts ein Abwägen zwischen hoher Enzymaktivität und hoher Enzymstabilität<sup>2</sup> [182]. Die Enzymstabilität wird im Rahmen dieser Arbeit als zeitliche Änderung der Enzymaktivität<sup>3</sup> definiert.

Die Benzaldehydlyase zeigt ein Aktivitätsmaximum bei  $\text{pH} = 8,75$ , dort ist allerdings nur eine geringe Enzymstabilität gegeben. Wie Abbildung 2.19 zeigt, liegt der pH-Wert größter Enzymstabilität davon abweichend bei  $\text{pH} = 7$ .

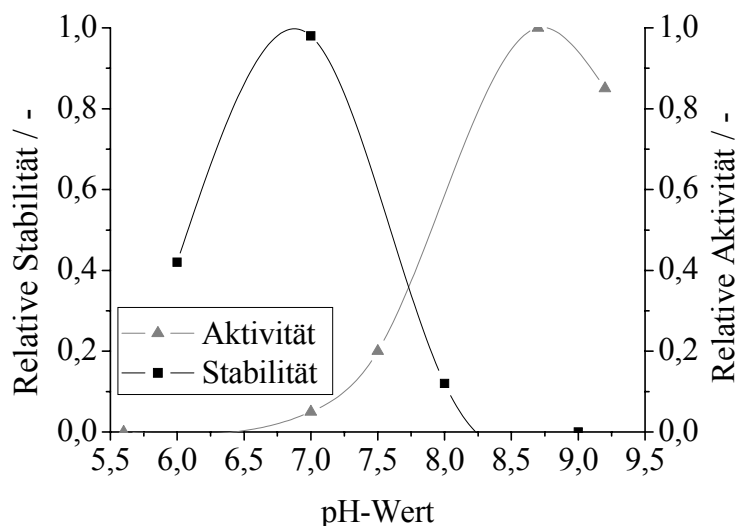


Abbildung 2.19: Einfluss des pH-Wertes auf Stabilität und Aktivität von Benzaldehydlyase [182]

Die Aktivität der BAL wird durch verschiedene Faktoren, wie Temperatur, Lösungsmittel oder Cofaktorkonzentration beeinflusst. Die katalytische Aktivität wird in Units [U] angegeben, was die Produktbildungsrate in  $\mu\text{mol min}^{-1}$  angibt. Die Enzymaktivität hat die Einheit  $\text{U mg}^{-1}$ . Allen

<sup>2</sup> Allgemein bezeichnet „Stabilität“ die Beständigkeit eines Systems, d.h. die Eigenschaft seinen Zustand gegenüber äußeren Einwirkungen nicht oder kaum zu ändern. „Stabil“ ist somit gleichbedeutend mit zeitlich konstant oder stationär. Die Enzymstabilität wird daher als eine Änderung der Enzymaktivität über die Zeit beschrieben, beispielsweise als Halbwertszeit.

<sup>3</sup> Grundsätzlich ist zwischen reversibler und irreversibler Änderung der Enzymaktivität zu unterscheiden. Relevant ist dies insbesondere bei Änderung der die Aktivität beeinflussenden Faktoren im Reaktionsverlauf. In dieser Arbeit wurden diese Einflüsse im Reaktionsverlauf allenfalls geringfügig verändert, sodass sie als konstant angesehen werden können. Somit kann die Stabilität als zeitabhängiger Verlauf der Enzymaktivität betrachtet werden.

im Verlauf der Arbeit angegebenen Enzymaktivitäten liegt ein Standardassay zur Bestimmung der Aktivität zugrunde. Sofern nicht anders angegeben ist 1 U Benzaldehydlyase definiert als die Enzymmenge, die erforderlich ist, um, ausgehend von 30 mM Benzaldehyd, in einer Minute 1  $\mu\text{mol}$  Benzoin zu synthetisieren (pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{MgSO}_4$  + 30 vol% DMSO, 30 mM Benzaldehyd, T = 20).

Die BAL ist ein hydrophiles und daher sehr gut wasserlösliches Enzym, während fast alle Substrate und Produkte der BAL ausgesprochen hydrophob bis nahezu wasserunlöslich sind. Zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substanzen werden in der technischen Chemie üblicherweise Cosolventien (Lösungsvermittler) eingesetzt. Diese werden im folgenden Kapitel (2.2.6) näher dargestellt. Die Verwendung von DMSO oder MTBE als Cosolvens trägt über die Verbesserung der Substratlöslichkeit auch zur Stabilisierung der BAL um ein Vielfaches bei [35, 76, 182].

Zur Erhöhung der Substratkonzentration im Reaktor eignet sich neben der Verwendung von Cosolventien der Einsatz von Zwei-Phasensystemen (vgl. Kapitel 2.4.3). Im Zweiphasensystem aus MTBE und Puffermedium wurde in Lagerversuchen unter definierten Bedingungen, d.h. bei 4°C, ohne Substrat und bei 4 ml Reaktorvolumen eine hohe Stabilität<sup>4</sup> erreicht (Halbwertszeit = 800 h) [182]. Bei der Übertragung des Zweiphasensystems auf Reaktionsbedingungen wurde für die BAL jedoch eine sehr kurze Halbwertszeit von 0,5 h gefunden. Es ist ungeklärt, worauf die schnelle Desaktivierung zurückzuführen ist, zumal im homogenen System mit MTBE stets eine erheblich gesteigerte Stabilität der BAL gefunden wurde. Beispielsweise könnte es eine günstige Temperatur für die Synthese mit der BAL im Zwei-Phasensystem geben oder die Phasengrenzfläche im Zweiphasensystem wirkt sich nachteilig auf die Stabilität der BAL aus [182].

### 2.2.6 Verwendung von Cosolventien

Cosolventien sind Stoffe, die als Lösungsvermittler genutzt werden können. Durch ihre Gegenwart werden Substanzen, die in einem bestimmten Lösungsmittel praktisch unlöslich sind, löslich gemacht. Durch den Einsatz von Cosolvens wird die Löslichkeit hydrophober Substanzen in wässriger Lösung, wie z. B. Benzaldehyd deutlich erhöht [78].

Die Zugabe von Cosolventien zu enzymkatalysierten Reaktionen erhöht neben der Löslichkeit hydrophober Substrate und Produkte [214] auch die Enantioselektivität einiger Biokatalysatoren [209] und ermöglicht die Beeinflussung thermodynamischer Gleichgewichte [169]. Cosolventien können jedoch auch ungünstig auf die Reaktion wirken und Enzyme inhibieren oder desaktivieren, sowie die Produktaufarbeitung erschweren.

Je unpolarer organische Lösungsmittel bzw. Cosolventien sind, desto größer ist meist ihr Molekulargewicht und ihre Biokompatibilität, d.h. ihre Verträglichkeit gegenüber Biokatalysatoren [102]. Als Maß hierfür eignet sich beispielsweise der Log-P-Wert, der aus dem Verteilungsverhältnis eines Lösungsmittels in einem Octanol / Wasser Gemisch bestimmt wird (vgl. Kapitel 2.4.3). Es gilt:

---

<sup>4</sup> Da kein Substrat vorlag, wurde diese Stabilität nicht in Reaktionen beobachtet

$$\log P = \frac{c_{\text{Octanol}}}{c_{\text{Wasser}}}$$

Formel 2.1

Je unpolarer ein Lösungsmittel ist, desto besser löst es sich in Octanol und desto größer ist der Log-P Wert. Die häufig damit verbundene bessere Biokompatibilität ist darauf zurückzuführen, dass die polare Mikroumgebung um Biokatalysatoren von großen, stark unpolaren Molekülen nur wenig beeinflusst wird. Dagegen können kleine, besser wasserlösliche Lösungsmittelmoleküle in die polare Mikroumgebung von Biokatalysatoren leichter eindringen. Dadurch kann es zu intermolekularen Umlagerungen im Biokatalysator kommen, was häufig zu einer verringerten Aktivität bzw. Desaktivierung des Biokatalysators führt [103]. Es ist jedoch zu betonen, dass der Log-P Wert nur ein Richtwert ist und keine Gesetzmäßigkeit darstellt [200]. Die Biokompatibilität von Lösungsmitteln und Cosolventien ist daher für jeden Einzelfall zu prüfen.

Für BAL-katalysierte Reaktionen wurde gezeigt, dass die Zugabe bestimmter Cosolventien die Stabilität der BAL erhöht [76, 182]. Zwei Cosolventien wurden eingesetzt, einerseits die Zugabe von 30 Vol% DMSO [37] andererseits 5 Vol% MTBE [182].

Im Fall der Verwendung von MTBE als Cosolvens kann die Halbwertszeit der BAL unter Lagerbedingungen (d.h. ohne Reaktion) bei 4 °C um den Faktor 75 gesteigert werden. Verwendet man DMSO, erhöht sich die Lagerstabilität um den Faktor 150. Die Halbwertszeit der BAL beträgt unter Lagerbedingungen (bei 4°C, im homogenen Reaktionsmedium, ohne Zugabe von Substrat) je nach Cosolvens 1125 bzw. 2250 h. In reinem K<sub>p</sub>-Puffer beträgt die Halbwertszeit der BAL nur 17 h (Abbildung 2.20).

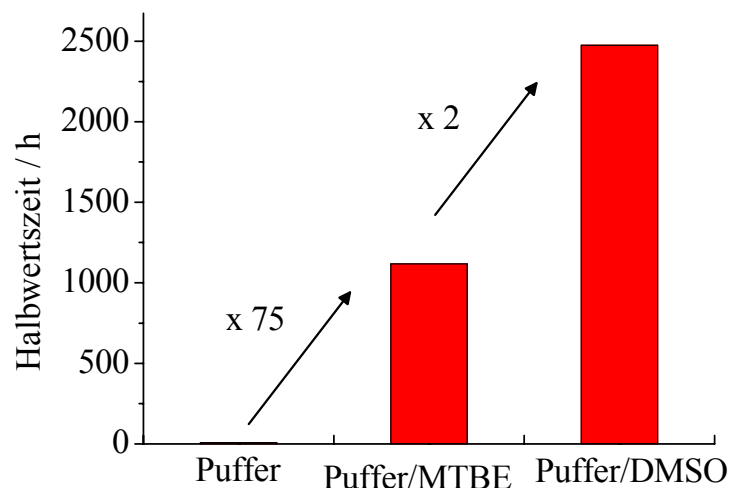


Abbildung 2.20: Lagerstabilität der BAL bei 4°C [182]

Es ist zu beachten, dass diese Ergebnisse unter Lagerungsbedingungen, d.h. bei 4°C ohne Substratzugabe realisiert wurden. Unter Reaktionsbedingungen lag die Halbwertszeit bei 20°C im kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor, (vgl. CSTR, Kapitel 2.4.1) in MTBE-

gesättigten Puffer bei 51 h, bzw. mit 30 % DMSO bei 101h. Dabei wurde eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute von bis zu  $1200 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht [182].

Die Verwendung von DMSO zeigt für die Benzoin synthese einen weiteren Vorteil [76]. Die Lyaseaktivität der BAL nimmt ab, während die Ligaseaktivität nicht beeinflusst wird. Es kommt zu einer Änderung des thermodynamischen Gleichgewichts zugunsten des Produkts.

Wegen der zusätzlichen Stabilisierung des Enzyms durch das Cosolvens wird die Einstellung des pH-Wertes auf 8,0 möglich. Somit erfolgt die Enzymkatalyse nahe dem Aktivitätsmaximum von  $\text{pH} = 8,75$ , bei gleichzeitig verringerter Enzymdesaktivierung (vergleiche Abbildung 2.20). Zu berücksichtigen ist, dass die Produktaufarbeitung bei der Verwendung von MTBE als Cosolvens im Vergleich zur Verwendung von DMSO erleichtert ist [182].

## 2.3 *Kinetik*

### 2.3.1 Enzymkinetik

Die Geschwindigkeit einer katalysierten Reaktion liefert grundlegende Informationen über das Enzym. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten und ihre Änderung unter verschiedenen Bedingungen wird als Kinetik bezeichnet [108]. Auch ohne Kenntnis des genauen Katalysemechanismus lässt sich die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von den Substratkonzentrationen beschreiben. Unter Annahme eines schnellen Gleichgewichts eignet sich das formalkinetische Modell von Michaelis und Menten [124] [12].

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

**Formel 2.2**

Dabei beschreibt  $v_{\max}$  die bei Substratsättigung erreichte Maximalgeschwindigkeit.  $K_M$  bezeichnet man als Michaelis-Menten-Konstante, die ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat ist. Wenn die Substratkonzentration  $K_M$  entspricht, ist  $v_0$  die Hälfte von  $v_{\max}$ .

Im Falle einer Ein-Substrat-Kinetik beobachtet man sowohl bei niedrigen Substratkonzentrationen als auch bei hohen Katalysatorkonzentrationen eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Bei niedrigen Substratkonzentrationen wird  $[S]$  im Nenner vernachlässigbar. Es ergibt sich eine Kinetik erster Ordnung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_S}$$

**Formel 2.3**

Bei hohen Substratkonzentrationen wird  $K_M$  im Nenner vernachlässigbar. Die Folge ist eine Kinetik nullter Ordnung:



$$v = v_{\max}$$

**Formel 2.4**

Berücksichtigt man im Modell zwei Substrate A und B ergibt sich Formel 2.5:

$$v = v_{\max} * \frac{[A]}{(K_{MA} + [A])} * \frac{[B]}{(K_{MB} + [B])}$$

**Formel 2.5**

In die Michaelis-Menten Gleichung geht die enzymatische Hemmung als Inhibitionsterm ein,

was durch die Multiplikation von  $K_M$  mit dem Term  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$  dargestellt wird:

$$v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$$

**Formel 2.6**

Dabei ist [I] die Konzentration des Inhibitors und  $K_I$  die Reaktionskonstante des Inhibitors. Eine breite Vielfalt von Arten und Mechanismen der Enzymhemmung wird in der weiter führenden Literatur beschrieben [12].

Die Geschwindigkeit der durch das Enzym katalysierten Reaktion kann vermutlich auch durch die intramolekulare Bewegung im Enzym mitbestimmt werden [49]. Die Änderung der Konformation des Enzymmoleküls erfolgt insbesondere während der katalytischen Umsetzung des Substrats. Besteht ein Enzym aus mehreren aktiven Untereinheiten, können diese sich wechselseitig beeinflussen. Ist beispielsweise in einem Tetramer nur ein aktives Zentrum mit Substrat belegt, kann die Änderung der Konformation in dieser Untereinheit, Konformationsänderungen in den anderen Untereinheiten induzieren. Somit kann die Substratbelegung eines aktiven Zentrums zur Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, bis hin zur reversiblen Inaktivierung, in den anderen Untereinheiten des Enzyms führen. Ein vergleichbarer Vorgang wird in der Literatur [81] als *active center communication* beschrieben.

### 2.3.2 Simulation

Für die Beschreibung der Geschwindigkeit einer Reaktion nach dem King Altman Modell [85] müssen die verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe und die im Übergangszustand an den Kofaktor gebundenen Substrate bestimmt werden. Der ThDP katalysierten C-C-Knüpfung liegt ein komplexer Mechanismus zugrunde, bei dem nicht alle Intermediate und Reaktionen über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit isoliert gemessen werden können [145].

Die kinetischen Parameter der Reaktion erhält man durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und anschließende nicht-lineare Anpassung der Geschwindigkeitsgleichung an die gemessenen Daten. Kriterium für die Anpassung ist die kleinste Quadratsumme der Fehlerdifferenzen [30].

Für die Anpassung ist die Vergleichbarkeit und Konstanz der experimentellen Daten eine grundlegende Voraussetzung. Die experimentellen Daten können durch die Verwendung unterschiedlicher Enzymchargen variieren, die aus ungleichen Belastungen während der Enzymaufreinigung und Gefriertrocknung resultieren. Deshalb sollte Enzymlyophilisat aus nur einer Charge eingesetzt werden, damit für alle Experimente eine konstante gewichtsspezifische Aktivität vorausgesetzt werden kann (Vgl. Kapitel 5.1.1.1).

Zur Überprüfung der kinetischen Daten eignet sich insbesondere die Simulation von Konzentrations-Zeit-Verläufen von Satzreaktoren. Dazu ist es notwendig, die Stoffbilanzen sämtlicher Reaktanden zu formulieren. Aus den Stoffbilanzen aller beteiligten Edukte, Intermediate und Produkte ergibt sich schließlich ein System gekoppelter Differentialgleichungen erster Ordnung.

Die Änderung (Akkumulation) der Konzentration einer Substanz pro Zeit- und Volumeneinheit setzt sich dabei aus Konvektion, Reaktion und Diffusion zusammen.

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} + \text{Diffusion} \quad \text{Formel 2.7}$$

Im Satzreaktor ist bei Annahme einer idealen Durchmischung die Diffusion = 0, da zu jedem Zeitpunkt  $t_x$  die Konzentration jedes Volumenelements gleich ist. Dem einzelnen Volumenelement werden pro Zeiteinheit keine Edukte oder Produkte zu- oder abgeführt und die Konvektion = 0.

Daher vereinfacht sich die Stoffbilanz im Satzreaktor zu:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \sum v_S$$

$$\text{Akkumulation} = \text{Reaktion} \quad \text{Formel 2.8}$$

Im kontinuierlich betriebenen Rührkessel (CSTR) liegt keine Diffusion vor und die Konzentrationen ändern sich nicht; vorausgesetzt der CSTR befindet sich im *steady-state*. Somit ist zu jedem Zeitpunkt  $t_x$  die Konzentration in jedem Volumenelement gleich. Die Stoffbilanz vereinfacht sich zu:

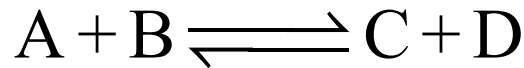
$$0 = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{[S]_0 - [S]}{\tau} + \sum v_S$$

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} \quad \text{Formel 2.9}$$

mit  $\tau$  = Verweilzeit

### 2.3.3 Thermodynamisches Gleichgewicht

Eine chemische Reaktion läuft nie vollständig ab, sondern nur bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes [129], (Abbildung 2.21).



**Abbildung 2.21: Allgemeiner Ablauf einer chemischen Reaktion**

Ist der Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts einer Reaktion erreicht, so tritt, wenn man das System von außen betrachtet, ein Stillstand der Reaktion ein. Für das System an sich bedeutet dies, dass keine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit für die Hin- und Rückreaktion mehr eintritt. Das System steht im Gleichgewicht. Dieser Zustand ist unabhängig von den eingesetzten Stoffmengen, wird aber von Druck und Temperatur beeinflusst. Das thermodynamische Gleichgewicht wird mathematisch durch die Gleichgewichtskonstante  $K$  beschrieben [129], (Formel 2.10).

$$K = \frac{[C]^c * [D]^d}{[A]^a * [B]^b}$$

**Formel 2.10**

In der Gleichung sind  $[C]$  und  $[D]$  Produktkonzentration bei der Gleichgewichtseinstellung und  $[A]$  und  $[B]$  die Konzentrationen an Substrat. Die stöchiometrischen Faktoren  $c$ ,  $d$ ,  $a$ ,  $b$  entsprechen der Anzahl Moleküle, die in der Reaktion von der jeweiligen Substanz verbraucht, bzw. gebildet werden.

Liegt der Wert von  $K$  über 1, so liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Produktseite und somit liegt im Gleichgewicht mehr Produkt als Edukt vor. Für einen Wert von  $K < 1$  ist es umgekehrt. Ist  $K = 1$ , so ist im Gleichgewicht genau so viel Edukt wie Produkt vorhanden. Katalysatoren verschieben das thermodynamische Gleichgewicht einer Reaktion nicht.

## 2.4 *Verfahrens- und reaktionstechnische Grundlagen*

Die Stoffvorbereitung und Stoffaufbereitung als Vor- und Nachstufe chemisch-technologischer Prozesse bestehen aus physikalisch-chemischen Grundverfahren, die unter dem Begriff „Grundoperationen“ (Unit operations) zusammengefasst werden (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Systematik der Grundoperationen [199]

Grundoperation	Mechanisch	Elektrisch-magnetisch	Thermisch
<b>Stofftrennung</b>	Auspressen	Elektroabscheiden	Destillieren
	Filtrieren	Magnetscheiden	Dialysieren
	Flotieren	Elektroscheiden	Extrahieren
	Klassieren	Elektrodialyse	Kristallisieren
	Zerkleinern	Elektrosmose	Kondensieren
	Zentrifugieren	Elektrophorese	Permeieren
<b>Stoffvereinigung</b>	Versprühen		Auflösen
	Rühren		Extrahieren
	Homogenisieren		Sorbieren
	Kneten		
	Vermengen		
	Dosieren		
	Kompaktieren		

Den Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik steht die Hauptstufe chemischer Verfahren – die Stoffwandlung durch chemische Reaktion- als „chemische Reaktionstechnik“ gegenüber. Die Systematik der Reaktionstechnik verwendet ebenfalls physikalisch-chemische Gesichtspunkte wie Energetik der Reaktion, Beeinflussen der Reaktionsgeschwindigkeit und Verschieben der Gleichgewichtslage [199]. Einen Überblick über die Kenngrößen der reaktionstechnischen Prozessentwicklung gibt Abbildung 2.22.

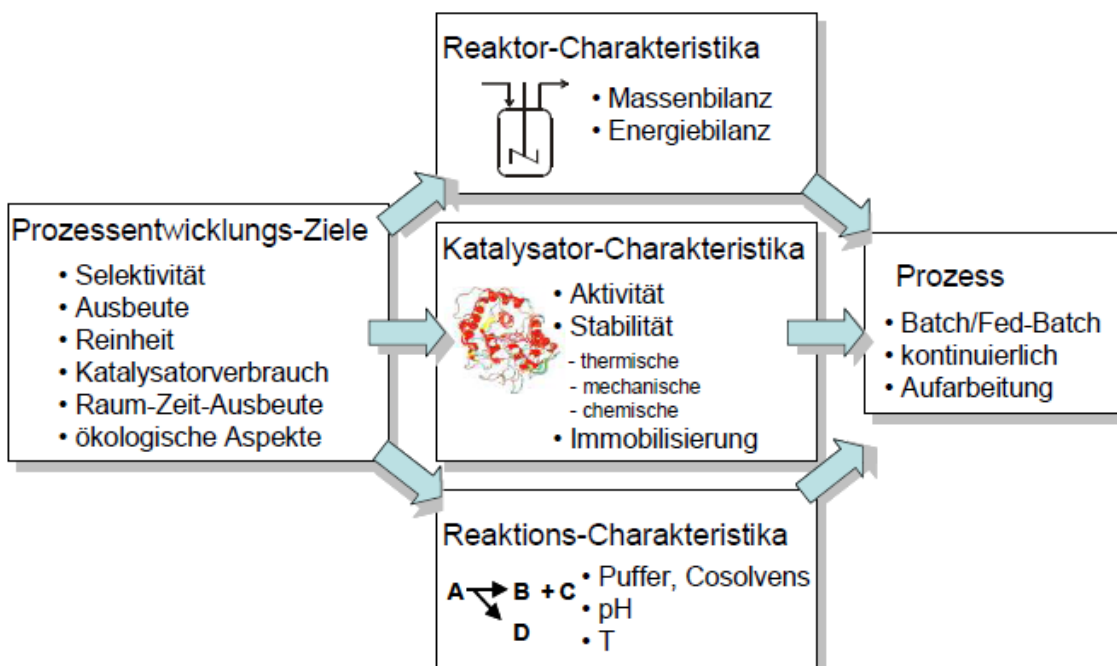


Abbildung 2.22: Kenngrößen der reaktionstechnischen Prozessentwicklung [117]

Ziele der reaktionstechnischen Prozessentwicklung sind beispielsweise die Erhöhung von Selektivität und Reinheit oder die Absenkung des Katalysatorverbrauchs. Diese Ziele werden durch Untersuchung und geeignete Bestimmung der Charakteristika (Prozessparameter) von Reaktor, Katalysator und der Reaktion optimiert. Die anschließende Wahl der Prozessparameter beeinflusst schließlich die Art der optimalen Reaktionsführung sowie die Produktaufarbeitung.

### 2.4.1 Reaktoren

Bei der Wahl eines geeigneten Reaktors wird, unter Berücksichtigung der speziellen Eigenschaften einer Reaktion, besonders auf das Erreichen hoher Raum-Zeit-Ausbeuten geachtet. Die wichtigsten Reaktoren werden kurz vorgestellt:

- Satzreaktor (engl.: Batch reactor):  
Hierbei handelt es sich um ein geschlossenes System. Während des Reaktorbetriebs wird weder etwas hinzudosiert, noch entnommen. Durch die wiederholte Entleerung, Reinigung und erneute Befüllung des Reaktors ergeben sich relativ lange Totzeiten [97].
- Zulaufverfahren (engl.: Fed-Batch reactor):  
Das Zulaufverfahren funktioniert im Prinzip wie der Satzreaktor, nur dass während der Reaktion kontinuierlich Substanz, beispielsweise Substrat zudosiert wird [97].
- Kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR, engl.: continuously operated stirred tank reactor)  
Hierbei wird Substrat kontinuierlich zugeführt und Produkt kontinuierlich abgeführt. Ein kontinuierlicher Reaktorbetrieb zeichnet sich durch Vorteile wie das Erzielen höherer Raum-Zeit-Ausbeuten aus: Wiederholtes Entleeren, Reinigen und Befüllen des Reaktors ist nicht nötig, wodurch eine bessere Wirtschaftlichkeit erreicht wird [97].

Die Abbildung 2.23 zeigt den charakteristischen Reaktionsverlauf der beschriebenen Modelle.

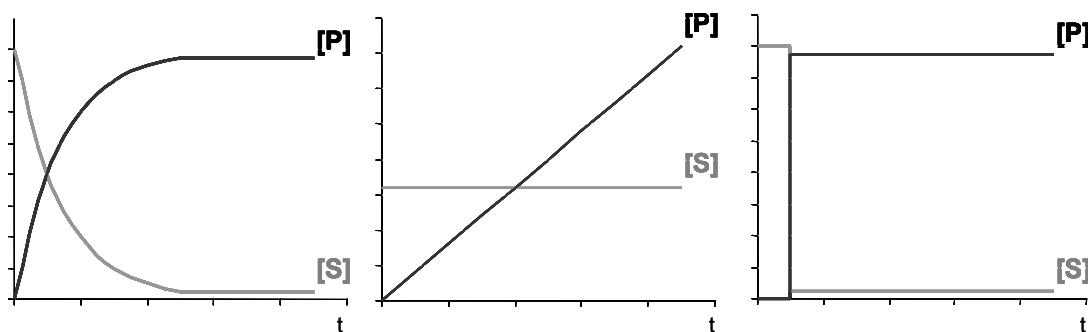


Abbildung 2.23: Vergleich Satzreaktor (Links), Zulaufverfahren (Mitte) und kontinuierlicher Reaktorbetrieb (Rechts)

Mit Hilfe folgender Kenngrößen wird der Reaktorbetrieb beschrieben:

- Umsatz - U: beschreibt, wie viel Substrat während der Reaktion verbraucht wurde (Formel 2.11).

$$U_S = \frac{n_{S_0} - n_S}{n_{S_0}}$$

**Formel 2.11**

- Ausbeute - Y: beschreibt, wie viel Produkt während der Synthese gebildet wurde (Formel 2.12).

$$Y_{P,k} = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{k_0}} * \frac{V_k}{V_P}$$

**Formel 2.12**

- Selektivität -  $\sigma$ : beschreibt den Anteil des gebildeten, gewünschten Produkts am insgesamt verbrauchten Substrat (Formel 2.13).

$$\sigma_{P,k} = \frac{\text{gebildete Menge (P)}}{\text{umgesetzte Menge (k)}} = \frac{(n_P - n_{P_0}) * V_i}{(n_{k_0} - n_k) * V_P} = \frac{Y_P}{U_k}$$

**Formel 2.13**

- Der Zusammenhang der Kenngrößen ergibt sich als Ausbeute durch das Produkt aus Selektivität und Umsatz (Formel 2.14)

$$Y_{P,k} = \sigma_{P,k} * U_k$$

**Formel 2.14**

- Raum-Zeit-Ausbeute - RZA: beschreibt die Ausnutzung des Reaktorraumes pro Zeiteinheit. Diese Größe ist eigentlich nur zur Beschreibung von kontinuierlichen Reaktoren zulässig, da für alle Satzreaktoren (auch Fed-Batch Reaktoren) neben der eigentlichen Produktionszeit auch der Zeitaufwand für Entleeren, Reinigung und Befüllen des Reaktors berücksichtigt werden müsste. Daher wird für diese Reaktortypen der Begriff volumetrische Produktivität (VP) angegeben (Formel 2.15).

$$RZA = \frac{\text{Menge Produkt}}{\text{Zeit} * \text{Reaktorvolumen}}$$

**Formel 2.15**

- Maximale Zyklenzahl - *ttn* (engl.: total turnover number) des Enzyms: Maß für die Katalysatorausnutzung (Formel 2.16).

$$ttn = \frac{n(\text{Produkt})}{n(\text{Enzym})}$$

Formel 2.16

### Die Wahl des Reaktortyps

Ein optimaler Reaktor wird so gewählt, dass ein hoher Umsatz sowie eine hohe Ausbeute bei gleichzeitig maximaler RZA und guter Enzymstabilität ermöglicht werden. Kommt es bei einer Reaktion zur intermediären Ausfällung eines Reaktanden, so ist das in jedem Reaktortyp eine Gefahr, die zur Verstopfung von Leitungen führen kann. Zur Vermeidung der Bildung von Intermediaten, aber auch bei Substratinhibierung ist die kontinuierliche Reaktionsführung optimal [95, 198]. Am Beispiel der Synthese von unsubstituiertem HPP wurde in einem 3 ml Maßstab die Eignung des kontinuierlichen Enzymmembranreaktors zur Vermeidung der Bildung von Intermediaten bei Substratinhibierung gezeigt [183]. In einem Membranreaktor kann die Benzoinausfällung vermieden werden, da die Substratkonzentrationen im Gleichgewichtszustand niedrig gehalten werden können. Vorteilhaft bei diesem Reaktortyp sind hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und hohe Enzymeffizienz (*ttn*) durch eine kontinuierliche Reaktionsführung. Weiterhin muss der Biokatalysator nicht immobilisiert werden [111], da er durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird [118]. Abbildung 2.24 zeigt schematisch den Aufbau eines kontinuierlichen Membranreaktors

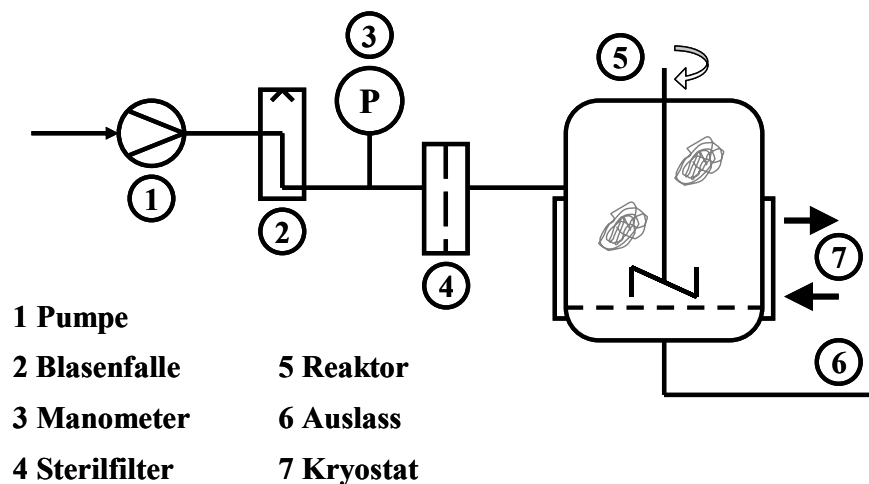


Abbildung 2.24: Schema eines kontinuierlichen Membranreaktors

### 2.4.2 Schwer lösliche Substanzen

Die natürliche Umgebung von Enzymen ist das intra- oder extrazelluläre wässrige Medium. Darin liegen die natürlichen Substrate in der Regel nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor, oft sogar im  $\mu\text{molaren}$  Bereich. Die hydrophoben Zielverbindungen organischer Synthesen sind jedoch häufig im wässrigen Medium nahezu unlöslich. Dadurch sind die Produktivitäten

biokatalytischer Reaktionen häufig deutlich niedriger als bei chemischen Synthesen. Ein bedeutendes Hindernis für den Einsatz von Biokatalysatoren ist daher häufig die geringe Löslichkeit von vielen organischen Substraten in der wässrigen Phase [94]. Bei einer maximalen Substratlöslichkeit von 1 mM werden 1.000 L Lösungsmittel benötigt, um 1 mol dieser Verbindung in Lösung zu bringen.

Ein wichtiges Ziel der biotechnologischen Prozessentwicklung ist es deshalb, die Löslichkeit hydrophober Substrate biokompatibel zu erhöhen, wofür in den letzten Jahrzehnten verschiedene Ansätze entwickelt wurden [78]. Zunächst gibt es zwei grundlegende Ansätze. Zum einen die homogene einphasige Reaktionsführung, zum anderen die Anwendung von Zweiphasensystemen [27].

Die homogene Reaktionsführung erfolgt unter Zusatz eines wassermischbaren, organischen Lösungsvermittlers (Cosolvens), wie Alkohol oder DMSO [191]. Zweiphasensysteme bestehen beispielsweise aus einer wässrigen und einer organischen Phase. Für die C-C-Knüpfung eignen sich etwa Micellen durch Zusatz von Tensiden zur Erhöhung der Substratlöslichkeit [135]. Auch die Anwendung von organischen Lösungsmitteln als Reaktionsmedium wurde untersucht [90, 211, 212] [61]. Die Zweiphasensysteme werden in Kapitel 2.4.3 näher beschrieben.

Durch die Verwendung organischer Lösungsmittel konnte die Substratlöslichkeit erheblich gesteigert werden. Die Tabelle. 2.2. zeigt enzymatische Prozesse die im molaren Substratkonzentrationsbereich durchgeführt werden [110].

**Tabelle 2.2: Bei enzymatischen Prozessen eingesetzte Substratkonzentrationen [110]**

<b>Enzym</b>	<b>Substrat</b>	<b>Konz.</b>	<b>Reaktionsmedium</b>
Lipase (EC 3.1.1.3)	Palmitinsäure	3,10 M	2-Propanol
Lipase (EC 3.1.1.3)	Cyclopentenyl- ester	4,16 M	wässrig/organisch
Nitrilhydratase (EC 4.2.1.84)	Acrylnitril	5,60 M (Produkt)	wässrig
L-Phenylalaninammonium- lyase (EC 4.3.1.5)	<i>trans</i> -Zimtsäure	9,31 M (NH <sub>3</sub> )	wässrig

Häufig wird die Enzymstabilität durch die Gegenwart organischer Lösungsmittel jedoch negativ beeinflusst [21, 98]. Ein anderer Ansatz ist daher die Komplexierung und Einschließung des Substrats mit Hilfe von Cyclodextrinen [213, 214].

Auch kann die Reaktion bei geringen Löslichkeiten mit gezielter Ausfällung von Reaktanden geführt werden. [16]. So wird in der homogenen Biokatalyse über systematische Produktausfällung [71] und die enantioselektiven Produktabtrennung berichtet [19]. Die geringe Löslichkeit kann zur Präzipitation und Abtrennung von festen Produkten genutzt werden [26]. Die Abtrennung erfolgt durch einfache Filtration [147], die hohe Umsätze und Reinheit ermöglicht [42]. In biokatalytisch durchgeführten Prozessen eignet sich die Kristallisation als Aufarbeitungsschritt [34, 168, 204]. Theoretisch kann der Vorgang der Kristallisation durch die Formel 2.17 beschrieben werden [204].



$$C = k_C \cdot (J \cdot c)^g$$

Formel 2.17

Dabei ist C die Kristallisationsrate in  $\text{mmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ , J die Diffusionskonstante im Medium,  $k_C$  die Geschwindigkeitskonstante, c die Konzentration und g ein Gewichtungsfaktor, der einen Wert zwischen 1 und 2,5 annimmt. Da g normalerweise den Wert 1 hat, kann durch Zusammenfassung von J und  $k_C$  die Formel 2.17 vereinfacht werden:

$$C = k_C \cdot c$$

Formel 2.18

Die Kristallisation ist ein Gleichgewicht zwischen der Feststoffbildung durch Überschreiten der Löslichkeitsgrenze und der Resolubilisierung der präzipitierten Substanz. Die Auflösung des Feststoffs stellt die Rückreaktion dar und wird durch die Formel 2.19 beschrieben:

$$S = k_S \cdot c_S$$

Formel 2.19

Dabei ist S die Solubilisationsrate,  $k_S$  die Geschwindigkeitskonstante und  $c_S$  die Konzentration an Feststoff im Reaktionsansatz.

Die Kristallisation ist eine Möglichkeit der integrierten Produktabtrennung bei einer Synthese. Während des Wachstums der Kristalle kann es zum Einschluss von Medium in die Kristallstruktur kommen. Dies beeinflusst die Reinheit des Produkts. Durch anschließendes Umkristallisieren in der Produktaufarbeitung kann die Reinheit erhöht werden.

### 2.4.3 Biokatalyse in Zweiphasensystemen

Zweiphasensysteme bieten bei Reaktionssystemen mit schwerlöslichen Substanzen verschiedene Vorteile und finden in der chemischen Industrie eine breite Anwendung [178]. Es kann grundsätzlich zwischen drei verschiedenen Fällen von Zweiphasensystem unterschieden werden. Zunächst gibt es rein wässrige Zweiphasensysteme z.B. aus PEG und Dextran [105, 131]. Weiterhin bietet die Durchführung von Biotransformationen in rein organischen Medien mit suspendierten bzw. immobilisierten Enzymen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten [4, 88-90, 103].

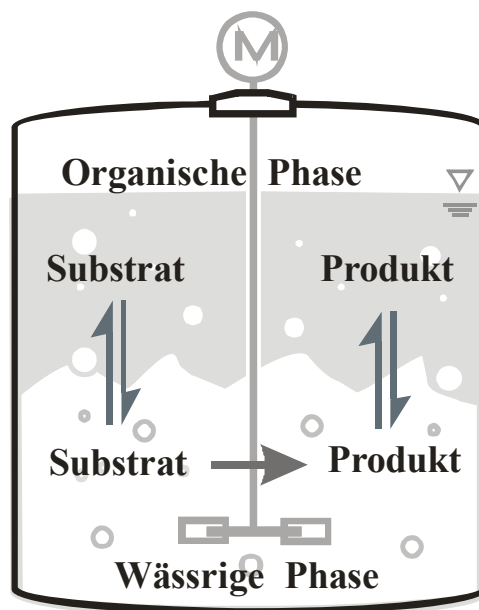
Ein weites Feld von Reaktionssystemen bietet die Reaktionsführung in wässrig-organischen Zweiphasensystemen. Hierbei wird die zweite Phase entweder durch das hydrophobe organische Substrat oder zusätzliches organisches Lösungsmittel gebildet [121]. Je nach Reaktionsführung bleiben die Phasen klar getrennt oder es bildet sich im Verlauf der Reaktion eine Emulsion bzw. Suspension aus. Die Verwendung eines organischen Lösungsmittels als zweite Phase erfolgt in der Biokatalyse deutlich häufiger als der Einsatz von Substrat als zweite Phase. Neben der enzymatischen Synthese von Benzoin finden vor allem durch Lipasen katalysierte Reaktionen in einem Reaktionsmedium statt, das nur aus Substrat und einem relativ geringen Anteil an Wasser besteht. [119, 138].

Das Enzym liegt im Zweiphasensystem entweder homogen gelöst in der wässrigen Phase oder immobilisiert auf bzw. in einem Träger gebunden vor. Letzteres erfolgt meist mit dem Ziel einer

besseren Rückhaltung und Stabilisierung des Katalysators. So erfolgt die Einschließung des Biokatalysators in Polyvinylalkohol (PVA) [2], in Mikrokapselfn [67, 146] oder es erfolgt eine Vernetzung des Katalysators zu Cross linked enzyme Crystals (CLEC) [151, 215].

Als Zweiphasensysteme werden im Rahmen dieser Arbeit Reaktionssysteme bezeichnet, die zu Beginn der Reaktion, neben der wässrigen Phase eine weitere Phase aus Substrat oder organischem Lösungsmittel enthalten. Die Verwendung eines wässrig-organischen Zweiphasensystems verbessert die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen [1]. Weiterhin wird eine mögliche Inhibierung des Enzyms durch das Substrat bzw. Produkt verringert [27]. Aufgrund der Unlöslichkeit der meisten Enzyme in der organischen Phase ergibt sich eine leichte Zurückhaltung des Biokatalysators [27]. Für schlecht lösliche Substanzen ist die organische Phase ein Substratreservoir [192, 208]. Auch können Folgereaktionen gezielt beeinflusst bzw. gesteuert werden.

Durch Zugabe von Tensiden besteht Zugang zum Einsatz von reversen Micellen [112, 114, 115, 122, 157] oder von Mikroemulsionen [70, 165, 166]. Abbildung 2.25 veranschaulicht schematisch das Prinzip eines Zweiphasensystems.



**Abbildung 2.25: Prinzip eines wässrig-organischen Zweiphasensystems**

Das Reaktionssystem setzt sich aus einer wässrigen und einer organischen Phase zusammen. Der Biokatalysator ist hydrophil und befindet sich in der wässrigen Phase, in welcher deshalb die Reaktion stattfindet. Das hydrophobe Substrat befindet sich zum Großteil in der organischen Phase. Entsprechend dem Verteilungskoeffizienten (Formel 2.1) verteilt es sich zwischen organischer und wässriger Phase. Das Substrat wird vom Biokatalysator in der wässrigen Phase zum Produkt umgesetzt. Durch Extraktion gelangt das Produkt dann in die organische Phase.

Die Extraktion wird häufig als erster Abtrennungsschritt in der Biotechnologie benutzt und idealerweise in den Produktionsprozess integriert. Durch die Integration von Aufarbeitungsschritten in den Produktionsprozess lassen sich die Herstellungskosten senken und

der Reaktionsverlauf beeinflussen. Beispielsweise kann bei Produktinhibierung die Produktivität durch *in situ* Abtrennung gesteigert werden. Da Enzyme an Phasengrenzflächen häufig inaktiviert werden oder durch ihre tensidische Wirkung die Phasentrennung erschweren, können Membranverfahren Probleme bei der *in situ* Extraktion beheben. Membrangestützte Zweiphasensysteme stellen daher ein grundlegendes Werkzeug zur Synthese von Feinchemikalien dar. In diesen Membranreaktoren wird die Phasengrenzfläche durch eine Membran stabilisiert, wobei das Enzym in einer Phase gelöst bzw. suspendiert vorliegt oder an der Membran immobilisiert ist [24, 48, 148].

In der Biotechnologie findet eine große Anzahl anderer Trenntechniken zur Abtrennung und Aufarbeitung der Produkte Anwendung. Die Aufarbeitung durch Destillation eignet sich für temperaturstabile Substanzen, während Chromatographie und Kristallisation in der Regel für spätere Aufreinigungsschritte verwendet werden. Die Produktabtrennung durch Ausfällung oder mittels Membranverfahren ist durch eine geringe Selektivität gekennzeichnet, wobei sich bei Membranverfahren die Selektivität durch Kombination mit anderen Trenntechniken (z.B. Extraktion) erhöhen lässt [170].

Für die Anwendung von Zweiphasensystemen in der Biokatalyse ist die Geschwindigkeit des Stofftransports zwischen den beiden Phasen im Verhältnis zur Katalyserate von besonderer Bedeutung. Der Stofftransport wird durch Formel 2.20 berechnet.

$$\frac{M_X}{A} = D_X * (c_{\text{org}} - c_{\text{aq}})$$

**Formel 2.20**

Dabei stehen  $M_X$  für den molaren Stoffstrom,  $A$  für die Phasengrenzfläche,  $D_X$  für den Stofftransportkoeffizient der Komponente  $X$  und  $c$  für die Konzentration der Komponente  $X$  in der jeweiligen Phase. Der Stofftransport hängt zusätzlich vom Verteilungskoeffizienten ( $P$ ) der Reaktanden im Zweiphasensystem ab (vgl. Kapitel 2.2.6):

$$P = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{aq}}}$$

**Formel 2.21**

Unter Einbeziehung des Verteilungskoeffizienten und Auflösung nach dem molaren Stofftransportkoeffizienten ergibt sich für Formel 2.22:

$$M_X = D_X * A * (c_{\text{org}} - c_{\text{aq}} * P_X)$$

**Formel 2.22**

Es ist zu klären, ob der Prozess durch die Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. Kapitel 2.3.1) oder durch den Stofftransport limitiert wird. Auf dieser Grundlage ist die maximale Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) ein wichtiger Prozessparameter. Weiterhin ist zu klären, wie eine effiziente Produktaufarbeitung aus der organischen Phase erfolgen kann [23, 28, 164, 174].

### 2.4.4 Fest-Flüssigtrennung

Die Trennung von Feststoffen aus Flüssigkeiten durch Filtration und verwandte Verfahren stellt einen wichtigen und in zahlreichen Prozessen limitierenden Schritt dar. In der Biokatalyse kann die *in situ* Abtrennung des Produkts als Feststoff jedoch auch klassische Reaktionslimitierungen, wie Substrat- oder Produktinhibierung bzw. Produktzerfall überwinden [163].

Bei der Fest-Flüssigtrennung wird grundlegend zwischen Filtration durch ein Medium und der Sedimentation durch Dichteunterschied differenziert. Beim Trennprozess mittels Filtration wird eine durchlässige Barriere in eine fließende Suspension eingebracht, mit dem Ziel, die suspendierten Feststoffe an der Barriere zurückzuhalten und das geklärte Medium passieren zu lassen. Zu unterscheiden sind weiterhin Oberflächenfilter von Tiefenfiltern, wie Filterkerzen, die zur Verstärkung der Filterwirkung bei der Ablagerung von Partikeln entstehenden Zwischenräume nutzen [156]. Tabelle 2.3. zeigt eine Einteilung von Verfahren zur Filtration mit Beispielen für Apparate.

Tabelle 2.3: Fest-Flüssigtrennung durch Filtration

<b>Filterprinzip</b>			
<b>Schwerkraft</b>	<b>Vakuum</b>	<b>Druck</b>	<b>Zentrifugalkraft</b>
	<i>Diskontinuierliche Apparate</i>		
Nutsche	Filterkerze	Pfannenfilter	Korbzentrifuge
	<i>Kontinuierliche Apparate</i>		
Rüttelsieb	Drehtrommelfilter	Bandpresse	Tellerzentrifuge

Diskontinuierliche Filterverfahren zeichnen sich bei geringem Durchsatz mit ihrer hohen Effizienz aus, da sie adsorptive Effekte am Filtermedium mit dem Effekt der Tiefenfiltration kombinieren. Dagegen ermöglichen kontinuierliche Verfahren hohe Filtrationsleistungen.

Bei der Trennung mittels Zentrifugation wird die Schwerkraft verstärkt. Zentrifugen verfügen entweder über einen geschlossenen Behälter und arbeiten nach dem Prinzip der Sedimentation oder haben eine durchlässige Barriere, was eine Filtration ermöglicht [156].

### 3 Ziel der Arbeit

Wie in Kapitel 2 beschrieben, ist die Synthese von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen eine der wertvollsten Reaktionen und das Rückgrat der synthetischen organischen Chemie [196]. Dabei besteht besonderes Interesse, die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen durch die Verwendung von Enzymen hoch enantioselektiv und bei milden Reaktionsbedingungen durchzuführen [55, 175].

In Kapitel 2.2.5 wurde gezeigt, dass die Benzaldehydlyase ein Biokatalysator von großem Potential ist, da sie ein breites Substratspektrum akzeptiert und dadurch die Synthese einer Vielzahl chiraler Intermediate ermöglicht. Die Benzaldehydlyase katalysiert die Synthese von chiralen 2-Hydroxyketonen, die als wertvolle Vorläufer für die Synthese pharmakologisch aktiver Verbindungen dienen können (Abbildung 2.5). Insbesondere die Umsetzung von substituierten Derivaten durch die Benzaldehydlyase wurde jedoch bisher reaktionstechnisch nicht näher untersucht. Ausgehend von einfachen Verbindungen sind komplexe chirale Moleküle zugänglich, die überwiegend noch nicht kommerziell erhältlich sind.

In Kapitel 2.2.5 wurde weiterhin dargestellt, dass die Löslichkeit der ausgesprochen hydrophoben Substrate und Produkte der Benzaldehydlyase durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln verbessert werden kann. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Benzaldehydlyase im Zweiphasensystem mit MTBE eine hohe Lagerstabilität aufweist. Beim *Scale up* des Zweiphasensystems wurde jedoch eine geringe Stabilität der Benzaldehydlyase gefunden [182]. Ungeklärt ist bisher, ob und wie sich der stabilisierende Effekt von MTBE als Cosolvent und im Zweiphasensystem unter Reaktionsbedingungen nutzen lässt. Mit Hilfe von Zweiphasensystemen wird in zahlreichen Synthesen der organischen Chemie die Substratkonzentration im Reaktor erhöht und damit die Effizienz gesteigert. Bisher wurde für BAL-katalysierte Reaktionen jedoch nicht untersucht, ob auch das Substrat selbst als zweite Phase eingesetzt werden kann.

In der Literatur wurde bereits über Reaktorkonzepte zur Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen mit der Benzaldehydlyase berichtet [182]. Jedoch wurden bisher keine Reaktorkonzepte zur Benzoin-Synthese mit der Benzaldehydlyase dargestellt. Weiterhin wurde bisher nicht untersucht, ob die gezielte Löslichkeitsüberschreitung der Hydroxyketone zur Feststoffabtrennung der Reaktionsprodukte als Reaktorkonzept genutzt werden kann. Die somit erhaltenen chiralen 2-Hydroxyketone sind wichtige Synthesebausteine der organischen Chemie, die Substrate für eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen darstellen und Zugang zu zahlreichen chiralen Verbindungen ermöglichen. [110].

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die reaktionstechnische Charakterisierung der von der Benzaldehydlyase katalysierten Synthesen, ausgehend von aromatischen und aliphatischen Aldehyden. Im ersten Teil der Arbeit wird die enzymkatalysierte Kondensation von aromatischen Aldehyden zu Benzoinen anhand der in Abbildung 2.4 gezeigten Reaktionssysteme detailliert untersucht.

Die Synthesen der Benzoin-derivate werden zunächst reaktionstechnisch charakterisiert, und die daraus erhaltenen kinetischen Parameter anschließend durch die Simulation von Reaktionsverläufen überprüft. Da die BAL sowohl die Bildung von C-C-Bindungen

(Ligaseaktivität) als auch die Spaltung von C-C-Bindungen (Lyaseaktivität) katalysiert, werden die Reaktionssysteme in Teilreaktionen zerlegt. Bei der Simulation sollen neben der Reaktion auch die physikalischen Vorgänge im Reaktor, wie die Kristallisation, berücksichtigt werden.

Anhand der aus den Untersuchungen bestimmten Ergebnisse sollen mit Hinblick auf eine einfache Produktaufarbeitung ein für die Benzoin synthese geeignetes Reaktorkonzept entwickelt werden und die Produkte im präparativen Maßstab hergestellt werden. Die Substrate und Produkte der untersuchten Reaktionssysteme weisen in wässrigen Medien eine sehr geringe Löslichkeit auf. Im Rahmen der Arbeit werden deshalb reaktionstechnische Ansätze für die Synthese mit hydrophoben Reaktanden in der Biokatalyse untersucht. In Experimenten wird der Einfluss von hydrophoben Lösungsmitteln auf die Enzymstabilität oder die Kristallisation schwer löslicher Produkte bestimmt.

Abbildung 2.6 zeigt von der Benzaldehydlyase katalysierte Synthesen aus substituierten aliphatischen und aromatischen Aldehyden. Bisher wurden diese Synthesen reaktionstechnisch nicht untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit werden daher die in Abbildung 2.6 gezeigten Synthesen von substituierten 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen reaktionstechnisch charakterisiert. Für die als Substrate benötigten aliphatischen Aldehyde wird zunächst eine geeignete analytische Methode entwickelt und das nicht kommerziell erhältliche Methoxyacetaldehyd in Reinform dargestellt. Anschließend werden die Reaktionssysteme in Teilreaktionen unterschieden und kinetisch charakterisiert. Abbildung 2.18 zeigt schematisch die möglichen Reaktionswege, die für die kinetische Charakterisierung der HPP-Synthese untersucht werden. Die erhaltenen Parameter werden durch die Simulation von kontinuierlichen und diskontinuierlichen Reaktionsverläufen überprüft.

Die Löslichkeit der hydrophoben Reaktanden und die Enzymstabilität kann durch organische Lösungsmittel unter bestimmten Bedingungen verbessert werden [76, 182]. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese Erkenntnisse auch unter Prozessbedingungen vorteilhaft auf die BAL auswirken. Ein mögliches Reaktorkonzept basiert deshalb auf einem wässrig-organischen Zweiphasensystem.

Es ist weiterhin zu klären, inwieweit etablierte Verfahren der organischen Chemie durch technische Maßnahmen an die speziellen Anforderungen der Biokatalyse angepasst werden können. Dazu werden limitierende Schritte und entscheidende Parameter für die Enzymstabilität, wie Temperatur und Phasengrenzfläche, identifiziert und quantifiziert.

Die in der Literatur beschriebene kontinuierliche Synthese von (*R*)-HPP im Enzym-Membran-Reaktor [182] soll auf substituierte HPPs übertragen werden und durch Variation der Verweilzeiten unterschiedliche Gleichgewichtszustände realisiert werden. Weiterhin sollen der Maßstab des Reaktionsvolumens vergrößert und relevante chirale Intermediate im g-Maßstab für Folgesynthesen synthetisiert werden. Ziel ist es somit die technologischen Anforderungen der enzymkatalytischen C-C-Knüpfung unter realen Bedingungen zu untersuchen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

<b>Analysenwaage BP 211-D</b>	<b>Sartorius, Göttingen</b>
diverse Glasgeräte	Werkstätten des Forschungszentrums
diverse Glasgeräte	Chromatographieservice, Langerwehe
Filterkerze, Porung 2 (40-100µm)	Firma Robu
HPLC-Anlage	Sycam, Gauting
HPLC-Anlage (Agilent 1100)	Agilent Technologies, Heilbronn
HPLC-Anlage, 5890	JASCO, Groß-Umstadt
HPLC-Säulen: Chiralcel OD H	Daicel Chemical Industries
Li-Chrosphere 100 RP-8, 250 * 4 mm	Merck
Klemmringverschraubung und Ventile	Swagelock (B.E.S.T., Köln)
Luftpolsterpipetten	Labsystems, Frankfurt
Magnetrührer	IKA Laboratoriumstechnik, Staufen
Massenflussmesser	Bronkhorst B.V (Niederlande)
NMR spectrometer AMX-300	Bruker Analytische Meßtechnik, Rheinstetten
P500 Wechselkolbenpumpe	Amersham Pharmacia Biotech
pH-Meter 691	Metrohm, Herisau (Schweiz)
Photometer, UV 1601	Shimadzu
Pumpe, Dosimat 665	Metrohm
Rotationsverdampfer, R 114	Büchi
Säulen	Pharmacia LBK, Freiburg
Schlauchpumpe, 503 S	Watson Marlow
Sonifier	Branson, über Gerhard Heinemann
Ultrafiltrationsmembranen, YM10	Millipore
Ultrafiltrationszelle	Amicon, Düsseldorf
Zentrifuge GS15-R	Beckman Coulter, Schwäbisch-Gmünd

Celgard X50 Hohlfasermembran und Modul

**Anzahl der Fasern = 180**

Membranfläche = 221 cm<sup>2</sup>

Durchmesser der Faser innen 220 µm, außen 300 µm

Länge, Modul effektiv = 15 cm

Durchmesser Modul = 1 cm

#### 4.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, mindestens in analytischer Qualität (p.a.) von den Firmen Fluka, Merck oder Sigma bezogen. Die aromatischen Aldehyde wurden vor der Verwendung destilliert und unter Argon aufbewahrt.

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril	Biosolve
Benzoin	Fluka
Bradford Reagenz	Sigma
CDCl <sub>3</sub> (Chloroform – D1)	Merck
Diethylether	KMF
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aldrich
Ethylacetat	Ethylacetat
Hexan	Merck
<i>iso</i> -Propanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka
Natriumsulfat	Merck
Petrolether	Riedel-de-Haën
Rinderserum-Albumin (BSA)	Fluka
<i>tert.</i> Butylmethylether (MTBE)	Merck
Thiamindiphosphat (ThDP)	Fluka

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Analytik

#### Derivatisierung aliphatischer Aldehyde

Insbesondere durch die Bedeutung von Acetaldehyd in der Umweltanalytik [125, 197] sind zahlreiche Methoden zu seiner Derivatisierung bekannt. Aus den unterschiedlichen Methoden [173, 202] wird die Derivatisierung mit 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion (Dimedon) [46, 127] ausgewählt. Die Vorteile gegenüber anderen Methoden, beispielsweise der Derivatisierung mit di-Phenylhydrazinen [216], liegen hierbei in der hohen Empfindlichkeit der Messungen, geringem Arbeitsaufwand und der Beständigkeit der derivatisierten Proben.

Zur Herstellung der Dimedonlösung werden 2,1 g Dimethylcyclohexandion (15 mmol), 17,5 mL *iso*-Propanol und 20 g Ammoniumacetat in einem Einhalskolben vorgelegt und mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung wird 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt. Die Lösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

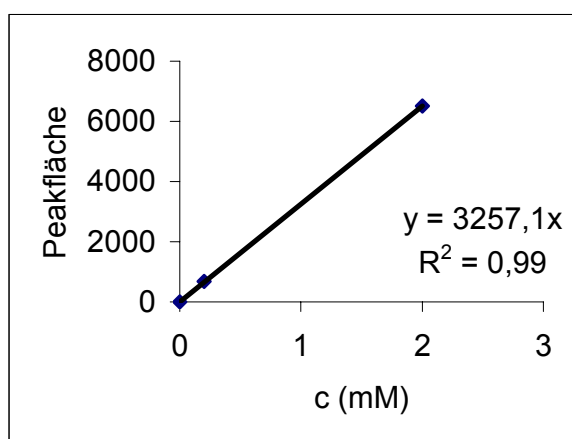
1 mL Dimedonlösung und 0,1 mL konzentrierte Schwefelsäure werden in einem 4 mL-Schraubdeckelgefäß vorgelegt. 0,2 mL Probe werden hinzugegeben. Anschließend wird die Reaktionslösung für 20 Minuten auf 100 °C im Wasserbad erhitzt. Danach wird die Reaktion durch Abkühlen der Probe im Eisbad abgebrochen.

Die Reaktionslösungen werden für fünf Minuten mit 2,5 mL Dichlormethan extrahiert, dann werden 0,1 mL des Extraktes mit 0,4 mL Dichlormethan verdünnt. Die Derivate werden mit den Methoden der HPLC untersucht (Detektion bei  $\lambda = 385$  nm).

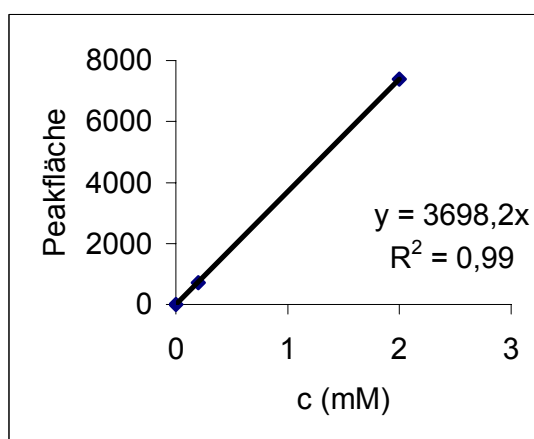


### Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

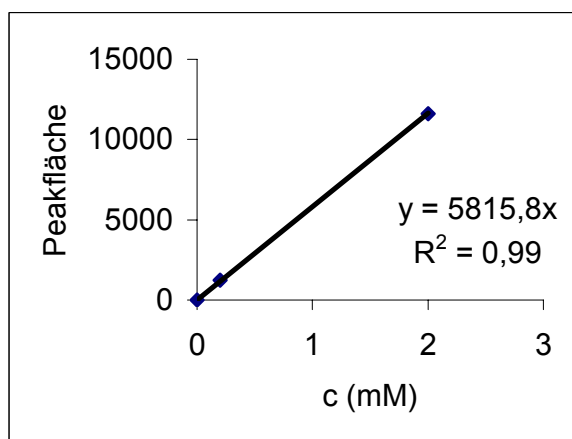
Die Quantifizierung der Reaktionsverläufe und Reaktanden erfolgte durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die Arbeiten wurden auf Anlagen der Firmen Agilent, JASCO und Sykam durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde Li-Chrosphere 100 RP-8, der Firma Merck in der Dimension 250 mm\*4 mm eingesetzt. Es wurde ein isokratischer Fluss aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 45 zu 55 eingestellt. Die Flussrate war 1 mL min<sup>-1</sup> bei 120 bar und 20 °C. Die Absorption wurde mittels UV-Detektor bei 385 nm (derivatisierte aliphatische Aldehyde) und 254 nm (aromatische Aldehyde) gemessen (Abbildung 4.1):



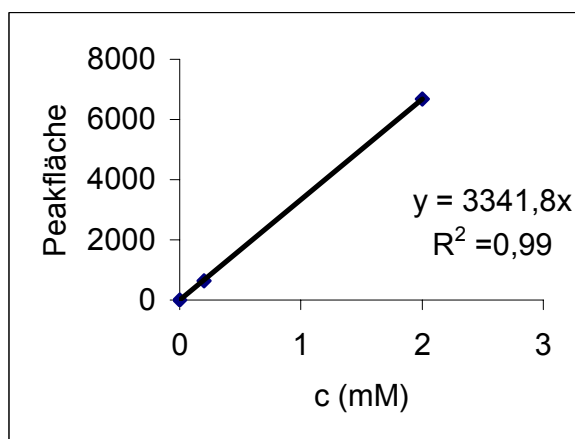
Benzaldehyd (1a)



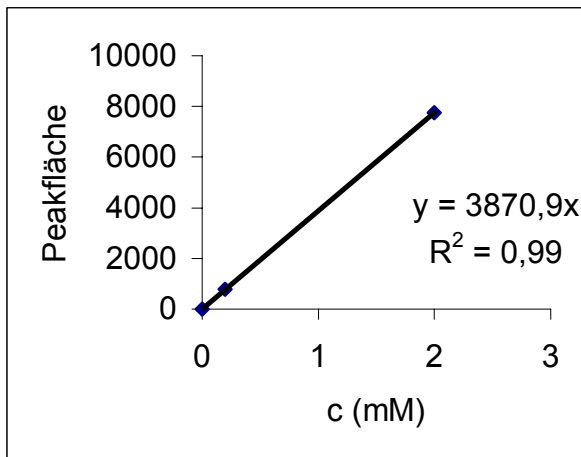
3-Methoxybenzaldehyd (1b)



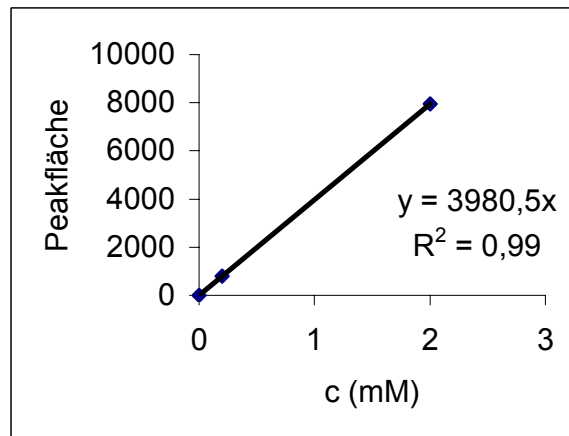
4-Methoxybenzaldehyd (1e)



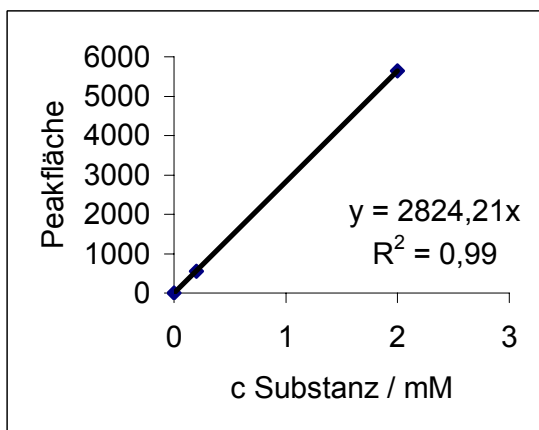
2-Chlorbenzaldehyd (1c)



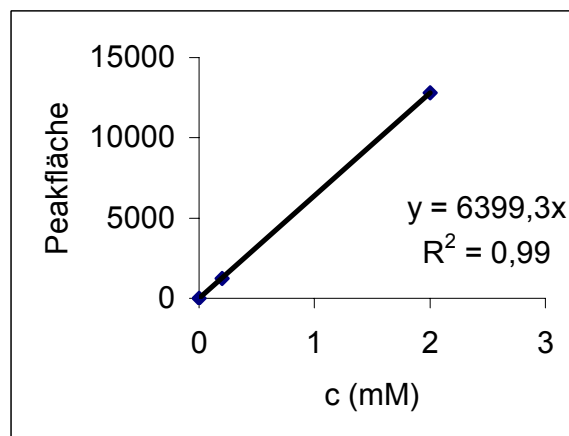
3-Chlorbenzaldehyd (1d)



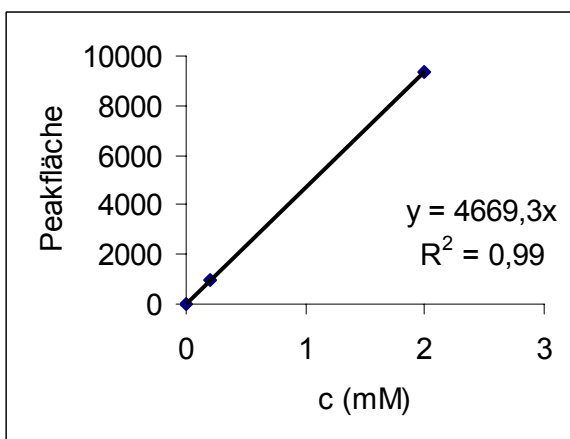
Benzoin (2a)



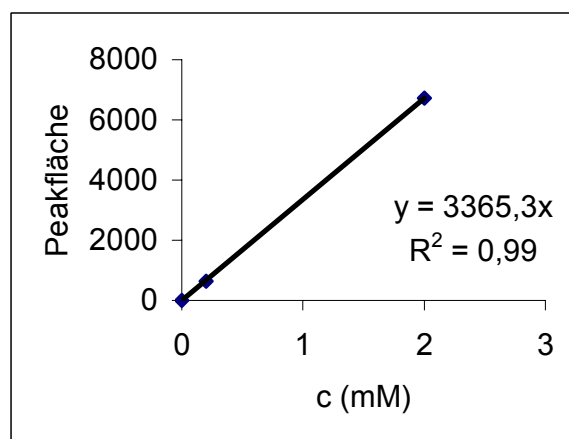
3,3'-Dimethoxy-benzoin (2b)



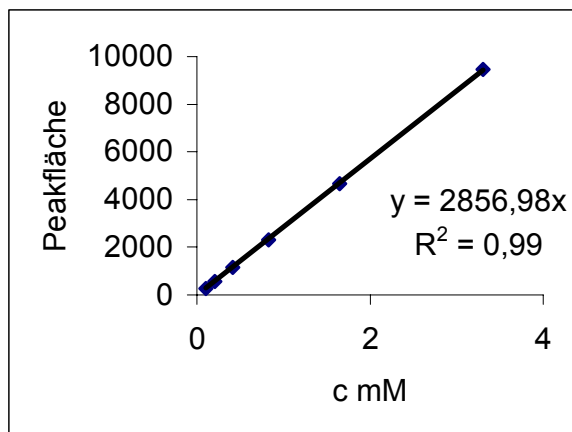
4,4'-Dimethoxy-benzoin (2d)



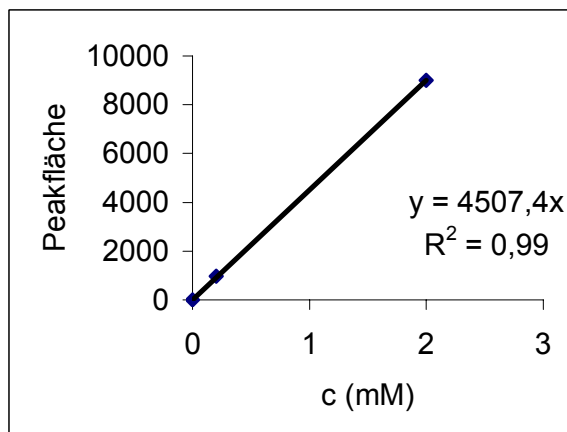
2-Chlor-3'-methoxy-benzoin (2c)



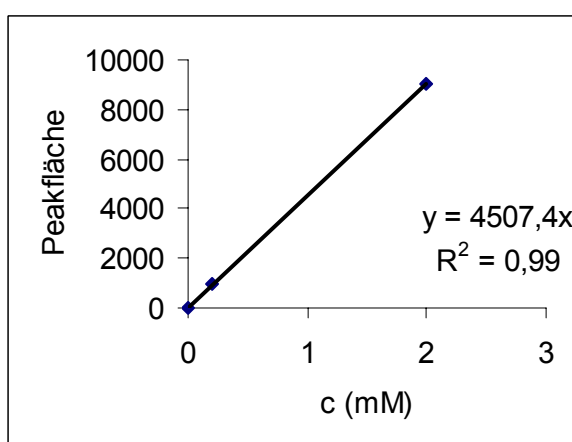
3,3'-Dichlor-benzoin (2e)



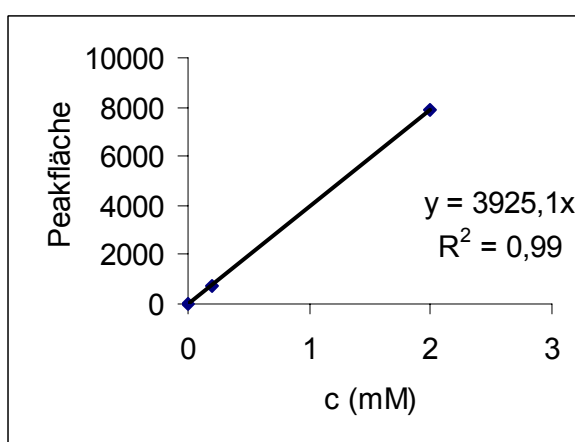
2,2'-Dichlorbenzoin (2f)



3-Chlor-HPP (4a)



3,3-Dimethoxy-HPP (4c)



3,4'-Dimethoxy-HPP (4b)

Abbildung 4.1: Standardgeraden für HPLC bei 254nm.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Benzoinderivate im Puffergemisch wurden die Versuchsreihen mit Benzoinen als Substraten bei 200 nm untersucht. Dort machte die höhere Absorption der Benzoinen die Messung von Konzentrationen bis etwa 0,05 mM möglich.

### Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mit HPLC

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde eine Säule der Marke Chiralcel von Daicel Chemical Industries, Osaka, J, verwendet.

- Laufmittel: Hexan und *iso*-Propanol im Verhältnis 90 zu 10
- Flussrate:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; 20 bar;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$
- Messung der Absorption: 250 nm

Der Enantiomerenüberschuss ist für ein Gemisch der (*R*)- und (*S*)-Enantiomere mit den Molanteilen  $F_{(S)}$  und  $F_{(R)}$  sowie  $F_{(S)} + F_{(R)} = 1$  definiert als  $ee = |F_{(S)} - F_{(R)}|$ , beziehungsweise prozentual als  $ee = 100 \cdot |F_{(S)} - F_{(R)}|$  [75].

### Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte auf einem 300 MHz Spektrometer AMX 300 der Firma Bruker, Rheinstetten. Alle Messungen fanden in Chloroform-d1 als Lösemittel statt.

### Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt einer Lösung bestimmen zu können, wird zuvor eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  bis  $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$  mit Hilfe von Rinderserum-Albumin (BSA) erstellt. In einer Plastikkuvette werden  $980 \text{ }\mu\text{L}$  Bradford Reagenz vorgelegt.  $20 \text{ }\mu\text{L}$  der Proteinlösung werden hinzugegeben, gut durchmischt und für 5 min bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend misst man mit Hilfe des Photometers die Extinktion bei  $595 \text{ nm}$ .

## 4.2.2 Bereitstellung von Substraten und Referenzen

### Herstellung des Kaliumphosphatpuffers

$50 \text{ mM}$  ( $0,36 \text{ g L}^{-1}$ ) Kaliumdihydrogenphosphat und  $50 \text{ mM}$  ( $10,9 \text{ g L}^{-1}$ ) di-Kaliumhydrogenphosphat werden eingewogen und auf das gewünschte Volumen mit Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wird auf 8 eingestellt. Die von der Benzaldehydlyase (BAL) benötigten Cofaktoren Thiamindiphosphat ( $0,5 \text{ mM}$   $248 \text{ mg L}^{-1}$ ) und Magnesiumchlorid ( $0,5 \text{ mM}$   $47,65 \text{ mg L}^{-1}$ ) werden dem Puffer zugesetzt.

### Synthesen im präparativen Satzreaktor

Die Arbeiten erfolgen unter Sauerstoffausschluss mit Argon. Vier Schraubdeckelgefäße werden mit je  $3 \text{ mL}$  Kpi-Puffer  $\text{pH} = 8$  gefüllt, der mit *tert.*-Butylmethylether (MTBE) gesättigt worden ist. Anschließend gibt man je  $250 \text{ }\mu\text{L}$  des aromatischen Aldehyds und bei der HPP-Synthese  $600 \text{ }\mu\text{L}$  des aliphatischen Aldehyds hinzu.  $1 \text{ mL}$  Enzymsuspension (enthält etwa  $10 \text{ mg}$  BAL-Lyophilisat) wird hinzugegeben und man lässt für 24 Stunden rühren. Die Reaktionslösungen werden vereinigt und zweimal mit je  $20 \text{ mL}$  Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt ( $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ -Säule, Kieselgel, Laufmittel: Petrolether 50/70 und Ethylacetat im Verhältnis 7:1). Es ergeben sich weiße bis gelbliche Kristalle. Die isolierten Ausbeuten der Benzoinen liegen bei  $740 \text{ mg}$  (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin (**2e**) ( $2,64 \text{ mmol}$ ; 60 Prozent);  $810 \text{ mg}$  (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin (**2d**) ( $2,95 \text{ mmol}$ ; 72 Prozent);  $770 \text{ mg}$  3,3'-Dimethoxy-benzoin (**2b**) ( $2,8 \text{ mmol}$ ; 63 %);  $560 \text{ mg}$  3-Methoxy-2'-Cl-benzoin (**2c**) ( $2,1 \text{ mmol}$ ; 47,8 %);  $600 \text{ mg}$  (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin ( $2,1 \text{ mmol}$ ; 48,3 %). Bei den HPPs erhält man  $0,8 \text{ g}$  gelbes Öl (*R*)-3-Chlor-HPP (**4a**); ( $4,3 \text{ mmol}$ ; 49 %),  $0,75 \text{ g}$  blassgelbe Kristalle (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP (**4b**); ( $3,6 \text{ mmol}$ ; 44 %) und  $1 \text{ g}$  weiße Kristalle (*R*)-3,3'-Dimethoxy-HPP (**4c**); ( $4,8 \text{ mmol}$ ; 58 %).

### 2,2'-Di-Chlorbenzil

Um das 2,2'-Di-Cl-Benzil herzustellen, geht man entsprechend der Synthese von Benzoinen vor, nur dass auf die sauerstofffreie Atmosphäre verzichtet wird. Es ergeben sich gelbe Kristalle, die mittels HPLC- und NMR Analyse überprüft werden. Die Ausbeute beträgt  $240 \text{ mg}$  (19,4 %), bei einer Reinheit von 97 %.

### Methoxyacetaldehyd (3b) aus Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan

In einem 50 mL-Kolben werden 20 mL halbmolare Salzsäure vorgelegt. 1,4 mL Trimethoxyethan (10,8 mmol) werden hinzugegeben. Anschließend wird eine Stunde bei 50 °C gerührt, nach Abkühlen der Reaktionslösung wird mit Natronlauge auf pH = 7 neutralisiert. Es ergibt sich eine Lösung von circa 6 mmol Methoxyacetaldehyd (**3b**). Dies entspricht einer Ausbeute von 60 Prozent.

### **Methoxyacetaldehyd (3b) aus Periodatspaltung von Glycerinmethylether**

35,1 g Kaliumperiodat (153 mmol) werden in 120 mL Wasser und 2,1 mL konzentrierter Schwefelsäure gelöst und in einem 250 mL-Kolben vorgelegt.

Unter starkem Rühren werden 15 g Glycerinmethylether (141 mmol) langsam hinzuge tropft. Man lässt zwei Stunden bei 25 - 30 °C rühren. Die ausgefallenen Feststoffe werden abfiltriert, anschließend neutralisiert man mit Natronlauge und fällt die verbleibenden Iodat-Ionen mit Bariumchlorid. Man filtriert erneut. Es wird mit 50 mL Diethylether gewaschen und das Produkt durch kontinuierliche Extraktion mit Diethylether im Extraktor gewonnen.

Im Extraktor fließt die leichtere organische Phase über eine Brücke in einen geheizten Kolben, von wo aus sie erneut verdunstet. Nach Kondensation am Kühler wird sie durch ein sich drehendes Rohr wieder in die wässrige Phase eingeleitet, wodurch weiterer Ether in den rechten Kolben übertritt. Wegen seines höheren Siedepunktes (etwa 88 °C) reichert sich Methoxyacetaldehyd (**3b**) im rechten Kolben an. Die Flüssigkeit wird dem Kolben entnommen und der Ether im Vakuum entfernt.

Es ergibt sich laut gaschromatographischer Analyse reines Methoxyacetaldehyd (**3b**). Nach drei Tagen Betrieb werden etwa 25 Prozent des Produktes isoliert, anschließend kann die Bildung von weißem Feststoff im Extraktor beobachtet werden. Das von nun an isolierte Methoxyacetaldehyd (**3b**) zeigt eine zunehmende Luftempfindlichkeit, weshalb der Versuch abgebrochen wird.

Alternativ dazu kann die Lösung bei vermindertem Druck destilliert werden. In diesem Fall erhält man eine wässrige Lösung von Methoxyacetaldehyd (**3b**).

Die nicht optimierten isolierten Ausbeuten betragen 2,7 g (35 mmol; 25 Prozent) bei Verwendung des Extraktors und 50 Prozent bei destillativer Aufreinigung.

### **4.2.3 Aufarbeitung der BAL**

Die in dieser Arbeit verwendete Benzaldehydlyase wurde rekombinant als Hexahistidininfusionsprotein in *E.coli* SG 13009/BAL<sub>His</sub> überexprimiert.

Die für die Aufarbeitung verwendeten Lösungen wurden vor Verwendung mit Helium entgast. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt vor einer eventuellen Zugabe von Imidazol. Alle Arbeiten wurden zügig durchgeführt, da das Enzym in Lösung an Aktivität verliert, besonders bei basischen pH-Werten.

Die Zellen wurden in Chargen von 20 g, durch Kombination von einer Spatelspitze Lysozym und drei Intervallen (5 min) von gepulstem Ultraschall aufgeschlossen. (Aufschlusspuffer 50 mM KPi, pH = 7, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM ThDP). Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, Rotor CO650, 4°C, 10.000 UpM).

Der Zellrohextrakt (Überstand) wurde mit einer Flussrate von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  auf eine Ni-NTA-Agarose Gelmatrix von Qiagen im Aufschlusspuffer auf eine Säule gebracht. Dabei handelt es sich um eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC). Dadurch werden zunächst die nicht bindenden Proteine abgetrennt und mit dem Aufschlusspuffer eluiert. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit Waschpuffer von der Säule entfernt (Waschpuffer 50 mM KPi, pH = 7, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM ThDP, 50 mM Imidazol).

Das Fusionsprotein wird mit Elutionspuffer eluiert (Elutionspuffer 50 mM KPi-Puffer, pH = 7, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM ThDP, 250 mM Imidazol). Zur Trennung der BAL von Imidazol und Verringerung der Konzentration an Puffersalzen erfolgt eine Entsalzung mittels Gelpermeationschromatographie (Sephadex G-25; Entsalzungspuffer 10 mM KPi-Puffer, pH = 6,5, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM ThDP). Durch Größenausschluss-verfahren werden dabei die niedermolekularen Puffersalze und das Imidazol von dem größeren BAL-Protein getrennt. Das erhaltene Eluat wird anschließend lyophilisiert und die Proteinpräparation bei  $-20^{\circ} \text{C}$  gelagert. Der Protein- bzw. BAL-Anteil im Lyophilisat liegt nach Bradford bei 40 %. Somit beziehen sich in dieser Arbeit alle Gewichts- und Konzentrationsangaben der BAL auf den reinen Enzymanteil und nicht auf die eingesetzte Menge Lyophilisat.

### 4.2.4 Versuche im Satzreaktor

#### 4.2.4.1 Kinetik

Die Enzymmenge (variierend zwischen 0,5 und 10 mg) wird in 1 mL Puffergemisch gelöst (Kpi-Puffer + 30 % DMSO) und die Konzentration durch den Bradford-Assay bestimmt. Die Enzymlösung wird im Eisbad gekühlt. Die Substratlösung (Kpi-Puffer + 30 % DMSO) versetzt man mit den gewünschten Mengen an aliphatischem bzw. aromatischem Aldehyd, die Verdünnungslösung (Kpi-Puffer + 30 % DMSO) enthält kein Substrat.

Zur Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten werden nun 3 mL verschiedener Gemische der beiden Lösungen in einem auf  $20^{\circ} \text{C}$  temperierten Schraubdeckelglas vorgelegt. Die Anfangskonzentrationen werden durch Probenahme bestimmt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Enzymlösung werden nach  $t = 2, 4, 6, 8$  und 10 Minuten durch Probenahme die Konzentrationen bestimmt. Zum Abbruch der Reaktion und zur Einstellung der Konzentrationen auf den Messbereich der HPLC werden alle Proben mit Acetonitril auf Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 mM verdünnt. Die Auftragung der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen erlaubt die Bestimmung der kinetischen Parameter durch lineare Regression.

#### Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität der BAL wurde entsprechend der Vorschrift zur Kinetik bestimmt. Als Substrat wurde stets 30 mM Benzaldehyd in Kpi-Puffer mit 30 % DMSO verwendet. Die Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten Enzymcharge lag in diesem Assay bei  $160 \text{ U mg}^{-1}$ .

#### 4.2.4.2 Homogener Satzreaktor

10 mL Puffergemisch werden in einem Schraubdeckelglas auf 20 °C temperiert und die gewünschten Mengen an aromatischem und aliphatischem Aldehyd hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wird verschlossen und die Anfangskonzentrationen der Substrate durch Probenahme durch ein Septum bestimmt.

Die Enzymlösung, deren Konzentration mit dem Bradford-Assay bestimmt wurde, wird mit einer Spritze hinzugegeben, und nach  $t = 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300$  und 360 Minuten werden die Konzentrationen der Reaktionslösung durch Probenahme bestimmt. Die Proben werden zum Reaktionsabbruch entsprechend mit Acetonitril verdünnt und mit den Methoden der HPLC analysiert.

#### 4.2.4.3 Präparativer Satzreaktor

In einer 200 mL Schottflasche werden 5 g (ca. 400 mM) Substrat vorgelegt. 95 mL mit 5 Vol% MTBE gesättigter KPi-Puffer werden hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird unter Argonatmosphäre gerührt. Um die Reaktion zu starten, werden 100 mg BAL-Lyophilisat hinzugefügt. Die exakte Enzymkonzentration wird mittels Bradford Assay bestimmt ( $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 30, 60 \text{ min}$ , und 16 h werden Proben entnommen, entsprechend mit Acetonitril verdünnt und mittels HPLC analysiert.

#### 4.2.4.4 Synthese Bupropion

1,4g 3'-Chlor-2-HPP in 6ml Dichlormethan unter Argon lösen und auf  $-40^\circ\text{C}$  kühlen in Trockeneis mit Ethanol. Anschließend 1,35mL Trifluormethansulfonsäure-anhydrid (Triflat, unter Argon), 1,3ml 2,6-Lutidin (Dimethylpyridin) und 1,7 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol dazu geben (hellgelbe Lsg.). 40min rühren bei  $-40^\circ\text{C}$ . Auf  $25^\circ\text{C}$  temperieren und über Nacht rühren. Das Produkt (Hydroxybupropion) racemisiert in wässriger Lösung (ca. 30h).

Aufarbeitung: 40ml Dichlormethan dazu und die organische Phase mit Natriumbicarbonat-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung waschen. Organische Phase separieren und einrotieren. Mit Kieselgel säulen (Laufmittel Acetonitril) und einrotieren. Es werden 0,75g weiße Kristalle mit etwas gelbem Öl erhalten. NMR:  $\sim 41,3 \%$  Ausbeute.

#### 4.2.4.5 Fed-Batch Reaktor mit Feststoffabtrennung

Der Reaktor wird vor dem Start mit einer wässrigen BSA-Lösung (ca. 1 g BSA in 200 mL Wasser) gespült.

Danach wird das Reaktionsgefäß mit KPi-Puffer befüllt, sodass das Verhältnis von Puffer zu Reaktanden am Ende der Reaktion etwa 2 zu 1 ist. Um die Reaktion zu starten, werden 100 mg BAL-Lyophilisat zur Reaktionslösung pipettiert. Die genaue Enzymkonzentration wird mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt. Die Reaktion findet unter Argonatmosphäre statt.

Beim Reaktor mit integrierter Filterkerze pumpt die Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von  $160 \text{ mL min}^{-1}$ . Die Substratzudosierung beträgt  $0,0076 - 0,33 \text{ mL min}^{-1}$ . In regelmäßigen

Abständen wird die Enzymaktivität bestimmt. Nach 2, 6, 24, 30 und 49 h wird erneut Enzym zugegeben (ungefähr 100 mg BAL-Lyophilisat).

### **Feststoffabtrennung**

Das feinkristalline (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin zentrifugiert man aus dem Reaktionsansatz 5 min bei 6800 rpm (Mulitfuge 3 S-R, Firma Heraeus), nimmt den Überstand ab und wäscht das Pellet mit Wasser. Man zentrifugiert erneut 5 min bei 6800 rpm (Mulitfuge 3 S-R, Firma Heraeus), nimmt den Überstand ab und trocknet den Feststoff in einem Exsikkator. Bei einem Ansatz, wo MTBE als Cosolvens zugesetzt wurde, muss vor der Zentrifugation MTBE unter Vakuum entfernt werden.

Das (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann mittels Filtration durch eine Filterkerze (Porung 2), der Firma Robu abgetrennt werden. Das Benzoin wurde aus der Reaktionslösung durch Filtrieren durch eine Nutsche (Porung 2) abgetrennt.

### **Umkristallisation**

Nach der Feststoffabtrennung mittels Filterkerze wird die Substanz in Aceton gelöst. Unter Vakuum wird das Lösungsmittel entfernt. Anschließend erfolgt die Umkristallisation. Die Rohkristalle werden in Hexan vorgelegt. Man gibt ca. 50 mL Diethylether hinzu und bringt die Reaktionslösung zum Sieden. Anschließend wird so lange Diethylether hinzugefügt, bis alle Kristalle gelöst sind (vgl. Stillger, 2004). Durch langsames Abkühlen wird die Lösung auf -20 °C gebracht, dabei kristallisiert (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin. Die entstandenen Kristalle werden abfiltriert und in einem Exsikkator getrocknet.

## **4.2.5 Versuche im Zweiphasensystem**

### **4.2.5.1 Heterogene Satzreaktoren**

In einem 20 mL Schraubdeckelgefäß werden 40 – 80 mg (ca. 20 – 40 mM) Substrat vorgelegt und mit 15 mL KPi-Puffer befüllt. Wird MTBE als zweite Phase untersucht, ersetzt man 7,5 mL Puffer durch MTBE. Wird MTBE als Cosolvens verwendet, wird der Puffer zuvor mit MTBE gesättigt.

Anschließend fügt man 1 mL einer Enzymlösung (Konz.: 0,1 - 1 mg mL<sup>-1</sup>) direkt in die wässrige Phase hinzu. In regelmäßigen Abständen werden Proben entnommen, mit Acetonitril verdünnt und mittels HPLC analysiert. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 30$  und  $180$  min wird die Enzymaktivität bestimmt.

### **Stabilität der BAL in der Lewiszelle**

Im Reaktor werden 10 mL Enzymlösung vorgelegt (1 mg mL<sup>-1</sup>) und mit Puffer auf 90ml aufgefüllt. Die genaue Enzymkonzentration wird mittels Bradford gemessen. Durch Einsetzen von Teflonscheiben unterschiedlicher Bohrung wird die Phasengrenzfläche eingestellt. Anschließend werden 25 mL MTBE überschichtet und die Rührergeschwindigkeit auf 90 – 700 rpm eingestellt. Für den Aktivitätstest werden nach 2h, 4h, 6h, 24h, 27h, 30h, 48h, 54h 50 – 100 µl Probe aus der wässrigen Phase entnommen.



### **Membrangestützter Zweiphasen Satzreaktor**

Die X50 Hohlfasermembranen werden von der Vorratsrolle in entsprechender Zahl und Länge abgewickelt und in ein Glasmodul eingebracht. Die Enden werden mit Zweikomponenten-Epoxyharz verklebt. Während der Härtung werden die überstehenden Fasern abgeschnitten.

Zu Beginn des Versuches wird zunächst durch Start der Pumpe (Flussrate:  $499\text{ ml h}^{-1}$ ) die wässrige Phase in das Membranmodul eingefüllt. Durch Starten der zweiten Pumpe (Flussrate:  $100\text{ ml h}^{-1}$ ) wird die organische Phase in das Membranmodul geführt. Der Druck am Eingang der wässrigen Phase in das Modul wird auf ca. 0.5-0.8bar eingestellt. Anschließend werden aromatischer (in MTBE) und aliphatischer Aldehyd (in Puffer) in der gewünschten Konzentration in die Vorlagebehälter gegeben und für 1 h equilibrieren gelassen. Zum Start der Reaktion wird die Benzaldehydlyase ( $1\text{ mg mL}^{-1}$ ) vorsuspendiert in die wässrige Phase gegeben. Nach 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min und weiter alle 30min werden aus beiden Phasen Proben genommen und für die HPLC-Analytik mit Acetonitril versetzt (Verdünnung organische Phase 1:10, wässrige Phase 1 : 1). Die Enzymaktivität wird alle 2 h gemessen.

### **4.2.6 Kontinuierlicher Reaktor**

Vor der Zugabe der Enzymlösung in den Reaktor wird das gesamte System bei einer Flussrate von  $50\text{ mL h}^{-1}$  für 90 Minuten mit 70%igem Ethanol gespült, um die Schläuche und den Reaktor von Mikroorganismen zu befreien. Anschließend wird der Alkohol durch Spülen mit destilliertem Wasser über fünf Verweilzeiten aus dem Reaktor verdrängt. Danach wechselt man die Vorlage für weitere fünf Verweilzeiten auf das verwendete Puffergemisch. Zuletzt legt man die mit Argon entgaste Substratlösung vor. Nach weiteren fünf Verweilzeiten gibt man bei niedriger Flussrate die Enzymlösung mit einer Spritze über die Blasenfalle in den Reaktorraum. Der Fraktionssammler wird auf die eingestellte Verweilzeit programmiert und die Produktlösung gesammelt. Die Konzentrationen der Produktlösungen werden mit den Methoden der HPLC bestimmt. Als Membran wird eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose YM10 der Firma Millipore, USA verwendet.

### **Stabilität der BAL in Gegenwart von Methoxyacetaldehyd (3b)**

10ml des Puffergemischs für den kontinuierlichen Ansatz wird mit Methoxyacetaldehyd (**3b**) ( $10\text{mM}$  und  $100\text{mM}$ ) versetzt, jedoch kein aromatischer Aldehyd zugegeben und in eine Amiconzelle gefüllt (10 ml Amicon-Zelle, Enschede, Holland mit einer YM10 Membran von Millipore, USA). Anschließend wird 1mg gelöste BAL zugegeben. Die genaue Enzymkonzentration wird mittels Bradford gemessen. Für den Aktivitätstest werden nach 2h, 4h, 6h und 24h, 50 – 100  $\mu\text{l}$  Probe aus der wässrigen Phase entnommen und entsprechend Kapitel 4.2.4.1 untersucht.

### **4.2.7 Simulationen**

Die Anpassung der Parameter und Simulation wurden mit dem Programm Scientist<sup>©</sup> (MicroMath<sup>©</sup>, USA) durchgeführt und sind in einer für das Programm lesbaren Art abgedruckt.

Die Standardabweichung ( $2\sigma$ ) der Parameter wurde mit Scientist bestimmt und ist bei den Parametern in Kapitel 5 (Ergebnisse) mit angegeben.

#### 4.2.7.1 Simulation im Satzreaktor

Anmerkung: die Kristallisationskonstante  $k_C$  wird im Programm als  $kg$  bezeichnet.

// MicroMath Scientist Model File **Simulation Benzoine** ((*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin)

IndVars: T

DepVars: BA, BZ, Eact, Edeact

Params: KMBA, KMBZ, VM1, VM2,  $k_C$ , Kact, Kdeact,  $k_s$

$R1=VM1*Eact*(BA/(KMBA+BA))^2$

$R2=VM2*Eact*(BZ/(KMBZ+BZ))$

$R5=k_C*BZ-k_s*BZc$

$R6=Kact*Eact-Kdeact*Edeact$

Equations:

$BA'=-2*R1+2*R2$

$BZ'=R1-R2-R5$

$BZc'=R5$

$Eact'=-R6$

$Edeact'=R6$

Initial conditions

T=0

BA=21

BZ=0

BZc=0

\*\*\*

Parameter Values

VM1=609.7

VM2=30.7

KMBA=2.12

KMBZ=0.058

$k_s=0.046$

$k_C=0.46$

Kact=0.0026142

Kdeact=0.0022915

Eact=0.0026

Edeact=0.0023

// MicroMath Scientist Model File **Simulation der HPP-Synthesen**

Satzreaktor für (*R*)-3-Chlor-HPP; 1. Wert in Klammern: (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP; 2. Wert: (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP 3. Wert: (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP erweitert mit Kristallisation und Enzymdesaktivierung)

IndVars: T

DepVars: BA, BZ, HPP, ALD, (erweitert:  $k_s$ ,  $k_C$ , Kact, Kdeact)

Params: VM1, KMBA, KMBZ, VM3, E, KIAA, (erweitert: BZc, Eact, Edeact)

$R1=VM1*E*(BA/(KMBA*(1+ALD/KIAA)+BA))^2$

$R3=VM3*E*BZ/(KMBZ*(1+ALD/KIAA)+BZ)$

(erweitert:

$R5=k_C*BZ-k_s*BZc$

$R6=Kact*Eact-Kdeact*Edeact$ )

Equations:

$BA'=-2*R1+R3$

$BZ'=R1-R3(-R5)$

Parameter Values

VM1=76 (VM1=1047; 439; 447)

VM3= 4.5 (VM3=1.7; 0.22; 43)

HPP'=R3	KMBA=9.1 (KMBA=53.8; 34.2; 28)
ALD'=-R3	KMBZ=1.1 (KMBZ=2.0; 0.09; 1.4)
(erweitert:	KIAA=86(KI=79; 25; 25)
BZc'=R5	E=0.25
Eact'=-R6	(erweitert:
Edeact'=R6)	kact=0,0026
Initial conditions	kdeact=0,0023
T=0	kc=0.46
BA=20	ks=0.001)
BZ=0	
HPP=0	
ALD=60	
(erweitert:	
BZc=0	
Eact=1	
Edeact=0)	
***	

#### 4.2.7.2 Simulation im Zweiphasensystem

Anmerkung: Der Stofftransportkoeffizient D entspricht im Programm k.

```
// MicroMath Scientist Model File
(R)-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese mit Enzymdesaktivierung und Kristallisation
IndVars: T
DepVars: BAaq, BAorg, BZaq, BZorg, (R)-3,3-Dimethoxy-HPPaq, DHPPorg, ALD, BZc
Params: KMBA, KMBZ, KIALD, VM1, VM3, Pba, Pbz, PDHPP, kBA, kBZ, kDHPP, A, kc,
Kact, Kdeact, ks
R1=VM1*Eact*(BAaq/(KMBA*(1+ALD/KIALD)+BAaq))^2
R3=VM3*Eact*(BZaq/(KMBZ*(1+ALD/KIALD)+BZaq))
R4=kBA*A*(BAorg-BAaq*Pba)
R5=kBZ*A*(BZaq*Pbz-0.1*BZorg)
R6=kDHPP*A*(DHPPaq*PDHPP-DHPPorg)
R7=kc*BZaq
R8=Kact*Eact-Kdeact*Edeact
R9=ks*BZc
Equations:
BAaq'=-2*R1+R3+R4
BAorg'=-R4
BZaq'=R1-R3-R5-R7+R9
BZorg'=R5
BZc'=R7-R9
DHPPaq'=R3-R6
Parameter Values
VM1=447
VM3=43
KMBA=28
KMBZ=1.4
KIALD=25
ks=0.046
```

```

DHPPorg'=R6          kc=0.46
ALD'=-R3             Kact=0.0026
Eact'=-R8            Kdeact=0.0023
Edeact'=R8           Pba=40
Initial conditions    Pbz=156
T=0                  PDHPP=4
BAaq=0               kBA=0.36
BAorg=75              kBZ=0.38
BZaq=0                kDHPP=0.024
BZorg=0               Eact=1
DHPPaq=0              Edeact=0
DHPPorg=0             A=0.0880
ALD=120
BZc=0

```

\*\*\*

#### 4.2.7.3 Simulation im Enzym-Membran-Reaktor

```

// MicroMath Scientist Model File
// Simulation HPP-Synthesen im CSTR
IndVars: T
DepVars: BA, BZ, HPP, ALD, U, A
Params: KMBA, KMBZ, VM1, VM3, E, TAU
Params: BA0, BZ0, HPP0, ALD0
R1=VM1*E*BA/(KMBA+BA)*BA/(KMBA+BA)
R3=VM3*E*BZ/(KMBZ+BZ)
Equations:
BA'=(BA0-BA)/TAU-R1
BZ'=(BZ0-BZ)/TAU+R1-R3
HPP'=(HPP0-HPP)/TAU+R3
ALD'=(ALD0-ALD)/TAU-R3
U=(BA0-BA)/BA0
A=HPP/BA0
Initial conditions
T=0
BA=7
BZ=0
HPP=0
ALD=60
Parameter Values (R)-3-Chlor-HPP
VM1=76 (VM1=1047; 439)
VM3= 4.5 (VM3=1.7; 0.22)
KMBA=9.1 (KMBA=53.8; 34.2)
KMBZ=1.1 (KMBZ=2.0; 0.09)
KIAA=86 (KI=79; 25)
E=0.2
Konstanten
BA0=7
BZ0=0
HPP0=0
ALD0=60
TAU=60
***

```

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kinetik und Thermodynamik der Benzoin synthese

Ziel der Untersuchungen ist die Bestimmung der kinetischen Parameter zur Simulation von Reaktionsverläufen in Reaktoren. Dazu werden in diesem Kapitel die kinetischen Parameter der Einzelreaktionen bestimmt, aus denen sich die untersuchten Reaktionen zusammensetzen.

#### 5.1.1 Kinetik

Abbildung 2.4 auf Seite 6 zeigt die in diesem Kapitel untersuchten Reaktionen.

##### 5.1.1.1 Allgemeine Anmerkung

Die kinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_M$  werden durch nicht-lineare Regression aus den gemessenen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Um die Vergleichbarkeit und Konstanz der experimentellen Daten zu gewährleisten, wird für die Untersuchung das Enzymlyophilisat aus nur einer Charge eingesetzt. Dadurch kann für alle Experimente eine konstante gewichtsspezifische Aktivität vorausgesetzt werden (Vgl. Kapitel 2.3.2).

Die BAL katalysiert sowohl eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsknüpfung (Ligasereaktion) als auch eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Spaltung (Lyasereaktion). Die Benzoinbildung ist eine Ligasereaktion, die von Aldehyden als Substrat ausgeht, während in der rückwärts gerichteten Lyasereaktion Aldehyde als Produkt gebildet werden. Deshalb werden bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der Synthese von Benzoinen sowohl die Hinreaktion als auch die Rückreaktion charakterisiert. Bei der Hinreaktion werden zwei Substratmoleküle verknüpft, weshalb für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Synthese von Benzoinen eine Zwei-Substratkinetik (Formel 5.1 und 5.2) zugrunde gelegt wird. Es gilt für die Bildung symmetrischer Benzoinen:

$$v = v_{\max} * \left( \frac{[S]}{K_M + [S]} \right)^2 \quad \text{Formel 5.1}$$

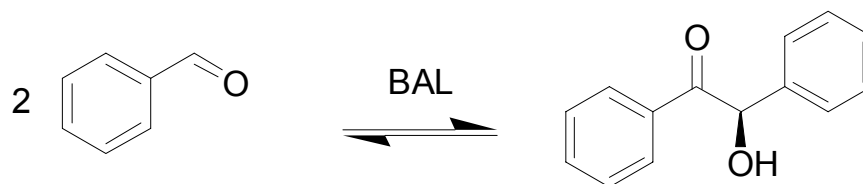
bzw. für gemischte Benzoinen:

$$v = v_{\max} * \left( \frac{[S_1]}{K_{M1} + [S_1]} \right) * \left( \frac{[S_2]}{K_{M2} + [S_2]} \right) \quad \text{Formel 5.2}$$

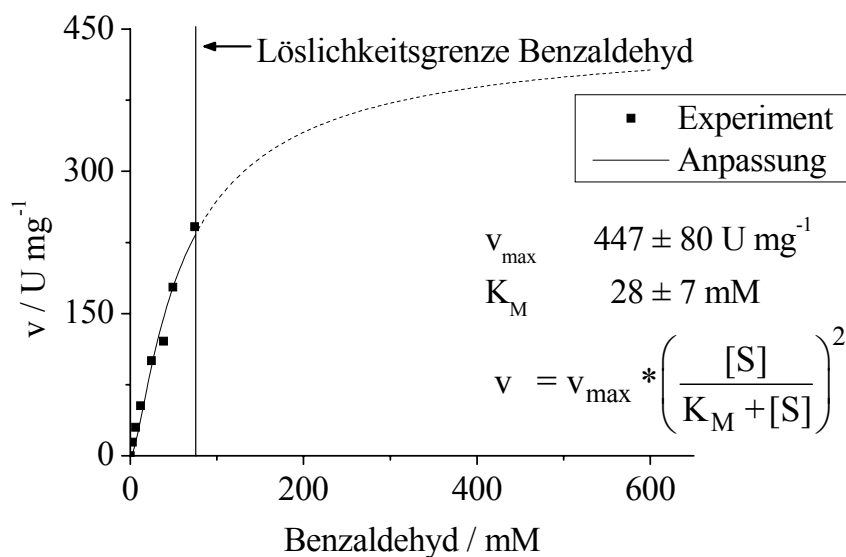
Für die Benzoin spaltung gilt:

$$v = v_{\max} * \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Formel 5.3}$$

Die Doppelsubstratkinetik stellt für die Benzoin synthese nur eine Näherung dar, da Donor und Akzeptormolekül unterschiedliche  $K_M$ -Werte haben können. Die Näherung wird in dieser Arbeit angewendet, da die separate  $K_M$ -Wert-Bestimmung nicht ohne weiteres möglich ist. Diese Methode wird als zulässig betrachtet, wenn sie durch die erhaltenen Daten gedeckt wird.

5.1.1.2 Bildung und Spaltung von (*R*)-Benzoin

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Benzoinbildung wird Benzaldehyd im Rahmen der Löslichkeit im Reaktionsmedium vorgelegt. In der Literatur werden unterschiedliche Werte für die Löslichkeit von Benzaldehyd in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur angegeben: 30 mM [179], 40-50 mM [74] und bis zu 60 mM [76]. Durch Zugabe von 30 % DMSO zum Reaktionspuffer wird eine maximale Benzaldehydkonzentration von 75 mM erreicht. In diesem Bereich korreliert die Reaktionsgeschwindigkeit der Benzoinbildung nahezu linear mit der Substratkonzentration. Wie in Abbildung 5.1 gezeigt ist, erfolgt die Anpassung der kinetischen Parameter teilweise durch Extrapolation der experimentellen Daten. Dies gilt insbesondere für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$ , die durch die begrenzte Substratlöslichkeit nur theoretische Bedeutung hat und in der Praxis nicht erreicht wird.



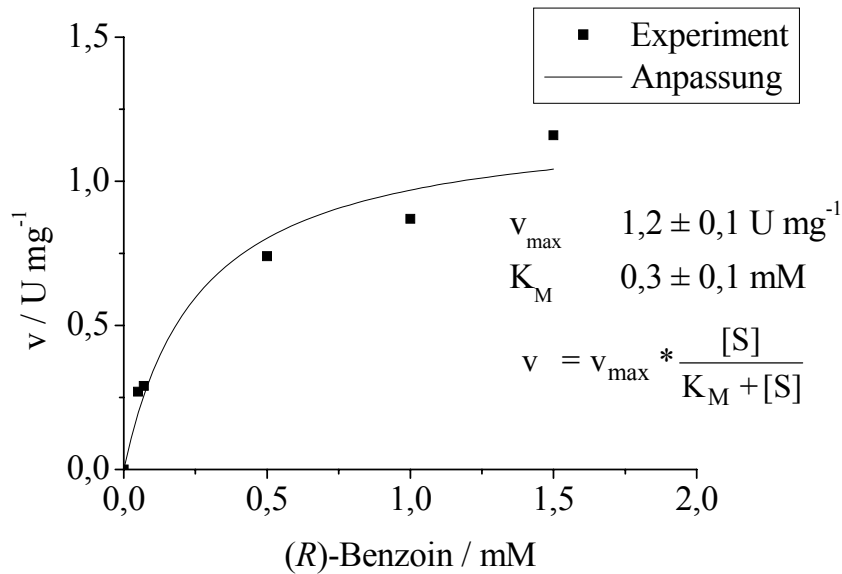
**Abbildung 5.1: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-Benzoin in Abhängigkeit der Konzentration von Benzaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ,  $V = 3 \text{ mL}$ ,  $[E] = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$

$K_M$  liegt mit 28 mM innerhalb des experimentell messbaren Bereiches. Die für die Benzoinbildung ermittelte theoretische Maximalgeschwindigkeit beträgt  $447 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

Setzt man (*R*)-Benzoin als Substrat in der Spaltungsreaktion ein, ergeben sich die in Abbildung 5.2 gezeigten kinetischen Parameter. Ein Vergleich der  $K_M$ -Werte für Benzaldehyd und (*R*)-

Benzoin zeigt, dass die Affinität des Enzyms zu (*R*)-Benzoin etwa 100fach größer ist als zu Benzaldehyd. Dadurch wird trotz der geringen Löslichkeit von (*R*)-Benzoin im wässrigen Reaktionsmedium von etwa 1,5 mM im Experiment ein Sättigungseffekt erreicht.

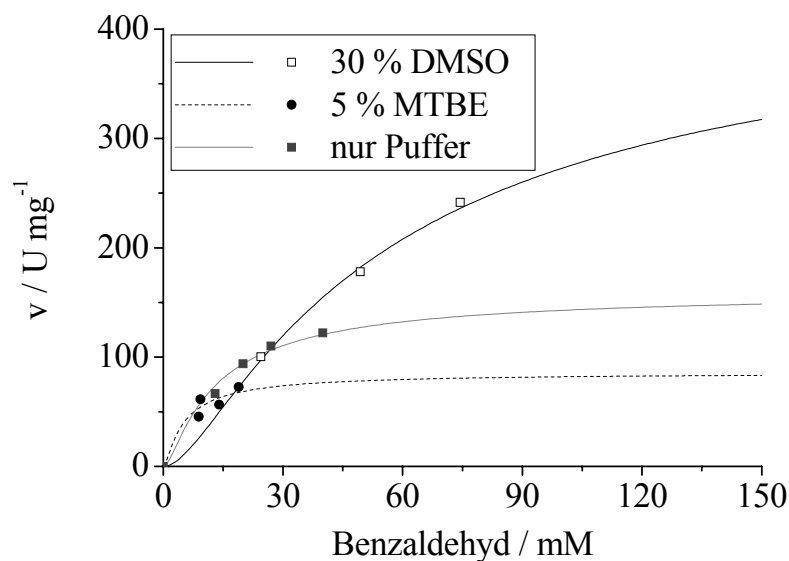


**Abbildung 5.2: Bildungsgeschwindigkeit von Benzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration von (*R*)-Benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 2 μg mL<sup>-1</sup>

### 5.1.1.3 Einfluss des Lösungsmittels

Die Kinetik von enzymkatalysierten Reaktionen wird durch organische Lösungsmittel beeinflusst [10], vgl. Kapitel 2.2.6. Abbildung 5.3 zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit der (*R*)-Benzoinbildung in drei verschiedenen Reaktionsmedien.



**Abbildung 5.3: Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-Benzoin in unterschiedlichen Reaktionsmedien**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 2 µg mL<sup>-1</sup>; Cosolvens: ohne, 5 % MTBE, bzw. 30 % DMSO

Die Geschwindigkeiten wurden bis zur maximalen Löslichkeit von Benzaldehyd im jeweiligen Medium gemessen (experimentelle Datenpunkte). Die Linien stellen die theoretischen Werte dar und sind für den Bereich über der Löslichkeitsgrenze extrapoliert.

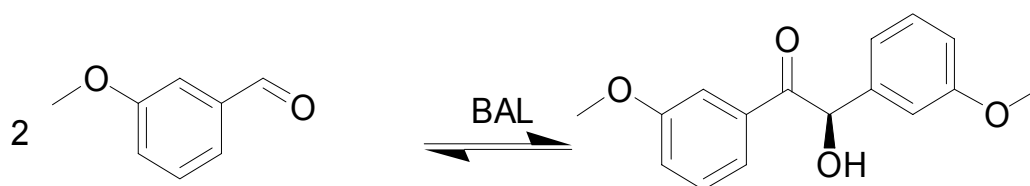
In wässrigem Medium mit 30 % DMSO wird die höchste maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  erreicht, während  $v_{\max}$  in wässrigem Medium mit 5 % MTBE am geringsten ist (vgl. Tabelle 5.1). Da in den untersuchten Reaktionsmedien mit einem kleinen  $v_{\max}$  auch niedrige  $K_M$ -Werte einhergehen, liegt eine erhöhte Substrataffinität vor. Daher sind die Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen unter 10 mM gering.

**Tabelle 5.1: Einfluss des Cosolvens auf die Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-Benzoin**

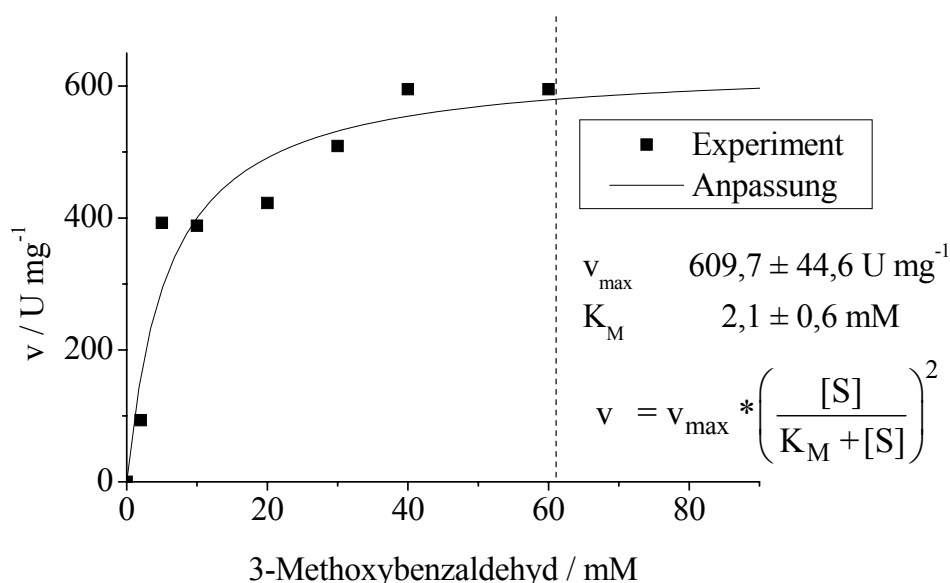
Cosolvens	Parameter	Wert
DMSO	$v_{\max}$	$447 \pm 80 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$28 \pm 7 \text{ mM}$
MTBE	$v_{\max}$	$86 \pm 7 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$2,4 \pm 0,4 \text{ mM}$
--	$v_{\max}$	$161 \pm 13 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$6,2 \pm 1,0 \text{ mM}$



### 5.1.1.4 Bildung und Spaltung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin



Bei dieser Reaktion handelt es sich um ein einfaches Reaktionssystem, das aus der Bildung und Spaltung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin besteht. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wird eine Zwei-Substratkinetik zugrunde gelegt. Bis zur Löslichkeitsgrenze des 3-Methoxybenzaldehyd von 60 mM wird die Bildungsgeschwindigkeit experimentell bestimmt (Abbildung 5.4). Bereits bei einer Substratkonzentration von 20 mM kann man einen eindeutigen Sättigungseffekt beobachten.



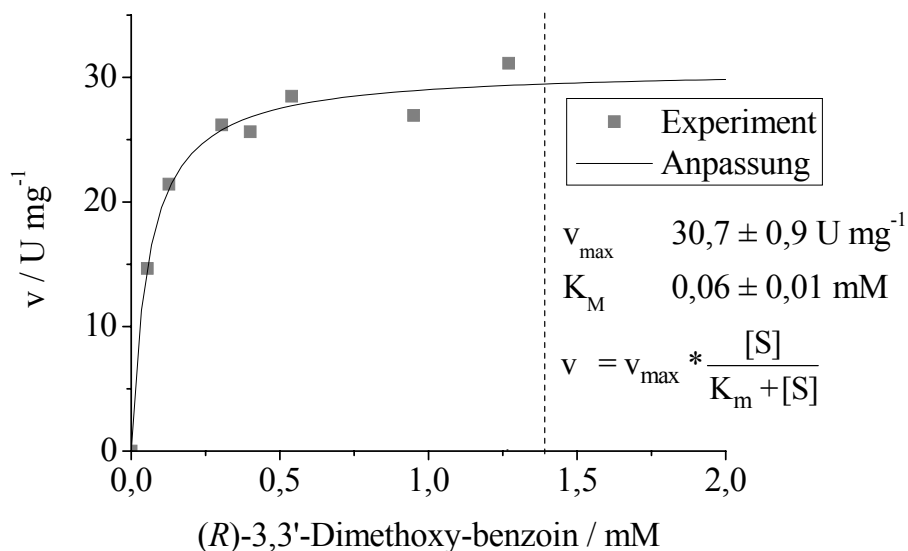
**Abbildung 5.4: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 1,93 µg mL<sup>-1</sup>

Bei 60 mM ist die Löslichkeitsgrenze von 3-Methoxybenzaldehyd dargestellt.

Die Reaktion läuft sehr schnell ab und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  liegt mit über 600 U mg<sup>-1</sup> höher als die  $v_{\max}$  der Synthese von (*R*)-Benzoin. Auch liegt der  $K_M$ -Wert für 3-Methoxybenzaldehyd niedriger als für Benzaldehyd, was bedeutet, dass 3-Methoxybenzaldehyd eine höhere Substrataffinität hat als Benzaldehyd.

Die Spaltung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin kann im Konzentrationsbereich von 0 bis 1,4 mM gemessen werden. Sie zeigt den typischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kurve (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Methoxybenzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration an (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 1,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Bei 1,4 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dargestellt

Im Vergleich zur Bildung läuft die Spaltung des (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin sehr langsam ab. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  beträgt  $30,7 \pm 0,88 \text{ U mg}^{-1}$  und der  $K_M$ -Wert ist 0,06 mM. Ein Sättigungseffekt ist bereits bei einer Substratkonzentration von 0,2 mM zu beobachten.

#### 5.1.1.5 Bildung und Spaltung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die unsymmetrische Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ist nicht vollständig chemoselektiv, d.h. neben dem gewünschten Produkt (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin entstehen auch die symmetrischen Benzoinen (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin [43]. Die Abbildung 5.6 veranschaulicht das Reaktionsschema.

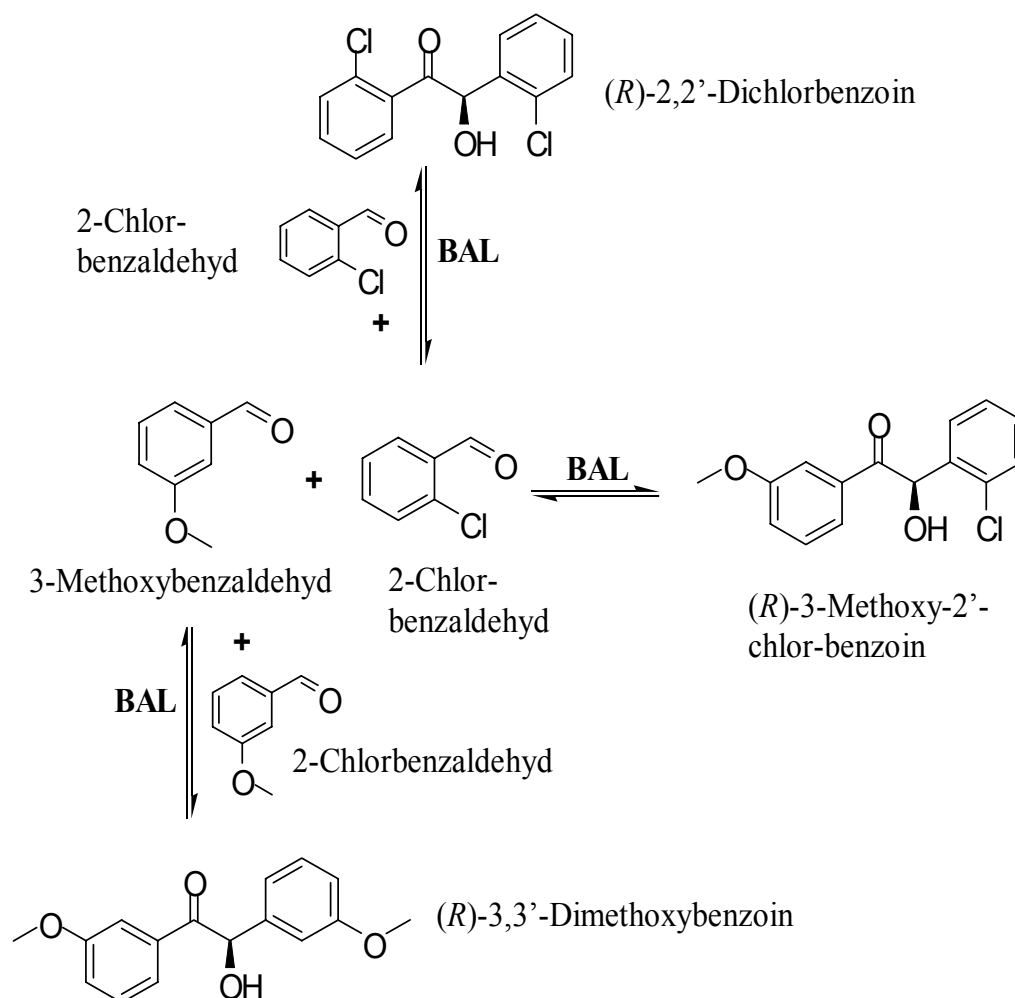


Abbildung 5.6: Reaktionsschema der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Um die Synthese kinetisch beschreiben zu können, müssen daher auch die jeweiligen Parameter der Nebenreaktionen bestimmt werden.

Für dieses Reaktionssystem ergeben sich somit sechs Teilreaktionen:

1. Die Bildung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin aus 3-Methoxybenzaldehyd
2. Die Spaltung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in 3-Methoxybenzaldehyd
3. Die Bildung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin aus 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd
4. Die Spaltung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd
5. Die Bildung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin aus 2-Chlorbenzaldehyd
6. Die Spaltung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin in 2-Chlorbenzaldehyd

Die Parameter der Teilreaktionen 1 und 2 wurden bereits in Kapitel 5.1.1.4 bestimmt. Die dritte Teilreaktion ist in Abbildung 5.7 gezeigt.

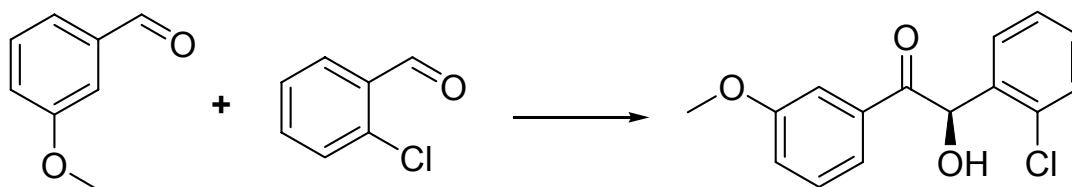


Abbildung 5.7: Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die Bildung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ist nicht wie die symmetrische Synthese von einem Substrat abhängig, sondern von zwei. Für die praktische Durchführung bedeutete dies, dass beide Substratkonzentrationen unabhängig voneinander variiert werden. Eine Veranschaulichung der Ergebnisse erfolgt in einem dreidimensionalen Diagramm (Abbildung 5.8).

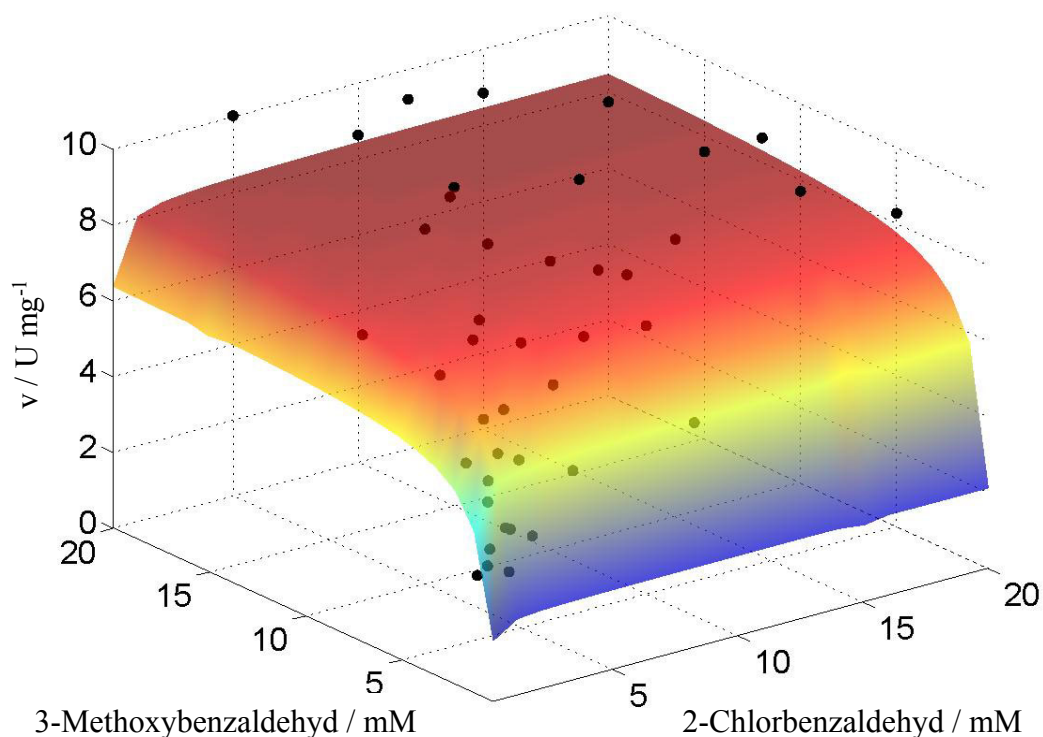


Abbildung 5.8: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in Abhängigkeit der Konzentration an 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 2,1 µg mL<sup>-1</sup>

Im Vergleich zur Bildung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin verläuft die Reaktion sehr langsam, was durch eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $8,7 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$  beschrieben wird. Die Michaelis-Menten-Konstanten beider Substrate unterscheiden sich um den Faktor zehn (vgl. Tabelle 5.1). Die Substrate haben daher eine sehr unterschiedliche Affinität zur BAL. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin aus 3-

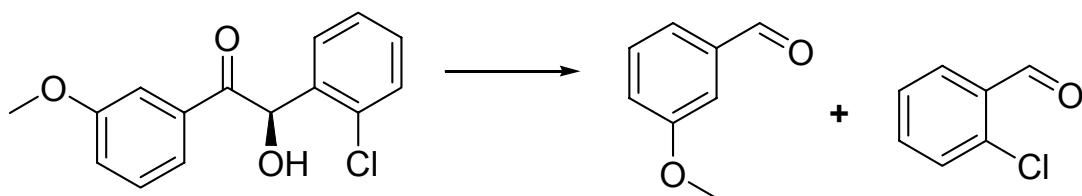
Methoxybenzaldehyd ( $S_1$ ) und 2-Chlorbenzaldehyd ( $S_2$ ) wird mit Formel 5.4 und den Parametern aus Tabelle 5.2 berechnet.

$$v = v_{\max} * \left( \frac{[S_1]}{K_{M \text{ 3-Methoxybenzaldehyd}} + [S_1]} \right) * \left( \frac{[S_2]}{K_{M \text{ 2-Chlorbenzaldehyd}} + [S_2]} \right) \quad \text{Formel 5.4}$$

**Tabelle 5.2:** Die kinetischen Parameter der Bildung von 3-(*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Parameter	Wert
$v_{\max}$	$8,7 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$
$K_{M \text{ 3-Methoxybenzaldehyd}}$	$0,6 \pm 0,1 \text{ mM}$
$K_{M \text{ 2-Chlorbenzaldehyd}}$	$0,07 \pm 0,04 \text{ mM}$

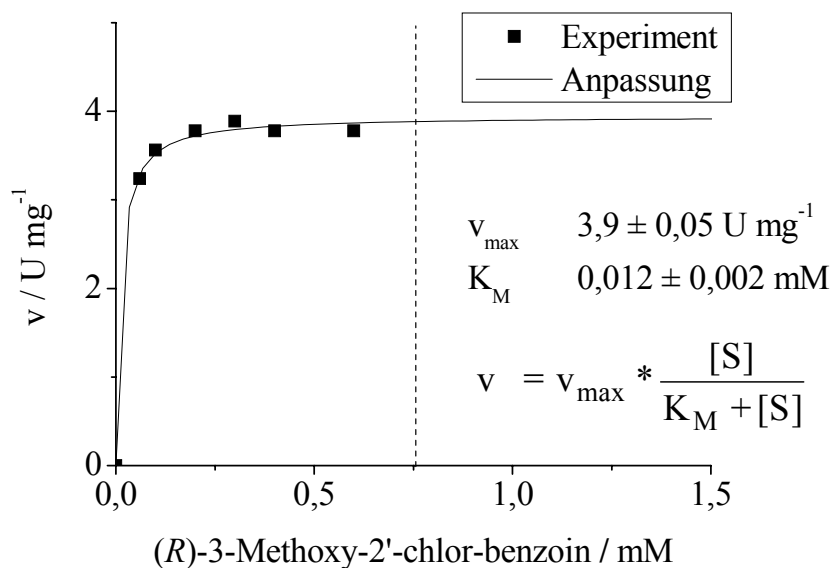
Die vierte Teilreaktion ist in Abbildung 5.9 gezeigt.



**Abbildung 5.9:** Spaltung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die Spaltung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann aufgrund der schlechten Löslichkeit von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin nur bis zu einer Konzentration von 0,75 mM durchgeführt werden.

Abbildung 5.10 zeigt die zugehörige Michaelis-Menten-Kurve. Bereits bei einer Substratkonzentration von 0,05 mM ist ein Sättigungseffekt zu erkennen.

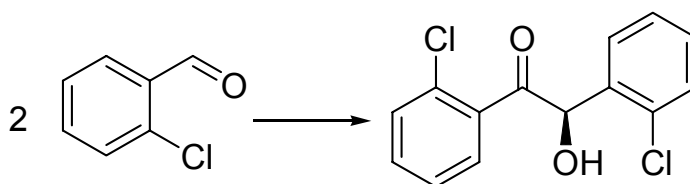


**Abbildung 5.10: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd in Abhängigkeit der Konzentration an (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V = 3 \text{ mL}$ ,  $[E] = 2,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Bei 0,75 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (R)-3-Methoxy-2'-Cl-benzoin angedeutet

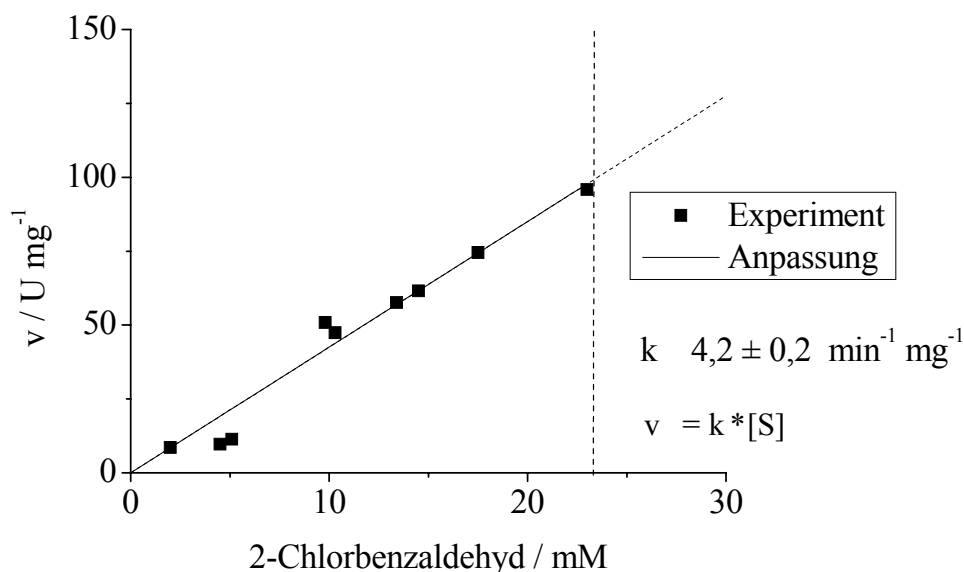
Eine experimentelle Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im Bereich, der Michaelis-Menten-Konstante ist nicht möglich, da die berechnete Michaelis-Menten-Konstante bereits unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC liegt. (vgl.  $K_M = 0,012 \pm 0,002 \text{ mM}$ ). Durch das Fehlen eines experimentellen Wertes kann die Anpassung an  $K_M$  ungenau sein.

Um die kinetischen Parameter der Bildung von (R)-2,2'-Dichlor-benzoin zu bestimmen (Abbildung 5.11), wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im Konzentrationsbereich von 0 bis zur Löslichkeitsgrenze (23 mM) des 2-Chlorbenzaldehyd untersucht.



**Abbildung 5.11: Synthese von (R)-2,2'-Dichlor-benzoin**

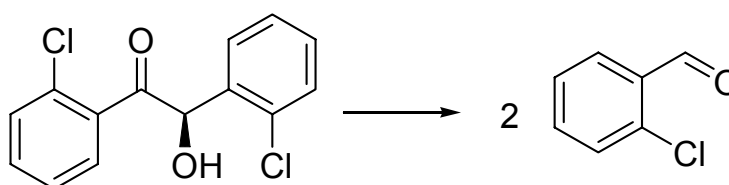
In diesem Bereich erreicht die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit jedoch keinen Sättigungseffekt (Abbildung 5.12). Es liegt eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration vor (vgl. Kapitel 2.3.1). Eine Sättigung des Enzyms durch 2-Chlorbenzaldehyd wird vermutlich erst bei einer höheren Substratkonzentration erkennbar sein. Eine vergleichbare Beobachtung wird bei der Bildung von (R)-Benzoin gemacht (vgl. Kapitel 5.1.1.2).



**Abbildung 5.12: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin in Abhängigkeit der Konzentration an 2-Chlorbenzaldehyd**

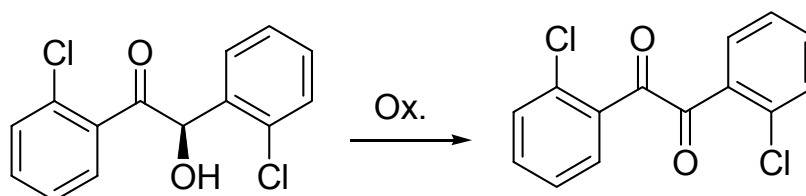
Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V = 3 \text{ mL}$ ,  $[E] = 3,33 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Bei 20 mM ist die Löslichkeitsgrenze von 2-Chlorbenzaldehyd dargestellt.

Die Teilreaktion 6 ist in Abbildung 5.13 gezeigt.



**Abbildung 5.13: Spaltung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin**

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der Spaltung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin ist experimentell nicht möglich: Bei allen Versuchen (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin im Reaktionsmedium zu lösen, oxidiert es zu 2,2'-Dichlorbenzil (Abbildung 5.14)



**Abbildung 5.14: Oxidation von Benzoin zu Benzil**

Bei der Oxidation von Benzoin wird die Hydroxylgruppe oxidiert, sodass eine Diketonstruktur entsteht. Hierbei bildet sich, mesomeriestabilisiert, eine alternierende Doppelbindungsstruktur,

die bei Benzilen zu einer intensiven gelblichen Farbe führt. Daher erkennt man einen deutlichen optischen Unterschied zwischen dem rein weißen Benzoin und dem gelblichen Farbton von Benzil.

Jedoch kann auch das Arbeiten unter Argonatmosphäre das weitgehende Oxidieren von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin nicht verhindern. Es wird versucht, das (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin durch Erwärmen und mittels Ultraschallbads zu lösen. Jedoch begünstigen beide Methoden die Oxidation. Die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin ist sehr niedrig – sie liegt ungefähr bei 0,3 mM. Hier reicht wahrscheinlich der noch vorhandene gelöste Luftsauerstoff aus, um das (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin zu oxidieren.

Die Oxidation zu 2,2'-Dichlorbenzil wird nicht nur bei den Versuchen, (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin im Reaktionsmedium zu lösen, sondern auch bei Experimenten (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin umzusetzen, beobachtet. Bei den Synthesen zu (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann die Oxidation zum jeweiligen Benzil ebenso beobachtet werden. Allerdings in einem geringeren Ausmaß und erst nach einer Laufzeit der Reaktion von 14 h. Die unterschiedlich schnelle Oxidation der Benzoinen liegt vermutlich an den elektronischen Eigenschaften, aufgrund der unterschiedlichen Substituenten am aromatischen Ringsystem.

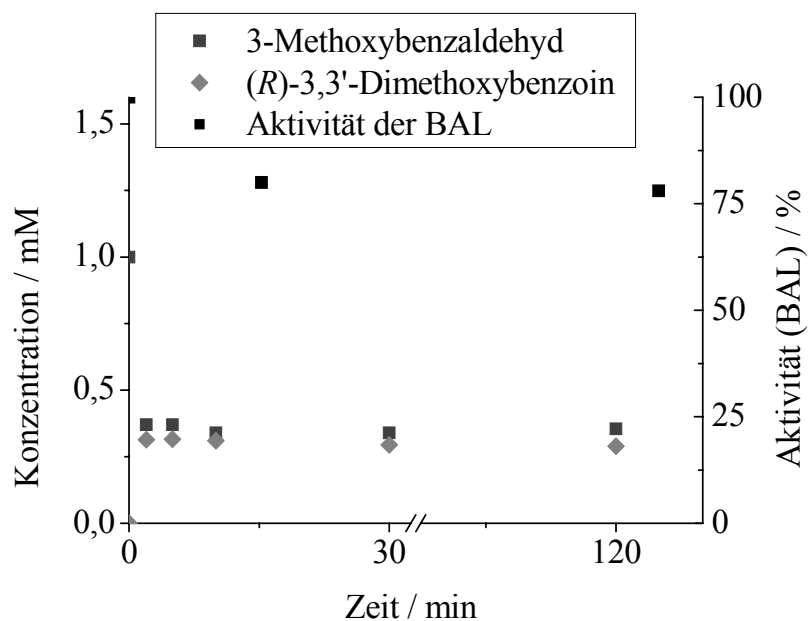
Für die Entwicklung eines Reaktorkonzepts zur Benzoin synthese muss berücksichtigt werden, dass die Synthese unter Sauerstoffausschluss stattfinden muss, um die Oxidation des Benzoins zu vermeiden.

### 5.1.2 Thermodynamisches Gleichgewicht und Selektivität

#### 5.1.2.1 (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

Um die Gleichgewichtskonstante *K* (vgl. Kapitel 2.3.3) zu bestimmen, wird ein Satzreaktor mit einer Substratkonzentration von 1 mM gewählt, um die Löslichkeit von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin zu gewährleisten (Löslichkeitsgrenze (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin: 1,4 mM). Die Abbildung 5.15 zeigt den Reaktionsverlauf des Versuches. Bereits nach wenigen Minuten erreicht die Reaktion ihr thermodynamisches Gleichgewicht. Um sicherzustellen, dass bei Reaktionsende noch aktives Enzym vorliegt, wird die Enzymaktivität bestimmt.





**Abbildung 5.15: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

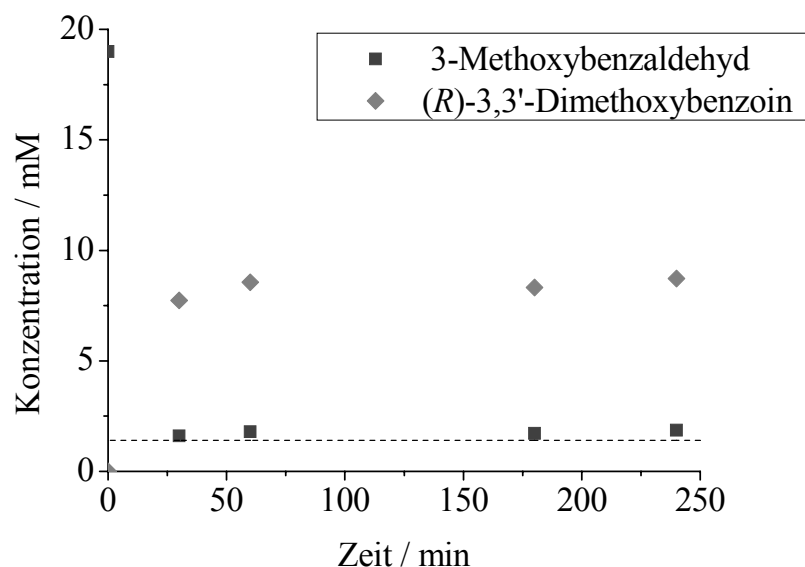
Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_1$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, [3-MeOBA] = 1 mM. Die Löslichkeitsgrenze von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin liegt bei 1,4 mM.

Mit folgender Formel wird die Gleichgewichtskonstante berechnet:

$$K = \frac{[(R) - 3,3' - \text{Dimethoxy} - \text{benzoin}]}{[3 - \text{Methoxybenzaldehyd}]^2} \quad \text{Formel 5.5}$$

Mit einem Wert von  $K = 2,4$  liegt das thermodynamische Gleichgewicht deutlich auf der Seite der Produkte, d.h. die Ligaseaktivität und somit die Benzoinbildung der BAL ist begünstigt.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Benzoinen im Reaktionssystem fällt das gebildete Benzoin aus. Das ausgefallene Benzoin ist dem Enzym nicht mehr zugänglich und wird dadurch dem thermodynamischen Gleichgewicht entzogen. Gezeigt werden kann dies bereits bei einer Anfangskonzentration von 20 mM 3-Methoxybenzaldehyd. Hierbei liegt das errechnete Konzentrationsverhältnis bei 2,8, also (scheinbar) höher als bei den beiden Ansätzen unterhalb der Löslichkeitsgrenze. Der Reaktionsverlauf dieses Satzreaktors wird in der Abbildung 5.16 dargestellt.



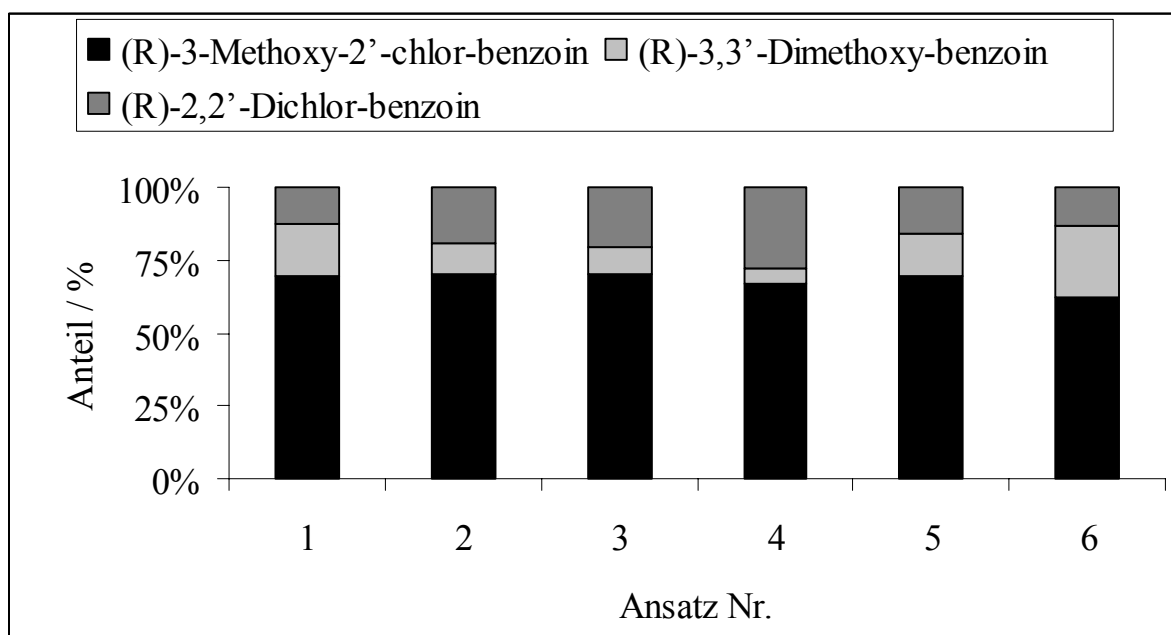
**Abbildung 5.16: Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 28,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [3-Methoxybenzaldehyd] = 19 mM. Bei 1,4 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dargestellt.

Für spätere präparative Ansätze ist es daher von Vorteil, Batch- oder Fed-Batch-Ansätze so zu führen, dass die gebildete Produktmenge die Löslichkeitsgrenze übersteigt.

### 5.1.2.2 Die Selektivität der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin verläuft nicht vollständig chemoselektiv [43], weshalb der Anteil an Nebenprodukten während der Synthese so gering wie möglich gehalten werden soll. Es wird untersucht, bei welchem Substratverhältnis der Anteil an gebildeten (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin am höchsten ist (vgl. Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17: Prozentualer Anteil der gebildeten Produkte je Ansatz**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 13,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Substratkonzentrationen:

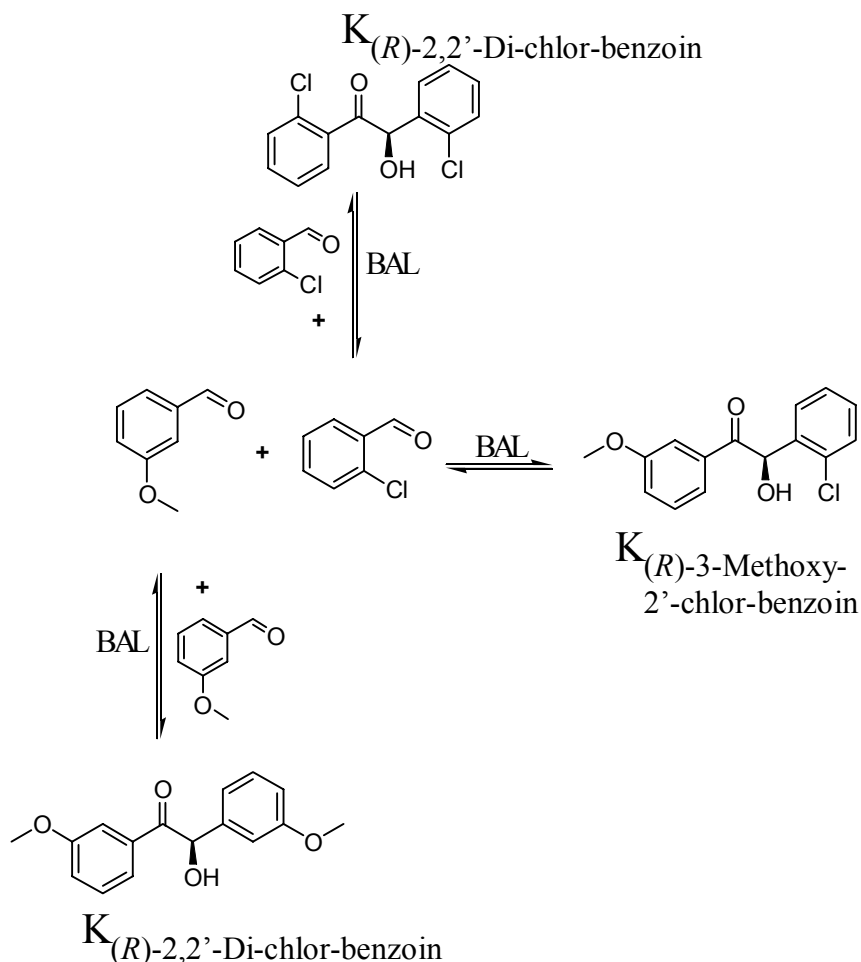
Ansatz Nr.	2-Chlorbenzaldehyd	3-Methoxybenzaldehyd
1	10 mM	12 mM
2	10 mM	11 mM
3	10 mM	10 mM
4	10 mM	9 mM
5	10 mM	8 mM
6	10 mM	6 mM

Die Abbildung 5.17 zeigt den prozentualen Anteil der Endprodukte des jeweiligen Ansatzes. Erhöht man den Anteil eines Substrates, so wird auch das jeweilige symmetrische Benzoin in größeren Mengen gebildet. In erster Linie nimmt dabei der Anteil am jeweilig anderen symmetrischen Benzoin ab, aber auch der Anteil an (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin wird verringert. Dies erkennt man besonders gut am Ansatz Nummer 6 und Nummer 1, hier beläuft sich der Anteil am gewünschten Hauptprodukt nur noch auf knapp 60 %. Ein deutlicher Unterschied am Anteil an (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann jedoch nicht beobachtet werden.

Das optimale Verhältnis an Substrat liegt bei einer 1 : 1 Mischung bzw. 1,1 : 1 von 3-Methoxybenzaldehyd zu 2-Chlorbenzaldehyd. Hier ist der Anteil am gewünschten Produkt (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin am höchsten (ca. 72 %).

### 5.1.2.3 (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Da die BAL die Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in beide Richtungen, jedoch nicht vollständig chemoselektiv, katalysieren kann (vgl. Abbildung 5.18), erfolgt die Bestimmung des thermodynamischen Gleichgewichts.

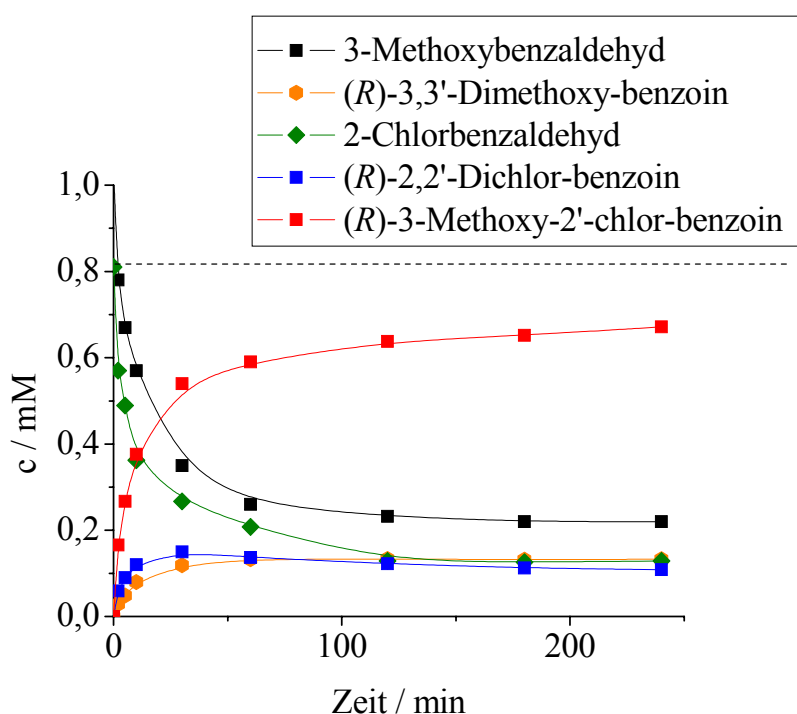


**Abbildung 5.18:** Reaktionsschema und die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Das Maß zur Berechnung des thermodynamischen Gleichgewichts ist die Gleichgewichtskonstante  $K$ , die durch die Konzentration und dem jeweiligen stöchiometrischen Faktor, mit der eine Substanz gebildet bzw. verbraucht wird, berechnet wird (vgl. Kapitel 2.3.3). Bei der Bildung von Nebenprodukten ist kein stöchiometrischer Faktor gegeben, ihr Anteil wird durch einen Selektivitätsfaktor bestimmt. Daher kann die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion nicht berechnet werden. Für die Bildungs- und Spaltungsreaktion jedes Produkts wird eine eigene Gleichgewichtskonstante bestimmt (vgl. Abbildung 5.18), wobei es sich hierbei um gekoppelte Gleichgewichtskonstanten handelt.  $K_{(R)\text{-}3\text{-Methoxy-}2'\text{-chlor-benzoin}}$  beschreibt das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion zu (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin aus 3-Methoxybenzaldehyd und 2-Chlorbenzaldehyd.  $K_{(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}}$  beschreibt das

thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion zu (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin' ausgehend von zwei Molekülen 3-Methoxybenzaldehyd. Das Gleichgewicht der Synthese von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin wird durch  $K_{(R)\text{-}2,2'\text{-Dichlor-benzoin}}$  beschrieben.

Entsprechend der Untersuchungen des (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin muss auch hier, bei der Bestimmung der gekoppelten Gleichgewichtskonstanten, die Löslichkeit der gebildeten Produkte gewährleistet sein (vgl. Löslichkeitsgrenze in  $\text{KP}_i$ -Puffer + 30 Vol% DMSO: (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin: 0,75 mM, (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin: 1,4 mM, (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin: 0,3 mM). Die Abbildung 5.19 zeigt den Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin (Die Messpunkte sind mit einer Linie verbunden). Nach etwa 4 Stunden wird das thermodynamische Gleichgewicht erreicht.



**Abbildung 5.19:** Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, [3-Methoxybenzaldehyd] = 0,8 mM, [2-Chlorbenzaldehyd] = 0,64 mM.

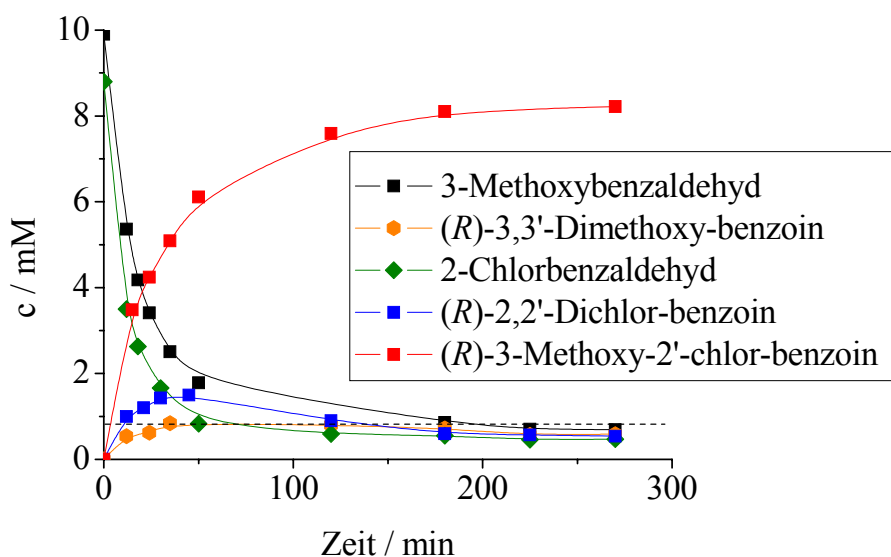
Bei 0,75 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin dargestellt.

**Tabelle 5.3:** Berechnete Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen

Konstante	Wert
$K_{(R)\text{-}3\text{-Methoxy-}2'\text{-chlor-benzoin}}$	27
$K_{(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}}$	2,4
$K_{(R)\text{-}2,2'\text{-Dichlor-benzoin}}$	6,3

Wie die Tabelle 5.3 zeigt, liegt das thermodynamische Gleichgewicht aller Teilreaktionen auf der Produktseite. Zwar ist die Bildung der symmetrischen Benzoinen kinetisch bevorzugt (vgl. Abbildungen 5.4, 5.5, 5.12 und 5.19), jedoch erhält man den höchsten Anteil an (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin, gegen Ende der Reaktion (vgl. Kapitel 5.1.2.2). Somit ist Bildung des Zielprodukts (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin mit einer Gleichgewichtskonstante von 27 thermodynamisch bevorzugt.

Die Gleichgewichtskonstanten werden auch für einen Ansatz mit höherer Anfangssubstratkonzentration bestimmt. Die Abbildung 5.20 stellt den Reaktionsverlauf dieses Ansatzes dar.



**Abbildung 5.20: Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20°C, V = 3 mL, [E] = 0,125 mg mL<sup>-1</sup>, [3-Methoxybenzaldehyd] = 10 mM, [2-Chlorbenzaldehyd] = 9 mM

Bei 0,75 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin dargestellt.

Nach ungefähr 4 Stunden wird das thermodynamische Gleichgewicht erreicht. Da die Löslichkeitsgrenze des gebildeten (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin überschritten wird, fällt dieses aus der Reaktionslösung aus und ist dem Enzym nicht mehr zugänglich. Dadurch ändert sich das Konzentrationsverhältnis, was durch  $K_{(R)\text{-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin}}$  gezeigt werden kann (Tabelle 5.4).

**Tabelle 5.4: Theoretische Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen**

Konstante	Wert
$K_{(R)\text{-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin}}$	58
$K_{(R)\text{-3,3'-Dimethoxy-benzoin}}$	2,4
$K_{(R)\text{-2,2'-Dichlor-benzoin}}$	13

Bei diesem Versuch wird auch die Löslichkeit des (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin überschritten (vgl. Löslichkeit (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin in  $\text{KP}_i$ -Puffer + 30 Vol% DMSO: 0,3 mM). Daher wird eine größere Menge an (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin als im thermodynamischen Gleichgewicht umgesetzt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle gekoppelten Gleichgewichte auf der Produktseite liegen. Durch die geringe Löslichkeit der Benzoinen lässt sich das Konzentrationsverhältnis Produkt/Edukt noch weiter erhöhen. Daher ist es vorteilhaft, die Reaktionen so zu führen, dass das Produkt ausfällt.

#### 5.1.2.4 Zusammenfassung

Tabelle 5.5 fasst die ermittelten kinetischen Parameter der Benzoin synthese zusammen:

Tabelle 5.5: Übersicht der kinetischen Parameter

Reaktion	Parameter	Wert
Bildung ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin	$v_{\max}$	$609 \pm 44 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$2,1 \pm 0,6 \text{ mM}$
Spaltung ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin	$v_{\max}$	$30 \pm 1 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$0,06 \pm 0,009 \text{ mM}$
Bildung ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin	$v_{\max}$	$8,7 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M, 3\text{-Methoxybenzaldehyd}$	$0,6 \pm 0,1 \text{ mM}$
	$K_M, 2\text{-Chlorbenzaldehyd}$	$0,07 \pm 0,04 \text{ mM}$
Spaltung ( <i>R</i> )-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin	$v_{\max}$	$3,9 \pm 0,05 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$0,012 \pm 0,002 \text{ mM}$
Bildung ( <i>R</i> )-2,2'-Dichlor-benzoin	$k$	$4,2 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$
Spaltung ( <i>R</i> )-2,2'-Dichlor-benzoin	---	---

- Bis auf die Spaltung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin konnten alle kinetischen Parameter bestimmt werden.
- (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin oxidiert sehr schnell zu 2,2'-Dichlor-benzil.
- Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin ist sehr hoch. Dadurch ist es möglich, binnen kurzer Zeit bei moderaten Enzymkonzentrationen viel Produkt zu synthetisieren. Aufgrund der kinetischen Parameter sind hohe volumetrische Produktivitäten für die Fed-Batch Versuche zu erwarten.
- Wegen der Oxidation von Benzoin zu Benzil durch Luftsauerstoff ist es notwendig unter Argonatmosphäre zu arbeiten.

Weiterhin werden folgende Gleichgewichtskonstanten bestimmt:

**Tabelle 5.6: Übersicht der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten**

Synthese von	Gleichgewichtskonstante
<b>(R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin</b>	$K_{(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}} = 2,4$
<b>(R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin</b>	$K_{(R)\text{-}3\text{-Methoxy-}2'\text{-chlor-benzoin}} = 27$
	$K_{(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}} = 2,4$
	$K_{(R)\text{-}2,2'\text{-Dichlor-benzoin}} = 6,3$

- Für die Synthese von (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann wegen der Bildung der Nebenprodukte das thermodynamische Gleichgewicht der Gesamtreaktion nicht ermittelt werden. Daher werden die gekoppelten Gleichgewichte der einzelnen Produkte untersucht. Bei beiden Reaktionen liegt das thermodynamische Gleichgewicht auf der Produktseite. Bei höheren Substratkonzentrationen fällt das gebildete Benzoin aufgrund seiner geringen Löslichkeit aus und ist dem Enzym nicht mehr zugänglich. Dadurch ist mehr Produkt als im Gleichgewichtszustand vorhanden. Für das Reaktorkonzept ist es daher von Vorteil, hohe Substratkonzentrationen zu wählen.
- Bisherige Untersuchungen zur Synthese von (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin haben gezeigt, dass zu Beginn der Reaktion der Anteil an Nebenprodukten höher ist. Mit zunehmendem Reaktionsverlauf nimmt er wieder ab; das Enzym spaltet die symmetrischen Benzoinen zu Gunsten des unsymmetrischen (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin. Dieser Effekt kann bei den präparativen Versuchen durch längere Versuchslaufzeiten genutzt werden.



## 5.2 Wahl des Reaktionssystems zur Benzoin synthese

In diesem Kapitel soll die Benzoinbildung zunächst im homogenen Reaktionssystem untersucht werden. Dies erfolgt beispielhaft anhand der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in einem Satzreaktor. Es wird ein Modell zur Simulation des Reaktionsverlaufes unter Verwendung der ermittelten kinetischen Parameter aufgestellt und anhand von Experimenten überprüft.

Anschließend erfolgen weitere Untersuchungen im heterogenen System, wobei entweder ein organisches Lösungsmittel oder das Substrat als zweite Phase verwendet wird.

### 5.2.1 Homogenes Reaktionssystem

Unter einem homogenen Reaktionssystem versteht man ein einphasiges Reaktionsmedium. Als homogenes Reaktionssystem wird im Rahmen dieser Arbeit jeder Reaktionsansatz bezeichnet, bei dem zu Beginn des Experiments alle Substanzen vollständig gelöst vorliegen. Im Verlauf der Reaktion kommt es jedoch häufig durch Ausfällung von Reaktanden zur Ausbildung heterogener Mehrphasensysteme. Dies wird nicht in der Bezeichnung des Reaktionssystems berücksichtigt.

### 5.2.2 Simulation der Benzoin synthese

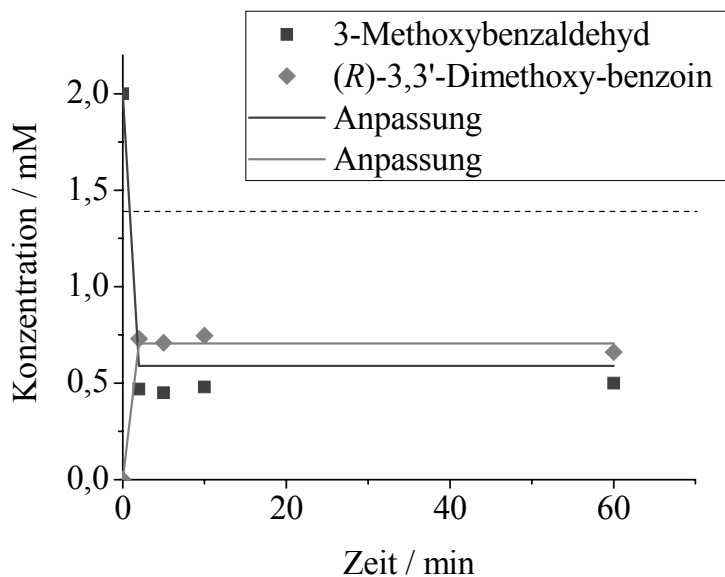
Zunächst wird ein Modell erstellt, welches die Michaelis-Menten-Gleichungen und somit die zuvor bestimmten kinetischen Parameter beinhaltet. Formel 5.6 und 5.7 zeigen die verwendeten Gleichungen.

$$v_{3\text{-Methoxybenzaldehyd}} = 609 * \left( \frac{[3\text{-Methoxybenzaldehyd}]}{2,1 + [3\text{-Methoxybenzaldehyd}]} \right)^2 \quad \text{Formel 5.6}$$

$$v_{(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}} = 30 * \left( \frac{[(R)\text{-}3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}]}{0,06 + [3\text{-Methoxybenzaldehyd}]} \right) \quad \text{Formel 5.7}$$

Die kinetischen Parameter werden anhand der experimentell ermittelten Daten überprüft.

Die Abbildung 5.21 zeigt die Anpassung des Modells an einen Satzreaktor, in dem auch nach Ende der Reaktion alle Reaktanden gelöst vorliegen. Der Konzentrationsverlauf von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und 3-Methoxybenzaldehyd wird gut beschrieben.



**Abbildung 5.21: Simulation der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichungen**

Reaktionsbedingungen: 50mM  $\text{KPi}$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, [3-Methoxybenzaldehyd] = 2 mM.

Bei 1,4 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dargestellt.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Modell den Reaktionsverlauf im Satzreaktor gut beschreibt. Bestätigt wird dies durch ein hohes Bestimmtheitsmaß (Tabelle 5.7).

**Tabelle 5.7: Bestimmtheitsmaß der Simulation des Satzreaktors**

	Konzentration von	Bestimmtheitsmaß
Satzreaktor	3-Methoxybenzaldehyd	0,99
	( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin	0,99

### 5.2.3 Kristallisation

Solange die Löslichkeitsgrenze des (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin nicht überschritten wird, ist davon auszugehen, dass die kinetischen Parameter gültig sind. Überschreitet das Produkt im Reaktionsverlauf jedoch die Löslichkeitsgrenze, so steht es nicht mehr für die enzymatische Umsetzung zur Verfügung.

Dies wird in der Simulation durch einbeziehen der Kristallisation und des (Wieder-)Auflösens des Produkts berücksichtigt (Formeln 5.8 und 5.9).

$$C = k_C * [(R) - 3,3' - \text{Dimethoxy} - \text{benzoin}] \quad \text{Formel 5.8}$$

$$S = k_S * [C_{(R)-3,3'\text{-Dimethoxy-benzoin}}] \quad \text{Formel 5.9}$$

Dabei ist C die Kristallisationsrate und S die Solubilisierungsrate der Benzoinkristalle.  $k_s$  bzw.  $k_C$  sind die Geschwindigkeitskonstanten, die durch Anpassung an den Reaktionsverlauf bestimmt werden (vgl. Kapitel 2.4.2) [204].

Die Stabilität der BAL wird in Gegenwart von Substrat reduziert [76]. Dieser Effekt wird erst sichtbar, wenn vergleichsweise wenig Enzym und viel Substrat eingesetzt wird. Die Enzymkonzentration im Ansatz in Abbildung 5.22 liegt um den Faktor 600 niedriger als im vorherigen Ansatz (Abbildung: 5.21), die Substratkonzentration ist dagegen um den Faktor 10 höher. Daher ist der Aktivitätsverlust in der Simulation des folgenden Reaktionsverlaufs berücksichtigt. Es wird angenommen, dass das Enzym durch Konformationsänderung reversibel von einer aktiven Form ( $E_{\text{act}}$ ) in eine inaktive Form ( $E_{\text{deact}}$ ) übergeht (vgl. Kap. 2.3.1). Zwischen beiden Formen stellt sich ein Gleichgewicht ein (Formel 5.10).

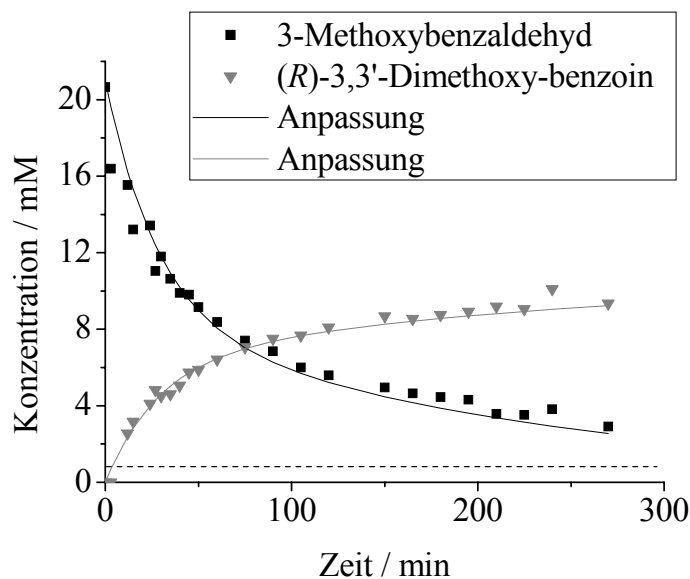
$$E = k_{\text{act}} * E_{\text{act}} - k_{\text{deact}} * E_{\text{deact}} \quad \text{Formel 5.10}$$

Tabelle 5.8 zeigt die Parameter, die für die Simulation der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxybenzoin bestimmt werden. Die Michaelis-Menten Parameter werden aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Dagegen erfolgt die Bestimmung der Parameter der Kristallisationsrate und der Enzymaktivität durch parallele Anpassung an die Daten aus den Satzreaktorverläufen.

**Tabelle 5.8: Parameter der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxybenzoin**

	Parameter	Wert
Bildung (R)-3,3'-Dimethoxybenzoin:	$v_{\text{max}}$	$609 \pm 44 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$2,1 \pm 0,6 \text{ mM}$
Spaltung (R)-3,3'-Dimethoxybenzoin	$v_{\text{max}}$	$30,7 \pm 0,9 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$0,06 \pm 0,01 \text{ mM}$
Kristallisationsrate	$k_C$	$0,46 \text{ mM min}^{-1}$
Enzymaktivität	$k_{\text{act}}$	$0,027 \text{ min}^{-1}$
	$k_{\text{deact}}$	$0,0023 \text{ min}^{-1}$
Lösungsrate	$k_s$	$0,046 \text{ mM min}^{-1}$

Die Geschwindigkeit der Kristallisation ist zehn Mal größer als die Geschwindigkeit der Auflösung der Kristalle. Abbildung 5.22 zeigt den Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxybenzoin sowie die Anpassung der Daten unter Berücksichtigung der Kristallisationsrate und der Enzymdesaktivierung.



**Abbildung 5.22: Anpassung der Reaktion unter Einbeziehung der Kristallisation und Enzymaktivität**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer, pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [3-Methoxybenzaldehyd] = 21 mM

Bei 1,4 mM ist die Löslichkeitsgrenze von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dargestellt.

In Abbildung 5.22 wird nicht zwischen kristallinem und gelöstem (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin unterschieden. Im Experiment fällt (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin fein verteilt aus und wird durch intensives Rühren gleichmäßig im gesamten Reaktionsvolumen verteilt. Das (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin ist aufgrund der feinen Partikel gleichmäßig im Reaktionsvolumen verteilt und weiterhin der Probenahme zugänglich. Da für die HPLC-Analytik ein Verdünnungsschritt notwendig ist, wird das entnommene (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin vollständig gelöst und somit als Konzentration erfasst.

## 5.2.4 Heterogenes Reaktionssystem

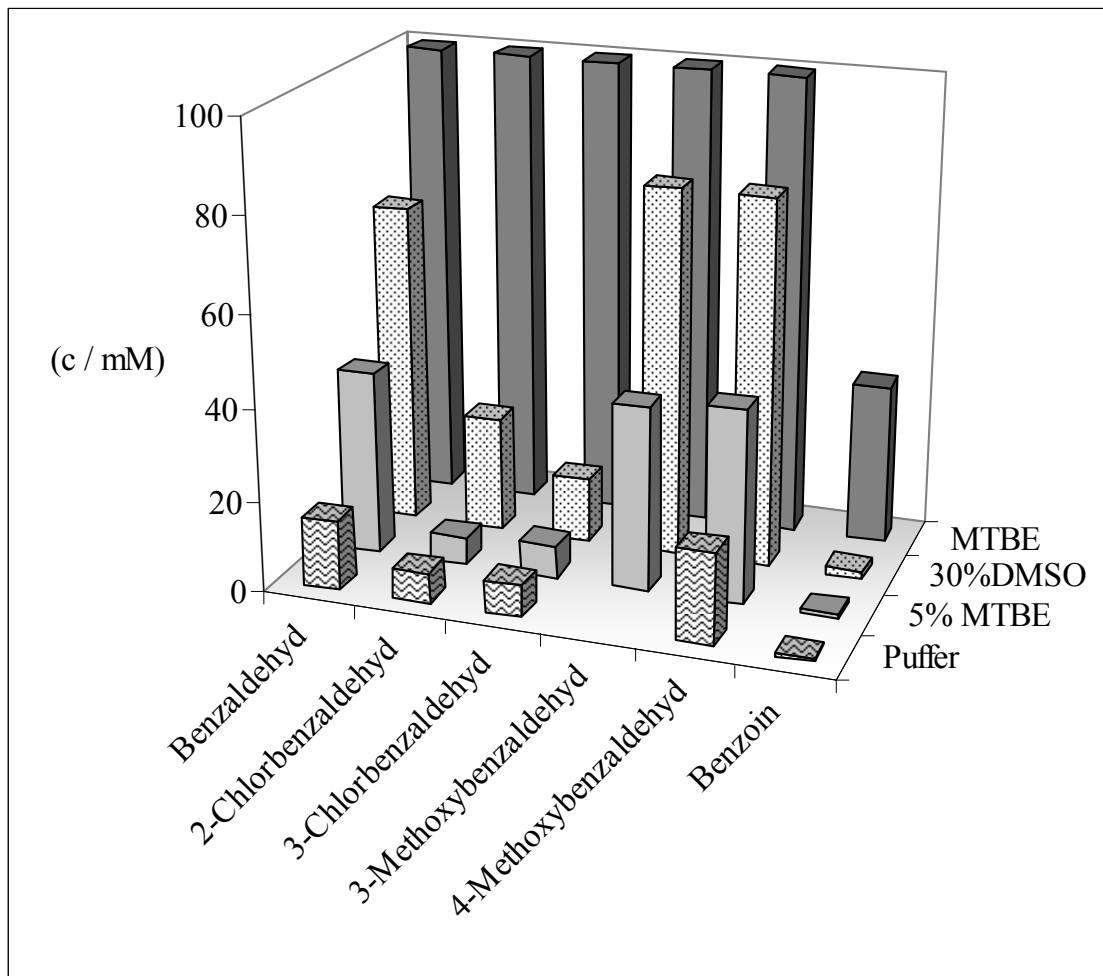
### 5.2.4.1 Zwei-Phasensystem

Zwei-Phasensysteme sind geeignet, um schlecht lösliche Substanzen in Reaktionen umzusetzen. Sie bieten die Möglichkeit, das synthetisierte Produkt *in situ* abzutrennen und in der organischen Phase in Lösung zu halten.

Biokompatible Lösungsmittel haben häufig einen hohen Siedepunkt, bzw. niedrige Wasser/Oktanol-Verteilungskoeffizienten (logP-Wert, vgl. Kapitel 2.2.6). Dagegen sind Lösungsmittel mit einem hohen logP-Wert oft nicht biokompatibel [102]. Dies schränkt die Wahl des Lösungsmittels ein.

In Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die Zugabe von MTBE (gegenüber der Lagerung in reinem Puffer) positiv auf die Stabilität der BAL auswirken kann [182] (vgl. Kapitel 2.2.5 f). Daher wird die Eignung von MTBE als zweite, organische Phase in einem Reaktionssystem für die Benzoin synthese untersucht und mit anderen Reaktionsmedien verglichen. Für die

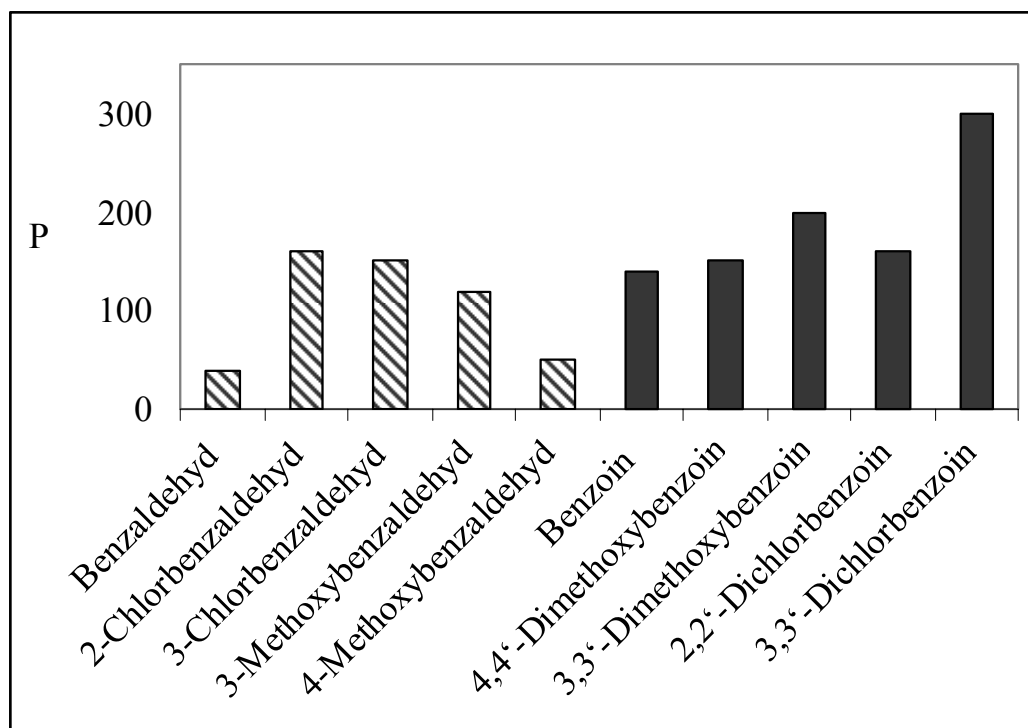
Untersuchung der Löslichkeiten in einem Zwei-Phasensystem werden die Phasen zunächst isoliert betrachtet. Abbildung 5.23 zeigt die Löslichkeiten verschiedener Reaktanden in den untersuchten Reaktionsmedien.



**Abbildung 5.23: Maximale Löslichkeiten in verschiedenen Medien**

Die Löslichkeit der Reaktanden ist in reinem Puffer am geringsten. Durch Zugabe von DMSO bzw. MTBE als Cosolventien kann die wässrige Phase eines Zweiphasensystems simuliert werden und eine verbesserte Löslichkeit gezeigt werden. Gegenüber wässrigen Reaktionsmedien wird in MTBE die Löslichkeit von Benzoin um mehr als den Faktor zehn verbessert. Die Löslichkeitsgrenze der als Substrat dienenden Benzaldehydderivate in MTBE liegt über zwei Molar und ist somit für die Reaktion nicht limitierend.

In einem Zwei-Phasensystem verteilen sich die Reaktanden entsprechend der Verteilungskoeffizienten zwischen beiden Phasen. Abbildung 5.24 zeigt die Verteilungskoeffizienten für verschiedene Benzaldehyd- und Benzoinderivate im Zwei-Phasensystem aus MTBE und Puffer.



**Abbildung 5.24: Verteilungskoeffizienten Benzoin- und Benzaldehyde**

Versuchsbedingungen: 10 ml MTBE + 10 ml  $\text{KP}_i$ -Puffer (pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) + 1 g Benzoin- bzw. 1 ml Benzaldehyd-Derivat;  $V_{\text{gesamt}} = 21 \text{ mL}$ ;  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Im Scheidtrichter schütteln und nach Phasentrennung (über Nacht) mittels HPLC analysieren.

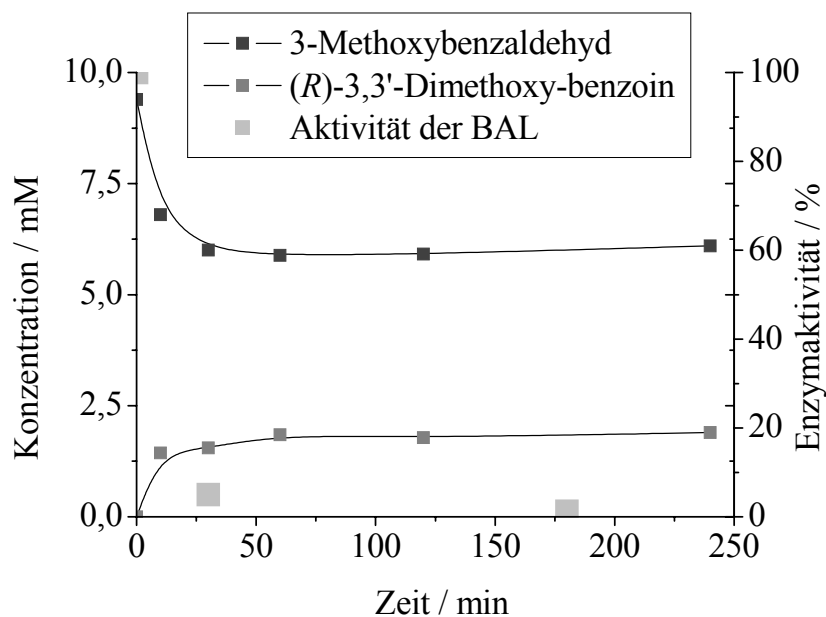
Die Benzoin- und Benzaldehyde haben hohe Verteilungskoeffizienten und werden sehr gut aus der wässrigen Phase extrahiert. Durch Einstellung einer hohen Substratkonzentration im Reaktionsansatz kann dem Entzug des Substrats aus der wässrigen Phase entgegengewirkt werden.

#### 5.2.4.2 Lösungsmittel als zweite Phase

Sowohl für die Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin als auch für die Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin wird das Zwei-Phasensystem aus Puffer und MTBE untersucht.

Die Reaktion findet in der wässrigen Phase statt und Substrat wird kontinuierlich aus der organischen Phase in die wässrige Phase transportiert. Das gebildete Benzoin wird *in situ* in die organische Phase extrahiert. Die hydrophoben Reaktanden verteilen sich aufgrund des Phasengleichgewichts überwiegend in die organische Phase. In der wässrigen Phase liegt somit eine weitgehend konstante, aber sehr niedrige Konzentration an Substrat und Produkt vor. Deshalb wird der Konzentrationsverlauf in der organischen Phase dargestellt.

Die Enzymkonzentration wird so gewählt, dass eine dauerhafte Phasenvermischung vermieden wird, da höhere Enzymkonzentrationen als ca.  $1 \text{ mg L}^{-1}$  zu stabiler Emulsionsbildung führen, deren Phasen sich nicht mehr isoliert analysieren lassen. Abbildung 5.25 zeigt den Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin im Zwei-Phasensystem.

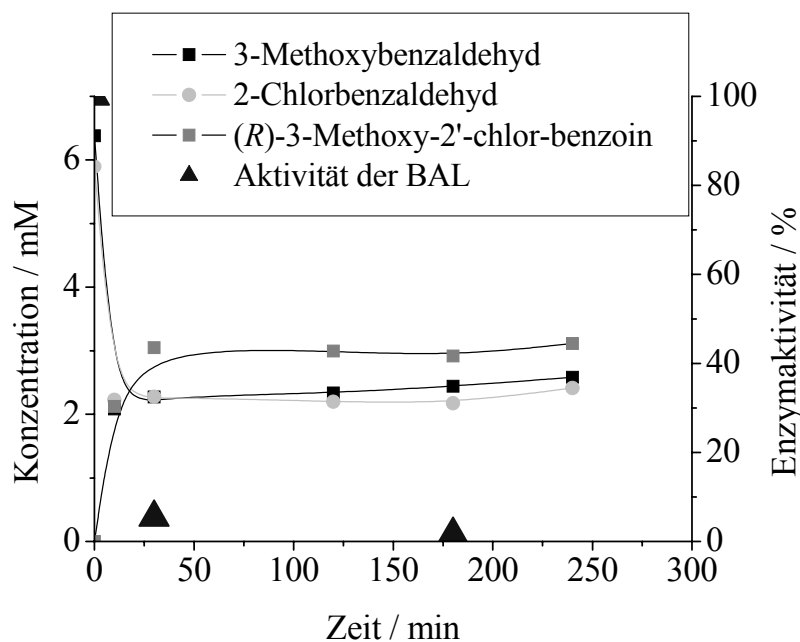


**Abbildung 5.25: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Reaktionsbedingungen: Wässrige Phase: 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer, 5 Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $V = 7,5$  mL,  $[\text{E}] = 0,3$  mg mL<sup>-1</sup>, Organische Phase: 7,5 mL MTBE, [3-Methoxybenzaldehyd] = 9,5 mM

Es wird nur ein geringer Umsatz erreicht, da die Enzymaktivität schnell abnimmt. Bereits nach 30 min beträgt die Enzymaktivität nur noch 5 % des ursprünglichen Wertes.

Abbildung 5.26 zeigt den Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin im Zwei-Phasensystem. Zur übersichtlicheren Veranschaulichung wird auf die Darstellung der Nebenprodukte verzichtet. Die experimentellen Daten sind durch visuelle Hilfslinien verbunden.



**Abbildung 5.26: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

Reaktionsbedingungen: Wässrige Phase: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 5 Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $V = 7,5 \text{ mL}$ ,  $[\text{E}] = 1,07 \text{ mg mL}^{-1}$

Organische Phase: 7,5 mL MTBE,  $[\text{3-Methoxybenzaldehyd}] = 6 \text{ mM}$ ,  $[\text{2-Chlorbenzaldehyd}] = 6 \text{ mM}$

Auch bei der Synthese von (R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kommt es zu einem schnellen Enzymaktivitätsverlust. Bereits nach 30 min sind nur noch 5 % der ursprünglich eingesetzten BAL aktiv. Dadurch kommt es zu dem relativ geringen Umsatz an Produkt.

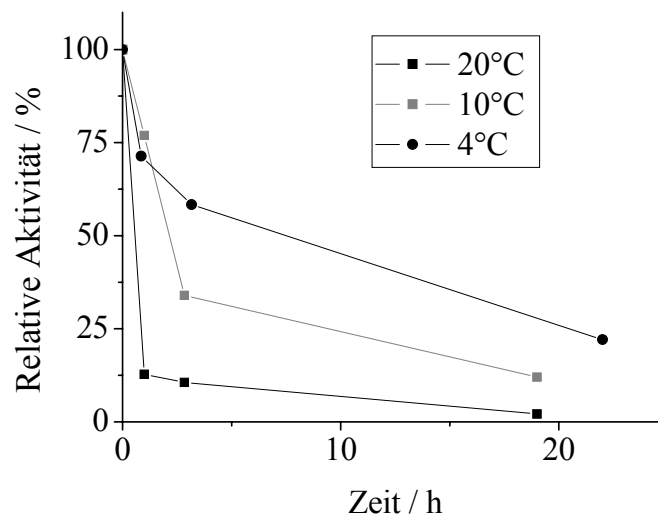
Wie bereits oben erwähnt, wird bei der praktischen Durchführung der Versuche eine „Mischphase“ zwischen organischer und wässriger Phase beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das Enzym denaturiert und dadurch inaktiviert wird. Grund für die starke Inaktivierung des Enzyms stellt entweder das MTBE der organischen Phase oder die Phasengrenze dar. Auf der anderen Seite wirkt sich die Verwendung von MTBE als Cosolvens vorteilhaft auf das Reaktionssystem aus (vgl. Kapitel 2.2.5). Für eine exakte Aussage erfolgten weitere Untersuchungen.

#### 5.2.4.3 Stabilität der BAL im Zwei-Phasensystem

In der Literatur wurde gezeigt, dass die BAL im Zwei-Phasensystem durch MTBE stabilisiert werden kann [182]. Die Experimente in der Literatur wurden in kleinem Maßstab (4 ml) und zur Minimierung der thermischen Desaktivierung bei 4°C durchgeführt. Bei einem Scale-up erhöht sich die Phasengrenzfläche und die Stabilität der BAL nimmt ab.

Zunächst wird der Einfluss der thermischen Desaktivierung auf das Enzym untersucht. Da im Rahmen dieser Arbeit auch das *Scale-up* der enzymatischen C-C-Knüpfung untersucht wird, erfolgen die Experimente in vergrößertem Maßstab (Abbildung 5.27).

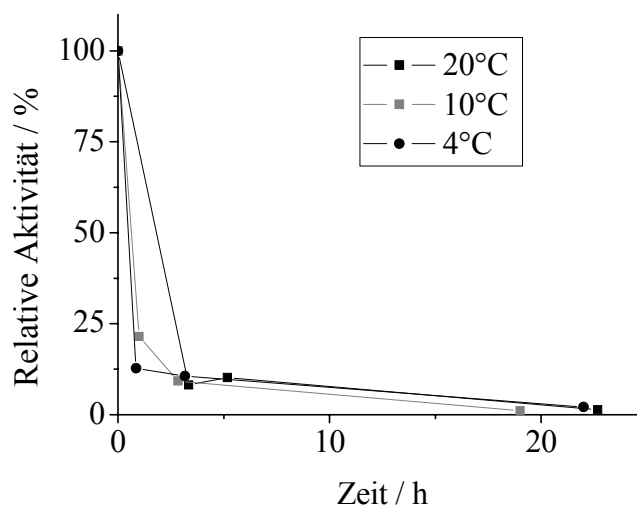




**Abbildung 5.27: Einfluss der thermischen Desaktivierung auf die BAL**

Bedingungen: 10 ml Puffer, 25 ml MTBE, 20mg BAL, 700 rpm

Gegenüber den Werten in der Literatur zeigt sich eine deutlich geringere Stabilität der BAL im wässrig-organischen Zwei-Phasensystem. Jedoch weist die Stabilität der BAL eine deutliche Temperaturabhängigkeit auf. Da in der Literatur [76] gezeigt wurde, dass die BAL in Gegenwart von Substrat eine verringerte Stabilität hat, wird der Einfluss des Substrats mit der thermischen Desaktivierung verglichen (Abbildung 5.28).



**Abbildung 5.28: Temperaturstabilität der BAL mit Substrat**

Bedingungen: 10 ml Puffer, 25 ml MTBE, 20mg BAL, 20 mM Benzaldehyd 700 rpm

In Gegenwart von Benzaldehyd als Substrat ist kein Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der BAL zu erkennen.

Da die gezeigten Experimente gegenüber den Untersuchungen in der Literatur in einem vergrößerten Maßstab durchgeführt werden, wird die Bedeutung der Phasengrenzfläche für die Stabilität der BAL untersucht.

Für die Untersuchung des Einflusses der Phasengrenzfläche auf die Stabilität der BAL wird der in Abbildung 5.29 gezeigte Reaktor verwendet. Durch Einsetzen von Teflonscheiben mit unterschiedlich großer Bohrung wird die Größe der Phasengrenzfläche zwischen der wässrigen und der organischen Phase variiert.

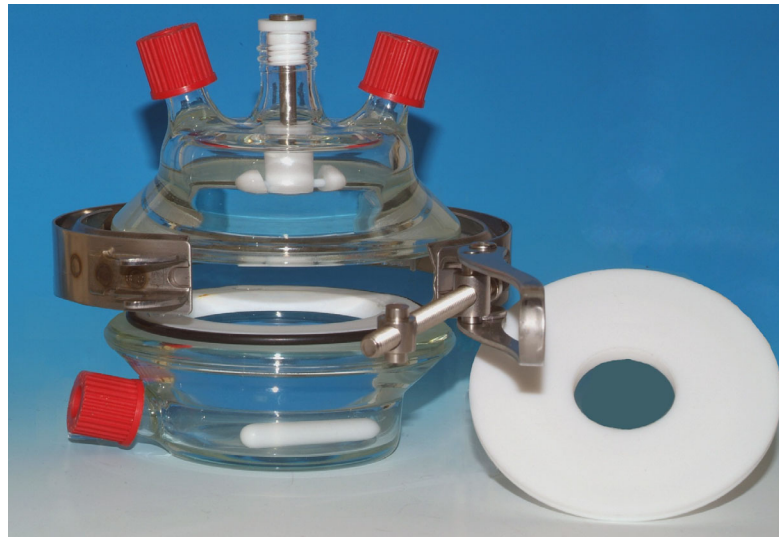


Abbildung 5.29: Reaktor zur Untersuchung der Enzymstabilität

In Abbildung 5.30 sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt.

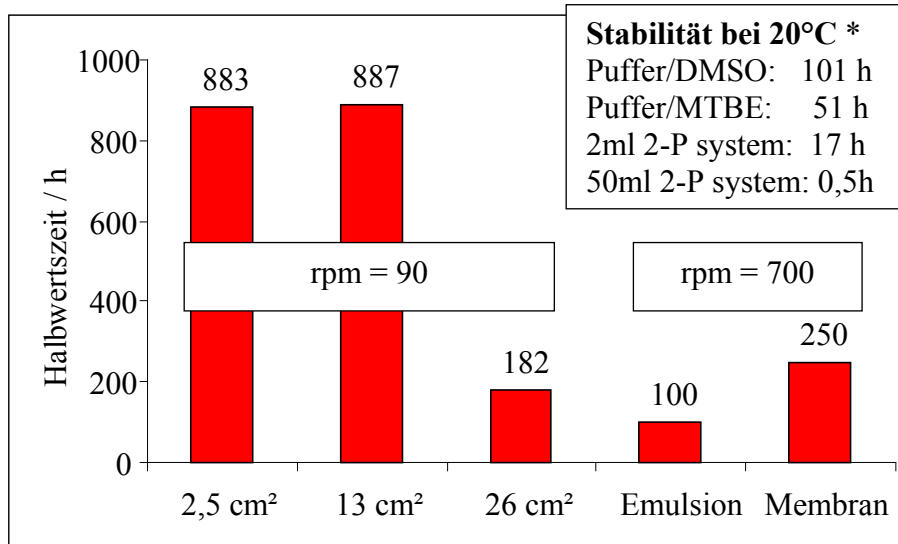


Abbildung 5.30: Halbwertszeit der Benzaldehydlyase in Zwei-Phasensystemen mit verschiedenen Grenzflächen<sup>5</sup>

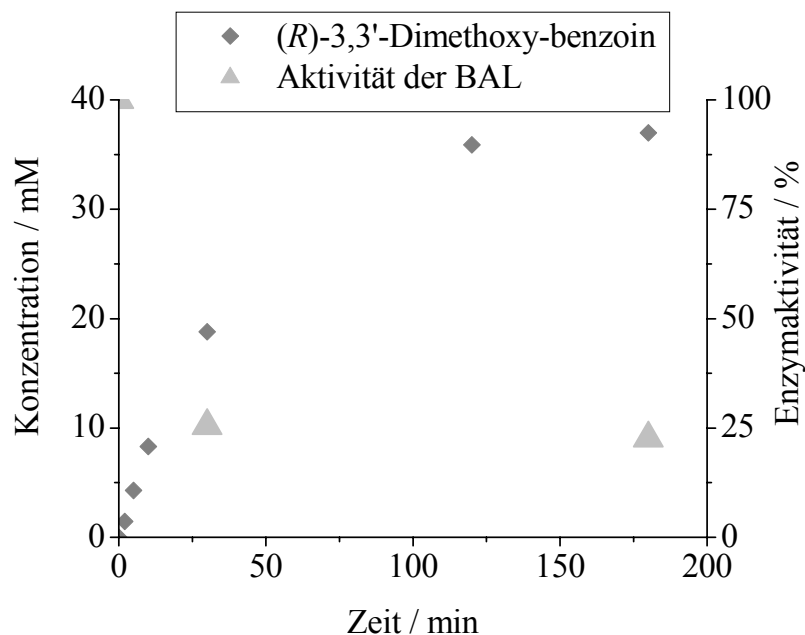
<sup>5</sup> Zum Vergleich Halbwertszeiten früherer Untersuchungen [99] bei 20°C:

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Größe der wässrig-organischen Grenzfläche. Je größer die Phasengrenzfläche ist, desto schneller erfolgt der Aktivitätsverlust. Daher scheidet das Zwei-Phasensystem in Form einer gerührten Emulsion aufgrund der starken Enzyminaktivierung für Anwendungen im größeren Maßstab aus. Durch die Verwendung einer Membran an der Phasengrenzfläche kann die Stabilität der BAL jedoch verbessert werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Benzoinen in der wässrigen Phase ist ein schneller Stofftransport in die organische Phase notwendig. Bei Verwendung einer Membran an der Phasengrenzfläche ist der Stofftransport jedoch reduziert. Daher eignet sich auch das membrangestützte Zwei-Phasensystem aus Puffer und MTBE nicht für die Benzoin synthese. Die Eignung des Zwei-Phasensystems für die Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen wird in Kapitel 5.4.5 untersucht [182].

#### **5.2.4.4 Substrat als zweite Phase**

Ein Zwei-Phasensystem kann auch erzielt werden, indem das Substrat oberhalb der Löslichkeitsgrenze eingesetzt wird und selbst die organische Phase darstellt, wobei zusätzlich MTBE als Cosolvens eingesetzt werden kann.

Der Reaktor wird stark gerührt, wodurch das Substrat und der  $KP_i$ -Puffer eine Emulsion bilden. Dabei wird das Produkt nicht in eine Lösungsmittelphase extrahiert, sondern fällt als Feststoff aus. Ein Nachteil des Arbeitens oberhalb der Löslichkeitsgrenze des Substrats zeigt sich bei der Analytik, da es ist praktisch unmöglich ist, den Substratverlauf während der Reaktion reproduzierbar zu messen. Somit kann nur die Produktbildung analysiert werden (Abbildung 5.31). Aufgrund der fein kristallinen Struktur des (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin verteilt sich die Substanz gleichmäßig im Reaktionsmedium, was reproduzierbares Messen erlaubt.



**Abbildung 5.31: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH = 8, 5Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, V = 15 mL, [E] = 37,66 µg mL<sup>-1</sup>, [3-Methoxybenzaldehyd] = 40 mM

Die Abbildung 5.31 stellt den Reaktionsverlauf dar. Nach drei Stunden liegt die Enzymaktivität bei 25%. Daher ist sie vergleichbar mit den Versuchen, die im homogenen Reaktionsmedium durchgeführt wurden (vgl. Abbildungen 5.21 u. 5.22). Der Reaktionsverlauf zeigt im Vergleich zum Ansatz in Abbildung 5.25 eine schnelle Produktbildung mit einem Umsatz von 92 %.

#### 5.2.4.5 Präparative Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

Zunächst wird die Synthese in einem größeren Maßstab im Satzreaktor durchgeführt. Ziel ist es, Produkt im Gramm-Maßstab zu synthetisieren. Bereits nach zwei Stunden Reaktionszeit wird das thermodynamische Gleichgewicht erreicht und der Reaktor kann gestoppt werden. Am Ende der Reaktion beträgt der Anteil an 3-Methoxybenzaldehyd 10 %. Die Katalysatorausnutzung des Satzreaktors wird durch eine maximale Zyklenzahl (*ttn*) von 25.000 beschrieben. Tabelle 5.9 fasst die Ergebnisse des Experiments zusammen.

**Tabelle 5.9: Ergebnisse des Satzreaktor-Versuches zur Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Parameter	Wert
<i>ttn</i>	25.000
Ausbeute in der Reaktion	4,5 g (90 %)
Isolierte Ausbeute	3,2 g (71 %)
Umsatz	90 %
Volumetrische Produktivität	540 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

Reaktionsbedingungen: 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer, pH = 8, 5 Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 100 mL, 3-Methoxybenzaldehyd: 5 g, BAL = 70 mg

Bei diesem Versuch werden 5 Vol% MTBE als Cosolvens verwendet, die mittels Destillation abgetrennt wurden. Durch Zentrifugieren wird das Produkt abgetrennt. Die isolierte Ausbeute an (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin beträgt 3,2 g (71 %). Das Produkt liegt in einer Reinheit von 97 % (*ee* 99,9 %) vor, wobei die Verunreinigung durch nicht umgesetztes Substrat verursacht wird. In einem weiteren Experiment wird für die Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin eine Volumetrische Produktivität von über 4.000 g pro Liter und Tag erreicht. Dabei reduziert sich jedoch die Katalysatorausnutzung auf eine *ttn* von unter 25.000 (vgl. Abbildung 6.5).

#### 5.2.4.6 Maximale Katalysatorausnutzung

Um die maximale Katalysatorausnutzung zu bestimmen, wird eine präparative Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin im Satzreaktor durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind bis auf die Enzymkonzentration, die um den Faktor 11 niedriger gewählt wird, identisch zu dem Satzreaktor, der im Kapitel 5.2.4.5 gezeigt ist. Die Tabelle 5.10 zeigt die Ergebnisse des Satzreaktors.

**Tabelle 5.10: Ergebnisse des Satzreaktor-Versuches zur Bestimmung der maximalen Katalysatorausnutzung**

Parameter	Wert
<i>ttn</i>	250.100
Ausbeute in der Reaktion	3,63 g (73 %)
Isolierte Ausbeute	2 g (40 %)
Umsatz	73 %
Volumetrische Produktivität	54,5 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

Reaktionsbedingungen: 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer, pH = 8, 5 Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 100 mL, 3-Methoxybenzaldehyd: 5 g, BAL = 6 mg

Da der Umsatz unterhalb des maximalen Umsatzes von 90 % liegt, ist gegen Ende der Reaktion kein Enzym mehr aktiv. Da somit das Enzym vollständig in der Reaktion verbraucht wird, handelt es sich bei der ermittelten maximalen Zyklenzahl um den Höchstwert für die Synthese

von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin. Im Vergleich zum vorherigen Versuch kann die *ttn* um einen Faktor 10 gesteigert werden. Die maximale Zyklenzahl liegt mit einem Wert von 250.100 oberhalb der in der Literatur beschriebenen höchsten Katalysatorausnutzung einer BAL katalysierten Reaktion (vgl. Stillger, 2004, *ttn* = 188.000 für die Synthese von HPP im CSTR, homogenes System).

Die maximale Ausnutzung des Katalysators geht mit verlängerten Reaktionszeiten einher, was die Reaktionszeit erhöht und dadurch die Produktivität senkt. Im Experiment wird für die Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin eine Volumetrische Produktivität von 54,5 g pro Liter und Tag erreicht.

#### 5.2.4.7 Präparative Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Der Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann nicht dargestellt werden, da es nicht möglich ist, reproduzierbar Proben zu entnehmen. Die Substanz ist nicht so fein kristallin wie (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und verteilt sich daher inhomogen im Reaktionsmedium.

Die präparative Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin wird in einem Satzreaktor durchgeführt. Die Reaktorlaufzeit beträgt 14 Stunden, da die Umsetzung des Substrats relativ langsam erfolgt. Tabelle 5.11 zeigt die Ergebnisse des Experiments.

**Tabelle 5.11: Größen des Satzreaktors der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

Parameter	Wert
<i>ttn</i>	16.000
Ausbeute	4,5 g (71 %)
Isolierte Ausbeute	3,7 g (62 %)
Umsatz	95 %
Selektivität	75 %
Volumetrische Produktivität	77 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

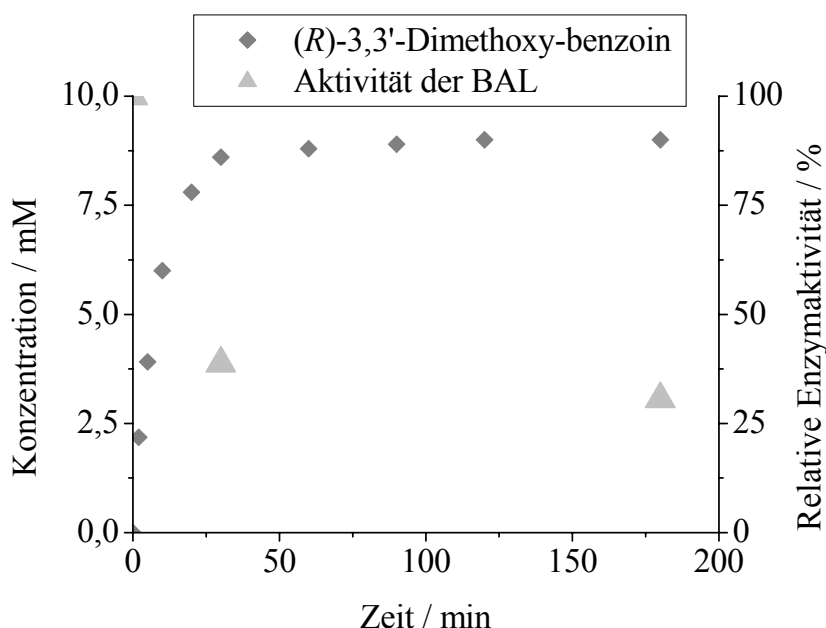
Reaktionsbedingungen: 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer, pH = 8, 5 Vol % MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, V = 100 mL, 3-Methoxybenzaldehyd = 3 g, 2-Chlorbenzaldehyd = 3 g, BAL = 80 mg

Bei einem Umsatz von 95 % stellt sich ein Gleichgewicht ein. Die maximale Zyklenzahl des Versuches liegt bei 16.000. Mit einer Selektivität von 75 % wird (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin gebildet, der Anteil der Nebenprodukte beläuft sich daher auf 15 % (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und 10 % (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin. Nach der Umkristallisation beträgt die Ausbeute an (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin 3,7 g (82 %). Das synthetisierte Produkt wird mit einer Reinheit von 92 % (*ee* 99,9 %) isoliert.

### 5.2.4.8 Synthese ohne Cosolvens

Hauptgrund für den Einsatz von Cosolvens ist die Verbesserung der Substratlöslichkeit im  $\text{KP}_i$ -Puffer. Da die vorherigen Versuche gezeigt haben, dass die Reaktion auch stattfindet, wenn Substrat oberhalb der Löslichkeitsgrenze eingesetzt wird, wird die Synthese von Benzoinderivaten auch in  $\text{KP}_i$ -Puffer ohne Cosolvens untersucht.

Dazu wird der Reaktionsverlauf unter den gleichen Bedingungen, die für die Cosolvensapplizierung gelten (vgl. Kapitel 5.2.2 f), dargestellt. Ist der Reaktionsverlauf vergleichbar, so ist davon auszugehen, dass auf das Cosolvens verzichtet werden kann.



**Abbildung 5.32: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin ohne Cosolvens**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 15 mL, [E] = 37,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , [3-Methoxybenzaldehyd] = 20 mM

Die Abbildung 5.32 stellt den Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dar. Mit einer relativen Enzymaktivität von ca. 35 % nach drei Stunden liegt dieser Wert im gleichen Rahmen wie bei den Ansätzen, die im homogenen Reaktionssystem durchgeführt worden sind. Unter Prozessbedingungen hat die durch das Cosolvens erhöhte Lagerstabilität der BAL keinen Einfluss auf das Reaktionssystem. Aufgrund des Arbeitens oberhalb der Löslichkeitsgrenze ist es nicht möglich, den Substratverlauf darzustellen. Nur die Produktbildung kann quantitativ erfasst werden. Der Reaktionsverlauf ist ähnlich den Ansätzen bei denen Cosolvens verwendet wurde. Binnen 30 min wird das Substrat umgesetzt und die Reaktion erreicht ihr Gleichgewicht. Verzichtet man auf Cosolvens, so verringert man neben der Substrat- auch die Produktlöslichkeit. Das gebildete Produkt fällt bei niedrigeren Konzentrationen aus, wodurch eine größere Produktmenge als im Gleichgewichtszustand gebildet wird. Dadurch dürfte die unter diesen Reaktionsbedingungen erhöhte Lyaseaktivität der BAL im Reaktionsverlauf nicht ins Gewicht fallen.

Der Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann nicht dargestellt werden. (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin verteilt sich nicht gleichmäßig im Reaktionsmedium, wodurch reproduzierbares Proben nehmen verhindert wird.

Die Untersuchungen zeigen, dass man für den Reaktorbetrieb auf das Cosolvens vollständig verzichten kann. Für den Prozess erweist sich dies als vorteilhaft, da die Reaktionsbedingungen noch milder und umweltfreundlicher werden. Darüber hinaus ermöglicht der Verzicht auf ein Cosolvens eine einfachere und weniger arbeitsintensive Produktaufarbeitung (vgl. Kapitel 5.3.2.1).

### 5.2.4.9 Zusammenfassung: Reaktionssystem

Die Untersuchungen zum heterogenen Reaktionssystem zeigen sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Ergebnisse:

- Der Einsatz von MTBE als organische Phase zeigt eine schnell abnehmende Enzymaktivität.
- Die Verwendung von MTBE als Cosolvens anstelle von DMSO ist bei der Produktaufarbeitung vorteilhaft, jedoch kann auf die Verwendung eines Lösungsmittels verzichtet werden (vgl. Kapitel 5.2.4.8).
- Für die präparative Synthese eignet sich ein Zweiphasensystem am besten (ohne organische Lösungsmittel). Die wässrige Phase wird durch  $KP_i$ -Puffer gebildet. Die zugegebene Substratmenge überschreitet die Löslichkeitsgrenze und bildet die organische Phase.
- Durch den Einsatz von Substrat als zweite Phase werden höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht. Die Enzymdesaktivierung in diesem Zwei-Phasen System ist vergleichbar mit einphasigen Reaktionssystemen.

## 5.3 *Reaktorkonzept zur Synthese von Benzoinen*

### 5.3.1 *Synthese von (R)-Benzoin*

Die cosolventfreie Katalyse in vergrößertem Maßstab wird zunächst anhand der Synthese von (*R*)-Benzoin, dem natürlichen Substrat der BAL, untersucht. Das Substrat wird im Reaktionsverlauf zudosiert und der Reaktor wird dabei so geführt, dass das Verhältnis von Reaktionsmedium zu Reaktanden am Versuchsbeginn annähernd 1 : 1 ist. Aufgrund der hohen Konzentrationen ist der Reaktorinhalt bereits bei Versuchsbeginn hoch viskos und inhomogen, weshalb der Reaktionsverlauf nicht analysiert wird.

Nach 6 Stunden wird der Versuch beendet und das Produkt mit einer Nutsche abfiltriert, ein Verfahren, das jedoch nicht die Methode der Wahl ist (vgl. Tabelle 2.3). Deshalb wird die Produktabtrennung und Reaktionsführung in den folgenden Kapiteln optimiert. Die isolierte

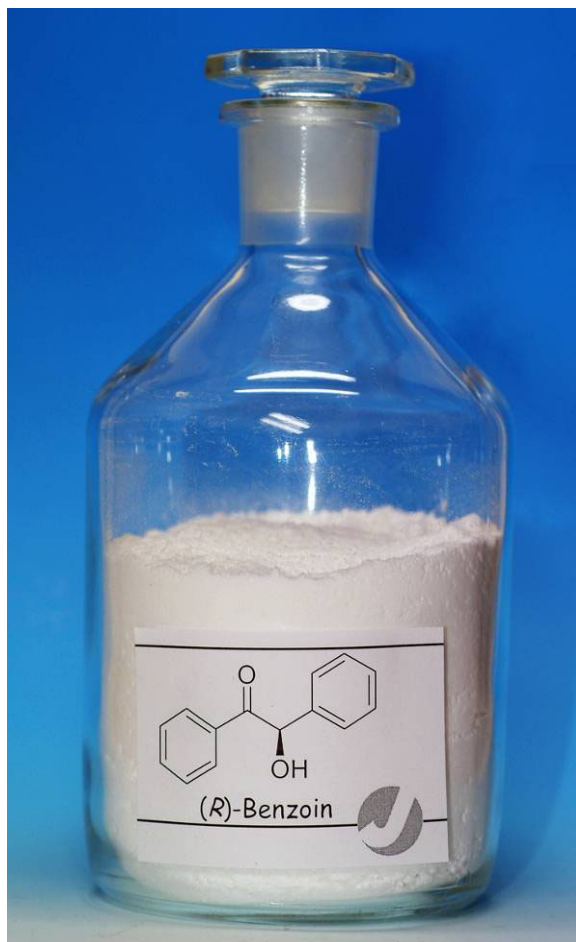


Ausbeute an (*R*)-Benzoin beträgt 90 g (*ee* 99,9 %) mit einer Reinheit von 97 % (Abbildung 5.33).

**Tabelle 5.12: Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von (*R*)-Benzoin**

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>
<i>t<sub>tn</sub></i>	12.000
Isolierte Ausbeute	90 g
Umsatz	97 %
Volumetrische Produktivität	2.000 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

Aufgrund der fehlenden In-Prozess Analytik wird unter der Ausbeute die isolierte Ausbeute verstanden. Durch Verluste bei der Produktaufarbeitung ist damit zu rechnen, dass die tatsächliche Ausbeute der Reaktion höher ist. Auch die anderen Ergebnisse werden mit der isolierten Ausbeute berechnet (Tabelle 5.12). Die Katalysatorausnutzung liegt bei einer maximalen Zyklenzahl von 12.000. Die volumetrische Produktivität des Fed-Batch Reaktors liegt bei 2.000 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.



**Abbildung 5.33: Im Fed-Batch Reaktor synthetisiertes (*R*)-Benzoin**

Reaktionsbedingungen: 100 mL  $KP_1$ -Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $Mg^{2+}$ , T = 20°C,  $V_{ges}$  = 100 mL, Benzaldehyd= 93 g, E = 2300 mg,

## 5.3.2 Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

### 5.3.2.1 Produktaufarbeitung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

Die Wahl des geeigneten Reaktorkonzepts hängt auch vom Produktabtrennungs- und Produktaufarbeitungskonzept ab. Benzoinen sind in wässrigen Lösungen sehr schlecht löslich und fallen somit während der Synthese als Feststoff aus. Für die Produktabtrennung bietet sich das Konzept der Feststoffabtrennung an. Da das gebildete (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin sehr fein kristallin ist und sich bereits während der Synthese in eine ölige und viskose Flüssigkeit umwandelt, empfiehlt sich eine Abtrennung durch Zentrifugation (Abbildung 5.34).

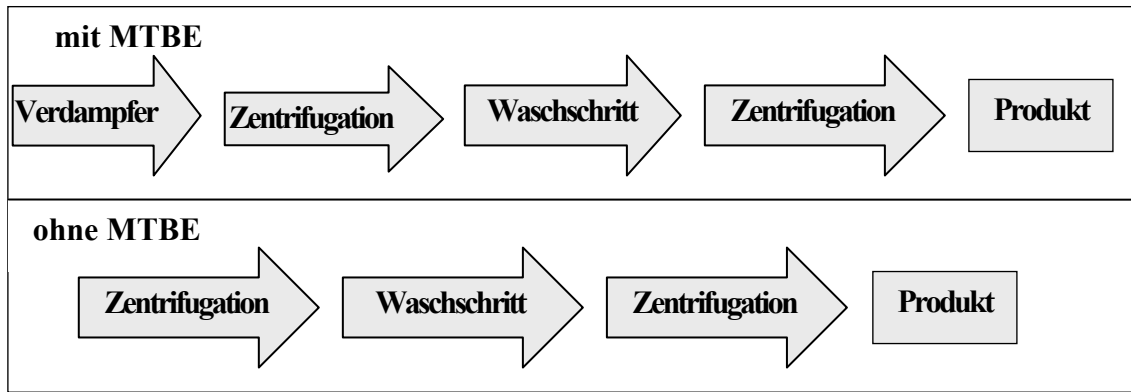


Abbildung 5.34: Aufarbeitungsprotokolle zur Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin mit und ohne MTBE

Mit Hilfe dieses Produktaufarbeitungsprotokolles ist es möglich, (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in einer Reinheit von 97 % zu isolieren (Abbildung 5.37). Für Satzreaktoren, bei denen MTBE als Cosolvens eingesetzt wird, ist noch ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt notwendig. Durch das Vorhandensein des organischen Lösungsmittels MTBE kann nicht direkt nach dem Stoppen des Reaktors zentrifugiert werden. MTBE muss zuerst unter Vakuum entfernt werden.

### 5.3.2.2 Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin im Fed-Batch Reaktor

Um semi-kontinuierliches Arbeiten zu ermöglichen, wird ein Fed-Batch Reaktor mit kontinuierlicher Substratzufuhr und diskontinuierlicher Enzymzufuhr entwickelt. Folgendes Schema veranschaulicht das Reaktorkonzept (Abbildung 5.35):

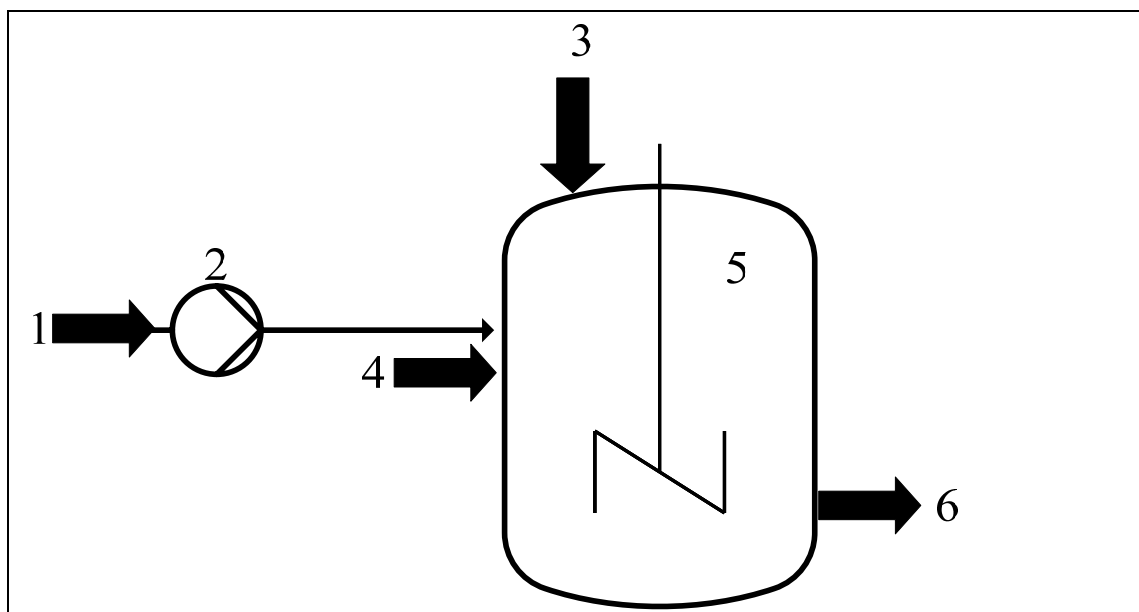
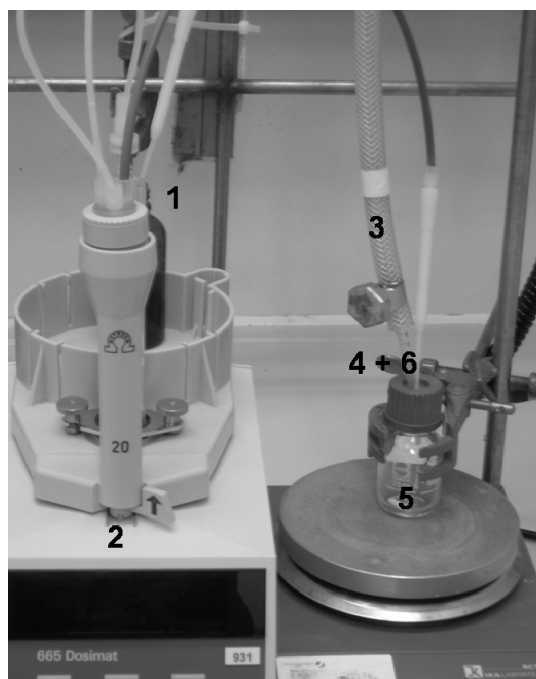


Abbildung 5.35: Schema des Fed-Batch Reaktors

1: Substratzudosierung, 2: Pumpe, 3: Argonzufuhr, 4: Enzymzudosierung, 5: Reaktionsgefäß, 6: Vorrichtung zur Probenahme

Um für eine gute Durchmischung zu sorgen, wird das Reaktionsmedium ständig gerührt (5). Die Argonzufuhr garantiert die sauerstofffreie Reaktionsumgebung (3), sodass die Oxidation von Benzoin zu Benzil verhindert werden kann. Mit Hilfe einer Pumpe wird kontinuierlich Substrat zugeführt (1 + 2). Die Möglichkeit Proben zu nehmen und Enzym nachzudosieren ist gegeben (4 + 5). Folgendes Foto veranschaulicht den Aufbau des Reaktors (Abbildung 5.36):



**Abbildung 5.36: Fed-Batch Reaktor zur Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

1: Substratzudosierung, 2: Pumpe, 3: Argonzufuhr, 4: Enzymzudosierung, 5: Reaktionsgefäß, 6: Vorrichtung zur Probenahme

Die volumetrische Produktivität wird entscheidend durch das Verhältnis von organischer zu wässriger Phase beeinflusst. Ein hoher Anteil an organischer Phase ist wünschenswert, weil dieser zu einer Steigerung der volumetrischen Produktivität führt. Als Startbedingung des Fed-Batch Reaktors wird daher ein Verhältnis von Substrat zu  $\text{KPi}$ -Puffer von 1 : 2 gewählt.

Da die Substratkonzentration der Suspension mit bis zu  $2,8 \text{ M L}^{-1}$  (zum Ende der Reaktion) sehr hoch liegt, ist der Reaktorinhalt viskos und inhomogen. Infolge dessen ist es nicht möglich, den Reaktionsverlauf zu quantifizieren oder die Enzymaktivität reproduzierbar zu messen. Daher muss analog der Synthese von (*R*)-Benzoin (Kapitel 5.3.1) während der Reaktionslaufzeit auf jegliche Analytik verzichtet werden.

Nach fünf Stunden wird der Versuch beendet und das Produkt entsprechend dem Produktaufarbeitungsalgorithmus (vgl. Abbildung 5.34) aufgearbeitet. Die isolierte Ausbeute an (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin beträgt 12 g (*ee* 99,9 %) (Abbildung 5.37). Das Produkt hat eine Reinheit von 97 % (Tabelle 5.13).

**Tabelle 5.13: Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

Parameter	Wert
<i>ttn</i>	35.000
Isolierte Ausbeute	12 g
Umsatz	82 %
Volumetrische Produktivität	2.304 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>

Reaktionsbedingungen: 10 mL KP<sub>r</sub>-Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20°C, V<sub>ges</sub> = 25 mL, 3-Methoxybenzaldehyd = 14,75 g, E = 178 mg, Dosierate – Substrat: 0,023 mL min<sup>-1</sup>

Aufgrund der fehlenden In-Prozess Analytik wird unter der Ausbeute die isolierte Ausbeute verstanden. Durch Verluste bei der Produktaufarbeitung ist damit zu rechnen, dass die tatsächliche Ausbeute der Reaktion höher ist. Auch die anderen Ergebnisse werden mit der isolierten Ausbeute berechnet (vgl. Tabelle 5.13). Die Katalysatorausnutzung liegt bei einer maximalen Zyklenzahl von 35.000. Die volumetrische Produktivität des Fed-Batch Reaktors liegt bei 2300 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

**Abbildung 5.37: Im Fed-Batch Reaktor synthetisiertes (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin**

### 5.3.2.3 Zusammenfassung (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

- Zur Produktabtrennung eignet sich die Zentrifugation. Das isolierte Produkt liegt in einer Reinheit von 97 % vor.
- Sowohl der Satzreaktor, als auch der Fed-Batch Reaktor mit kontinuierlicher Substratzudosierung, stellen ein geeignetes Reaktorkonzept zur Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin dar.
- Im Satzreaktor zeigt die BAL eine maximale Zyklenzahl von 250 100 für die Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin.
- Im Fed-Batch Reaktor kann für die Synthese von (R)-3,3'-Dimethoxy-benzoin eine volumetrische Produktivität von 2 300 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bei einer *ttn* von 35.000 erreicht werden.

- Aus dem Fed-Batch Reaktor konnten 12 g (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in einer Reinheit von 97 % isoliert werden (*ee* 99,9 %).

### 5.3.3 Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

#### 5.3.3.1 Produktaufarbeitung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

(*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ist nur gering löslich, zeigt keine Ölbildung und fällt somit als Feststoff aus. Daher bietet sich die Filtration mittels Glassinternutschen zur Produktabtrennung an (vgl. Kapitel 5.3.1). Eine Alternative dazu stellt die Filterkerze dar (Abbildung 5.38).

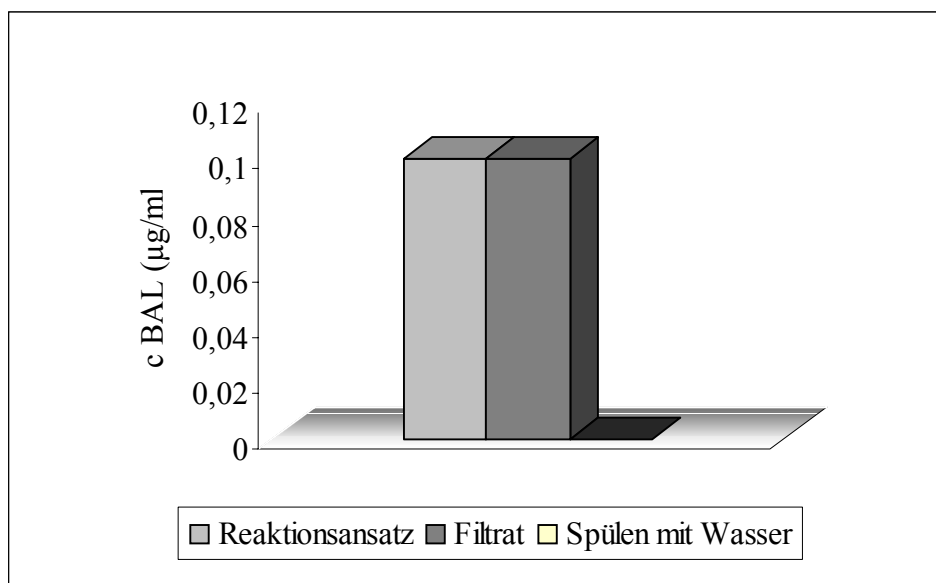


Abbildung 5.38: Schematische Darstellung einer Filterkerze <sup>6</sup>

Ähnlich einer Glassinternutsche besteht der untere Teil der Filterkerze aus porösem Material, in welchem der gebildete Feststoff zurückgehalten wird. Da die Filterkerze als Modul im Fed-Batch Reaktor zum Einsatz kommt, wird der Enzymverbleib während der Filtration überprüft. Es wäre von Nachteil, wenn die BAL in der Filterkerze (auf den Produktkristallen) zurückgehalten würde.

---

<sup>6</sup> Abbildung von Robu (<http://www.robuglas.com/de/produkttekmr2.htm>)

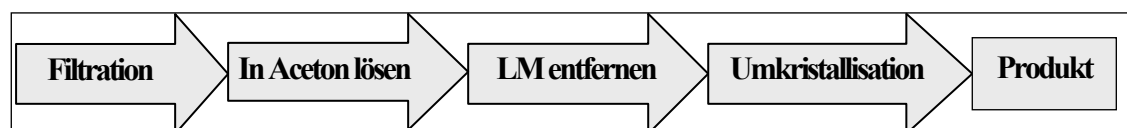


**Abbildung 5.39: Enzymverbleib während der Filtration**

Reaktionsbedingungen: 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer, pH = 8, 5 Vol% MTBE, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, V = 3 mL, [E] = 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, [3-Methoxybenzaldehyd] = 20 mM, [2-Chlorbenzaldehyd] = 20 mM; Filterkerze Porung 2 (40-100µm)

Die Abbildung 5.39 zeigt, dass die BAL nicht in der Filterkerze verbleibt, sondern vollständig im Filtrat gelöst ist.

Wie in Kapitel 5.1.2.2 gezeigt werden konnte, beträgt die Chemospezifität dieser Synthese rund 76 %. Zu 14 % bildet sich (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und zu 10 % (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin. Daher muss das Rohprodukt noch weiter aufgereinigt werden. Nach der Filtration wird das Produkt mit Aceton aus dem Filtersubstrat gelöst und einrotiert. Durch diesen Schritt werden Produktverluste im Filter vermieden und die in Aceton unlöslichen Proteinreste des Enzyms abgetrennt. In der Literatur wird gezeigt, dass Benzoin in einem Hexan-Diethylethergemisch umkristallisiert werden kann [182]. Diese Aufarbeitungsmethode eignet sich auch für (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin (Abbildung 5.40). Dabei gelingt die Abtrennung der Nebenprodukte. (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin liegt nach dem Umkristallisieren in einer Reinheit von 97 % vor, die 3 % Verunreinigung bestehen aus (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin.

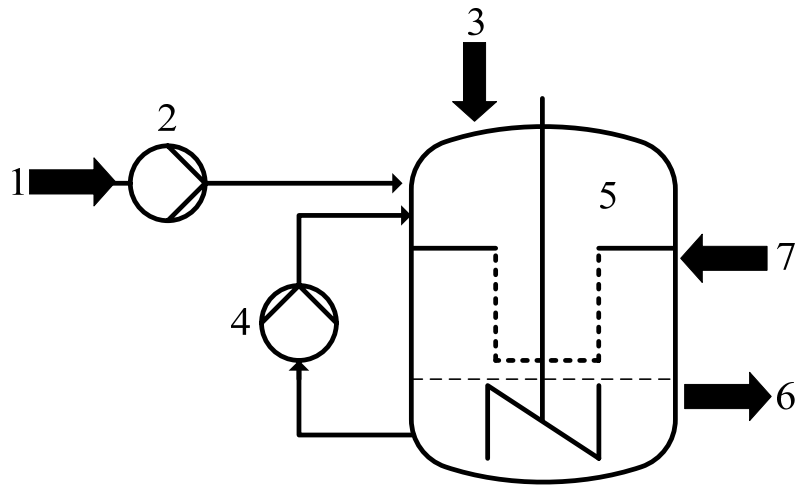


**Abbildung 5.40: Produktaufarbeitungsalgorithmus zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

### 5.3.3.2 Fed-Batch Reaktor zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Da die Produktauftrennung anders als bei der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin, durch Filtration erfolgt, sind Unterschiede im Reaktorkonzept vorhanden. Im folgenden Schema

(Abbildung 5.41) wird das Reaktorkonzept zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin veranschaulicht:



**Abbildung 5.41: Schema des Fed-Batch Reaktors zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

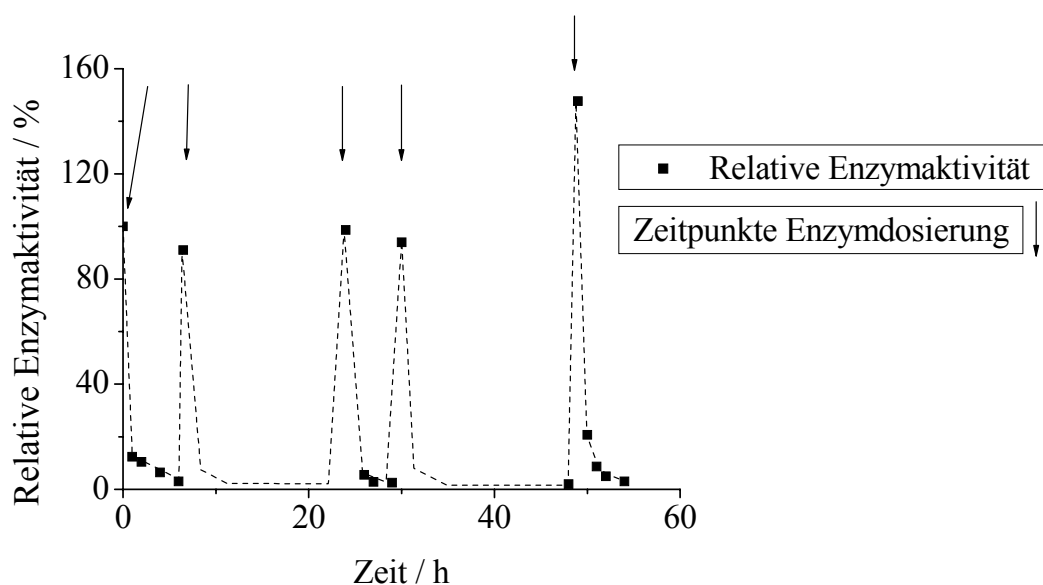
1: Substratzudosierung, 2: Pumpe zur kontinuierlichen Substratzudosierung, 3: Argonzufuhr, 4: Schlauchpumpe, 5: Reaktionsgefäß mit Filterkerzeneinheit, 6: Enzymzudosierung, 7: Vorrichtung zur Probeentnahme

Mit einer Pumpe wird kontinuierlich Substrat zugeführt (1 + 2). Eine Argonzufuhr erlaubt, die Reaktion unter Sauerstoffausschluss durchzuführen (3). Es sind Zugänge für die Probenahme, sowie für die Enzymnachdosierung vorhanden (6 + 7). Ein wichtiges Element des Reaktorkonzepts ist die Filterkerze (5), das Modul zur Feststoffabtrennung. Das gebildete Benzoin wird dadurch vom Reaktionsmedium abgetrennt. Das Auffanggefäß, welches die Filterkerze ummantelt, dient zugleich als Reaktionsgefäß (5). Mit einer Schlauchpumpe wird die Reaktionslösung aus dem Reaktionsgefäß über die Filterkerze gepumpt (4). Während das Produkt dort zurückgehalten wird, passieren das Reaktionsmedium und das Enzym die Filterkerze.

### 5.3.3.3 Betrieb des Fed-Batch Reaktors

Die Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin kann im Fed-Batch Reaktor erfolgreich durchgeführt werden. Da die Probennahme aufgrund des Arbeitens oberhalb der Substratlöslichkeitsgrenze in der Suspension nicht möglich ist, wird der Reaktionsverlauf nicht dargestellt. Die Messung der Enzymaktivität ist möglich und wird in Abbildung 5.42 dargestellt.





**Abbildung 5.42: Enzymaktivität während des Reaktorbetriebs**

Reaktionsbedingungen: 180 mL  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $V_{\text{ges}} = 300$  mL,  $T = 20$  °C, 3-Methoxybenzaldehyd = 15 g, 2-Chlorbenzaldehyd = 15 g, Dosierung BAL: 0h: 73mg, 7h: 66mg, 24h: 70, 30h: 68mg, 49h: 107;  $E_{\text{ges}} = 384$  mg, Dosierrate – Substrat:  $0,0076$  mL  $\text{min}^{-1}$

Zur Veranschaulichung sind die experimentellen Daten mit einer Hilfslinie verbunden

Insgesamt wird während des Reaktorlaufs vier Mal Enzym nachdosiert. Jedes Mal nimmt die Aktivität der BAL binnen kurzer Zeit ab. So sind bereits nach einer Stunde nur noch 15 % des ursprünglich eingesetzten Enzyms aktiv. Dies liegt vermutlich an der hohen Substratkonzentration, die im Reaktor vorliegt. Dem Reaktor wird zwar kontinuierlich Substrat zugeführt, doch da kaum noch Enzym aktiv ist, kann das Substrat nicht umgesetzt werden. Daher kommt es zu relativ langen Totzeiten. Durch eine höhere Enzymkonzentration könnte man die volumetrische Produktivität erhöhen. Tabelle 5.14 zeigt die Ergebnisse der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin im Fed-Batch Reaktor.

**Tabelle 5.14: Ergebnisse des Fed-Batch Reaktors zur Darstellung von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin**

Parameter	Wert
<i>t<sub>tn</sub></i>	28.000
Ausbeute	19,5 g
Umsatz	86 %
Selektivität	78 %
Volumetrische Produktivität	$27,3$ g $\text{L}^{-1}$ $\text{d}^{-1}$

Reaktionsbedingungen: 180 mL  $\text{KP}_i$ -Puffer, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $V_{\text{ges}} = 300$  mL,  $T = 20$  °C, 3-Methoxybenzaldehyd = 15 g, 2-Chlorbenzaldehyd = 15 g,  $E_{\text{ges}} = 384$  mg, Dosierrate – Substrat:  $0,076$  mL  $\text{min}^{-1}$

Da es nicht möglich ist, die Substrat- bzw. Produktkonzentration reproduzierbar zu bestimmen, wird die isolierte Ausbeute zur Berechnung der reaktionstechnischen Parameter herangezogen (Tabelle 5.14). Die volumetrische Produktivität über den gesamten Reaktorlauf ist mit einem Wert von  $27 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  relativ gering. Dies liegt an den relativ langen Totzeiten des Reaktors, in denen kaum Enzym aktiv ist. Innerhalb des Zeitraumes von 49 - 54 h wird versucht, durch höhere Enzymkonzentrationen mehr Substrat binnen kürzerer Zeit umzusetzen. Die volumetrische Produktivität innerhalb dieses Zeitraumes beträgt  $79 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , also fast das Dreifache des Wertes der Gesamtlaufzeit.

Nach 54 h wird der Reaktor gestoppt und das Produkt aufgearbeitet. Das Rohprodukt beinhaltet 75 % (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin, der Anteil der Nebenprodukte (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin beträgt 12 % und 9 % für das (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin. 4 % Substrat werden nicht umgesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mittels Umkristallisation (vgl. Kapitel 4.2.4.5) wobei 19,5 g aufgereinigtes (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin aus dem Reaktor isoliert werden können. Die Reinheit liegt bei 97 % (*ee* 99,9 %), wodurch die Reinheit im Vergleich zum isolierten Produkt aus dem Satzreaktor sogar noch gesteigert werden kann. Die 3 % Verunreinigung werden durch (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin verursacht.

### 5.3.3.4 Zusammenfassung: Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

- Mit der Filterkerze kann das Produkt vom Reaktionsmedium abgetrennt werden. Der Anteil der Nebenprodukte wird durch Umkristallisation in einem Hexan-Diethylethergemisch reduziert. (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin liegt nach dem Umkristallisieren in einer Reinheit von 97 % vor.
- Sowohl der Satzreaktor als auch der Fed-Batch Reaktor stellen geeignete Konzepte zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin dar. Die Verwendung des Fed-Batch Reaktors zeigt jedoch Vorteile wie eine höhere Katalysatorausnutzung, (Fed-Batch Reaktor:  $ttn = 28.000$ ; Satzreaktor:  $ttn = 16.000$ ) und ist aufgrund des semi-kontinuierlichen Betriebs weniger arbeits- und zeitintensiv.
- Aus dem Satzreaktor werden 3,7 g (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin mit einer Reinheit von 92 % (*ee* 99,9 %) isoliert.
- Im Fed-Batch Reaktor wird eine  $ttn$  von 28.000 erreicht. Die volumetrische Produktivität liegt bei  $27 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Im Zeitraum von 49 - 54 h kann die volumetrische Produktivität auf fast das Dreifache gesteigert werden. Aus dem Reaktor werden 19,5 g (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in einer Reinheit von 97 % (*ee* 99,9 %) isoliert.

## 5.4 Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen

### 5.4.1 Auswahl der Reaktionen

Für die Untersuchungen zur Entwicklung eines Reaktorkonzepts zur Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonderivaten werden die Abbildung 2.6 gezeigten Reaktionen ausgewählt.

### 5.4.2 Synthese der Substrate und Analytik

#### 5.4.2.1 Substratsynthesen

Die für die Experimente erforderlichen Substanzen müssen teilweise synthetisiert werden. So werden bei der BAL-katalysierten Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanon-derivaten, ausgehend vom aromatischen und aliphatischen Aldehyd, stets die symmetrischen Kopplungsprodukte der aromatischen Aldehyde (Benzoine) gebildet und gehen in die HPP-Bildung ein. Deshalb werden zur Charakterisierung der Synthesen der HPP-Derivate, die Benzoinderivate (*R*)-3,3'-di-Chlor-Benzoin und (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin, entsprechend der Synthesevorschrift in Kapitel 4.2.2 durchgeführt.

Das für die Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP mit der Benzaldehydlyase verwendete Methoxyacetaldehyd [40] kann aus der sauren Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan erhalten (Abbildung 5.43) und ohne Aufarbeitung eingesetzt werden [39].

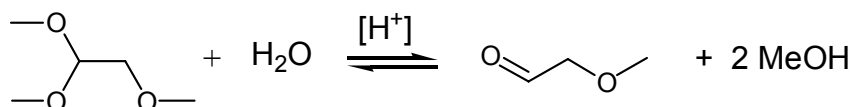


Abbildung 5.43: Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan

Nach einer Stunde wird ein Umsatz von 60 Prozent erreicht. In der Reaktionslösung liegen jedoch neben Methoxyacetaldehyd auch nicht umgesetztes Substrat und zwei Äquivalente Methanol vor, da sich ein Gleichgewicht einstellt. Methanol verringert jedoch die Stabilität der BAL, wie in 5.77 gezeigt. Es wird deshalb untersucht, ob sich Methoxyacetaldehyd nach der Hydrolyse aus der Reaktionslösung isolieren lässt.

Durch Destillation und Extraktion des Reaktionsgemisches können lediglich Gemische aus Methoxyacetaldehyd, Methanol und Spuren von Wasser erhalten werden. Eine Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion zur Produktseite gelingt durch kontinuierliches Entfernen von Methanol im Unterdruck. Dadurch ist eine deutliche Verringerung der Methanolkonzentration, jedoch keine Isolierung des Produkts möglich.

#### Methoxyacetaldehyd aus Periodatspaltung von Glycerinmethylether

Alternativ kann Methoxyacetaldehyd durch Spaltung des Methylethers von Glycerin mit Kaliumperiodat erhalten werden [63].

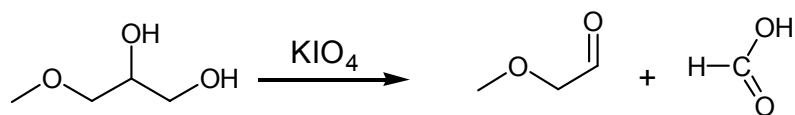


Abbildung 5.44: Periodatspaltung von Glycerinmethylether

Die in der Literatur beschriebene destillative Aufreinigung des Produkts führt unter Vakuum nicht zum Ziel, jedoch kann Methoxyacetaldehyd durch Extraktion mit Diethylether isoliert werden.

Methoxyacetaldehyd ist nicht nur hitzelabil, sondern auch in organischen Lösungsmitteln instabil. Die Verluste in Lösungsmitteln sind dabei geringer als durch Temperatureinwirkung, wie beispielsweise bei der Destillation. Durch den niedrigen Siedepunkt von Diethylether wird eine schonende Entfernung des Lösungsmittels ermöglicht. Der sehr ungünstige Verteilungskoeffizient von Methoxyacetaldehyd zwischen Ether und Wasser erforderte den Einsatz eines kontinuierlichen Extraktors. Wie Abbildung 5.45 zeigt, wird dabei die wässrige Phase im linken Kolben kontinuierlich von Ether durchströmt.

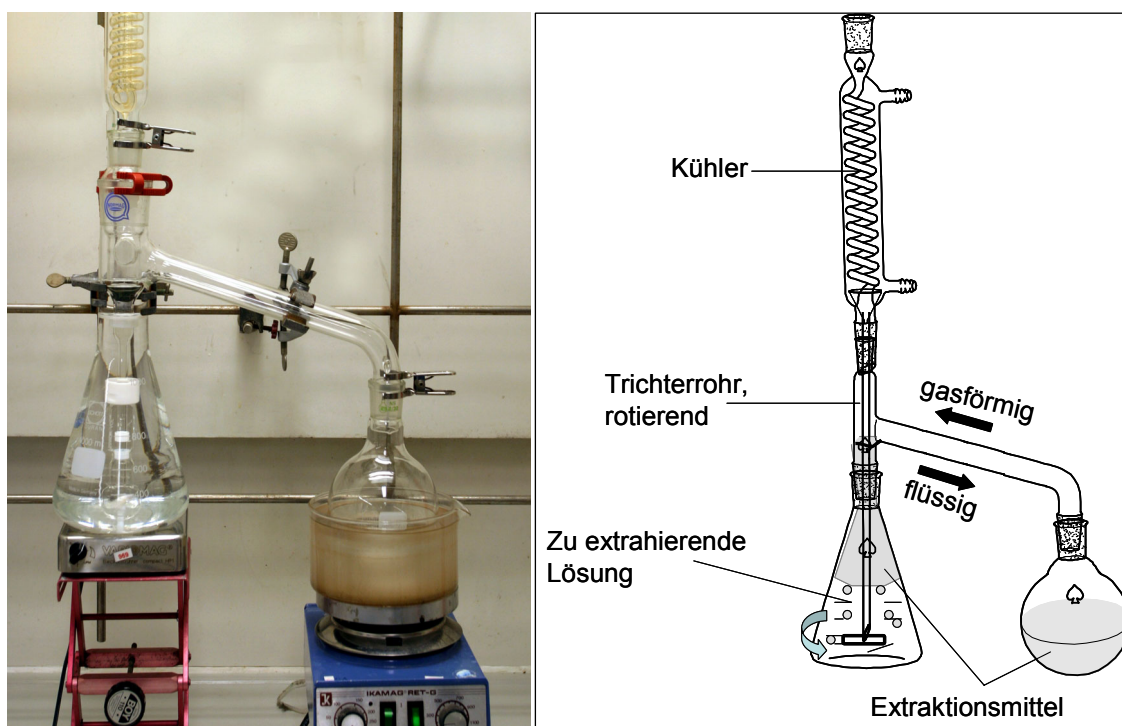


Abbildung 5.45: Kontinuierliche Extraktionsanlage

Methoxyacetaldehyd ist in Reinsubstanz eine farblose, luftempfindliche und viskose Flüssigkeit, die innerhalb von Stunden zu einem weißen Feststoff polymerisiert. Deshalb wird es in konzentrierter Lösung im später verwendeten Puffergemisch aus  $\text{KP}_i$ -Puffer pH = 8 mit 30 Volumenprozent Dimethylsulfoxid (DMSO) bei vier Grad Celsius gelagert. Dabei kann in einer halbmolaren Lösung auch nach einigen Tagen keine Zersetzung beobachtet werden. Mit dem isolierten Methoxyacetaldehyd ist es möglich, für die Analytik eine HPLC-Methode zu entwickeln (Kapitel 5.4.2.2).

Für den Einsatz im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor werden größere Mengen an Methoxyacetaldehyd benötigt, als sich auf diese Art gewinnen lassen. Dafür wird die Reaktionslösung von Iodat-Ionen befreit und mit Diethylether gewaschen und bei einem Druck von etwa 30 mbar über eine kurze Brücke destilliert. Auf diese Weise können etwa fünfzig Prozent Ausbeute erzielt werden. Die Entstehung von weißem, amorphem Feststoff in der Vorlage während der Destillation deutet auf eine teilweise Zersetzung des Methoxyacetaldehyds hin. Das Destillat (wässrige Lösung von Methoxyacetaldehyd) bleibt dabei frei von Verunreinigungen.

### 5.4.2.2 Analytik

#### Derivatisierung von aliphatischen Aldehyden

Die in dieser Arbeit verwendeten aliphatischen Aldehyde sind sehr flüchtig. Deshalb wird eine Derivatisierungsmethode entwickelt, mit der diese Aldehyde mittels HPLC-Analytik quantifiziert werden können.

Aus unterschiedlichen Methoden [173, 202] wird die Derivatisierung mit 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion (Dimedon) [46, 127] ausgewählt (vgl. Kapitel 4.2.1). Abbildung 5.46 zeigt die Umsetzung des Aldehyds mit zwei Äquivalenten Dimedon und Ammoniumacetat unter Abspaltung von Essigsäure und drei Äquivalenten Wasser:

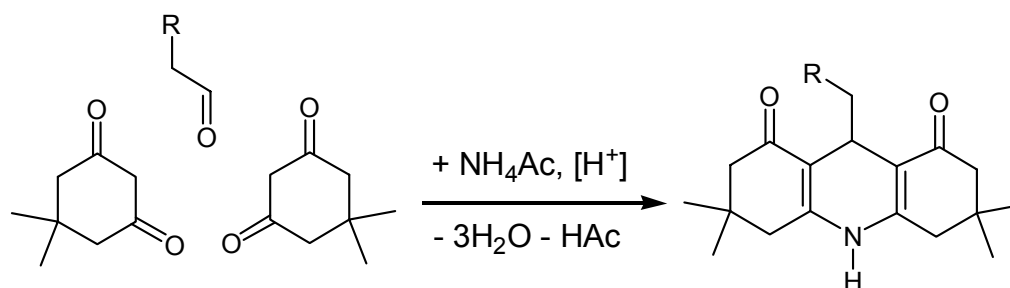


Abbildung 5.46: Derivatisierung von Aldehyden mit Dimedon

Das Absorptionsmaximum der derivatisierten Aldehyde liegt bei  $\lambda = 385 \text{ nm}$ , einer Wellenlänge, bei der keine andere verwendete Verbindung absorbiert. Auch die aromatischen Aldehyde, die ebenfalls teilweise derivatisiert werden, stören die Bestimmung nicht, da ihre Derivate andere Retentionszeiten aufweisen.

### 5.4.3 Kinetik

In diesem Kapitel sollen die kinetischen Parameter der durch die BAL katalysierten Synthese von HPP-Derivaten untersucht werden. Dabei werden die Substratkonzentrationen über den gesamten Löslichkeitsbereich variiert und die entsprechenden Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Die Gesamtreaktion der HPP-Bildung kann in vier Teilreaktionen unterschieden werden, deren kinetische Parameter untersucht werden sollen (vgl. Abbildung 2.18):

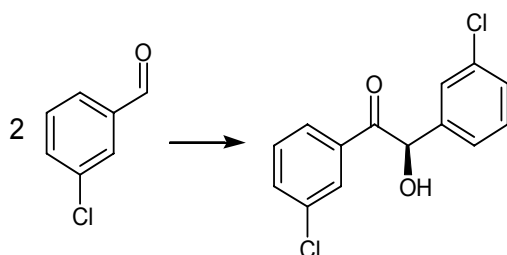
- Bildung des Benzoins aus dem Benzaldehydderivat (Reaktion 1)
- Spaltung des Benzoins zum Benzaldehydderivat (Reaktion 2)
- Bildung des HPPs aus Benzoin und aliphatischen Aldehyd (Reaktion 3)
- Bildung des HPPs aus aromatischem und aliphatischen Aldehyd (Reaktion 4)

Anhand der kinetischen Parameter wird ein Modell entwickelt (vgl. Kapitel 2.3.1), das die Gesamtreaktion beschreibt. Zur Überprüfung dieses Modells sollen anschließend die Konzentrationsverläufe im Satzreaktor gemessen und mit den simulierten Werten verglichen werden.

#### 5.4.3.1 Kinetik der Bildung von (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-hydroxypropanon

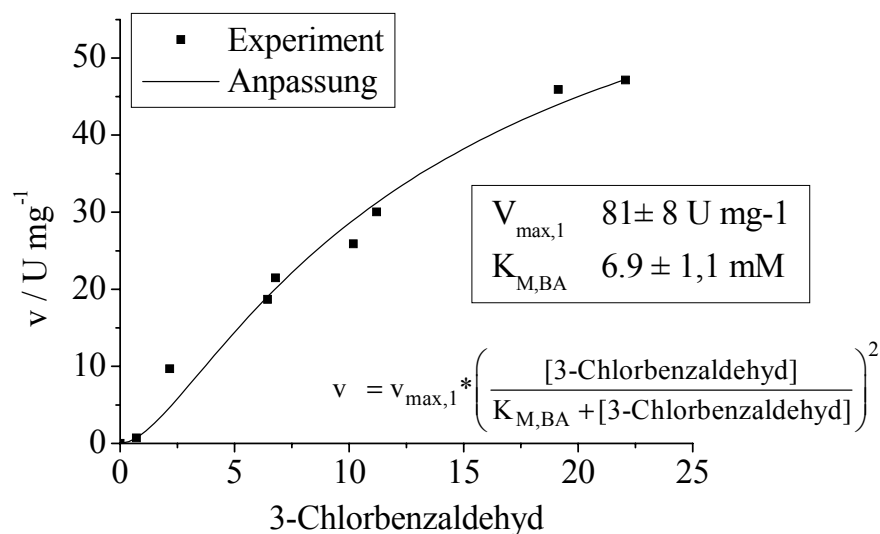
Entsprechend der Abbildung 2.18 werden in diesem Kapitel die Teilreaktionen der Synthese von (*R*)-3-Chlor-HPP durch die BAL untersucht. Da die kinetischen Parameter der Synthese von (*R*)-3,3'-di-Chlor-Benzoin noch nicht bestimmt sind, werden diese zuerst bestimmt.

#### Bildung von (*R*)-3,3'-di-Chlor-Benzoin aus 3-Chlorbenzaldehyd



Die Bildungsgeschwindigkeiten von (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin aus 3-Chlorbenzaldehyd werden bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 25 mM bestimmt. Dabei kann der Beginn eines Sättigungseffekts beobachtet werden, sodass die Beschreibung durch das Modell von Michaelis und Menten erfolgen kann. Eine präzisere Bestimmung der Parameter würde die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Konzentrationen erfordern, die durch die maximale Löslichkeit von etwa 25 mM 3-Chlorbenzaldehyd im verwendeten Reaktionsmedium nicht möglich sind.

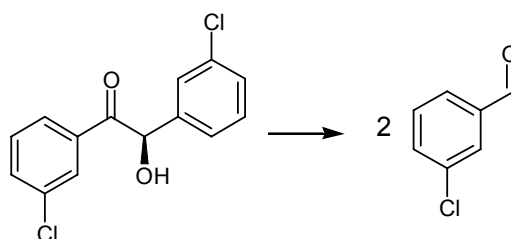
Die kinetischen Parameter der Benzoinkupplung sind in Abbildung 5.47 gezeigt.



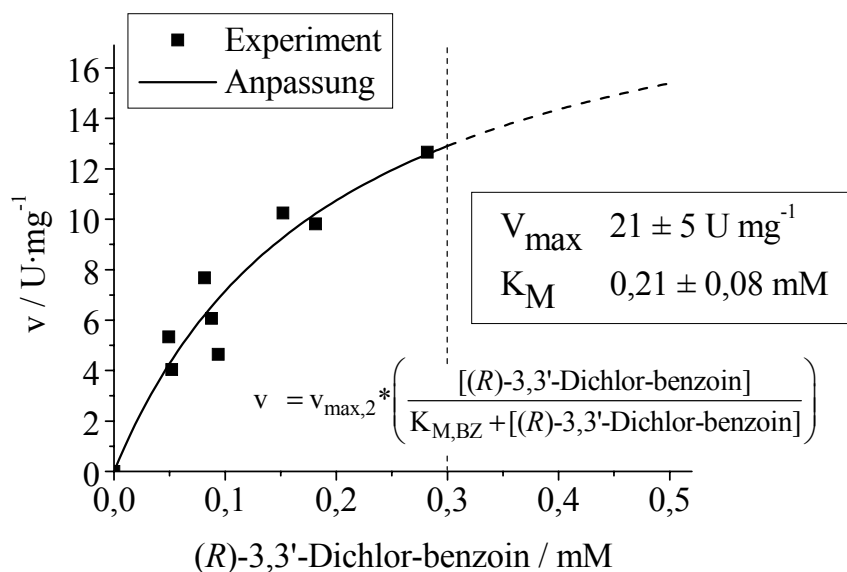
**Abbildung 5.47: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin aus 3-Chlorbenzaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 25 mM <sub>3</sub>-Chlorbenzaldehyd, V = 3 mL, [E] = 4,7 μg mL<sup>-1</sup> Bei 25 mM ist die Löslichkeitsgrenze angedeutet.

### Spaltung (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin zu 3-Chlorbenzaldehyd



Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Benzoinspaltung erfolgt im Rahmen der Löslichkeit von (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin im verwendeten Puffergemisch (0,3 mM). Wie in Abbildung 5.48 dargestellt, kann im untersuchten Konzentrationsbereich ein Sättigungseffekt beobachtet werden, der die Angabe kinetischer Parameter ermöglicht.

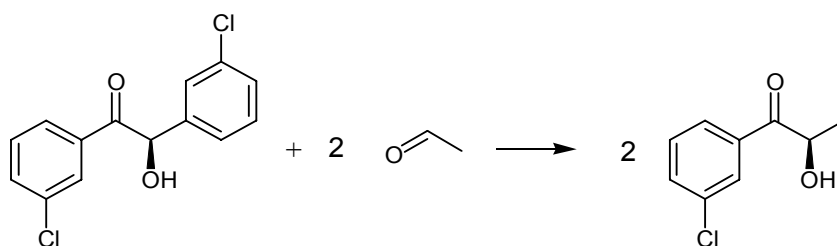


**Abbildung 5.48: Bildungsgeschwindigkeit von 3-Chlorbenzaldehyd aus (R)-3,3'-Dichlor-benzoin**

Reaktionsbedingungen: 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0,3 mM 3-Cl-BZ, V = 3 mL, [E] = 1,2 μg mL<sup>-1</sup>

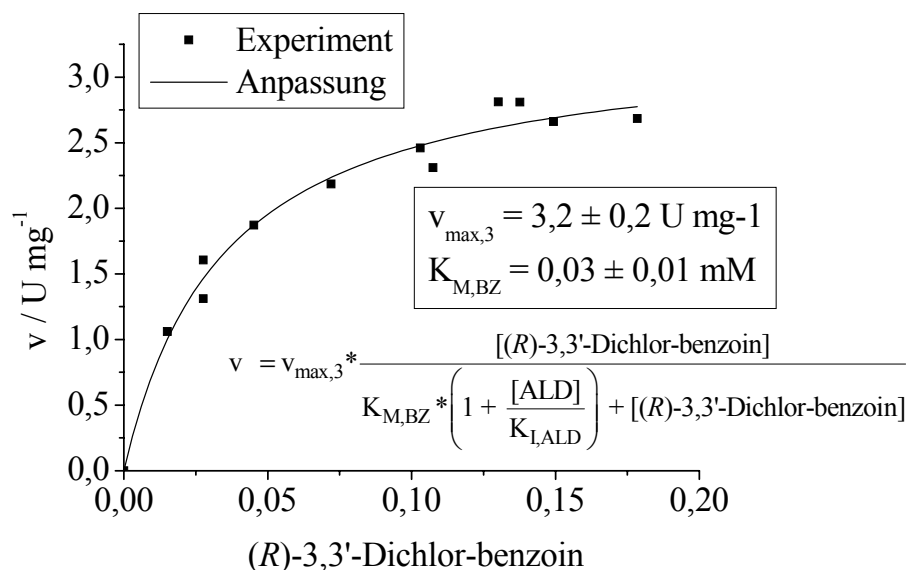
Bei 0,3 mM ist die Löslichkeitsgrenze angedeutet.

**Bildung von (R)-3-Chlor-HPP aus (R)-3,3'-Dichlor-benzoin und Acetaldehyd (Abbildung 2.18 Reaktion 3)**



Bei der Umsetzung von (R)-3,3'-Dichlor-benzoin mit Acetaldehyd zu (R)-3-Chlor-HPP kann bereits im Löslichkeitsbereich von (R)-3,3'-Dichlor-benzoin im verwendeten Puffergemisch (0,3 mM) ein Sättigungseffekt beobachtet werden (Abbildung 5.49).



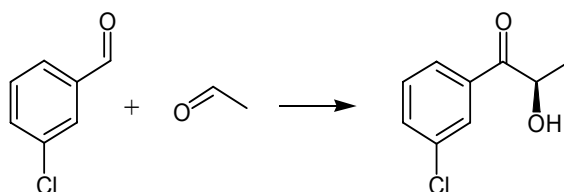


**Abbildung 5.49: Bildungsgeschwindigkeit von (R)-3-Chlor-HPP aus (R)-3,3'-Dichlor-benzoin und Acetaldehyd**

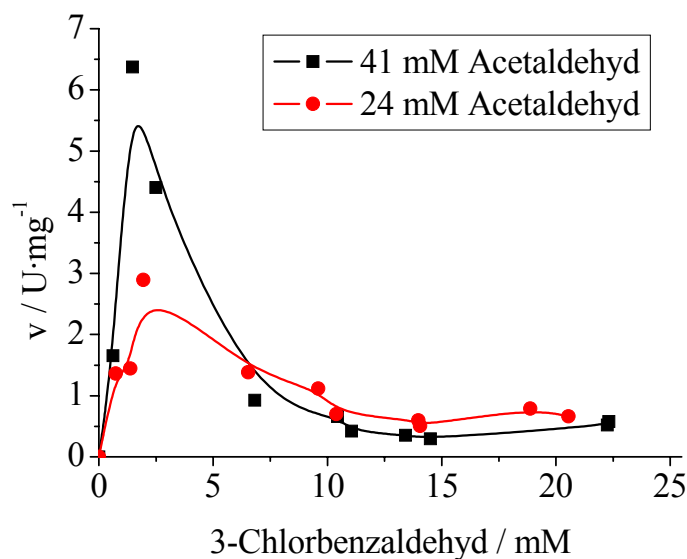
Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP,

0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0,3 mM, (R)-3,3'-Dichlor-benzoin, V = 3 mL; 85 mM Acetaldehyd, [E] = 2,0 µg mL<sup>-1</sup>; Bei 0,3 mM ist die Löslichkeitsgrenze angedeutet.

**Bildung von (R)-3-Chlor-HPP aus 3-Chlorbenzaldehyd und Acetaldehyd (Abbildung 2.18 Reaktion 4)**



Die erste Möglichkeit zur Bildung von (R)-3-Chlor-HPP ist die direkte Bildung aus den Substraten 3-Chlorbenzaldehyd und Acetaldehyd. In zwei parallelen Experimenten werden bei zwei konstanten Acetaldehyd-Konzentrationen (24 mM und 41 mM) die Konzentrationen des zweiten Substrats 3-Chlorbenzaldehyd variiert und die entsprechenden Anfangs-Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Für geringe Substratkonzentrationen wird dabei eine deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit gemessen als für Konzentrationen ab 5 mM 3-Chlorbenzaldehyd, oberhalb der die Geschwindigkeit etwa gleich bleibt. Abbildung 5.50 verdeutlicht dies:



**Abbildung 5.50: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3-Chlor-HPP aus 3-Chlorbenzaldehyd und Acetaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 25 mM 3-Chlorbenzaldehyd, V = 3 mL; a) 24 mM Acetaldehyd, [E] = 5,0 µg mL<sup>-1</sup>; b) 41 mM Acetaldehyd, [E] = 5,0 µg mL<sup>-1</sup>; Die Messpunkte sind durch Hilfslinien verbunden.

Diese Enzymaktivitäten können nicht mit einem plausiblen kinetischen Modell erklärt werden. Bei Substratkonzentrationen oberhalb von 5 mM kommt es während der kinetischen Messungen (30 min) nur zu einem teilweisen Umsatz des 3-Chlorbenzaldehyds zu (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin durch die bevorzugt katalysierte Benzoinkupplung. Somit läuft die untergeordnete Weiterreaktion zu (*R*)-3-Chlor-HPP immer nur mit geringer Geschwindigkeit ab. Bei niedrigen Konzentrationen wird hingegen die geringe vorliegende Stoffmenge an 3-Chlorbenzaldehyd so schnell zu (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin umgesetzt, dass anschließend die Bildung von (*R*)-3-Chlor-HPP aus (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin die dominierende Reaktion wird (vgl. Abbildung 2.18). Daher liegen die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten bei niedrigen Substratkonzentrationen deutlich höher.

#### 5.4.3.2 Kinetik der Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon

Ziel dieses Kapitels ist die Charakterisierung der Teilreaktionen, die bei der Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP auftreten können (Abbildung 2.18) und die Bestimmung der kinetischen Parameter.

### Bildung von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin aus 4-Methoxy-Benzaldehyd

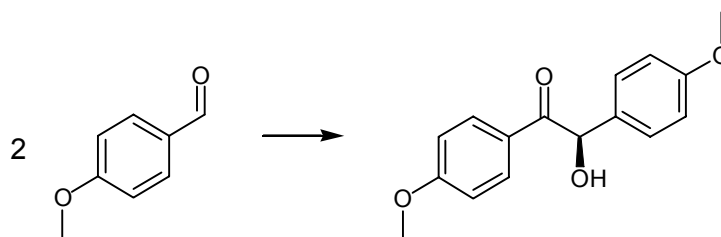
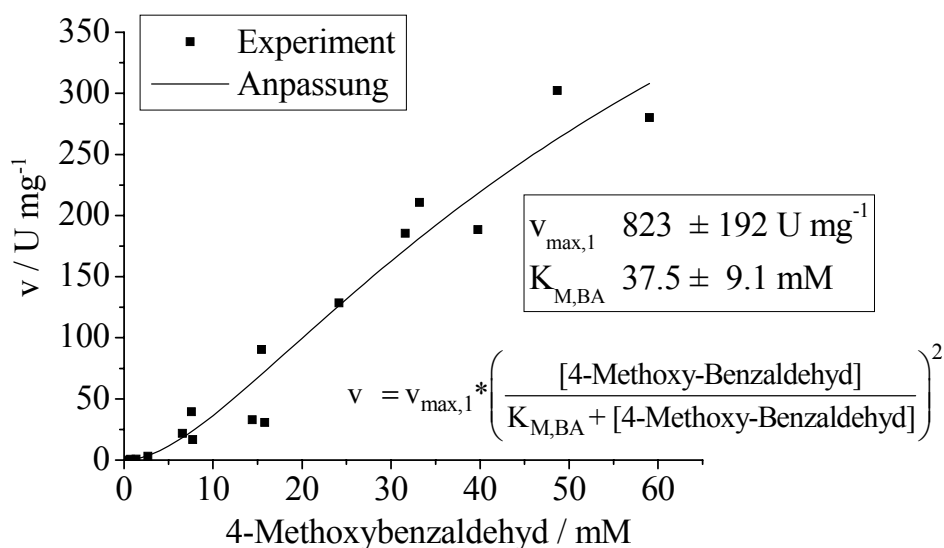


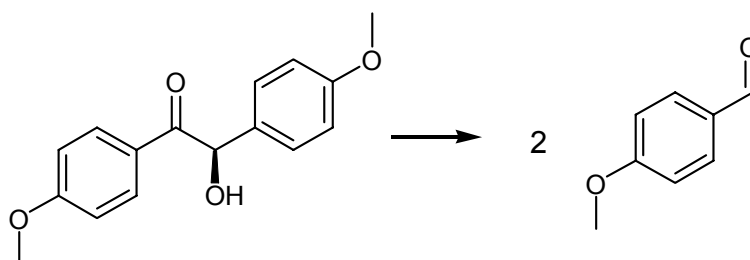
Abbildung 5.51 zeigt die Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin aus 4-Methoxy-Benzaldehyd. 4-Methoxy-Benzaldehyd besitzt eine sehr niedrige Affinität zur Benzaldehydlyase, sodass im Löslichkeitsbereich von 4-Methoxy-Benzaldehyd im Puffergemisch (bis etwa 70 mM) keine Sättigung des Enzyms beobachtet werden kann.



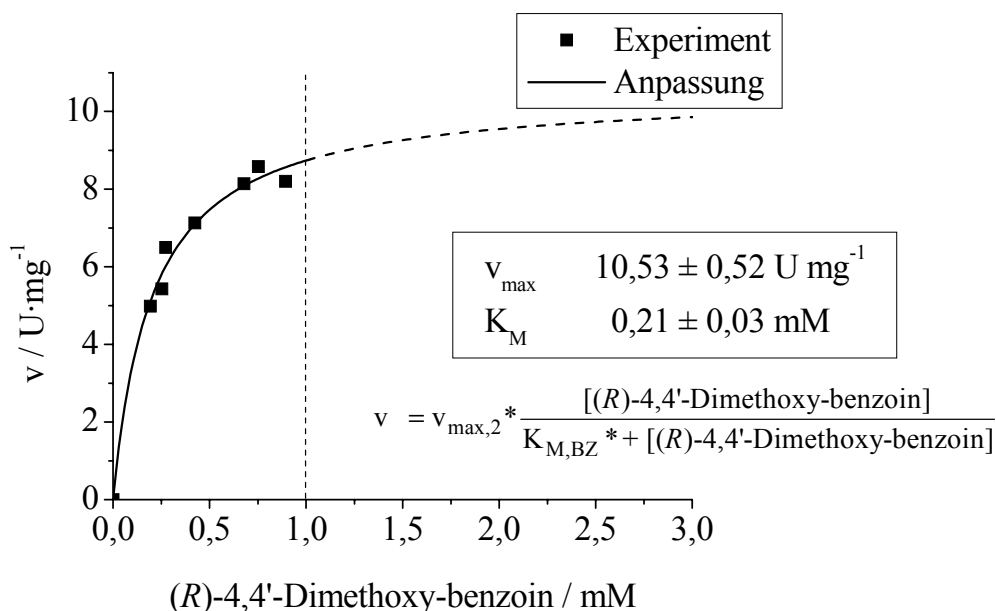
**Abbildung 5.51: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin aus 4-Methoxybenzaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 Vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 60 mM 4-Methoxybenzaldehyd, V = 3 mL, [E] = 4,6 µg mL<sup>-1</sup>

### Bildung von 4-Methoxy-Benzaldehyd aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin



Obwohl (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin im verwendeten Puffergemisch eine maximale Löslichkeit von nur etwa 1 mM zeigt, kann in diesem Bereich bereits eine Enzymsättigung beobachtet werden, sodass die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten durch das Modell nach Michaelis und Menten beschrieben werden können (Abbildung 5.52).

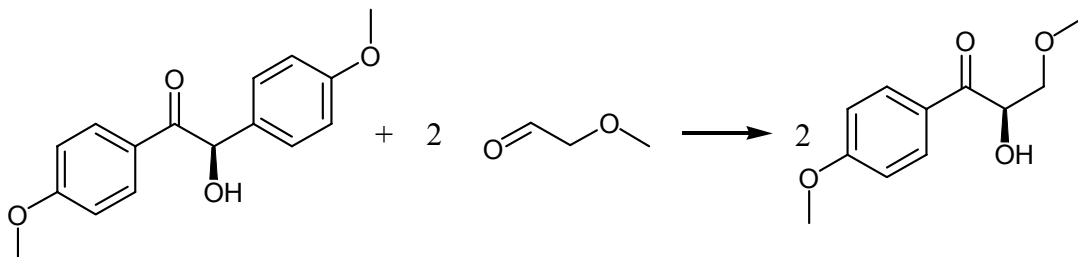


**Abbildung 5.52: Bildungsgeschwindigkeit von 4-Methoxy-Benzaldehyd aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin**

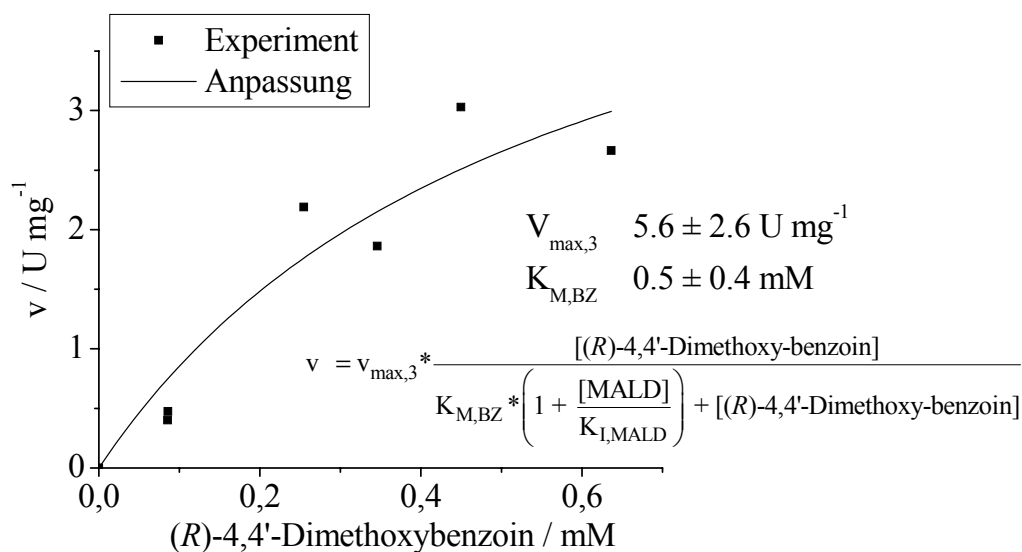
Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 1 mM 4-MeO-BZ, V = 3 mL, [E] = 1,6 µg mL<sup>-1</sup>

Bei 1,0 mM ist die Löslichkeitsgrenze angedeutet.

**Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin und Methoxyacetaldehyd (Abbildung 2.18, Reaktion 3)**



Die Messung der Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin und Methoxyacetaldehyd (Reaktionsweg 3 in Abbildung 2.18) werden innerhalb der Löslichkeit von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin (1 mM) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.53 dargestellt.

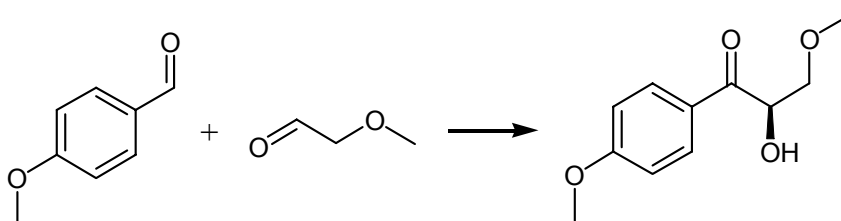


**Abbildung 5.53: Bildungsgeschwindigkeit von (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus (R)-4,4'-Dimethoxy-benzoin und Methoxyacetaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0,7 mM 4-MeO-BZ, 83mM Methoxyacetaldehyd (MALD), V = 3 mL, [E] = 2,7 µg mL<sup>-1</sup>

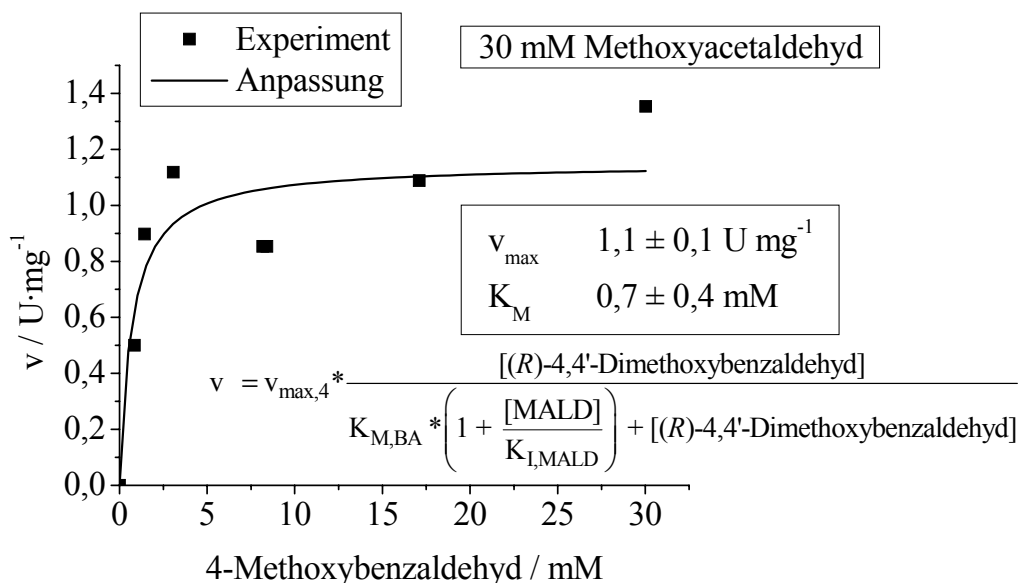
Die kinetischen Parameter, die sich aus der nicht-linearen Regression ergeben, sind mit großen Fehlern behaftet. Dies erklärt sich durch den geringen Messbereich, der das Arbeiten im Konzentrationsbereich um K<sub>M</sub> nicht ermöglicht.

#### HPP-Bildung aus 4-Methoxy-Benzaldehyd und Methoxyacetaldehyd (Abbildung 2.18, Reaktion 4)



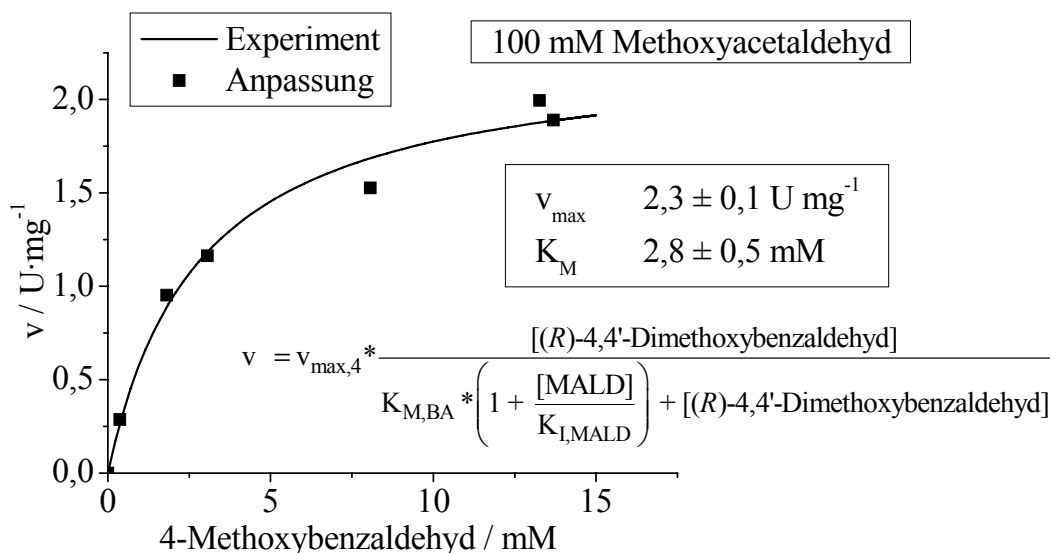
In zwei Messreihen mit jeweils konstanten Konzentrationen von 30 und 100 mM Methoxyacetaldehyd wird die Substratkonzentration an 4-Methoxy-Benzaldehyd im Bereich zwischen 0 und 30 mM variiert.

Die Abbildungen 5.54 (30 mM Methoxyacetaldehyd) und 5.55 (100 mM Methoxyacetaldehyd) zeigen die ermittelten Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration an 4-Methoxy-Benzaldehyd:



**Abbildung 5.54: Bildungsgeschwindigkeit von (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus 4-Methoxy-Benzaldehyd und Methoxyacetaldehyd (I)**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, 30 mM 4-Methoxybenzaldehyd, 30 mM Methoxyacetaldehyd (MALD), V = 3 mL, [E] = 6,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$



**Abbildung 5.55: Bildungsgeschwindigkeit von (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus 4-Methoxy-Benzaldehyd und Methoxyacetaldehyd (II)**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , T = 20 °C, 30 mM 4-Methoxybenzaldehyd, 100 mM Methoxyacetaldehyd (MALD), V = 3 mL, [E] = 6,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Die Maximalgeschwindigkeit bei dreifachem Überschuss an aliphatischem Aldehyd ist etwa doppelt so groß wie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei äquimolaren Mengen der

Reaktionspartner. Auch die ermittelten Michaelis-Konstanten unterscheiden sich deutlich voneinander. Weiterhin fällt auf, dass die erzielten Maximalgeschwindigkeiten unter den Geschwindigkeiten liegen, die im vorigen Abschnitt für die (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP Bildung aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin ermittelt wurden.

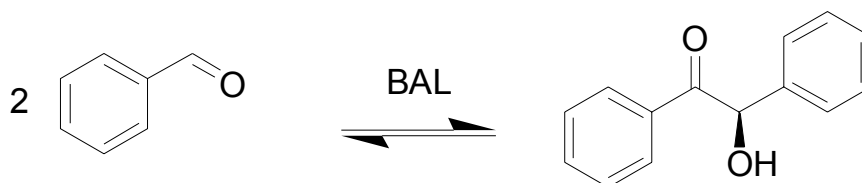
Die Hauptreaktion der BAL ist die Katalyse der Benzoinkupplung, die HPP-Bildung spielt nur eine untergeordnete Rolle. Durch höhere Konzentrationen an Methoxyacetaldehyd kann der Anteil der HPP-Bildung gesteigert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber geringer als im Fall von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin als einzigem Substrat, wenn die konkurrierende Benzoinkupplung nicht stattfindet (Reaktionsweg 3 in Abbildung 2.18).

Im Abschnitt über die Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP im 10 mL-Satzreaktor (vgl. 5.4.4) soll gezeigt werden, dass die Simulation des Reaktionsverlaufes auch dann gute Ergebnisse liefert, wenn man die direkte Bildung von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP aus den Substraten nicht berücksichtigt und die (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP-Bildung aus (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin und Methoxyacetaldehyd als einzigen Reaktionsweg annimmt.

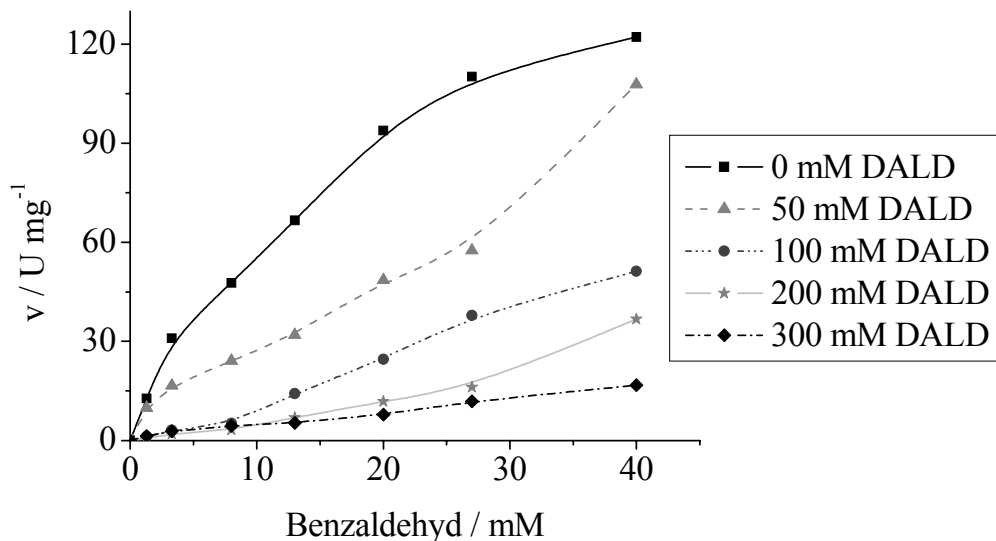
#### 5.4.3.3 Kinetik der Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon

In diesem Kapitel werden die möglichen Reaktionen der BAL bei der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP untersucht.

##### Bildung von Benzoin aus Benzaldehyd in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd



Die Geschwindigkeit der Benzoinbildung, ausgehend von Benzaldehyd in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd, ist in Abbildung 5.56 gezeigt.



**Abbildung 5.56: Benzoinbildung in bei verschiedenen Konzentrationen von Dimethoxyacetaldehyd**

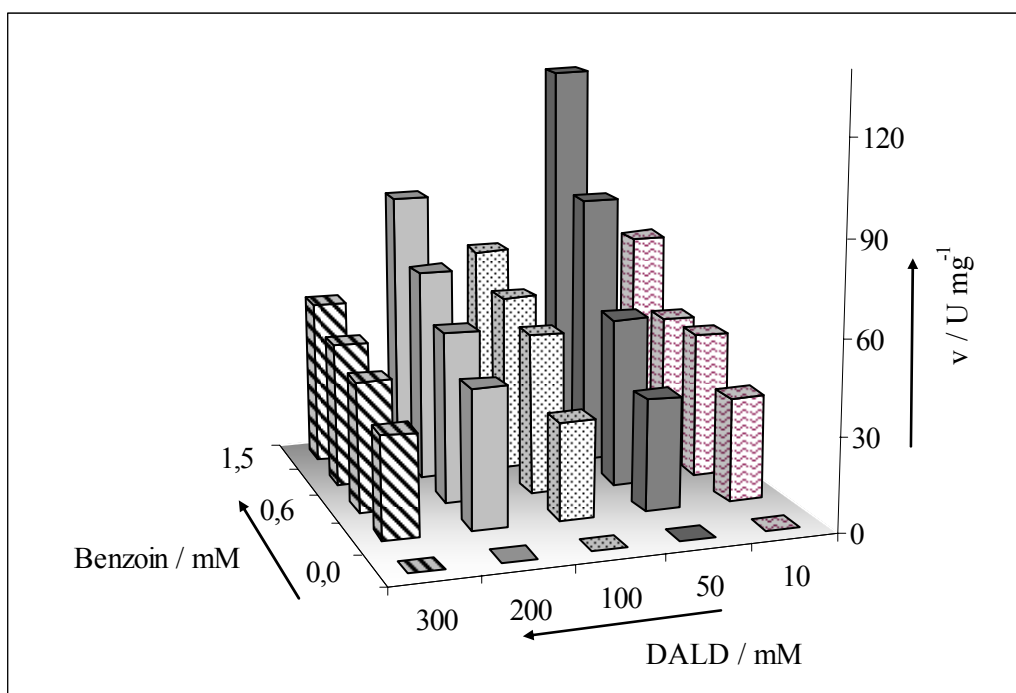
Reaktionsbedingungen: 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0 -40 mM Benzaldehyd, 0 – 300 mM Dimethoxyacetaldehyd (DALD), V = 3 mL, [E] = 2,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Die Datenpunkte sind zur besseren Verständlichkeit mit Linien verbunden.

Die Benzoinbildung aus Benzaldehyd wird in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd inhibiert. Für die Inhibierung können jedoch keine kinetischen Parameter angepasst werden, da der Inhibierungsverlauf nicht der Michaelis-Menten-Kinetik entspricht. In Kapitel 5.1.1.2 wurden die kinetischen Parameter für die Benzoinbildung ohne Dimethoxyacetaldehyd bestimmt und sind in Abbildung 5.1 gezeigt.



## Spaltung von Benzoin in Benzaldehyd in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd

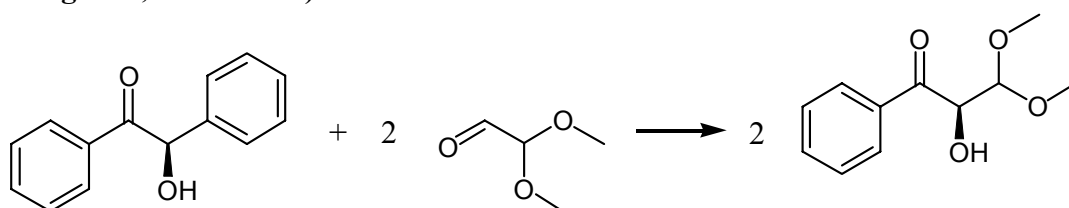


**Abbildung 5.57: Geschwindigkeit der Benzaldehydbildung in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd**

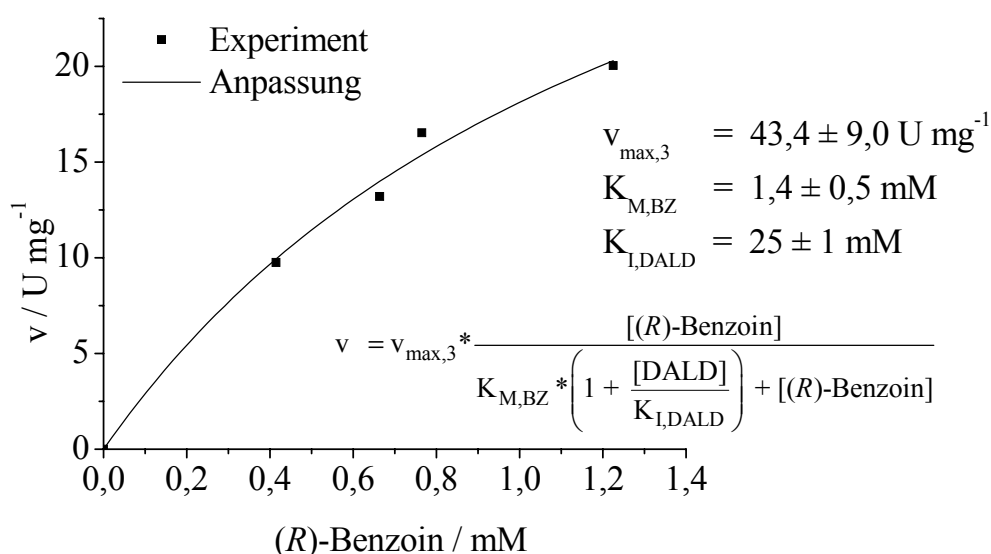
Reaktionsbedingungen: 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0 - 1,5 mM Benzoin, 0 - 300 mM Dimethoxyacetaldehyd (DALD), V = 3 mL, [E] = 2,7 μg mL<sup>-1</sup>

In Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd wird die Reaktion der Benzoinspaltung inhibiert (Abbildung 5.57). Es können keine kinetischen Parameter angepasst werden, die Dimethoxyacetaldehyd als Inhibitor berücksichtigen. Die Kinetik der Benzoinspaltung ohne Dimethoxyacetaldehyd sind in Kapitel 5.1.1.2 bestimmt worden und in Tabelle 5.2 gezeigt.

**Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP aus (*R*)-Benzoin und Dimethoxyacetaldehyd (Abbildung 2.18, Reaktion 3)**



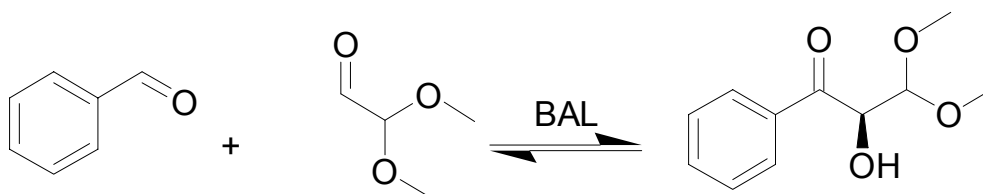
Die Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP aus Benzoin und Dimethoxyacetaldehyd ist in Abbildung 5.58 gezeigt.



**Abbildung 5.58: Bildungsgeschwindigkeit von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP aus Benzoin und Dimethoxyacetaldehyd**

Reaktionsbedingungen: 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 0 – 1,2 mM Benzoin, 100 mM Dimethoxyacetaldehyd (DALD), V = 3 mL, [E] = 2,7 µg mL<sup>-1</sup>

#### **Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP aus Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd (Abbildung 2.18, Reaktion 4)**

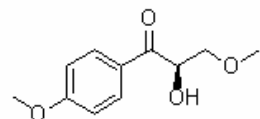
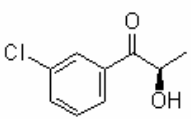
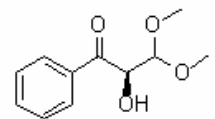


Für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP, ausgehend von Benzaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd, werden keine Werte erhalten. Die Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP erfolgt nur verzögert, nachdem in den Reaktionsansätzen Benzoin entsteht. Da sich die Benzoinbildung in Gegenwart von Benzaldehyd nicht unterdrücken lässt, kann die (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP-Bildung, ausgehend von Benzaldehyd, nicht isoliert gemessen werden.

#### **5.4.3.4 Zusammenfassung Kinetik**

Die Geschwindigkeiten der vier möglichen Teilreaktionen wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und die Ergebnisse in Tabelle 5.15 zusammengefasst. Abbildung 2.18 veranschaulicht die vier möglichen Reaktionswege der BAL-katalysierten HPP-Synthese.

Tabelle 5.15: Kinetische Parameter der HPP-Synthese ( $v_{\max,1-4}$  bezieht sich auf die 4 möglichen Reaktionswege)

 $(R)$ -3',4-Dimethoxy-HPP	 $(R)$ -3-Chlor-HPP	 $(R)$ -3,3-Dimethoxy-HPP																																										
$v = v_{\max,1} * \left( \frac{[4\text{-Methoxybenzaldehyd}]}{K_{M,BA} + [4\text{-Methoxybenzaldehyd}]} \right)^2$	$v = v_{\max,1} * \left( \frac{[3\text{-Chlorbenzaldehyd}]}{K_{M,BA} + [3\text{-Chlorbenzaldehyd}]} \right)^2$	$v = v_{\max,1} * \left( \frac{[\text{Benzaldehyd}]}{K_{M,BA} + [\text{Benzaldehyd}]} \right)^2$																																										
$v = v_{\max,3} * \frac{[(R)\text{-}4,4'\text{-DiMeO-BZ}]}{K_{M,BZ} * \left( 1 + \frac{[\text{MALD}]}{K_{I,MALD}} \right) + [(R)\text{-}4,4'\text{-DiMeO-BZ}]}$	$v = v_{\max,2} * \left( \frac{[(R)\text{-}3,3'\text{-Dichlor-benzoin}]}{K_{M,BZ} + [(R)\text{-}3,3'\text{-Dichlor-benzoin}]} \right)$	$v = v_{\max,2} * \left( \frac{[(R)\text{-}3,3'\text{-Dichlor-benzoin}]}{K_{M,BZ} + [(R)\text{-}3,3'\text{-Dichlor-benzoin}]} \right)$																																										
$v = v_{\max,3} * \frac{[(R)\text{-}4,4'\text{-DiMeO-BZ}]}{K_{M,BZ} * \left( 1 + \frac{[\text{MALD}]}{K_{I,MALD}} \right) + [(R)\text{-}4,4'\text{-DiMeO-BZ}]}$	$v = v_{\max,3} * \frac{[(R)\text{-}3,3'\text{-DiCl-BZ}]}{K_{M,BZ} * \left( 1 + \frac{[\text{ALD}]}{K_{I,ALD}} \right) + [(R)\text{-}3,3'\text{-DiCl-BZ}]}$	$v = v_{\max,3} * \frac{[(R)\text{-BZ}]}{K_{M,BZ} * \left( 1 + \frac{[\text{DALD}]}{K_{I,DALD}} \right) + [(R)\text{-BZ}]}$																																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Wert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>V_{\max,1}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>823 \pm 192 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BA}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>37.5 \pm 9.1 \text{ mM}</math></td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,2}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,3}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>5.6 \pm 2.6 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>0.5 \pm 0.4 \text{ mM}</math></td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Wert	$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$823 \pm 192 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$37.5 \pm 9.1 \text{ mM}$	$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	-	$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	-	$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$5.6 \pm 2.6 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$0.5 \pm 0.4 \text{ mM}$	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Wert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>V_{\max,1}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>81 \pm 8 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BA}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>6.9 \pm 1,1 \text{ mM}</math></td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,2}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td><math>21,6 \pm 2,5</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td><math>0,2 \pm 1,0</math></td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,3}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>3,3 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>0,03 \pm 0,01 \text{ mM}</math></td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Wert	$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$81 \pm 8 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$6.9 \pm 1,1 \text{ mM}$	$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	$21,6 \pm 2,5$	$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	$0,2 \pm 1,0$	$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$3,3 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$0,03 \pm 0,01 \text{ mM}$	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Wert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>V_{\max,1}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>447 \pm 80 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BA}</math> (Benzoin-Bildung)</td> <td><math>28 \pm 7 \text{ mM}</math></td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,2}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (Benzoin-Spaltung)</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td><math>V_{\max,3}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>43,4 \pm 9,0 \text{ U mg}^{-1}</math></td> </tr> <tr> <td><math>K_{M,BZ}</math> (HPP-Bildung)</td> <td><math>1,4 \pm 0,5 \text{ mM}</math></td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Wert	$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$447 \pm 80 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$28 \pm 7 \text{ mM}$	$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	-	$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	-	$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$43,4 \pm 9,0 \text{ U mg}^{-1}$	$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$1,4 \pm 0,5 \text{ mM}$
Parameter	Wert																																											
$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$823 \pm 192 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$37.5 \pm 9.1 \text{ mM}$																																											
$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	-																																											
$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	-																																											
$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$5.6 \pm 2.6 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$0.5 \pm 0.4 \text{ mM}$																																											
Parameter	Wert																																											
$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$81 \pm 8 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$6.9 \pm 1,1 \text{ mM}$																																											
$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	$21,6 \pm 2,5$																																											
$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	$0,2 \pm 1,0$																																											
$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$3,3 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$0,03 \pm 0,01 \text{ mM}$																																											
Parameter	Wert																																											
$V_{\max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$447 \pm 80 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$28 \pm 7 \text{ mM}$																																											
$V_{\max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	-																																											
$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	-																																											
$V_{\max,3}$ (HPP-Bildung)	$43,4 \pm 9,0 \text{ U mg}^{-1}$																																											
$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$1,4 \pm 0,5 \text{ mM}$																																											

<sup>7</sup> Abkürzungen: (R)-4,4'-DiMeO-BZ = (R)-4,4'-Dimethoxy-benzoin; (R)-DiCl-BZ = (R)-3,3'-Dichlor-benzoin; (R)-BZ = (R)-Benzoin; ALD = Acetaldehyd; MALD = Methoxyacetaldehyd; DALD = Dimethoxyacetaldehyd

Bei der HPP-Bildung, ausgehend vom aromatischen Aldehyd und aliphatischen Aldehyd als Substrat, können für keines der Reaktionssysteme kinetische Parameter bestimmt werden. In den folgenden Kapiteln soll gezeigt werden, dass diese Teilreaktion für die Beschreibung der Gesamtreaktion vernachlässigt werden kann.

Dagegen kann die Bildungsgeschwindigkeit der HPP-Derivate, ausgehend vom jeweiligen Benzoinderivat und dem aliphatischen Aldehyd als Substrat, mit dem Michaelis-Menten-Modell beschrieben werden.

Zu (*R*)-3-Chlor-HPP:

- Die Enzymaktivitäten bei der Bildung und Spaltung von (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin in Abwesenheit von Acetaldehyd können durch das Modell nach Michaelis und Menten beschrieben werden.
- Acetaldehyd-Konzentrationen von über 25 mM garantieren einen genügend hohen Überschuss, um die kinetischen Parameter als von der Acetaldehydkonzentration unabhängig anzusehen.

Zu (*R*)-3',4-Dimethoxy-HPP:

- 4-Methoxy-Benzaldehyd wird von der Benzaldehydlyase schnell umgesetzt ( $v_{\max} = 823 \text{ U mg}^{-1}$ ).
- Die Spaltung von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin läuft im Vergleich zur Spaltung von (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin deutlich langsamer ab.

Zu (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP:

- Die Bildung von (*R*)-Benzoin aus Benzaldehyd wird in Gegenwart von Dimethoxyacetaldehyd inhibiert. Aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit konnte jedoch keine Inhibierungskonstante erhalten werden.

#### 5.4.4 Darstellung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen im Satzreaktor

Aus den kinetischen Untersuchungen wird zunächst ein vereinfachtes kinetisches Modell entwickelt, das den Reaktionsverlauf der HPP-Synthese im Satzreaktor beschreiben kann (vgl. Formel 2.8). Das Modell ist in den Formeln 5.11 bis 5.13 gezeigt.

$$\frac{d[\text{BA}]}{dt} = [\text{E}] * (-2 * v_{\text{BZ-Bildung}} + v_{\text{HPP-Bildung}})$$

**Formel 5.11**

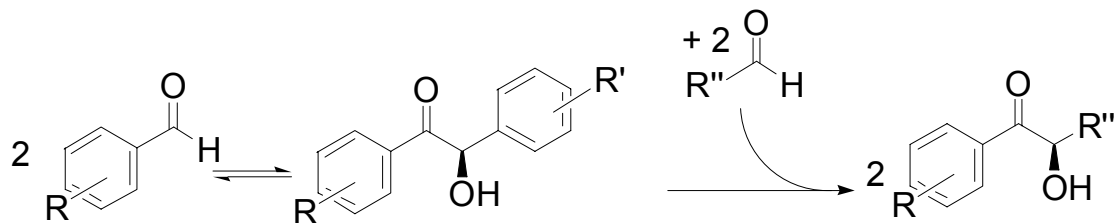
$$\frac{d[\text{BZ}]}{dt} = [\text{E}] * (-v_{\text{HPP-Bildung}})$$

**Formel 5.12**

$$\frac{d[\text{HPP}]}{dt} = [\text{E}] * (v_{\text{HPP-Bildung}})$$

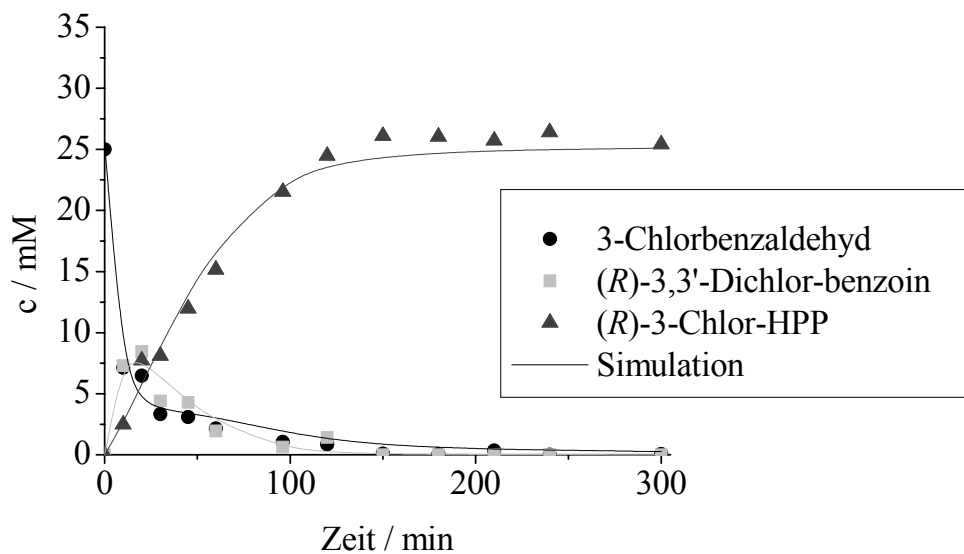
**Formel 5.13**

Da die Benzoinspaltung im Vergleich zur Benzoinbildung deutlich langsamer abläuft, geht sie nicht in das Modell ein. Um die in Kapitel 5.4.3 bestimmten kinetischen Parameter zu überprüfen, wird die Synthese von HPP-Derivaten im Satzreaktor durchgeführt und der Reaktionsverlauf mit dem entwickelten kinetischen Modell simuliert. Den für die Simulation angenommenen Reaktionsweg zur Bildung der HPP-Derivate veranschaulicht Abbildung 5.59:



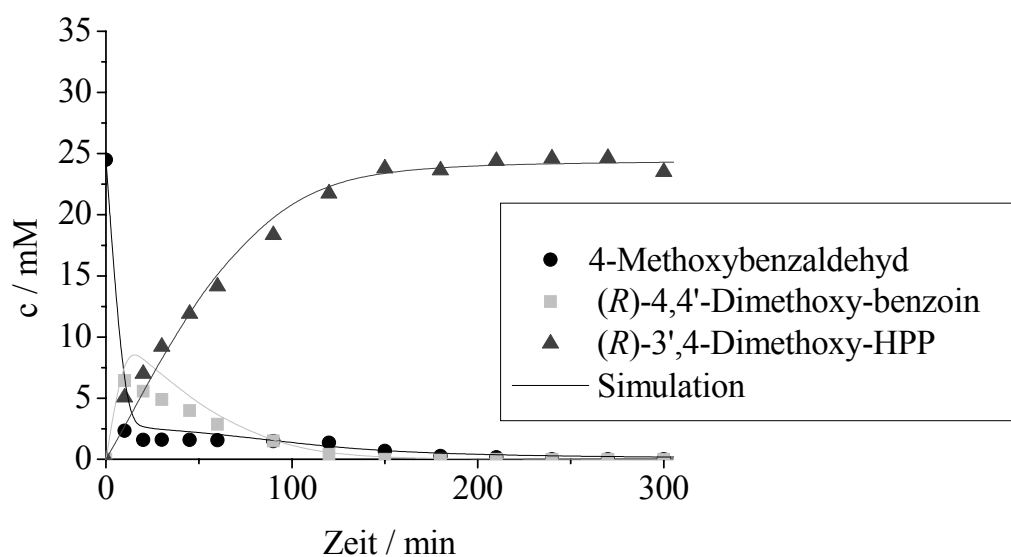
**Abbildung 5.59: Reaktionsweg der Bildung von HPP-Derivaten**

Die Abbildungen 5.60 – 5.62 zeigen den Reaktionsverlauf der Synthese von HPP-Derivaten im Satzreaktor. Die Substratkonzentrationen werden so gewählt, dass ein zwei bis fünffacher Überschuss des aliphatischen Aldehyds gegenüber dem aromatischen Aldehyd vorliegt. Dadurch wird ein hoher Umsatz zum gewünschten HPP-Derivat erreicht. Auch wird berücksichtigt, dass die Löslichkeitsgrenzen der Substrate und Produkte nicht oder nur mäßig überschritten werden, um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten.



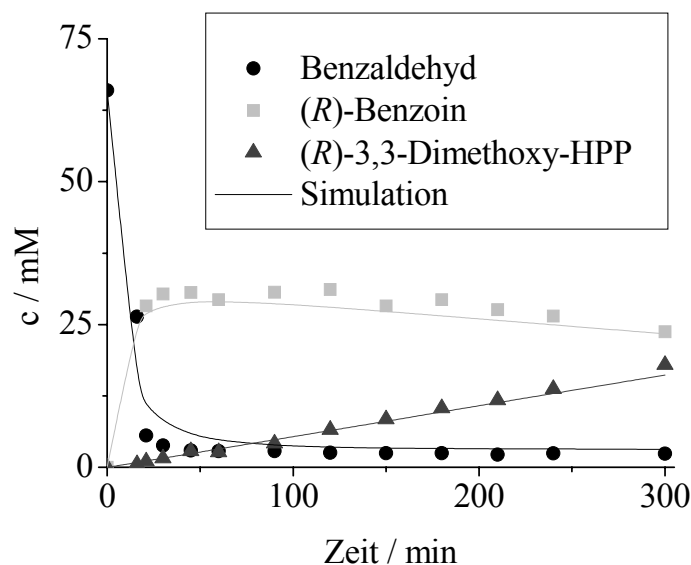
**Abbildung 5.60: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3-Chlor-HPP im Satzreaktor**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $Mg^{2+}$ , T = 20 °C, 25 mM 3-Chlorbenzaldehyd, 118 mM Acetaldehyd, V = 10 mL, [E] = 93  $\mu\text{g mL}^{-1}$



**Abbildung 5.61: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,4'-Dimethoxy-HPP im Satzreaktor**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $Mg^{2+}$ , T = 20 °C, 25 mM 4-Methoxybenzaldehyd, 89 mM Methoxyacetaldehyd, V = 10 mL, [E] = 240  $\mu\text{g mL}^{-1}$



**Abbildung 5.62: Reaktionsverlauf der Synthese von (R)-3,3-Dimethoxy-HPP im Satzreaktor**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $Mg^{2+}$ ,  $T = 20\text{ }^{\circ}C$ , 66 mM Benzaldehyd, 130 mM Dimethoxyacetaldehyd,  $V = 10\text{ mL}$ ,  $[E] = 250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$

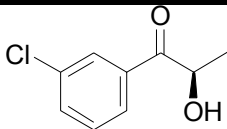
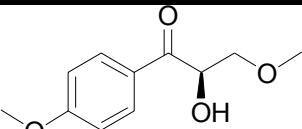
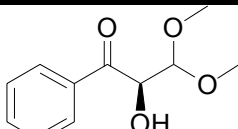
Es ist offensichtlich, dass der Großteil des vorliegenden Benzaldehyds rasch zum korrespondierenden Benzoin umgesetzt wird. Mit zunehmender Reaktionsdauer verliert die Benzoinbildung durch geringer werdende Substratkonzentration jedoch wieder an Bedeutung.

Im weiteren Reaktionsverlauf reagiert das intermediär entstehende Benzoin-Derivat vollständig weiter zum HPP, d.h. der Lösung wird durch die HPP-Bildung Benzoin entzogen und kristallin vorliegendes Benzoin geht erneut in Lösung. Die Konzentration der HPP-Derivate steigt zu Beginn der Reaktion linear an und nähert sich dann asymptotisch einem Maximalwert von über 95 Prozent Umsatz.

Da die Benzoinen zwischenzeitlich die Löslichkeitsgrenze von unter 1,5 mM überschreiten, fallen sie vorübergehend aus. Die Konzentration an Benzoin in Lösung steigt nach Versuchsbeginn schnell auf den jeweils maximalen Wert von 0,3 mM – 1,5 mM, anschließend bleibt sie durch Präzipitation des überschüssigen Benzoins über lange Zeit konstant.

Durch die notwendige Verdünnung der Proben mit Acetonitril vor der HPLC-Analyse wird auch der auskristallisierte Anteil des Benzoins wieder in Lösung gebracht und damit eine scheinbar höhere Konzentration gemessen als tatsächlich in der Lösung vorhanden. Die gemessenen Werte geben also nicht die in Lösung vorliegende Konzentration wieder, sondern die insgesamt im Reaktor teils fest, teils gelöst vorliegende Benzoinmenge. In der zur Anwendung kommenden Simulation wird die Kristallisation der Benzoinen nicht berücksichtigt. Daher werden die in Kapitel 5.4.3 bestimmten kinetischen Parameter für die Simulation im Satzreaktor optimiert (Tabelle 5.16).

Tabelle 5.16: Durch Anpassung an Satzreaktoren optimierte kinetische Parameter

Parameter			
$V_{\max,1}$	$76 \pm 7 \text{ U mg}^{-1}$	$1047 \pm 237 \text{ U mg}^{-1}$	$439 \pm 58 \text{ U mg}^{-1}$
$K_{M,BA}$	$9,1 \pm 0,6 \text{ mM}$	$53,8 \pm 6,3 \text{ mM}$	$34,2 \pm 2,4 \text{ mM}$
$V_{\max,3}$	$4,5 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$	$1,7 \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$	$0,22 \pm 0,01 \text{ U mg}^{-1}$
$K_{M,BZ}$	$1,1 \pm 0,1 \text{ mM}$	$2,0 \pm 0,2 \text{ mM}$	$0,09 \pm 0,03 \text{ mM}$
$K_{I,2}$	$86 \pm 8 \text{ mM}$	$79 \pm 12 \text{ mM}$	$25 \pm 2,0 \text{ mM}$

Die drei Reaktionen werden durch das kinetische Modell mit den optimierten Parametern gut beschrieben. Die für die Simulation im Satzreaktor bestimmten Parameter liegen überwiegend in der Bandbreite der Ergebnisse der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten. Die Parameter der Benzoinbildung weichen jedoch stärker ab, da das Modell die zwischenzeitliche Kristallisation der Benzoin im Reaktor nicht berücksichtigt. Im folgenden Kapitel wird auf die intermediäre Kristallisation eingegangen.

#### 5.4.4.1 Erweiterung der Simulation zur Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen

Solange die Löslichkeitsgrenze der Benzoin nicht überschritten wird, ist davon auszugehen, dass die kinetischen Parameter gültig sind. Da jedoch im Reaktionsverlauf die Löslichkeitsgrenze überschritten wird, stehen die Benzoin nicht mehr für die enzymatische Umsetzung zur Verfügung.

Daher wird das Modell für die Simulation der HPP-Synthese im homogenen Satzreaktor erweitert. Es wird das in Abbildung 2.18 gezeigte Reaktionssystem angenommen und um die Kristallisation sowie die Desaktivierung des Enzyms erweitert (Kapitel 2.4.2, Formeln 2.18 + 2.19).

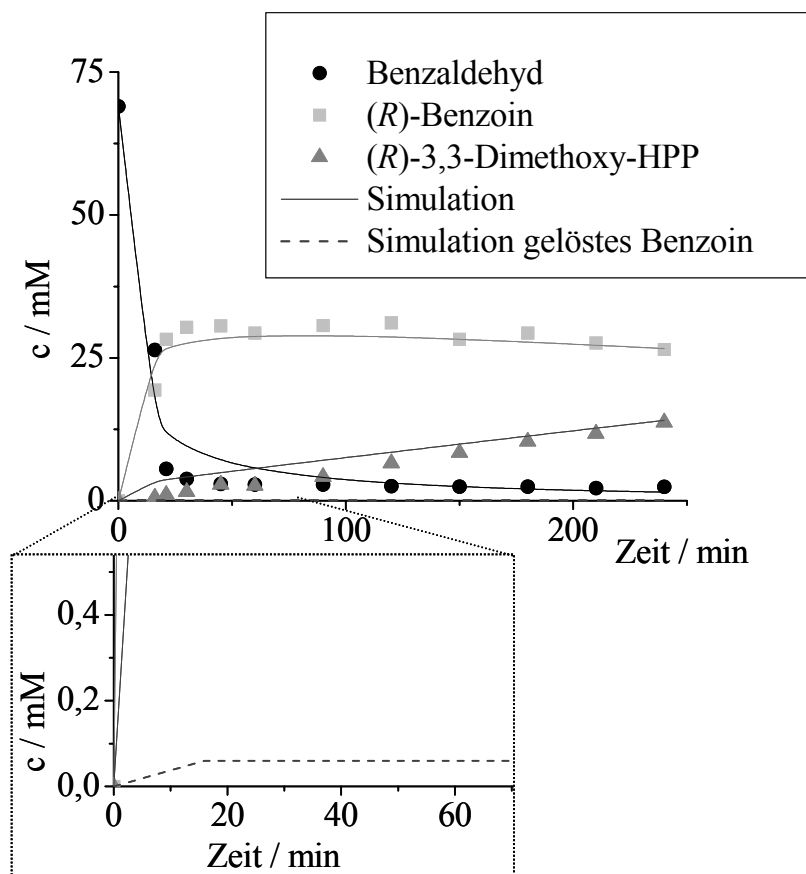
$$C = k_C * [\text{Benzoin}] \quad \text{vgl. Formel 2.18}$$

$$S = k_s * [\text{Benzoin}] \quad \text{vgl. Formel 2.19}$$

$$E = k_{\text{act}} * E_{\text{act}} - k_{\text{deact}} * E_{\text{deact}} \quad \text{Formel 5.8}$$

Die Simulation der HPP-Synthese mit dem erweiterten Modell wird beispielhaft an der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP im homogenen Satzreaktor überprüft (Abbildung 5.63).





**Abbildung 5.63: Simulation der  $(R)$ -3,3-Dimethoxy-HPP im Homogenen System mit dem erweiterten Modell**

Reaktionsbedingungen: 50 mM Kpi-Puffer pH = 8, 30 vol% DMSO, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 60 mM BA, 100 mM Dimethoxyacetaldehyd,  $V = 10 \text{ mL}$ ,  $[E] = 43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

Der Reaktionsverlauf kann mit den kinetischen Parametern aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit durch das erweiterte Modell beschrieben werden.

Tabelle 5.17 zeigt die Parameter, die für die Simulation der Synthese von  $(R)$ -3,3-Dimethoxy-HPP bestimmt werden.

Tabelle 5.17: Parameter der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP

	Parameter	Wert
Bildung ( <i>R</i> )-3,3'-Dimethoxy-benzoin:	$v_{\max}$	$447 \pm 80 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$28 \pm 7 \text{ mM}$
Bildung ( <i>R</i> )-3,3-Dimethoxy-HPP	$v_{\max}$	$43,4 \pm 9,0 \text{ U mg}^{-1}$
	$K_M$	$1,4 \pm 0,5 \text{ mM}$
Kristallisationsrate	$k_c$	$0,46 \pm 0,13 \text{ mM min}^{-1}$
Enzymaktivität	$k_{\text{act}}$	$0,027 \pm 0,013 \text{ min}^{-1}$
	$k_{\text{deact}}$	$0,0023 \pm 0,0017 \text{ min}^{-1}$
Lösungsrate	$k_s$	$0,001 \pm 0,0002 \text{ mM min}^{-1}$

Die Michaelis-Menten Parameter stimmen mit den Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten überein. Weiterhin wird für die Kristallisationsrate von Benzoin der gleiche Wert, wie für die Kristallisation von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin erhalten. Dagegen ist Wert für die Lösungsrate von Benzoin deutlich kleiner als die von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin.

#### 5.4.4.2 Zusammenfassung: Satzreaktor zur Darstellung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen

- Durch die Messung der Konzentrationsverläufe in den Satzreaktoren können die kinetischen Parameter erfolgreich optimiert werden.
- Das vereinfachte Modell auf der Basis der optimierten Michaelis-Menten-Parameter ermöglicht eine sehr gute Voraussage der Konzentrationsverläufe.
- Ein dreifacher Überschuss an aliphatischem Aldehyd bringt fast vollständigen Umsatz (> 95 Prozent).
- Durch die Optimierung der kinetischen Parameter kann eine Inhibierungskonstante  $K_I$  für die aliphatischen Aldehyde bestimmt werden.
- Unter Einbeziehung der Kristallisation von Benzoin und der Enzymdesaktivierung wird die Gültigkeit der kinetischen Parameter aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gezeigt.

#### 5.4.5 Membrangestütztes Zwei-Phasensystem

Die intermediäre Kristallisation von Benzoinen bei der Synthese der HPPs kann sich nachteilig auf die Reaktionsführung auswirken. So kann es durch den Feststoffanteil im Reaktor zur Verstopfung von Leitungen und Pumpen kommen. Bei der Synthese von schwerlöslichen Substanzen bieten wässrig-organische Zwei-Phasensysteme verschiedene Vorteile (Kapitel 2.4.3). Daher wird untersucht, ob sich die enzymatische C-C-Knüpfung mit der BAL für die Anwendung im Zwei-Phasensystem eignet.

#### Entwicklung lösungsmittelstabiler Membrankontaktoren

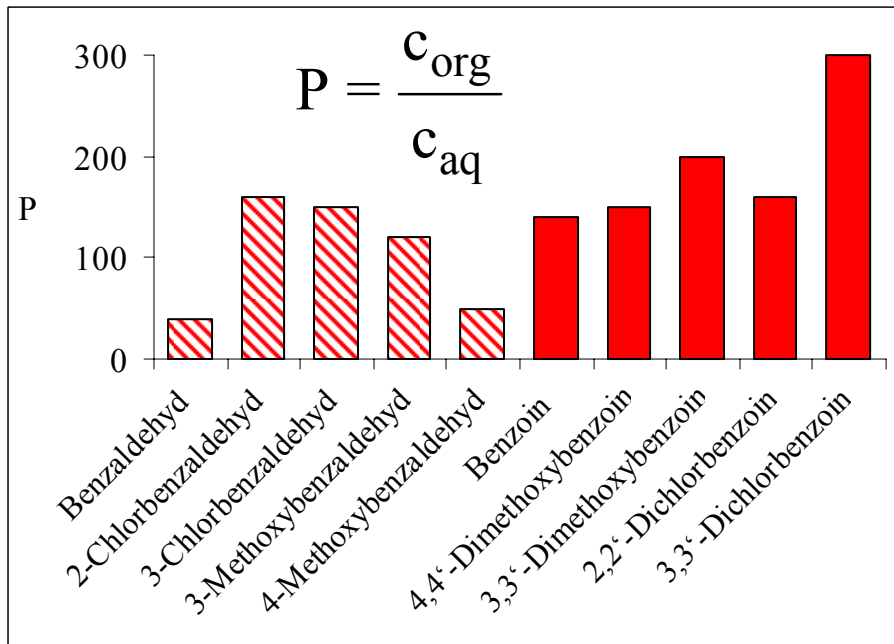
Bisher verwendete Membranmodule bestanden aus Materialien (Gehäuse, Dichtungen), die gegen das verwendete Lösungsmittel MTBE nicht resistent sind [182]. Aufgrund der kurzen Standzeit (< 20 h), waren keine Experimente über einen längeren Zeitraum möglich. Daher wird ein lösungsmittelstabiler Hohlfaserkontaktor konstruiert. Das Gehäuse besteht vollständig aus Glas und die Verklebung der Hohlfasern erfolgt mit einem 2-Komponenten-Epoxidharz:



Abbildung 5.64: Lösungsmittelresistenter Hohlfaserkontaktor mit X-50 Membran von Celgard

### 5.4.5.1 Verteilungskoeffizienten

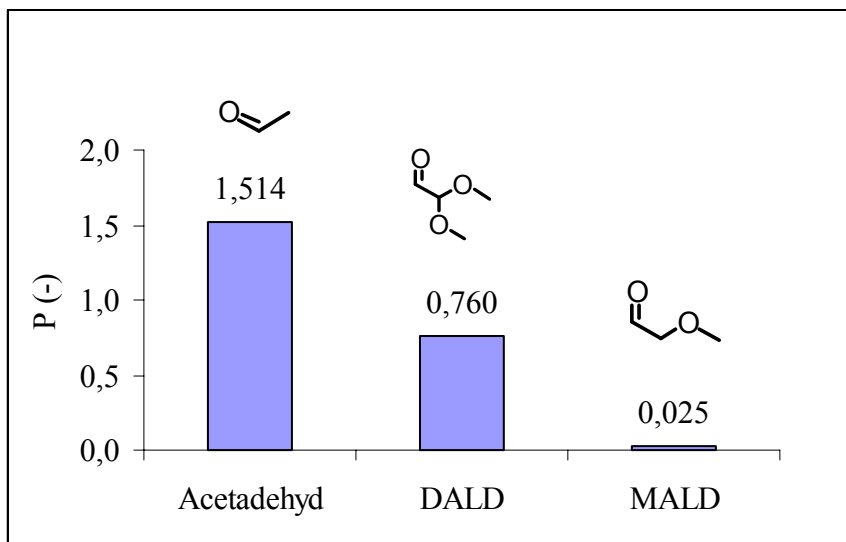
Für das untersuchte wässrig-organische Reaktionssystem wird der Verteilungskoeffizient für die verfügbaren Substrate und Produkte bestimmt. Die HPPs werden in diese Untersuchung nicht einbezogen, da für die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten große Mengen der jeweiligen Substanz eingesetzt werden müssen. Abbildung 5.65 zeigt die Verteilungskoeffizienten für die aromatischen Aldehyde und für Benzoin.



**Abbildung 5.65: Verteilungskoeffizienten für Benzoin und Benzaldehyde**

Bedingungen: 25 ml Puffer, 25 ml MTBE, 1 g Substanz

Es zeigt sich, dass die Benzoinen gut aus der wässrigen Phase extrahiert werden und somit möglicherweise eine Kristallisation im Reaktor technisch vermieden werden kann. Weiterhin werden die Verteilungskoeffizienten der aliphatischen Aldehyde bestimmt (Abbildung 5.66).



**Abbildung 5.66: Verteilungskoeffizienten der aliphatischen Aldehyde**

Bedingungen: 25 ml Puffer, 25 ml MTBE, 1 g Substanz; (DALD = Dimethoxyacetaldehyd; MALD = Methoxyacetaldehyd)

Im Vergleich zu den Benzoinen haben die aliphatischen Aldehyde deutlich kleinere Verteilungskoeffizienten. Sie verbleiben daher überwiegend in der wässrigen Phase und werden

wenig in die organische Phase extrahiert. Dadurch kann gewährleistet werden, dass durch einen Überschuss an aliphatischem Aldehyd ein vollständiger Umsatz zu den HPPs erfolgt.

#### 5.4.5.2 Untersuchung des Stofftransports

Um eine Aussage über die erforderliche Austauschfläche zu erhalten, wird der Stofftransport der Substanzen durch die Membran gemessen. Für die Simulation des Stofftransports ( $M_x$ ) werden folgende Gleichungen verwendet (vgl. Formel 2.22):

$$M_{BA} = D_{BA} * A * (BA_{org} - P * BA_{aq}) \quad \text{Formel 5.14}$$

$$M_{BZ} = D_{BZ} * A * (BZ_{aq} * P_{BZ} - 0.1 * BZ_{org}) \quad \text{Formel 5.15}$$

Abbildung 5.67 zeigt die Extraktion von Benzaldehyd aus der wässrigen Phase in die organische Phase. Aus dem Verlauf der experimentellen Daten wird der Stofftransportkoeffizient  $D_{BA}$  zu  $0.36 \pm 0.012 \text{ dm}^2 \text{ min}^{-1}$  berechnet.

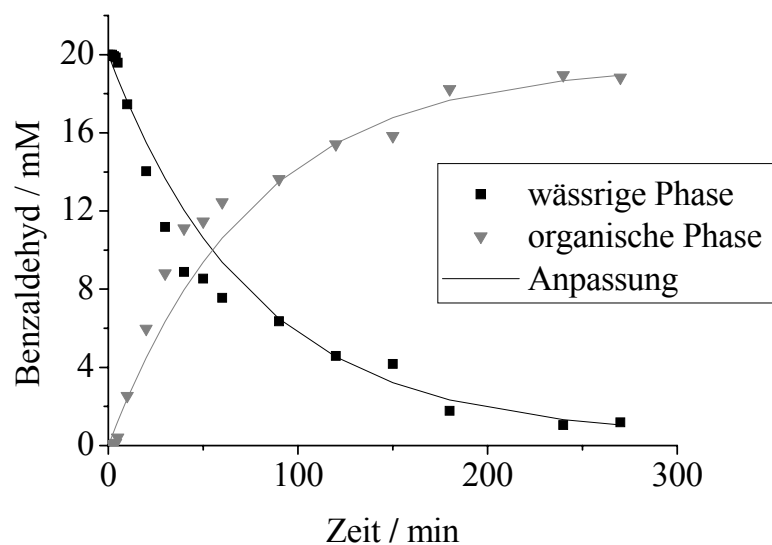


Abbildung 5.67: Extraktion von Benzaldehyd aus der wässrigen Phase in die organische Phase

Die Extraktion von Benzoin aus der wässrigen Phase in die organische Phase läuft scheinbar deutlich langsamer ab und es wird ein Koeffizient von  $D_{BZ}$  zu  $0.0017 \pm 0.009 \text{ dm}^2 \text{ min}^{-1}$  erhalten (Abbildung 5.68).

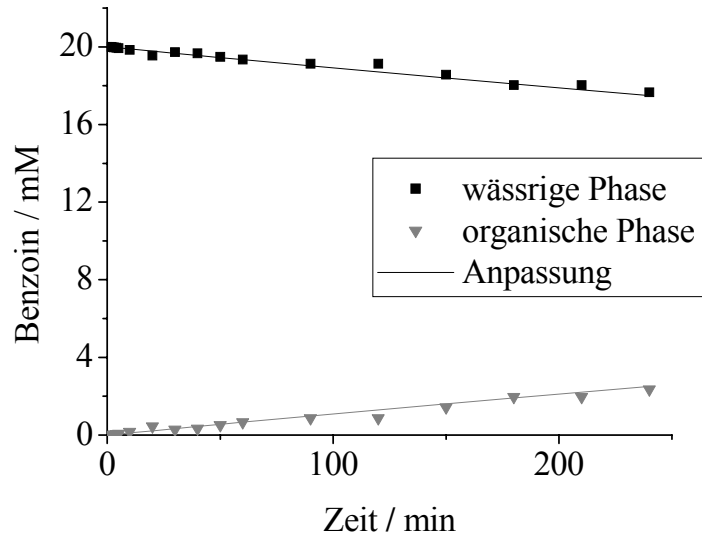
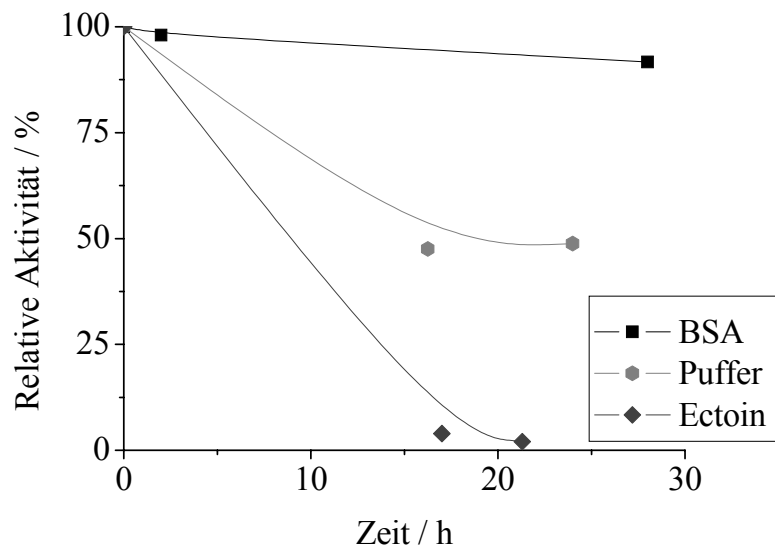


Abbildung 5.68: Extraktion von Benzoin aus der wässrigen Phase in die organische Phase

Der langsamere Übergang von Benzoin aus der wässrigen Phase in die organische Phase erklärt sich durch das Vorliegen als Feststoff. Somit muss das Benzoin vor dem Phasenübergang in Lösung gehen. Da der Reaktor konstruktionsbedingt Totzonen aufweist, setzt sich das Benzoin hier ab und wird nur langsam gelöst und extrahiert. Dennoch sind diese Werte für die Simulation geeignet, da sie den realen Stoffübergang im Reaktor beschreiben.

#### 5.4.5.3 Die Stabilität der BAL im Prozess

Wie in Kapitel 5.2.4.3 gezeigt wurde, lässt sich die Stabilität der BAL im Zwei-Phasensystem durch die Einbringung einer Membran verbessern. Im Prozess führen weitere Faktoren, wie Kontaktflächen der Membran, Scherkräfte der verwendeten Pumpen, Oberflächen des Reaktors zur Inaktivierung von Enzymen. Deshalb werden verschiedene Schutzstoffe auf ihren Einfluss auf die Stabilität der BAL im membrangestützten Zwei-Phasensystem untersucht. Abbildung 5.69, zeigt die Stabilität der BAL in Abhängigkeit unterschiedlicher Schutzstoffe.



**Abbildung 5.69: Stabilität der BAL**

Reaktionsbedingungen: 90 ml Kpi-Puffer (50 mM) pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 25 ml MTBE V = 115 mL, [E] = 43 µg mL<sup>-1</sup>; Ectoin: 10mM bzw. BSA: 1g L<sup>-1</sup>, (Die Messpunkte sind durch Hilfslinien verbunden).

BSA hat eine deutlich stabilisierende Wirkung auf die BAL [76] im Zwei-Phasensystem und wird daher im Experiment verwendet. Dagegen wirkt sich Ectoin [93, 158] nicht stabilisierend auf das Enzym aus.

#### 5.4.5.4 Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon im Zwei-Phasensystem

Anhand der Ergebnisse aus den vorigen Untersuchungen wird ein membrangestützter Zwei-Phasenreaktor entwickelt. Abbildung 5.70 zeigt schematisch den Aufbau des Reaktors.

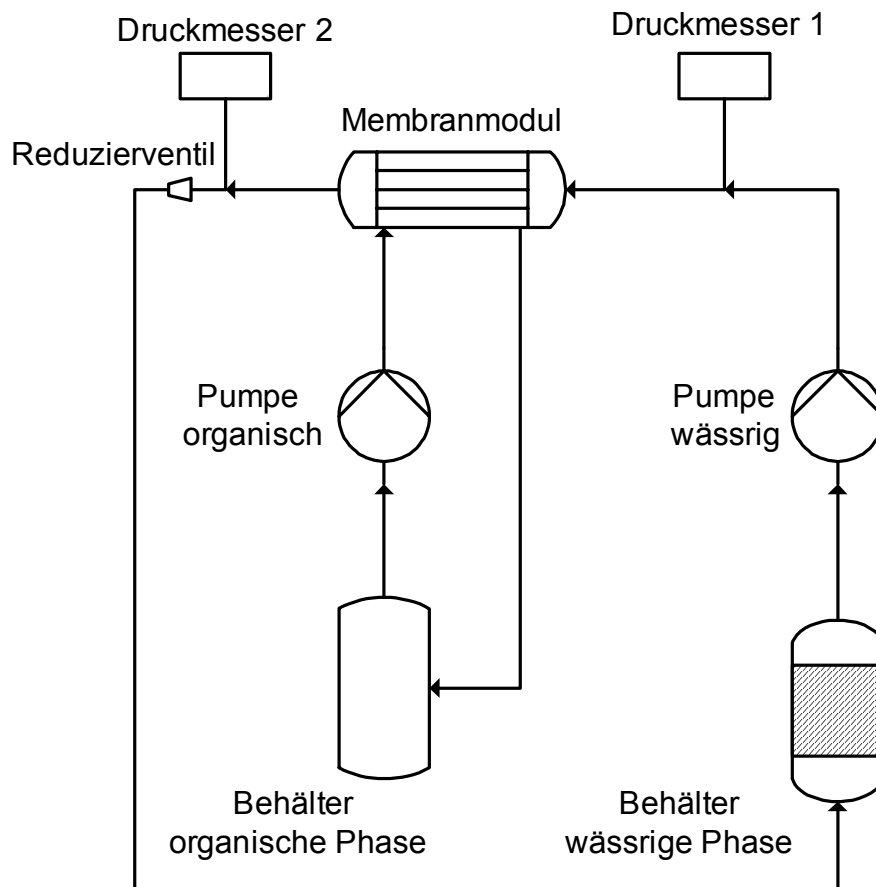
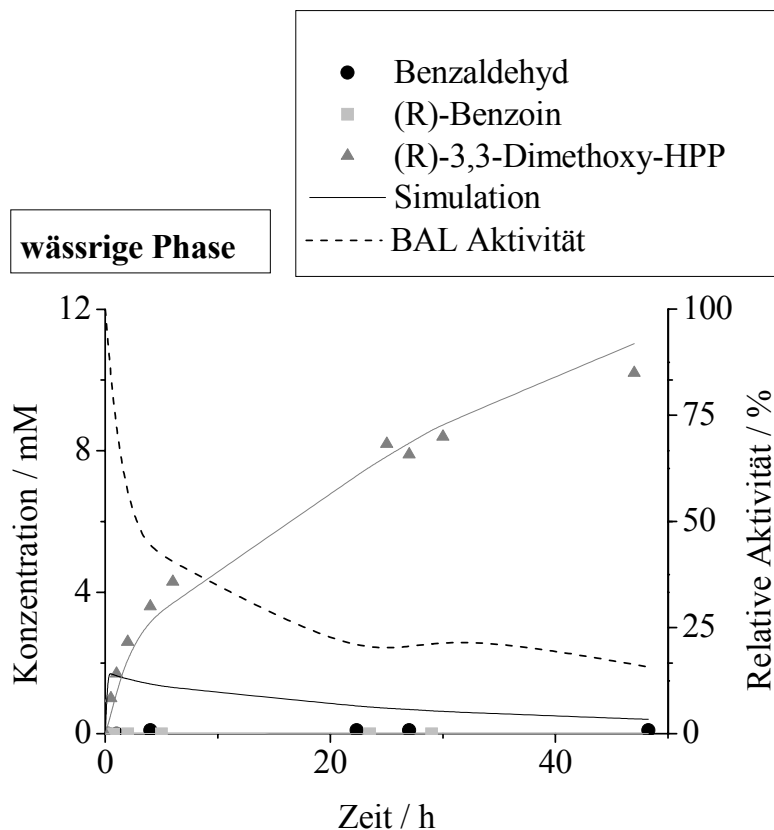


Abbildung 5.70: Schema des membrangestützten Zwei-Phasensystems

Die Synthese der HPPs im Zwei-Phasensystem wird beispielhaft an der Bildung von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP untersucht. Der Reaktionsverlauf kann mit dem in Kapitel 5.4.4.1 entwickelten kinetischen Modell unter Einbeziehung der Ergebnisse zur Simulation des Massentransports in Kapitel 5.4.5.2 beschrieben werden. Im Zwei-Phasensystem wird für die wässrige Phase und die organische Phase jeweils ein Konzentrations-Zeit-Diagramm erhalten (Abbildungen 5.71 und 5.72).

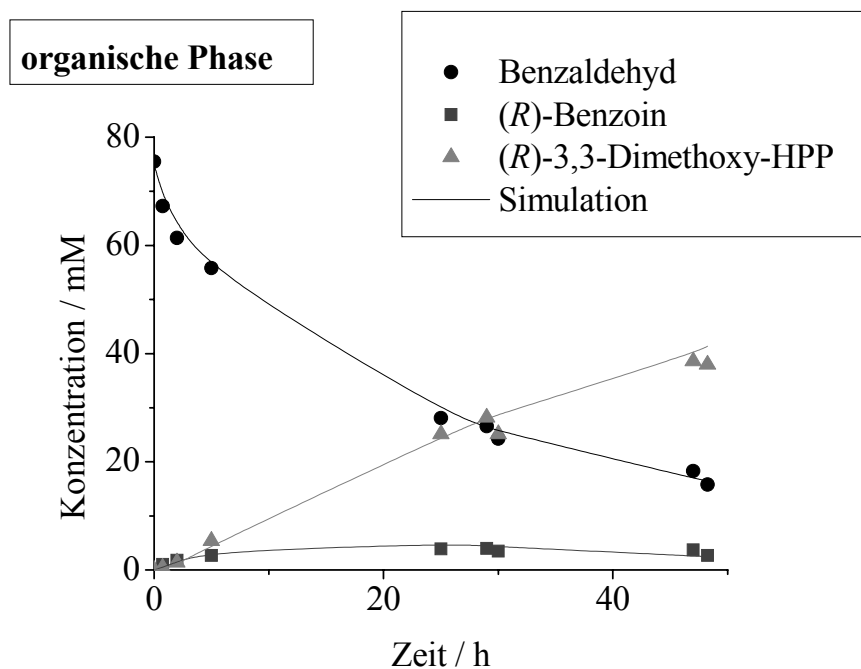




**Abbildung 5.71: Verlauf (R)-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese in der wässrigen Phase**

Reaktionsbedingungen: 200 ml Kpi-Puffer (50 mM) pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 50 ml MTBE, [E] = 0,8 mg mL<sup>-1</sup>; [BSA] = 1 mg mL<sup>-1</sup>; 100 mM Benzaldehyd, 100 mM Dimethoxyacetaldehyd

Während die Aktivität des Enzyms bereits in den ersten Stunden des Versuchs deutlich abnimmt, geht die Aktivität nach ca. 5 Stunden deutlich langsamer zurück und nimmt nach 20 h in einen fast konstanten Wert an. Die Benzoinkonzentration ist in der Abbildung 5.71 fast null, sodass Simulation und Messwerte auf der Abszisse (X-Achse) liegen. Die Messwerte für die Benzaldehydkonzentration liegen unter Nachweisgrenze (HPLC), womit die Simulation deutlich von den experimentellen Werten abweicht.



**Abbildung 5.72: Verlauf (R)-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese in organischer Phase**

Reaktionsbedingungen: 200 ml Kpi-Puffer (50 mM) pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, 50 ml MTBE, [E] = 0,8 mg mL<sup>-1</sup>; [BSA] = 1 mg mL<sup>-1</sup>; 100 mM Benzaldehyd, 100 mM Dimethoxyacetaldehyd

Nach 48h wird bei einer volumetrischen Produktivität von 1,26 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ein Umsatz von 69 % bei einer Selektivität von 88 % erreicht. Die Enzymeffizienz liegt bei einer Gesamtwechselzahl von  $t_{tn} = 3.600$ .

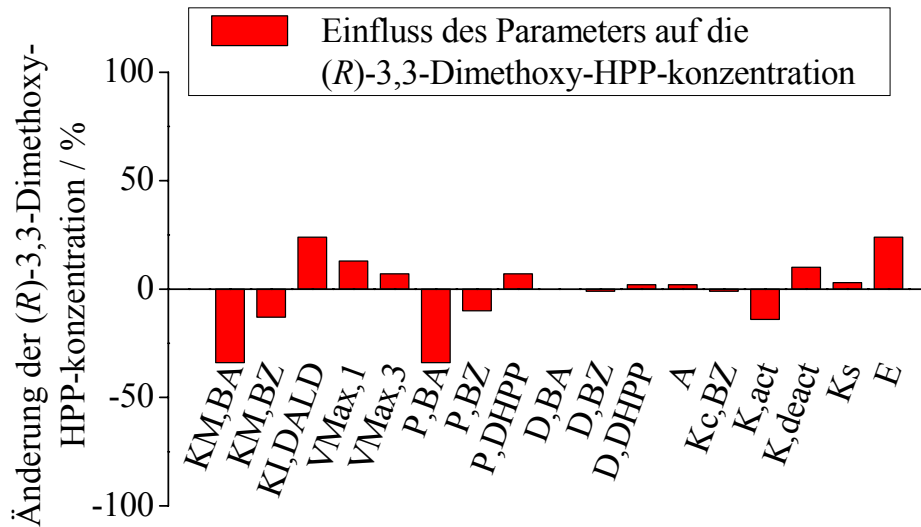
Durch Berücksichtigung der Benzoinkristallisation und des Massentransports können im Zwei-Phasensystem die Konzentrationsverläufe sowohl in der wässrigen Phase als auch in der organischen Phase simuliert werden. Die aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erhaltenen Parameter sind in dem erweiterten Modell gültig. Tabelle 5.18 zeigt die für die Simulation verwendeten Parameter.

Tabelle 5.18: Parameter zur Simulation der (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP-Synthese im Zwei-Phasensystem

Parameter	Abkürzung	Wert	Standard Abweichung	Dimension
Michaelis-Menten	$K_{M,BA}$	28	$\pm 7,8$	mM
Konstante	$K_{M,BZ}$	1,4	$\pm 0,5$	mM
Inhibierungskonstante	$K_{I,DALD}$	25	$\pm 1$	mM
Maximale	$V_{Max,1}$	447	$\pm 88$	$U\ mg^{-1}$
Geschwindigkeit	$V_{Max,3}$	43	$\pm 9,0$	$U\ mg^{-1}$
Verteilungskoeffizient	$P_{BA}$	40	$\pm 14$	--
	$P_{BZ}$	156	$\pm 57$	--
	$P_{(R)-3,3-}$ Dimethoxy-HPP	4	$\pm 0,5$	--
Stofftransportkoeffizient	$D_{BA}$	0,36	$\pm 0,012$	$dm^2 \cdot min^{-1}$
	$D_{BZ}$	0,38	$\pm 0,17$	$dm^2 \cdot min^{-1}$
	$D_{DHPP}$	0,024	$\pm 0,013$	$dm^2 \cdot min^{-1}$
Membranfläche	A	0,088	--	$dm^2$
Kristallisierungsrate	$k_c$	0,46	$\pm 0,13$	$min^{-1}$
Lösungsrate	$k_s$	0,046	$\pm 0,015$	$min^{-1}$
Enzym Aktivierungsrate	$k_{ACT}$	0,0026	$\pm 0,0014$	$min^{-1}$
	$k_{DEACT}$	0,0023	$\pm 0,0017$	$min^{-1}$

Der Massentransferkoeffizient und Verteilungskoeffizient für (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wird durch Anpassung an den Reaktionsverlauf erhalten. Das Produkt (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP hat im Vergleich zum Substrat Benzaldehyd und zum Intermediat Benzoin den kleinsten Verteilungskoeffizienten. Somit ist es vergleichsweise hydrophil. Der Massentransferkoeffizient ist im Vergleich zu Benzoin und Benzaldehyd eine Größenordnung kleiner. (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP passiert die hydrophobe Membran bzw. Phasengrenze somit langsamer als Benzoin.

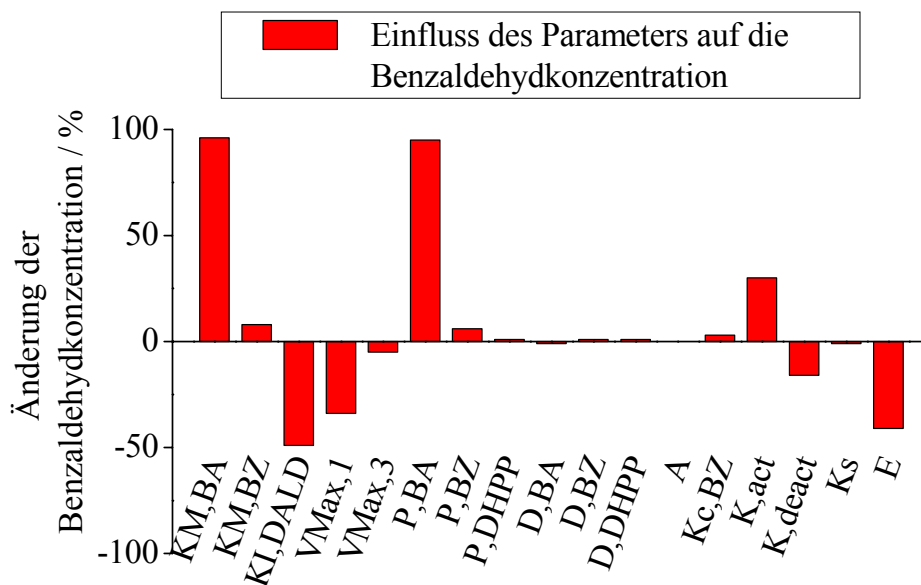
Um den Einfluss aller Parameter der Simulation auf die Reaktion zu bestimmen, wird eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt (Abbildungen 5.73 und 5.74). Die Parameter werden jeweils um 50 % erhöht, während alle anderen Parameter konstant gehalten werden. Anschließend wird jeweils eine Simulation durchgeführt und der Einfluss auf die Endkonzentration an Produkt bzw. Substrat bestimmt.



**Abbildung 5.73: Sensitivitätsanalyse: Änderung der (R)-3,3-Dimethoxy-HPP-Konzentration**

Einfluss der Parametererhöhung (+ 50%) auf die Konzentration an (R)-3,3-Dimethoxy-HPP in der organischen Phase nach 50 h (Simulation mit Scientist)

Die Parameter mit dem größten Einfluss auf die Produktkonzentration am Reaktionsende sind die Reaktionsparameter  $K_{M,BA}$  und  $K_{I,DALD}$ , sowie  $P_{BA}$  (Verteilungskoeffizient) und  $E$  (Enzymkonzentration). Dagegen haben die Membranfläche und die Massentransferkoeffizienten praktisch keinen Einfluss auf die Produktkonzentration zu Reaktionsende.



**Abbildung 5.74: Sensitivitätsanalyse: Änderung der Benzaldehydkonzentration**

Einfluss der Parametererhöhung (+ 50%) auf die Konzentration an Benzaldehyd in der organischen Phase nach 50 h (Simulation mit Scientist)

Abbildung 5.74 verdeutlicht die Ergebnisse aus der vorigen Abbildung. Auch hier sind die entscheidenden Parameter  $K_{M,BA}$ ,  $K_{I,DALD}$ ,  $P_{BA}$  und  $E$ . Es wird bestätigt, dass der Massentransport nicht limitierend für die Umsetzung des Substrats ist. Der vergleichsweise niedrige Verteilungskoeffizient von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP (4) wirkt sich ebenfalls nicht limitierend auf das System aus.

Eine Möglichkeit, den Einfluss des diffusionsbedingten Massentransports, mit dem Einfluss der Reaktion zu vergleichen, ist die Bestimmung der Hatta-Zahl [9]. Dadurch können schnelle und langsame Reaktionen unterschieden werden und es wird Aufschluss erhalten, ob eine Reaktion in der Bulk-Phase oder an der Phasengrenzfläche abläuft. Schnelle Reaktionen ( $Ha > 3$ ) erfolgen an der Grenzfläche, langsame Reaktionen ( $Ha < 0,3$ ) in der flüssigen Bulk-Phase. Die Hatta-Zahl ist definiert durch:

$$Ha = \frac{1}{D_{BA}} * \sqrt{\frac{2}{n+1} * J_{BA} * [BA_{eq}]^{n-1} * k_r}$$

**Formel 5.16**

mit:

$D_{BA}$  = Stofftransportkoeffizient von Benzaldehyd

$J_{BA}$  = Diffusionskonstante von Benzaldehyd im Medium

$k_r$  = Reaktionsgeschwindigkeit

$n$  = Reaktionsordnung

$BA_{eq}$  = Gleichgewichtskonzentration in der wässrigen Phase

Da die Benzaldehydkonzentration in der wässrigen Phase sehr niedrig ist ( $< 1$  mM) liegt eine Reaktion erster Ordnung vor (vgl. Abbildung 5.1). Es gilt

$$k_r = v_{max} (2 * K_M)^{-1}$$

**Formel 5.17**

Formel 5.16 vereinfacht sich zu:

$$Ha = \frac{1}{D_{BA}} * \sqrt{J_{BA} \frac{v_{max}}{2 * K_{M,BA}}}$$

**Formel 5.18**

mit

$D_{BA} = 0,36 \text{ dm}^2 \text{ min}^{-1}$

$J_{BA} = 0,9 * 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

$v_{max} = 448$

$K_{M,BA} = 28 \text{ mM}$

ergibt sich:

$$Ha = \frac{1}{0,36} * \sqrt{0,9 * 10^{-9} \frac{448}{2 * 28}} = 0,000033 = 3,3 * 10^{-4}$$

Die Hatta-Zahl ist somit kleiner als 0,3. Das zeigt, dass die Reaktion in der wässrigen Phase abläuft und durch den Massentransport limitiert werden könnte. Die zuvor durchgeführte

Sensitivitätsanalyse belegt jedoch, dass in diesem System die Reaktion aufgrund der niedrigen Substratkonzentration geschwindigkeitsbestimmend ist.

#### **5.4.5.5 Zusammenfassung membrangestütztes Zwei-Phasensystem**

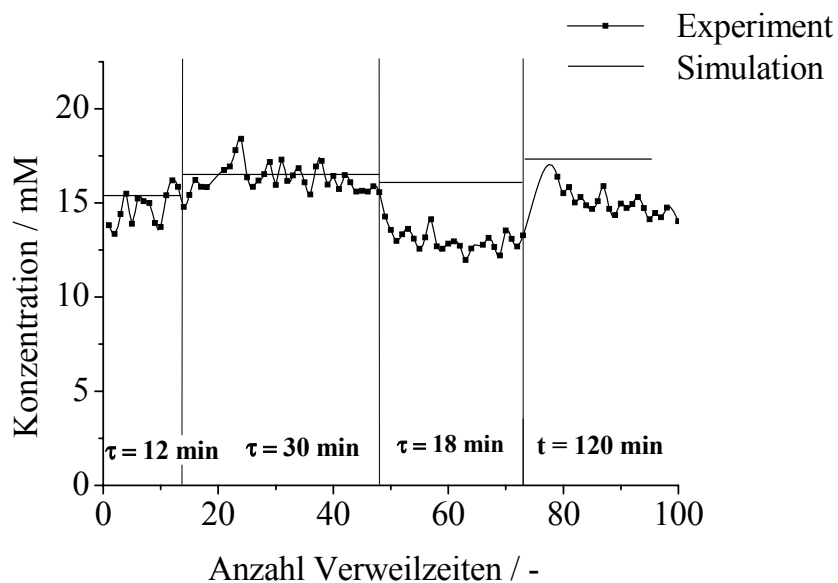
- Ein Membranreaktor wird für die Untersuchungen im Zwei-Phasensystem aufgebaut und zudem werden lösungsmittelstabile Hohlfasermodule entwickelt.
- Durch Berücksichtigung der Benzoinkristallisation, des Massentransports und der Enzymaktivität wird die Gültigkeit der aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erhaltenen Parameter gezeigt.
- Anhand einer Sensitivitätsanalyse der Parameter werden Limitierungen des Reaktionssystems ermittelt. Limitierend für die Synthese ist die Affinität der BAL an Benzaldehyd ( $K_{M,BA}$ ), die Inhibierung durch den aliphatischen Aldehyd ( $K_{I,DALD}$ ), der Verteilungskoeffizient von Benzaldehyd ( $P_{BA}$ ) und die Enzymkonzentration ( $E$ ).
- Die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wird jedoch nicht durch den Massentransport limitiert

#### **5.4.6 Darstellung von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen im Enzym-Membran-Reaktor**

Anhand der Daten aus diesen Experimenten soll das entwickelte kinetische Modell in einem kontinuierlich geführten Reaktor überprüft werden. Die experimentell erhaltenen Daten werden mit dem vereinfachten kinetischen Modell (Kapitel 5.4.4.) überprüft.

##### **5.4.6.1 Kontinuierliche Synthese von (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-hydroxypropanon**

Bei der Synthese von (*R*)-3-Chlor-HPP im Satzreaktor wurde gezeigt, dass ein vierfacher Überschuss an Acetaldehyd für einen vollständigen Umsatz ausreicht. Abbildung 5.75 zeigt die Produktkonzentration am Reaktorauslauf für verschiedene Verweilzeiten.



**Abbildung 5.75: Konzentration an (*R*)-3-Chlor-HPP bei der Synthese im kontinuierlichen Membranreaktor**

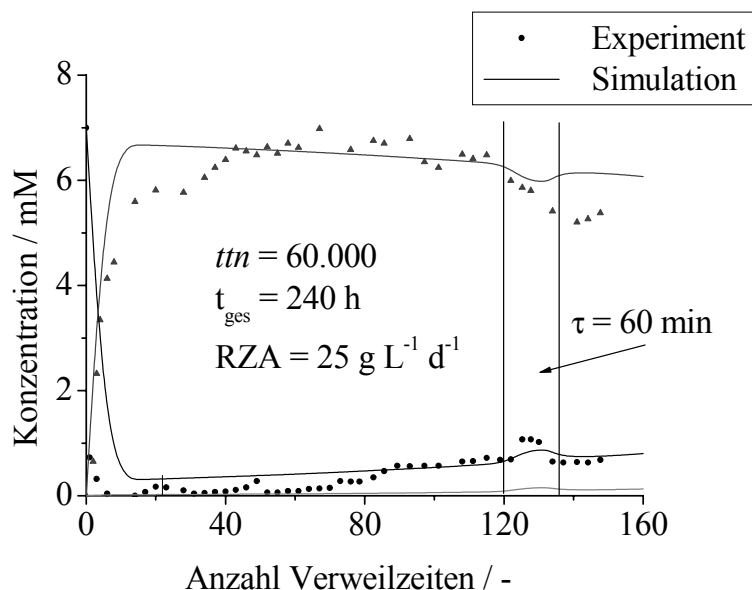
Reaktionsbedingungen: K<sub>pi</sub>-Puffer (50 mM), + 30 vol % DMSO, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, [E] = 2 mg mL<sup>-1</sup>; V = 10 ml, 18 mM 3-Chlorbenzaldehyd, 80 mM Acetaldehyd

Die horizontalen Linien in Abbildung 5.75 entsprechen der Produktkonzentration der Simulation. Sie sind in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Nach 50 Verweilzeiten weichen die Simulation und die experimentellen Daten durch die Inaktivierung des Enzyms ab, die im Modell nicht berücksichtigt wird.

Das Gleichgewicht wird für vier verschiedene Verweilzeiten von 12, 18, 30, 120 min eingestellt. Nach 100 Verweilzeiten werden 2,6 g (7,9 mmol) (*R*)-3-Chlor-HPP erhalten. Bei 12 min Verweilzeit wird die maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 330 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erreicht. Die Konzentration an (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin liegt stets unter 0,3 mM, was zu einer Selektivität von über 95 % führte.

Bei einer Verweilzeit von über 30 min wird am Reaktorauslass ausschließlich (*R*)-3-Chlor-HPP gemessen. Bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge von 18 mg Protein (MW (BAL) = 59 kDa) wird eine Gesamtwechselzahl von 43.000 erreicht.

Die Verwendung von DMSO als Cosolvens erschwert die Aufarbeitung des Produkts. Dagegen ist MTBE durch Verdampfung im Vakuum leicht vom Produkt zu trennen. Daher wird die Eignung von MTBE als Cosolvens bei der Synthese von HPPs im EMR untersucht. Abbildung 5.76 zeigt die Produktkonzentration am Reaktorauslauf.



**Abbildung 5.76: MTBE als Cosolvens**

Reaktionsbedingungen: Kpi-Puffer (50 mM), + 5 vol % MTBE, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, [E] = 1,8 mg mL<sup>-1</sup>; [BSA] = 1 mg mL<sup>-1</sup>; V = 10 ml, 8 mM 3-Chlorbenzaldehyd, 60 mM Acetaldehyd

Der EMR wird über 240 Stunden und 150 Verweilzeiten mit einer Enzymausbeute von  $ttn = 60.000$  betrieben. Beim Betrieb des EMRs mit MTBE als Cosolvens kommt es zu starkem Gegendruck, sodass der Reaktor überwiegend druckkontrolliert gefahren wird. Zwischen der 120sten und 140sten Verweilzeit kann vorübergehend eine konstante Verweilzeit von 60 min eingestellt werden. Sie wird auch durch die Simulation beschrieben. Danach verliert das Enzym an Aktivität und die Produktkonzentration am Reaktorauslass sinkt ab.

#### 5.4.6.2 Kontinuierliche Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon

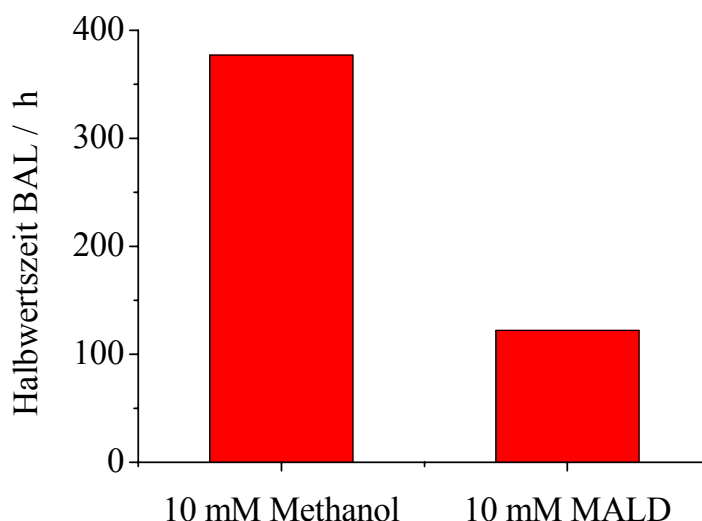
In einem ersten Experiment fällt der Umsatz nach wenigen Stunden Betriebsdauer unter 10 % und es wurde kein Gleichgewicht erreicht.

Bei der Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP, ausgehend von 4-Methoxybenzaldehyd und 100 mM Methoxyacetaldehyd als Substraten, liegt die Halbwertszeit der Enzymaktivität bei etwa vier Stunden. Wird die Konzentration von Methoxyacetaldehyd auf 10 mM reduziert, liegt die Halbwertszeit bei etwa 22 Stunden. Die anschließende Messung der Enzymstabilität in Gegenwart verschiedener Mengen an Methoxyacetaldehyd zeigt eine schnelle Desaktivierung, auch bei mäßigen Konzentrationen an Methoxyacetaldehyd.

Es wird untersucht, ob die Inhibierung reversibel ist. Dafür wird das Methoxyacetaldehyd durch dreimaliges Waschen mit Pufferlösung in einer Amiconzelle entfernt. Jedoch bleibt die Aktivität nach der Entfernung von Methoxyacetaldehyd niedrig und verbessert sich auch nach 16 h Lagerung nicht.



Daher wird die BAL durch Methoxyacetaldehyd irreversibel desaktiviert. Möglicherweise bindet Methoxyacetaldehyd an Aminogruppen des Enzyms, unter Ausbildung von Schiffbasen, während andere Substrataldehyde aufgrund sterischer Hinderung schadlos umgesetzt werden. Dadurch wird die Tertiärstruktur des Enzyms dauerhaft verändert und die Aktivität reduziert. Das für die bisherigen Experimente verwendete Methoxyacetaldehyd wurde durch Extraktion aus der Periodatspaltung (Kapitel 5.4.2.1) erhalten. Bei der Extraktion wurden möglicherweise Verunreinigungen in der Methoxyacetaldehyd Lösung angereichert und haben die BAL deaktiviert. Daher wird der Einfluss von Methoxyacetaldehyd, welches aus der Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan gewonnen wurde, auf die Stabilität untersucht. In dieser Lösung ist jedoch Methanol enthalten, das sich nachteilig auf die Enzymstabilität auswirken kann. Zunächst wird deshalb der Einfluss von Methanol auf die BAL isoliert untersucht, anschließend wird der Einfluss der aus der Hydrolyse erhaltenen Methoxyacetaldehyd Lösung untersucht (Abbildung 5.77).

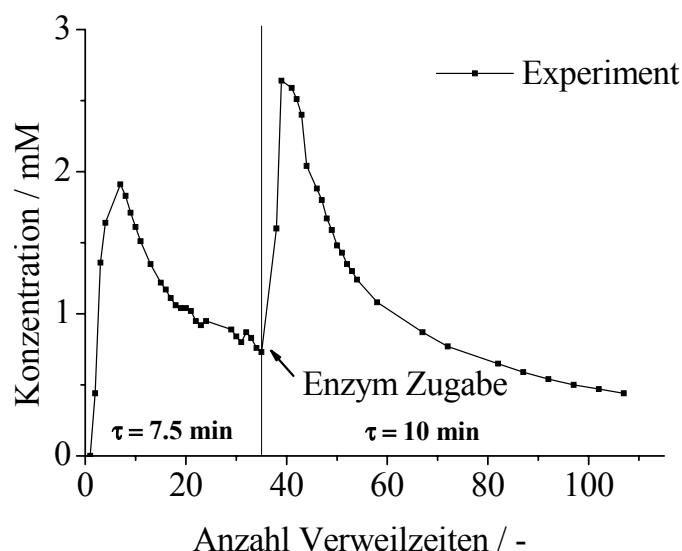


**Abbildung 5.77: Inhibierung der BAL durch Methanol und Methoxyacetaldehyd (aus Hydrolyse)**

Lagerbedingungen: Kpi-Puffer (50 mM), + 30 vol % DMSO, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, [E] = 0,2 mg mL<sup>-1</sup>; [BSA] = 1 mg mL<sup>-1</sup>; V = 10 ml; (MALD = Methoxyacetaldehyd)

Gegenüber der Lagerung in Puffer mit DMSO (Abbildung 2.20) verringert Methanol die Halbwertszeit der BAL deutlich. Da in dem Experiment die Lagerstabilität der BAL gemessen wird liegt kein Substrat vor und die BAL ist somit nicht katalytisch aktiv. Deshalb liegen die Halbwertszeiten höher als bei der Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP. Jedoch zeigt sich eine deutlich geringere Stabilität der BAL in Gegenwart von Methoxyacetaldehyd als in Gegenwart von Methanol.

Dennoch wird versucht die Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP im Membranreaktor durchzuführen, indem die Substratlösung des Zulaufs verdünnt und die Enzymmenge erhöht wird. Ziel ist es, durch eine schnelle Umsetzung des Substrats, kurze und möglichst viele Verweilzeiten zu realisieren. Abbildung 5.78 zeigt die Produktkonzentration am Auslauf.



**Abbildung 5.78: Synthese von (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP im kontinuierlichen Membranreaktor**

Reaktionsbedingungen: K<sub>pi</sub>-Puffer (50 mM), + 30 vol % DMSO, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, [E] = 2 mg mL<sup>-1</sup>; V = 10 ml; 2 mM 4-Methoxybenzaldehyd, 20 mM Methoxyacetaldehyd, nach Enzymzugabe (2 mg mL<sup>-1</sup>), 3 mM 4-Methoxybenzaldehyd und 10 mM Methoxyacetaldehyd

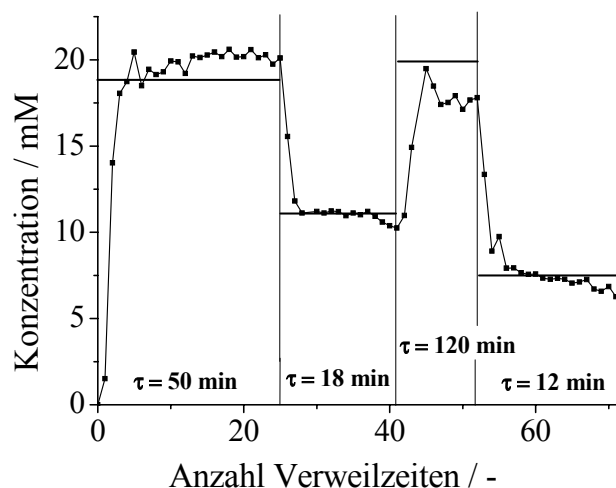
Die Datenpunkte sind für eine bessere Übersichtlichkeit durch eine Linie verbunden.

Trotz der reduzierten Konzentration des Inhibitors Methoxyacetaldehyd und einer Verweilzeit von 7,5 min fällt die Produktkonzentration nach wenigen Stunden. Deshalb werden 28 mg BAL nachdosiert und die Konzentration an Methoxyacetaldehyd wird auf 10 mM gesenkt, während die Konzentration an 4-Methoxybenzaldehyd auf 3 mM erhöht wird. Nach der Erhöhung der Verweilzeit auf 10 min erhöht sinkt der Umsatz im Reaktionsverlauf durch zunehmende Enzymdeaktivierung ebenfalls ab. Die Anreicherung von (*R*)-4,4'-Dimethoxy-Benzoin wird erfolgreich vermieden, wobei eine maximale Konzentrationen von 1,4 mmol (*R*)-4,4'-Dimethoxy-Benzoin gemessen wird.

Insgesamt werden 0,25g (1,2mmol) (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP bei einer *t<sub>tn</sub>* von 1.200 erhalten. Da sich kein *steady-state* einstellt, ist die Formulierung einer Raum-Zeit-Ausbeute nicht sinnvoll.

#### 5.4.6.3 Kontinuierliche Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanon

Abbildung 5.79 zeigt den Reaktionsverlauf für die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP, für fünf verschiedene Verweilzeiten von  $t = 12, 18, 30, 50$  und 120 Minuten.



**Abbildung 5.79: Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP im kontinuierlichen Membranreaktor**

Reaktionsbedingungen: Kpi-Puffer (50 mM), + 30 vol % DMSO, pH = 8, 0,5 mM ThDP, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, T = 20 °C, [E] = 2 mg mL<sup>-1</sup>; V = 10 ml; 21 mM Benzaldehyd, 60 mM Dimethoxyacetaldehyd. Die Verweilzeit wurde verändert, um verschiedene Umsätze zu realisieren. Zur besseren Übersicht sind die Datenpunkte durch eine Linie verbunden.

Bei einer Katalysatorausnutzung von  $ttn = 25.000$  werden nach 80 Verweilzeiten 2,8 g (13,3 mmol) (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP erhalten. Durch eine kurze Verweilzeit wird eine maximale Raum-Zeit-Ausbeute von 188 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erzielt. Das entwickelte kinetische Modell ermöglicht eine gute Beschreibung des experimentellen Reaktionsverlaufs

#### 5.4.6.4 Zusammenfassung: Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen im Enzym-Membran-Reaktor

- Es wurde ein Reaktorkonzept entwickelt, das die Synthese von HPP-Derivaten in einem kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor (EMR) ermöglicht.
- Aufgrund der Substratinhibierung durch aliphatische Aldehyde ist der CSTR optimal für die HPP-Synthese geeignet.
- Alle Produkte wurden im Gramm-Maßstab und bei mäßigem Enzymverbrauch (18 – 56 mg) synthetisiert.
- Das für die Simulation des Satzreaktors verwendete Modell (Kapitel 5.4.4) eignet sich gut zur Vorhersage des Reaktionsverlaufs im EMR.
- MTBE wird als Cosolvens für die (*R*)-3-Chlor-HPP-Synthese im EMR mit 160 Verweilzeiten und einer Gesamtwechselzahl von  $ttn = 60.000$  eingesetzt.

#### 5.4.7 Folgechemie für 2-Hydroxy-1-phenylpropanone

Abbildung 5.80 zeigt die Synthese von Hydroxybupropion aus (*R*)-3-Chlor-HPP.

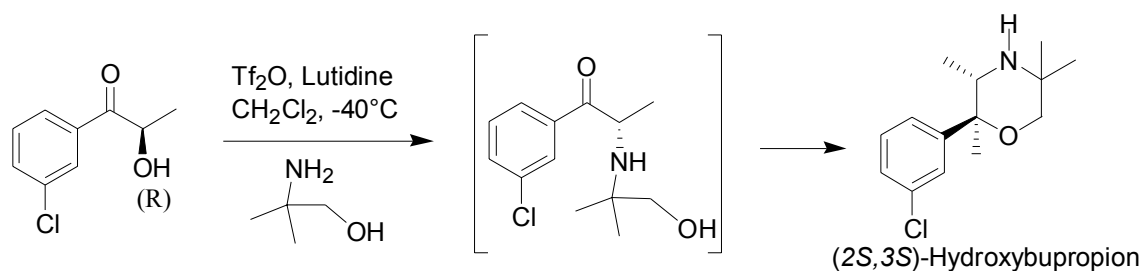


Abbildung 5.80: Synthese von Hydroxybupropion

Hydroxybupropion ist ein hydroxylierter und biologisch aktiver Metabolit von Bupropion. Da 2-Amino-2-methyl-1-propanol bereits bei Raumtemperatur als Feststoff vorliegt, wird die in der Literatur [53] angegebene Vorschrift optimiert. Zunächst werden alle Substrate bei  $-40^\circ\text{C}$  im Lösungsmittel gelöst, entsprechend der Vorschrift in Kapitel 4.2.4.4. Zum Start der Reaktion wird die Temperatur anschließend auf  $25^\circ\text{C}$  angehoben. Der Nachweis des Produkts erfolgt mittels NMR, jedoch liegt kein Ergebnis über die Stereochemie des Hydroxybupropion vor. In der Literatur wird berichtet, dass das Produkt bei Raumtemperatur bereits nach etwa 30 h racemisiert ist [53]. Durch Säulen über Kieselgel werden 0,8 g Hydroxybupropion aufgereinigt, was einer Ausbeute von 41 % entspricht (Literatur 60 %).

### Kostenschätzung für Synthese von Hydroxybupropion

Eine Preisrecherche am Markt<sup>7</sup> (ergab einen Herstellungspreis von  $1\text{€ g}^{-1}$ ):

Tabelle 5.19: Herstellungskosten Bupropion

Preisermittlung Bupropion	
Menge Bupropion pro Tablette	130 mg
Apothekenpreis pro Tablette	1,30 €
	das entspricht 10 € pro 1 g
Herstellungskosten	10 % vom Apotheken preis
	→ 1 € pro 1 g Bupropion

Es wurde angenommen, dass die Herstellungskosten pharmazeutischer Produkte bei etwa 10% des Apothekenpreises liegen [203], wodurch sich ein Preis von 1 €/g Bupropion in der konventionellen Synthese ergibt. Für die Biotechnologische Synthese von Hydroxybupropion ergibt sich folgende Schätzung:

<sup>7</sup> Quelle: [www.shop-apotheke.de](http://www.shop-apotheke.de) (am 22.11.2006)

**Tabelle 5.20: Herstellungskosten für die biotechnologische Synthese von Hydroxybupropion**

Biotechnologische Synthese	
Fermentation BAL (300 L-Ansatz): 1.000g BAL = 10.000g ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP (Preis für Fermentation von AC-Biotech 5792€)	0,58 € g <sup>-1</sup>
Kosten für Aufarbeitung von ( <i>R</i> )-3-Chlor-HPP aus Synthese mit BAL-Rohextrakt (geschätzt)	0,10 € g <sup>-1</sup>
Chemikalien Folgechemie <sup>8</sup> (Preise: Sigma-Aldrich, 2006)	0,3 € g <sup>-1</sup>
Kostenschätzung für Aufarbeitung (Material und Arbeitszeit) von Hydroxybupropion aus Folgesynthese: Ausbeute 40 %	2,5x0,1 € g <sup>-1</sup> = 0,25 €
Summe	~1,2 € g <sup>-1</sup>

Bei der Nutzung der BAL zur Synthese von Hydroxybupropion fallen weniger als 50 % der Gesamtkosten (1,2 € g<sup>-1</sup>) für den biotechnologischen Syntheseschritt von (*R*)-3-Chlor-HPP an. Bei der kostenintensiveren Folgechemie müssten die Ausbeute der Reaktion verbessert und die Kosten der Aufarbeitung von Hydroxybupropion gesenkt werden, um den Prozess kostengünstiger zu gestalten. Größtes Potential zur Kostensenkung bei den Chemikalien für die Folgechemie bietet 2-Amino-2-methyl-1-propanol, das mit 0,3 € g<sup>-1</sup> in die Kalkulation eingeht. Möglicherweise ist es vorteilhaft das 2-Amino-2-methyl-1-propanol selbst zu synthetisieren. Der hier gezeigte biotechnologische Syntheseweg liegt lediglich 20 % über den Kosten für den konventionellen Syntheseweg von Bupropion.

#### 5.4.8 Zusammenfassung 2-Hydroxy-1-phenylpropanone

- Die Synthesen von (*R*)-3-Chlor-HPP, (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP und (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wurden in ihren Teilreaktionen durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten kinetisch charakterisiert (vgl. Kapitel 5.4.3).
- Die daraus erhalten kinetischen Parameter wurden zur Beschreibung des Reaktionsverlaufs in Satzreaktoren mittels eines vereinfachten Modells verwendet und optimiert (vgl. Kapitel 5.4.4).
- Am Beispiel der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wurde das Modell erweitert und die Kristallisation von Benzoin sowie die Enzymdesaktivierung berücksichtigt. Dadurch wurde die Gültigkeit der kinetischen Parameter aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gezeigt.
- Die Stabilität der BAL, die Verteilungskoeffizienten und der Stofftransport im Zwei-Phasensystem wurden untersucht.
- Ein membrangestützter Zwei-Phasenreaktor wurde aufgebaut und lösungsmittelstabile Hohlfaserkontakoren entwickelt. In 50 h wurden dabei 0,7 g (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP synthetisiert ( $t_{tn} = 750$ ;  $RZA = 1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ).

<sup>8</sup> Im technischen Maßstab rechnet man ungefähr 10 % der Preise von Sigma-Aldrich, die hier zugrunde liegen (116. Lütz, S., *Persönliche Mitteilung*. 2006.

- Bei der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wurden im Zwei-Phasenreaktor die Löslichkeiten der Substrate und Produkte verbessert und der Reaktionsverlauf unter Berücksichtigung der Kristallisation, Desaktivierung und des Massentransports in beiden Phasen beschrieben.
- Die Reaktionen zur HPP-Synthese wurden im EMR durchgeführt und theoretisch durch das in Kapitel 5.4.4 entwickelte Modell beschrieben.
- Es wurde gezeigt, dass DMSO im EMR durch MTBE ersetzt werden kann.
- Aus enzymatisch hergestelltem (*R*)-3-Chlor-HPP wurden in einer Folgesynthese 100 mg Hydroxybupropion hergestellt.

## 6 Diskussion

Im Folgenden wird die reaktionstechnische Charakterisierung und Auswahl geeigneter Reaktorkonzepte für die Synthese relevanter Produkte (vgl. Abbildung 2.5) durch die enzymatische C-C-Knüpfung erörtert. Im Rahmen der Arbeiten wurden die Synthesen dreier teilweise substituierter Benzoinen (Abbildung 2.4) sowie dreier substituierter 2-Hydroxy-1-phenylpropanone (Abbildung 2.6) untersucht. Durch die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden detaillierte kinetische Parameter bestimmt, und anhand von stationären und instationären Reaktionsverläufen experimentell sowie im Modell überprüft. Weiterhin werden die Löslichkeit der hydrophoben Reaktanden, Ansätze zur Steigerung der Substratkonzentration im Reaktor und die Stabilität des Enzyms beeinflussende Faktoren eingehend diskutiert. Darauf aufbauend wurden verschiedene Reaktorkonzepte entwickelt und hinsichtlich Enzymeffizienz und Produktivität, unter technologisch realen Bedingungen, optimiert [68, 100].

### 6.1 Charakterisierung der Benzoin synthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese des unsubstituierten (*R*)-Benzoins, des symmetrisch substituierten (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und des unsymmetrisch substituierten (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin untersucht (Abbildung 2.4).

Da die BAL sowohl über eine Lyase- als auch eine Ligaseaktivität verfügt, wurde sowohl die Bildung als auch die Spaltung der Benzoinen untersucht. Für die kinetischen Untersuchungen wurden die Reaktionssysteme daher in Einzelreaktionen zerlegt. Zur Verbesserung der Löslichkeit der beteiligten hydrophoben Reaktanden im wässrigen Reaktionsmedium wurde DMSO als Cosolvens verwendet. Die Gegenwart von Lösungsmitteln bei enzymkatalysierten Reaktionen beeinflusst die Kinetik der katalysierten Reaktion [76]. So ist bei Zugabe von DMSO der  $K_M$ -Wert und der  $V_{max}$ -Wert gegenüber der Synthese in reinem Puffer erhöht (Abbildung 5.3). Das bedeutet eine geringere Substrataffinität bei der Verwendung von DMSO als Cosolvens, die durch eine erhöhte Substratkonzentration und durch das gesteigerte  $V_{max}$  mehr als kompensiert wird und somit höhere Reaktionsraten ermöglicht.

Die Zugabe von MTBE als Cosolvens verringert den  $K_M$ -Wert und den  $V_{max}$ -Wert gegenüber der Synthese in reinem Puffer (Abbildung 5.3). Bei Substratkonzentrationen unter 10 mM ist der Einfluss der Lösungsmittel auf die Reaktionsgeschwindigkeit gering. Bei höheren Konzentrationen unterscheiden sich die Reaktionsraten in den drei untersuchten Reaktionsmedien, jedoch ist  $V_{max}$  aufgrund der begrenzten Substratlöslichkeit stets ein theoretischer Wert. Im Bereich der Substratlöslichkeit wird kein Sättigungseffekt erreicht, wodurch die maximal erreichbare Reaktionsrate in den Systemen entscheidend limitiert wird.

Für die Benzoinspaltung wurden deutlich niedrigere kinetische Konstanten als für die Benzoinbildung gefunden (Abbildungen 5.1, 5.2, 6.1). Das bedeutet, dass die Benzoinen eine deutliche höhere Substrataffinität haben als die korrespondierenden Benzaldehyde. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Benzoinen im wässrigen Reaktionsmedium waren die experimentellen Arbeiten erschwert. Jedoch wurde trotz der geringen Löslichkeit für die Benzoinen ein deutlicher

Sättigungseffekt durch das Substrat erreicht. Somit liegt das  $V_{\max}$  der Benzoinspaltung um eine Größenordnung unter dem  $V_{\max}$  der Benzoinbildung.

Für die symmetrischen Synthesen von (*R*)-Benzoin und (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin aus zwei Substratmolekülen konnten sowohl für die Bildungsreaktion als auch für die Spaltungsreaktion die kinetischen Parameter bestimmt werden (Abbildungen 5.4, 5.5, 6.1).

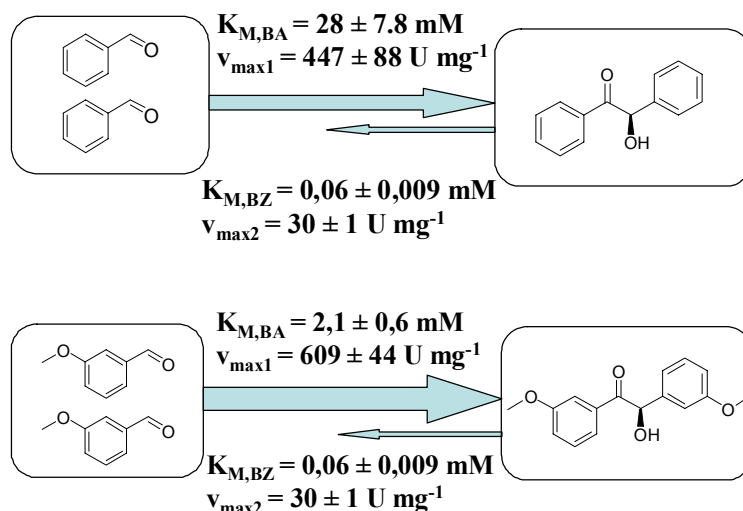


Abbildung 6.1: Kinetische Parameter der Synthese von Benzoin(derivaten) im Vergleich

Bei 3-Methoxybenzaldehyd handelt es sich um ein nicht natürliches Substrat und es wäre zu erwarten, dass es durch die Methoxygruppe gegenüber dem natürlichen Substrat Benzaldehyd sterisch benachteiligt ist. Jedoch wird 3-Methoxybenzaldehyd besser und schneller durch die BAL umgesetzt als Benzaldehyd.

Die Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ist eine nicht vollständig chemoselektive Reaktion, bei der nicht nur das gewünschte Produkt (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin sondern auch die symmetrischen Benzoinen (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin und (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin entstehen [43] (Vgl. Kapitel 5.1.1.5 und Abbildung 6.2). Das (*R*)-2-Chlor-3'-methoxybenzoin wird nicht gebildet. Zur Charakterisierung der Reaktion wurde sie in sechs Teilreaktionen unterteilt. Dabei war es nicht möglich, die kinetischen Parameter der Spaltung des Nebenprodukts (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin zu bestimmen, da es zu einer schnellen Oxidation von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin zu 2,2'-Di-Cl-benzil kam (Kapitel 5.1.1.5). Für die Bildung von (*R*)-2,2'-Dichlor-benzoin wurde ein linearer Zusammenhang gefunden. Der mechanistische Grund für die lineare Anpassung liegt in den hohen  $K_M$ -Werten von Enzymen für nicht-natürliche Substraten. Deshalb erfolgt die Messung im gesamten Löslichkeitsbereich des Substrats unterhalb des  $K_M$ -Werts, weshalb die Datenlage und folglich die Anpassung nur unzureichend erfolgen kann. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in früheren Untersuchungen zur enzymatischen C-C-Knüpfung gezeigt [73, 182].



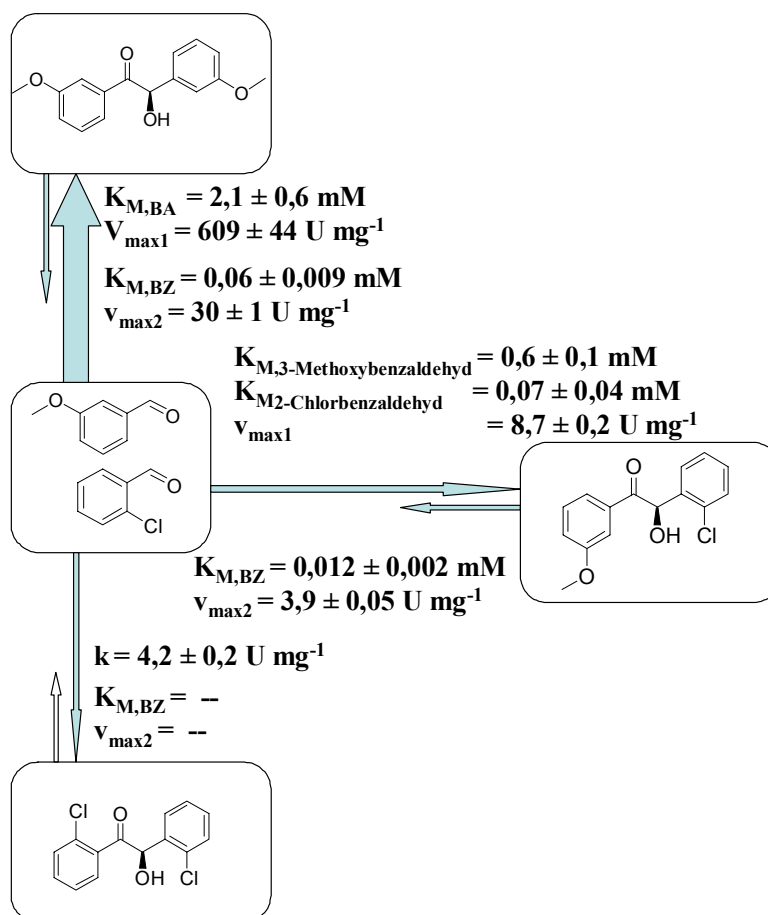


Abbildung 6.2: Kinetische Parameter der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die Selektivität der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin liegt bei äquimolarem Einsatz der Substrate bei etwa 70 %. Kinetisch sind die Nebenprodukte und insbesondere das (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin begünstigt. Sowohl durch Erhöhung als auch durch Absenkung des Substratverhältnisses, wird die Selektivität thermodynamisch zu Gunsten der Nebenprodukte verschoben (Abbildung 5.17). Deshalb ist es für die Reaktionsführung optimal, die Substrate in gleichen Verhältnissen zuzugeben.

Weiterhin wurde das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktionen untersucht. Hierbei ist zu betonen, dass die thermodynamische Gleichgewichtskonstante nur für homogene, also einphasige Systeme gültig ist. Bei Ausfällung der Reaktionsprodukte wird das Gleichgewicht der Reaktion verschoben und es kann ein scheinbares Gleichgewicht berechnet werden, das hier mit *K* bezeichnet wird. Bei der Synthese der Benzoinen liegt das Gleichgewicht, wie Tabelle 5.6 zeigt, auf der Produktseite. Das Gleichgewicht der Gesamtreaktion der Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin konnte aufgrund der Bildung von Nebenprodukten nicht ermittelt werden. Daher wurde die Reaktion formal in 3 Teilreaktionen getrennt und davon jeweils die Gleichgewichtskonstante bestimmt (gekoppelte Gleichgewichte). Erhöhte Substratkonzentrationen führen zu einem scheinbar höheren Gleichgewicht und sind daher vorteilhaft für die Synthese der Benzoinen.

## 6.2 *Synthese von Benzoinen*

### 6.2.1 Simulation und Untersuchung des Reaktionssystems

Anhand der experimentell bestimmten kinetischen Parameter wurde ein nicht-lineares Modell nach Michaelis-Menten entwickelt und beispielhaft am Reaktionsverlauf der Bildung von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in einem Satzreaktor überprüft (Abbildung 5.21). Die für das Modell ermittelten Basisdaten wurden aus Experimenten erhalten, die innerhalb der Löslichkeitsgrenzen der beteiligten Reaktanden durchgeführt wurden. Das Modell ist daher zunächst für die Simulation von Synthesen geeignet, die während des gesamten Reaktionsverlaufes einphasig sind.

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Benzoinen kommt es bei Substratkonzentrationen über 2 mM im Satzreaktor bei der Benzoinensynthese zur Präzipitation der Benzoinen. Dies wurde in Experimenten mit höheren Substratkonzentrationen beobachtet und durch eine Erweiterung des Modells als Kristallisation berücksichtigt (Kapitel 5.2.3). Die für die Simulation der Kristallisation erforderlichen Parameter wurden durch Anpassung an den Satzreaktor bestimmt (Tabelle 5.8, Abbildung 6.3). Durch die Berücksichtigung der Kristallisation im Modell werden die Vorgänge im Reaktor genauer beschrieben und es können die kinetischen Parameter aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit überprüft werden.

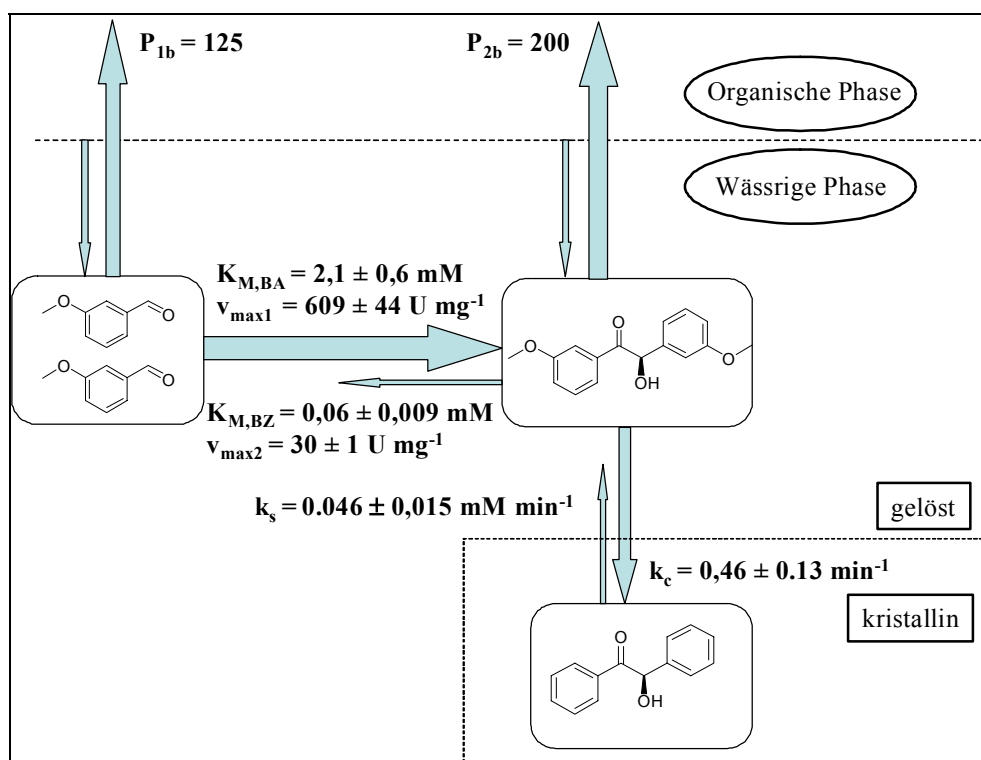
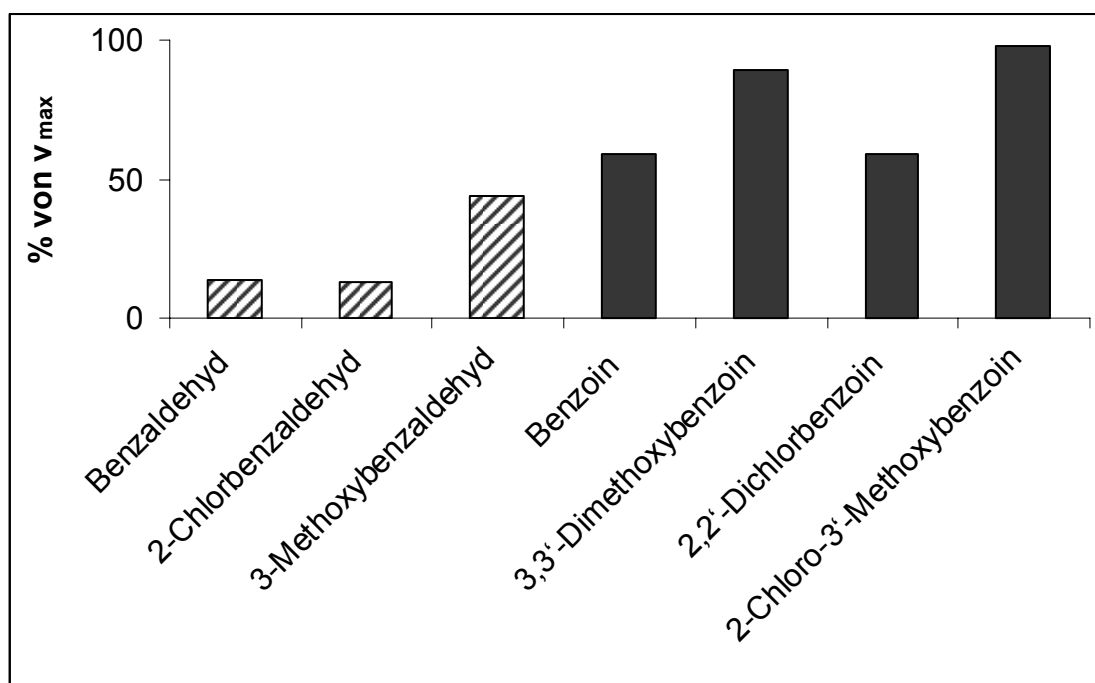


Abbildung 6.3: Reaktionssystem zur Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin

Für die Reaktionsführung im Reaktor kann es nachteilig sein, wenn es im Reaktionsverlauf zur Ausfällung von Feststoffen kommt, die z.B. Leitungen blockieren können. Weiterhin lassen sich in der wässrigen Phase auch bei Verwendung von Cosolventien nur vergleichsweise niedrige Substratkonzentrationen lösen. Höhere Substratkonzentrationen sind wünschenswert um

beispielsweise höhere Reaktions-geschwindigkeiten oder Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen. Daher wurde ein heterogenes wässrig-organisches Reaktionssystem für die Benzoin synthese untersucht und die Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten der Reaktanden im Zweiphasensystem charakterisiert (Abbildungen 5.23 und 5.24). Die Benzoin und Benzaldehyd werden aufgrund hoher Verteilungskoeffizienten sehr gut aus der wässrigen Phase extrahiert. In Abbildung 6.4 werden die Reaktionsgeschwindigkeiten der BAL in der wässrigen Phase unter Berücksichtigung der Verteilungskoeffizienten dargestellt. Für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten der BAL, werden in der organischen Phase (MTBE) Substratkonzentrationen von 500 mM für die Aldehyde und 200 mM für die Benzoin angenommen. Aus den Verteilungskoeffizienten (vgl. Abbildung 5.24) ergeben sich die Konzentrationen in der wässrigen Phase. Diese gehen als Substratkonzentrationen in die Michaelis-Menten-Kinetik ein.



**Abbildung 6.4:** Reaktionsgeschwindigkeiten der BAL in Prozent der Maximalgeschwindigkeiten in der wässrigen Phase

Abbildung 6.4 zeigt, dass die Umsetzung der aromatischen Aldehyde im Zweiphasensystem stärker beeinflusst wird als die Umsetzung der Benzoin. Dem Entzug des Substrats aus der wässrigen Phase kann durch Einstellung einer hohen Substratkonzentration im Reaktionsansatz entgegengewirkt werden.

Bei der Untersuchung der Synthese von Benzoinen im wässrig-organischen Zweiphasensystem war die maximale Konzentration der BAL auf etwa  $1 \text{ mg L}^{-1}$  limitiert, da es bei höheren Konzentrationen zu stabiler Emulsionsbildung kam. Diese Emulsion war nicht analysierbar und darüber hinaus kann vermutet werden, dass der Stofftransport in diesem komplexen System an der stabilen Phasengrenzfläche limitierend ist.

In den durchgeführten Experimenten kam es zu einer schnellen Inaktivierung der BAL. Über eine schnelle Inaktivierung der BAL im Zweiphasensystem wurde bereits in früheren

Untersuchungen berichtet [182]. Jedoch wurde dort auch gezeigt, dass die Stabilität der BAL in Gegenwart von MTBE als zweite Phase bei 4°C um den Faktor 1.000 gesteigert werden kann. Daher wurde der Einfluss der thermischen Deaktivierung der BAL im Zweiphasensystem untersucht. Es zeigte sich, dass die Stabilität bei 20°C deutlich geringer ist als bei 4°C (Abbildung 5.27). Jedoch kann diese erhöhte Stabilität im Prozess nicht genutzt werden, da die Deaktivierung der BAL im Zweiphasensystem in Gegenwart von Substrat unabhängig von der Temperatur ist (Abbildung 5.28).

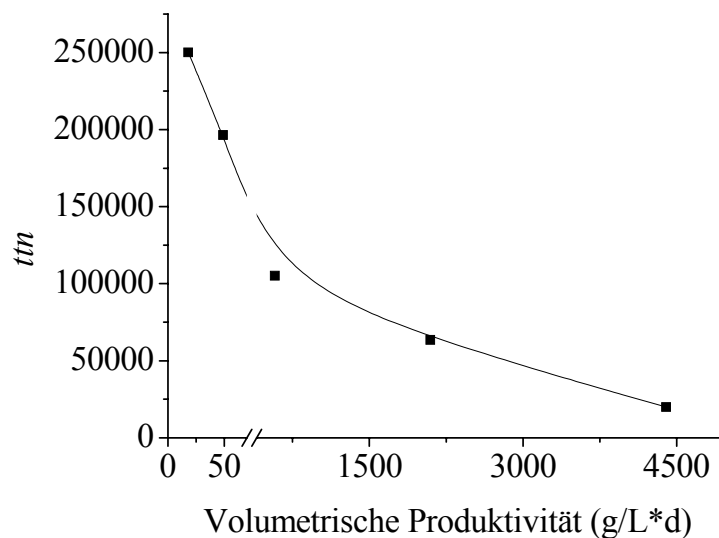
In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Phasengrenzfläche einen relevanten Einfluss auf die Stabilität der BAL hat (Abbildung 5.30). Hierfür wurde ein Reaktor entwickelt, mit dem die Größe Phasengrenzfläche gezielt beeinflusst werden kann (Abbildung 5.29). Die Stabilität der BAL im Zweiphasensystem sinkt mit der Vergrößerung der Phasengrenzfläche, was den *Scale up* eines Reaktors verhindert. Durch Einbringung einer Membran in das Zweiphasensystem kann die Stabilität der BAL im Zweiphasensystem verbessert werden. Da eine Membran den Stofftransport limitieren kann und somit die Extraktion der Benzoin in die organische Phase verringert, ist das membranbasierte Zweiphasensystem für die Benzoin synthese ungeeignet.

Die Erhöhung der Substratmenge im Reaktor, auch über die Löslichkeitsgrenze hinaus, erwies sich im Verlauf der Arbeit als ein geeigneter Ansatz für die Reaktionsführung und wird im Folgekapitel diskutiert.

### 6.2.2 Steigerung der Substratkonzentration

Mit dem Ziel, die Enzym- und Reaktoreffizienz zu steigern wurde die Substratkonzentration im Reaktor zu erhöht und dafür ein weiteres Zweiphasensystem untersucht. Dabei wurde das Substrat über der Löslichkeitsgrenze im wässrigen Medium durch intensives Rühren dispergiert. In einem Satzreaktor wurden 360 mM (5 g) 3-Methoxybenzaldehyd (Löslichkeitsgrenze 80 mM) vorgelegt. Daraus wurden 4,5 g (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin isoliert, wobei eine Enzymeffizienz, ausgedrückt durch die maximale Zyklenzahl, von 25.000 erreicht wurde (Tabelle 5.9).

Die Enzymeffizienz korreliert mit der volumetrischen Produktivität. Eine hohe Effizienz der BAL geht mit einer niedrigen volumetrischen Produktivität einher und umgekehrt. Dieser Zusammenhang ist für die Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in Abbildung 6.5 dargestellt.



**Abbildung 6.5: Vergleich  $t_{tn}$  mit der Volumetrischen Produktivität**

Experimentell wurde eine maximale Zyklenzahl von 250.100 bzw. eine maximale volumetrische Produktivität von  $4,4 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht.

Hauptgrund für die Verwendung eines Cosolvens bei der Benzoin synthese ist die Verbesserung der Substratlöslichkeit und der Enzymstabilität. Da gezeigt wurde, dass sich das Substrat auch oberhalb der Löslichkeitsgrenze einsetzen lässt, wurde der Reaktionsverlauf der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin in einem weiteren Experiment ohne Cosolvens untersucht (Abbildung 5.32). Der Reaktionsverlauf und die Enzymstabilität werden in dem Experiment durch das Fehlen des Cosolvens nicht beeinflusst. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass DMSO die Lyaseaktivität der BAL reduziert [76]. Durch den Verzicht auf ein Cosolvens wird die Produktlöslichkeit reduziert, wodurch das Produkt schneller ausfällt. Die Lyaseaktivität wird somit reaktionstechnisch durch Absenkung der gelösten Produktkonzentration verringert.

Die BAL kann durch Überexprimierung in *E.coli* (SG 13009/BAL<sub>His</sub>) mittels Hochzelldichtefermentation günstig hergestellt werden. Daher ist der Anteil der Katalysatorkosten für enzymatische Synthesen mit der BAL sehr niedrig. Es ist unter diesem Gesichtspunkt auch bei verringerter Katalysatorstabilität sinnvoll, die BAL mit geringem reaktionstechnischem Aufwand für die Synthese von Benzoinen zu nutzen. Darüber hinaus führt der Verzicht auf Cosolventien zu mildereren und umweltfreundlicheren Reaktionsbedingungen.

Bei der Synthese von Benzoinen bietet die geringe Löslichkeit der Benzoinen in wässrigen Medien zwei wesentliche Vorteile. Zum einen kann die Ausfällung der Benzoinen reaktionstechnisch zur Verschiebung des Gleichgewichts auf die Produktseite genutzt werden. Zum anderen lässt sich bei einer geeigneten Wahl des Reaktors die Ausfällung der Benzoinen für eine integrierte Produktabtrennung nutzen. Da (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin sehr feinkristallin ist, wurde hierfür die präparative Synthese in einem Fed-Batch Reaktor mit separater Feststoffabtrennung durch Zentrifugation durchgeführt (Abbildung 5.36).

Da in vorherigen Experimenten teilweise eine sehr schnelle Oxidation der Benzoinen zu Benzil beobachtet wurde, erfolgten alle präparativen Synthesen unter Sauerstoffausschluss. Die Rate der

Oxidation ist abhängig von der Substitution am aromatischen Ring und erfolgt unter dem Verlust der chiralen Information durch die Dehydrierung der Alkoholfunktion zum Keton. Dabei wird das korrespondierende Benzil gebildet, das durch eine mesomeriestabilisierte Kette an konjugierten Doppelbindungen eine intensive Rot- bis Gelbfärbung aufweist. Die typische gelbliche Färbung der Benzoinen ist deshalb eine Verunreinigung und beruht auf der teilweisen Oxidation zum Benzil.

Bei der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin im Fed-Batch Reaktor wurde eine Substratkonzentration von 2,8 M eingestellt. Die Substratkonzentration ist in dieser Größenordnung maximal, da Puffer und Substrat in einem Verhältnis von zwei : eins vorlagen. Aus dem Reaktor konnten bei einer volumetrischen Produktivität von 2,3 kg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 12 g Produkt mit einer maximalen Zyklenzahl von 35.000 isoliert werden.

### 6.2.3 Reaktor mit Feststoffabtrennung

Für die präparative Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin wurde ein Fed-Batch Reaktor mit integrierter Feststoffabtrennung entwickelt (Abbildung 6.6). Durch eine Vergrößerung des Reaktionsvolumens bisher verwendeter Reaktoren wurde ein *Scale up* durchgeführt. Die Verwendung des Fed-Batch Reaktors ist gegenüber der Synthese im Satzreaktor vorteilhaft, da eine höhere Katalysatorausnutzung erzielt werden kann und sie aufgrund des semi-kontinuierlichen Betriebs weniger arbeits- und zeitintensiv ist.

Mit Hilfe der Filterkerze konnte das Produkt erfolgreich vom Reaktionsmedium abgetrennt werden, während die BAL im Reaktionsmedium verbleibt (Abbildung 5.39). Das aus dem Reaktor erhaltene Produkt wurde entsprechend der Abbildung 5.40 aufgearbeitet. Um den Anteil der Nebenprodukte zu reduzieren, stellt die Umkristallisation in einem Hexan-Diethylethergemisch eine geeignete Methode dar. (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin liegt nach dem Umkristallisieren in einer Reinheit von 97 % vor.

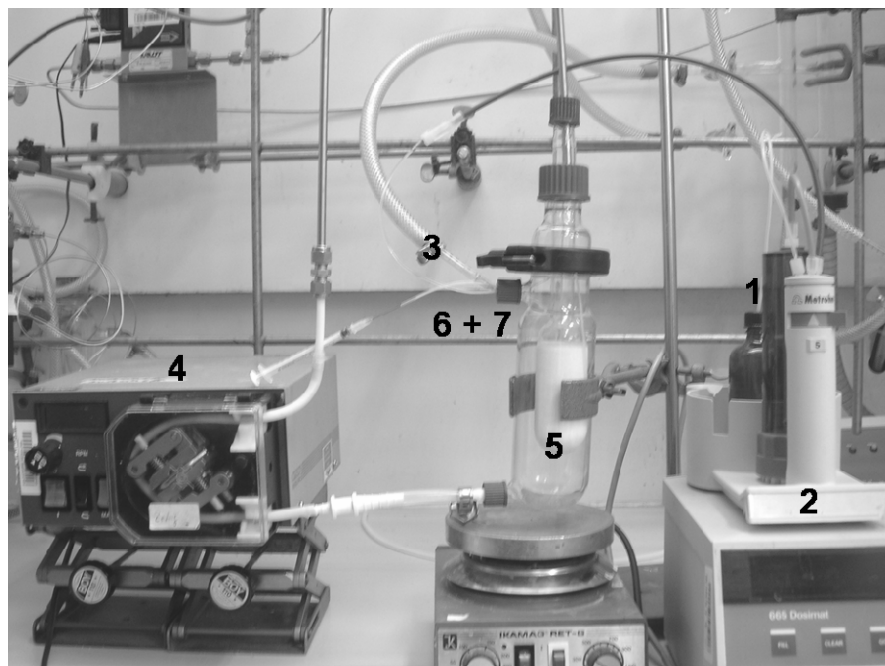


Abbildung 6.6: Fed-Batch Reaktor zur Synthese von (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

1: Substratzudosierung, 2: Pumpe zur kontinuierlichen Substratzudosierung, 3: Argonzufuhr, 4: Schlauchpumpe, 5: Reaktionsgefäß mit Filterkerzeneinheit, 6: Enzymzudosierung, 7: Vorrichtung zur Probeentnahme

Im Fed-Batch Reaktor lag die *t<sub>tn</sub>* bei 28.000 und die volumetrische Produktivität bei 27 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Im Zeitraum von 49 - 54 h konnte die volumetrische Produktivität auf fast das Dreifache erhöht werden. Durch eine kontinuierliche Enzymdosierung konnte die volumetrische Produktivität gesteigert werden, da die eingesetzte Enzymmenge während des Reaktorlaufs häufig verbraucht war (Abbildung 5.42). Während der gesamten Reaktorlaufzeit konnten 19,5 g (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin in einer Reinheit von 97 % (*ee* 99,9 %) isoliert werden (Abbildung 6.7).

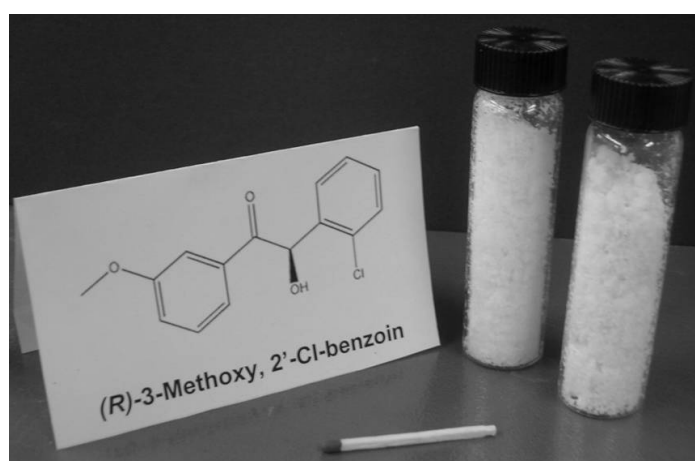


Abbildung 6.7: Mit Hilfe des Fed-Batch Reaktor synthetisiertes (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin

Die analytischen Versuche zur Charakterisierung der Benzoin synthese wurden in einem Reaktionsvolumen von 3 mL durchgeführt. Das Volumen des Fed-batch Reaktors mit integrierter Feststoffabtrennung lag bei 300 mL, womit ein *Scale up* um den Faktor 100

durchgeführt wurde. Die Effizienz des Reaktors kann zum einen durch eine kontinuierliche Enzymdosierung verbessert werden, zum anderen bietet sich eine kontinuierliche Feststoffabtrennung mittels einer Kontifuge (Siebtrommelzentrifuge) an. Dadurch kann der Prozess auch kontinuierlich geführt werden.

Einen zusammenfassenden Überblick über alle durchgeführten präparativen Reaktorexperimente zur Benzoin synthese gibt Tabelle 6.1. Es zeigt sich, dass in den Fed-Batch Reaktoren größere Produktmengen synthetisiert werden konnten. Für feinkristalline Produkte, wie das (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin ist die Produktabtrennung mittels Zentrifuge besonders geeignet. Bildet ein Produkt wie das (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin ausreichend große Kristalle aus, erfolgt die Abtrennung vorteilhaft mit einer Filterkerze der geeigneten Porung.



Tabelle 6.1: Übersichtstabelle der durchgeführten Reaktorexperimente zur Benzoin synthese (wichtige Werte sind fett gedruckt)

Reaktor, Verfahren	Satzreaktor	Satzreaktor, enzymlimitiert	Satzreaktor	Satzreaktor, Fed-Batch	Zentrifugation Fed-Batch	Filterkerze Fed-Batch
<i>Produkt</i>	(R)-3,3'-Dimethoxybenzoin	(R)-3,3'-Dimethoxybenzoin	(R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin	(R)-Benzoin	(R)-3,3'-Dimethoxybenzoin	(R)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin
<i>Umsatz</i>	90 %	73 %	95 %	97 %	82 %	86 %
<i>t<sub>tn</sub></i>	25.000	<b>250.100</b>	16 000	12.000	35.000	28.000
<i>Ausbeute</i>	4,5 g (90 %)	3,63 g (73 %)	4,5 g (71 %)	-	-	-
<i>Isolierte Ausbeute</i>	3,2 g (71 %)	2 g (40 %)	3,7 g (62 %)	<b>90 g (97 %)</b>	12 g (82 %)	19,5 g (86 %)
<i>Reinheit</i>	97 % ( <i>ee</i> 99,9 %)	92 % ( <i>ee</i> 99,9 %)	92 % ( <i>ee</i> 99,9 %)	97 % ( <i>ee</i> 99,9 %)	97 % ( <i>ee</i> 99,9 %)	97 % ( <i>ee</i> 99,9 %)
<i>Volumetrische Produktivität</i>	540 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	54,5 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	77 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	2.000 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<b>2.304 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup></b>	27,3 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
<i>vgl. auch</i>	Tab. 5.9	Tab. 5.10	Tab. 5.11	Tab. 5.12	Tab. 5.13	Tab. 5.14

### 6.3 Charakterisierung der 2-Hydroxy-1-phenylpropanon-Synthese

Im Folgenden wird die Entwicklung eines Reaktorkonzepts für die enzymkatalysierte Synthese von substituierten HPPs anhand von (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-hydroxy-propanon, (*R*)-3,3-Dimethoxy-2-hydroxyphenylpropanon und (*R*)-3-Methoxy-1-(4-Methoxyphenyl)-2-hydroxypropanon diskutiert. Neben der Bereitstellung der Substrate und einer geeigneten Analytik wurden die Reaktionssysteme detailliert kinetisch charakterisiert und die erhaltenen kinetischen Parameter an kontinuierlichen und diskontinuierlichen Reaktionsverläufen überprüft. Weiterhin wurde ein *Scale up* des Reaktors durchgeführt und die Produkte im g-Maßstab für die Folgechemie synthetisiert.

#### 6.3.1 Substratsynthesen und Analytik

##### Analytik

Für die Untersuchung der Reaktionssysteme zur Synthese von HPPs musste die für die Untersuchung der Benzoinen genutzte HPLC-Analytik angepasst werden. Die aliphatischen Aldehyde können nicht unmittelbar quantifiziert werden, da insbesondere das Acetaldehyd sehr volatil ist (Sdp. 21°C). Daher war eine Derivatisierung der aliphatischen Aldehyde erforderlich. Es wurde ein Derivatisierungsprotokoll für die Umsetzung mit Dimedon entwickelt (vgl. 4.2.1), das die Messung und Quantifizierung von Acetaldehyd, Methoxyacetaldehyd und Dimethoxyacetaldehyd ermöglicht. Für die Analytik von Methoxyacetaldehyd wurde eine Derivatisierung mit Dimedon bisher in der Literatur nicht beschrieben. Durch die Derivatisierung wurde die UV-Aktivität der aliphatischen Aldehyde gesteigert und es konnten alle Reaktanden der untersuchten HPP-Synthesen einheitlich mittels HPLC quantifiziert werden.

##### Bereitstellung der Substrate

Zur Etablierung der Analytik und Charakterisierung der (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP-Synthese wurde reines Methoxyacetaldehyd benötigt. Da es instabil und kommerziell schwer erhältlich ist, wurde es für die Versuche zeitnah synthetisiert. Aus der Hydrolyse von 1,1,2-Trimethoxyethan ist Methoxyacetaldehyd leicht zu erhalten [40]. Es ist jedoch nicht möglich, es von dem in der Reaktionslösung enthaltenen Methanol zu trennen. Um Methoxyacetaldehyd in Reinform darzustellen, wurde es aus der Periodatspaltung von Glycerinmethylether hergestellt. Aus der Reaktionslösung konnten durch kontinuierliche Extraktion 2,6 g Methoxyacetaldehyd (25 Prozent Ausbeute), bzw. durch Destillation 5,3 g Methoxyacetaldehyd (50 Prozent Ausbeute) erhalten werden. Damit wurde die oben genannte HPLC-Analytik etabliert und die weiteren Untersuchungen zur (*R*)-3,4'-Dimethoxy-HPP-Synthese wurden durchgeführt.

Bei der Synthese der HPPs entsteht durch die Selbstkondensation des aromatischen Aldehyds stets das korrespondierende Benzoin als Nebenprodukt. Zur Charakterisierung der Reaktionssysteme wurden die Benzoinen enzymatisch hergestellt. Ausgehend von Benzaldehyd, 3-Chlorbenzaldehyd und 4-Methoxy-Benzaldehyd wurden (*R*)-Benzoin, (*R*)-3,3'-di-Chlor-Benzoin und (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin enantioselektiv (*ee* > 99%) hergestellt. Die isolierten Ausbeuten lagen für Benzoin bei 75 Prozent (4 g), (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin bei 60 Prozent (740 mg) und für (*R*)-4,4'-Dimethoxy-benzoin 72 Prozent (810 mg).

### 6.3.2 Kinetik

#### Reaktionssystem

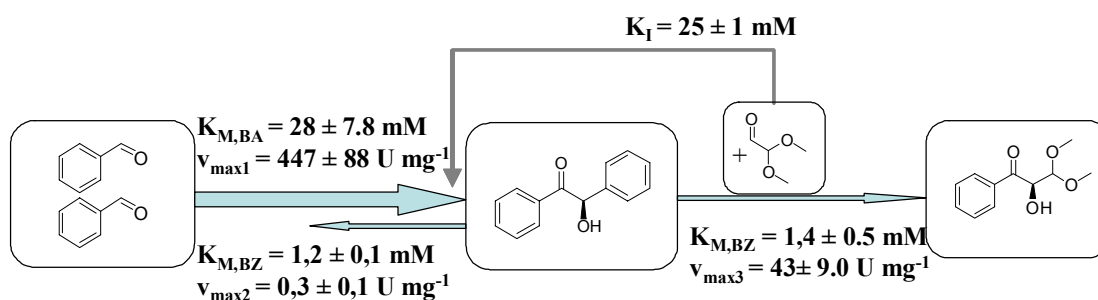
Bisher ist unklar, ob es sich bei der HPP-Bildung um eine Konkurrenzreaktion der Benzoinbildung handelt, ob sie eine Folgereaktion des Benzoin mit Acetaldehyd darstellt, oder ob beide Reaktionen parallel ablaufen (Abbildungen 2.18 und 5.59).

Zunächst wurden die Synthesen der substituierten HPPs charakterisiert. Dazu wurde die HPP-Bildung in vier Teilreaktionen unterschieden und deren kinetische Parameter bestimmt (Kapitel 5.4.3). Da die HPP-Bildung bei einem Überschuss an aliphatischem Aldehyd das thermodynamisch begünstigte Produkt ist [40], wurde angenommen, dass die HPP-Spaltung nicht relevant sei. Darüber hinaus wurde in der Literatur [76] gezeigt, dass die Affinität der BAL an (*R*)-HPP geringer als an Benzoin ist. Das unterstützt die Annahme, dass die HPP-Spaltung als vernachlässigbar angenommen werden kann.

#### Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten

Abbildung 6.8 fasst die bestimmten kinetischen Parameter der untersuchten Reaktionen zur HPP-Synthese zusammen. Die Parameter unterscheiden um bis zu drei Größenordnungen voneinander. Dies wird durch unterschiedliche Pfeilstärken für die Teilreaktionen veranschaulicht.

Die schnellste Reaktion ist jeweils die Benzoin synthese. Wie bereits bei der Charakterisierung der Benzoin gezeigt, ist methoxylierter Benzaldehyd ein besseres Substrat, als der unsubstituierte Benzaldehyd. Offenbar ist eine Methoxygruppe in *meta* oder *para* Position am aromatischen Aldehyd vorteilhaft für die enzymatische Umsetzung mit der BAL.



	(R)-3-Chlor-HPP	(R)-3',4-Dimethoxy-HPP
$V_{max,1}$ (Benzoin-Bildung)	$81 \pm 8 \text{ U mg}^{-1}$	$823 \pm 192 \text{ U mg}^{-1}$
$K_{M,BA}$ (Benzoin-Bildung)	$6.9 \pm 1,1 \text{ mM}$	$37.5 \pm 9.1 \text{ mM}$
$V_{max,2}$ (Benzoin-Spaltung)	$21,6 \pm 2,5$	-
$K_{M,BZ}$ (Benzoin-Spaltung)	$0,2 \pm 1,0$	-
$V_{max,3}$ (HPP-Bildung)	$3.3 \pm 0.2 \text{ U mg}^{-1}$	$5.6 \pm 2.6 \text{ U mg}^{-1}$
$K_{M,BZ}$ (HPP-Bildung)	$0.03 \pm 0.01 \text{ mM}$	$0.5 \pm 0.4 \text{ mM}$

**Abbildung 6.8: Kinetische Parameter zur Synthese der Hydroxyketon-Derivate**

(In der Grafik die Parameter für (R)-3,3-Dimethoxy-HPP, darunter die Parameter für (R)-3-Chlor-HPP und (R)-3',4-Dimethoxy-HPP)

Die kinetischen Untersuchungen der Benzoinspaltung waren durch die geringe Löslichkeit von Benzoinen im verwendeten Reaktionspuffer schwierig. ((R)-3,3'-Dichlor-benzoin 0,3 mM; (R)-4,4'-Dimethoxy-benzoin 1,0 mM; Benzoin 1,5 mM). Gegenüber der Benzoinbildung lief die Benzoinspaltung um zwei Größenordnungen langsamer ab. Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten waren niedrig, weil das als Cosolvens verwendete DMSO die Lyaseaktivität der BAL reduziert [35]. In der Gegenwart von aliphatischem Aldehyd reduziert sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch die konkurrierende HPP-Bildung weiter (Reaktionsweg 3, Abbildung 2.18).

Der aliphatische Aldehyd lag in allen Experimenten gegenüber der niedrigen Benzoinkonzentration im Überschuss vor. Es wurde eine Inhibierung durch den aliphatischen Aldehyd beobachtet, jedoch konnte aus den Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten keine Inhibierungskonstante quantifiziert werden. Für die Wahl des Reaktors bedeutet bei isolierter Betrachtung der Substratinhibierung, dass ein Reaktorsystem gewählt werden sollte, in dem die Konzentration des inhibierenden Substrats niedrig ist, wie es z.B. im CSTR eingestellt werden kann.

Für die HPP-Bildung aus der Kupplung von aromatischem und aliphatischem Aldehyd konnten aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nur teilweise kinetische Parameter erhalten werden (Abbildungen 5.50, 5.54, 5.55). Die Reaktion kann nicht isoliert gemessen werden, da sie stets von der etwa drei Größenordnungen schneller ablaufenden Benzoinkondensation begleitet bzw. überlagert wird. Die Maximalgeschwindigkeit der HPP-Bildung aus aromatischem Aldehyd und dreifachem Überschuss an aliphatischem Aldehyd (Reaktionsweg 4 in Abbildung 2.18) ist etwa doppelt so groß wie die maximale

Reaktionsgeschwindigkeit bei äquimolaren Mengen der Reaktionspartner. Daher begünstigt ein Überschuss an aliphatischem Aldehyd die HPP-Bildung nicht nur thermodynamisch, sondern auch kinetisch.

Die Enzymaktivitäten für die Bildung von (*R*)-3-Chlor-HPP (Abbildung 5.50) können daher nicht mit einem plausiblen kinetischen Modell nach Reaktionsweg 4 in Abbildung 2.18 erklärt werden. Der Kurvenverlauf erinnert an eine Substratüberschussinhibierung. Dem widerspricht jedoch, dass die höchste Geschwindigkeit bei hohem Anteil an aliphatischem Substrat und gleichzeitig geringem Anteil an aromatischen Aldehyd erreicht wird. Eine Interpretation der Daten wird möglich unter der Berücksichtigung des anderen Reaktionsweges (Reaktionsweg 3 in Abbildung 2.18).

Bei Substratkonzentrationen oberhalb von 5 mM kommt es während der kinetischen Messungen (30 min) nur zu einem teilweisen Umsatz des 3-Chlorbenzaldehyds zu (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin durch die bevorzugt katalysierte Benzoinkupplung, sodass die untergeordnete Folgereaktion zu (*R*)-3-Chlor-HPP immer nur mit geringer Geschwindigkeit abläuft. Bei niedrigen Konzentrationen hingegen wird die gering vorliegende Stoffmenge an 3-Chlorbenzaldehyd so schnell zu (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin umgesetzt, dass anschließend die Bildung von HPP aus (*R*)-3,3'-Dichlor-benzoin die dominierende Reaktion wird und die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich höher liegen.

Weiterhin fällt für alle drei untersuchten Reaktionen auf, dass die erzielten Maximalgeschwindigkeiten für Reaktionsweg 4 (Abbildung 2.18) unter den Geschwindigkeiten liegen, die für Bildung aus Benzoinen (Reaktionsweg 3, Abbildung 2.18) ermittelt wurden. Es ist daher denkbar, dass HPP direkt aus dem parallel gebildeten Benzoin entstand und nicht durch die Kupplung von aromatischem und aliphatischem Aldehyd. Aufgrund der großen Unterschiede in den Bildungsraten und den daraus resultierenden hohen Konzentrationsunterschieden lässt diese makroskopische Betrachtung keine genaue mechanistische Aussage zu, ist jedoch wichtig für die Simulation der Reaktionsverläufe.

Die Katalyse der Benzoinkupplung stellt die Hauptreaktion der BAL dar, die HPP-Bildung spielt nur eine untergeordnete Rolle. Durch höhere Konzentrationen an aliphatischem Aldehyd kann der Anteil der HPP-Bildung gesteigert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die direkte Bildung von HPPs aus Benzaldehyd (Abbildung 2.18, Reaktionsweg 4) ist sehr niedrig bzw. für (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP nicht messbar. Dagegen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der HPP-Bildung (Reaktionsweg 3 in Abbildung 2.18), ausgehend von Benzoin als Substrat, deutlich höher, da hier die konkurrierende Benzoinkupplung nicht stattfindet.

## 6.4 *Synthese von 2-Hydroxy-1-phenylpropanonen*

### 6.4.1 Satzreaktor

#### Synthese und Simulation im Satzreaktor

Aus den kinetischen Untersuchungen wurde zunächst ein vereinfachtes Modell zur Beschreibung der HPP-Synthese im Satzreaktor (Abbildungen 5.60- 5.62) entwickelt, das in den Formeln 5.11 bis 5.13 gezeigt ist. Leitfaden war, dass das einfachste Modell, das die kinetischen Daten mit genügender Genauigkeit beschreibt, Anwendung findet [96].

Es wurde angenommen, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten entsprechend dem Michaelis-Menten-Modell von den Substratkonzentrationen abhängen. Aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ergab sich, dass nur die Benzoinbildung und die HPP-Bildung aus Benzoin für die Simulation relevant sind. Für die Benzoinbildung aus zwei korrespondierenden Benzaldehydmolekülen wurde der entsprechende Term in der Geschwindigkeitsgleichung quadriert (Formel 5.1). Zusätzlich wurde die zuvor beobachtete Inhibierung durch den aliphatischen Aldehyd als kompetitive Inhibierung integriert (Abbildungen 5.54 f).

Die direkte Bildung von HPP aus Benzaldehyd war praktisch nicht messbar und die Benzoinspaltung (Reaktionsweg 2, Abbildung 2.18) lief stark verlangsamt ab, weshalb diese Reaktionen in der Simulation nicht berücksichtigt wurden. Diese Annahmen wurden anschließend durch die Genauigkeit der Simulationen in den Abbildungen 5.60- 5.62 unterstützt. Mit dem Modell war es möglich, die Reaktion makroskopisch zu beschreiben und optimierte Parameter für den Reaktor zu bestimmen (Tabelle 5.16). Für die Benzoinbildung (Reaktionsweg 1, Abbildung 2.18) weichen die optimierten kinetischen Parameter nur wenig von den Werten aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ab. Für die HPP-Bildung (Reaktion 3, Abbildung 2.18) kommt es in einem gewissen Rahmen zu Abweichungen.

Die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erfolgte innerhalb des Löslichkeitsbereiches der Benzoin (< 1,5 mM). Dagegen fällt im Satzreaktor während der Reaktion auch Benzoin aus, das zu scheinbar höheren Konzentrationen führt. Während der Probenahme wird das ausgefallene Benzoin durch Zugabe von Acetonitril wieder aufgelöst. Die scheinbar höheren Benzoinkonzentrationen im Satzreaktor werden bei der Optimierung durch erhöhte  $K_{M,BZ}$ -Werte kompensiert (Vgl. Kapitel 5.4.4.1).

Das vereinfachte Modell (Formeln 5.11 – 5.13) wurde für eine schnelle und grundsätzliche Reaktionsbeschreibung entwickelt. Die erfolgreiche Simulation der Satzreaktoren zeigt dass das entwickelte Modell, eine geeignete Möglichkeit zur Beschreibung des Systems darstellt. Es ermöglicht nach einer Optimierung der Parameter eine sehr gute Beschreibung der Experimente im Satzreaktor. Jedoch berücksichtigt das Modell nicht die beobachtete Kristallisation von Benzoin weshalb die Gültigkeit der kinetischen Parameter nicht bestätigt wird.

In Kapitel 5.2.3 wurde gezeigt, dass die Kristallisation von Benzoin mit der Formel 2.18 beschrieben werden kann. Die dafür notwendige Bestimmung der einzelnen Parameter für die Kristallisation jedes Benzoinderivates macht das Modell wesentlich komplexer und ist sehr aufwendig. Eine umfassende Charakterisierung der Kristallisationsvorgänge für jede hier untersuchte Reaktion geht daher über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Deshalb wurde das

Modell beispielhaft für die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP um die Kristallisation erweitert. Die dafür erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.17 gezeigt.

Das erweiterte Modell beschreibt den Reaktionsverlauf und die Kristallisation im Satzreaktor (Abbildung 5.63) und bestätigt die Gültigkeit der kinetischen Parameter aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten. Betrachtet man die ebenfalls ermittelte Kristallisationsrate von Benzoin, so fällt auf, dass sie dem Wert für die Kristallisation von (*R*)-3,3'-Dimethoxybenzoin entspricht. Dagegen ist die Lösungsrate von Benzoin deutlich kleiner als die von (*R*)-3,3'-Dimethoxybenzoin. Das ist darauf zurück zu führen, dass (*R*)-3,3'-Dimethoxybenzoin viel feinere Kristalle ausbildet, wodurch es eine größere Oberfläche hat und somit schneller in Lösung geht als das grobkristalline Benzoin.

### 6.4.2 Zwei-Phasensystem

Die Untersuchungen im homogenen Reaktionsmedium haben gezeigt, dass es bei der HPP-Synthese intermediär zur Präzipitation von Benzoinen kommt. Zur Verbesserung der Löslichkeit der Benzoinen und der anderen organischen Reaktanden im Reaktor wurde ein wässrig-organisches Zweiphasensystem gewählt. Dabei ist nicht nur die Grenzlöslichkeit der Reaktanden in den beiden Phasen zu bestimmen (Abbildung 5.23), sondern auch die Charakterisierung des Massentransfers zwischen wässriger und organischer Phase. Es muss beachtet werden, dass eine Phasentransferlimitierung die Reaktionsgeschwindigkeit beeinträchtigen kann.

Das Zweiphasensystem bietet zusätzlich die Möglichkeit, synthetisierte Produkte *in situ* zu extrahieren. Das verwendete Zweiphasensystem eignet sich gut für die Extraktion der Benzoinen aus der wässrigen Phase in die organische Phase (Abbildung 5.24).

Ein möglicher Nachteil der Verwendung eines Zweiphasensystems für enzymatische Synthesen ist die häufig geringe Stabilität von Enzym in Zweiphasensystemen [9]. Frühere Untersuchungen zeigten eine sehr gute Lagerstabilität der BAL bei 4°C im Zweiphasensystem mit MTBE und Puffer [182]. Im homogenen System aus Puffer mit Cosolvens wurde auch bei 20°C im CSTR eine gute Stabilität gemessen.

Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität blieb jedoch genauso unklar wie die schnelle Deaktivierung der BAL im Zweiphasensystem bei größerem Maßstab (> 4 mL). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Temperatur und der Phasengrenzfläche auf die Stabilität der BAL untersucht. Abbildung 5.28 zeigt, dass die thermische Deaktivierung der BAL unter Prozessbedingungen keine Rolle spielt. Die Abhängigkeit der Stabilität der BAL von der Phasengrenzfläche wird in Abbildung 5.30 gezeigt. Die Einbringung einer Membran erweist sich im Zweiphasensystem für die Stabilität als vorteilhaft.

Um einen möglichst guten Stofftransport zu gewährleisten, wurden Hohlfasermembranen für das membrangestützte Zweiphasensystem ausgewählt. Frühere Untersuchungen waren durch die geringe Stabilität der Hohlfaserkontakoren gegenüber organischen Lösungsmitteln, insbesondere MTBE, limitiert. Deshalb wurden für die Experimente lösungsmittelstabile Module entwickelt, die sich zusätzlich gegenüber allen Reaktanden stabil verhalten und keine Reaktanden absorbieren. Für die Experimente wurde der in Abbildung 6.9 gezeigte Reaktor verwendet.

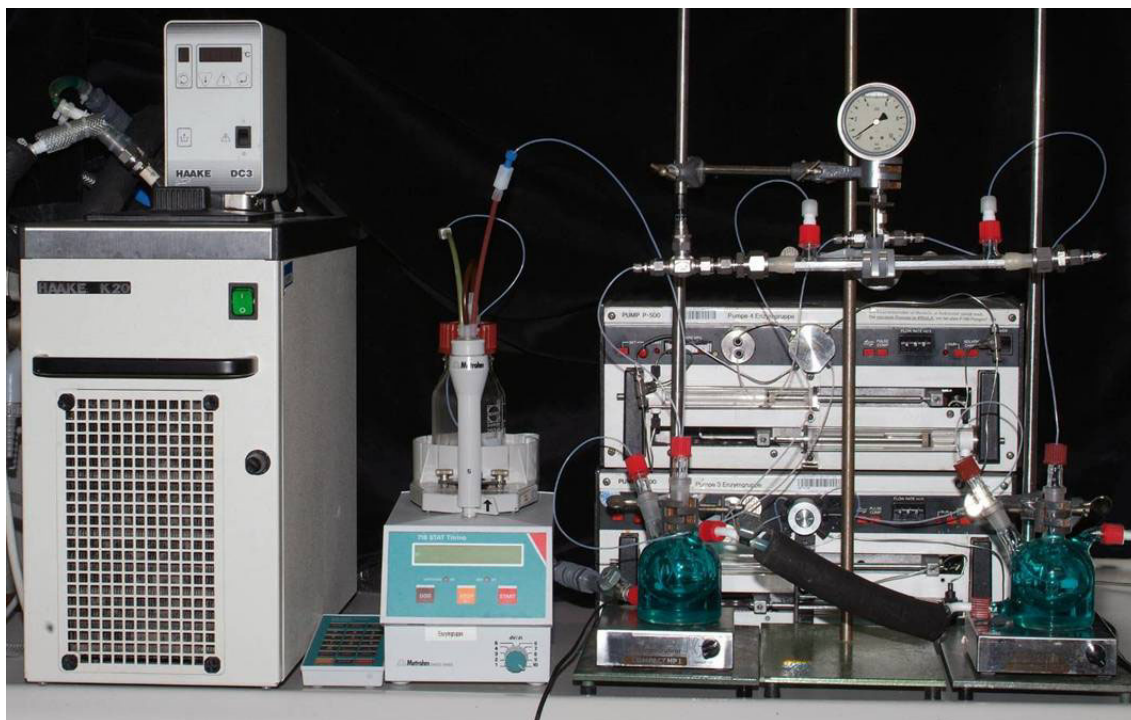


Abbildung 6.9: Membrangestütztes Zwei-Phasensystem

### Annahmen für die Simulation des Reaktors

Die Kinetik von enzymkatalysierten Reaktionen wird durch die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln beeinflusst [187]. Dies galt es für die BAL im vorliegenden Reaktionssystem zu untersuchen.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Synthese der HPPs erfolgte aufgrund der besseren Löslichkeiten in Puffer mit 30 % DMSO als Cosolvens. Dagegen war im untersuchten Zweiphasensystem MTBE in der wässrigen Phase systembedingt gelöst. Abbildung 5.3. zeigt den Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Kinetik der BAL. In Bezug auf die Kinetik kann man wegen der Verteilung der Substrate in zwei Phasen (Abbildung 5.66) erwarten, dass die Geschwindigkeit niedriger als im homogen-wässrigen System wird (Abbildung 6.4), da nur ein geringer Teil des Substrats in der wässrigen Phase vorliegt. Aufgrund der niedrigen Substratkonzentrationen ( $< 1\text{mM}$  für Benzaldehyd) in der wässrigen Phase des Zweiphasensystems ist der lösungsmittelbedingte Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit gering. Dies wird durch Satzreaktorversuche in den Abbildungen 5.71 und 5.72 bestätigt. Daher wurden die bereits zugänglichen kinetischen Daten aus der Messung mit DMSO als Cosolvens für die Simulation des Zweiphasensystems verwendet. Die Genauigkeit der Simulation stützt diese Annahme.

Durch Ausnutzung der höheren Löslichkeitsgrenze der Reaktanden in organischen Lösungsmitteln, können verringerte Reaktionsgeschwindigkeiten in der wässrigen Phase ausgeglichen werden. könnte die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden. Darauf wurde hier jedoch verzichtet, da beobachtet wurde, dass lokal hohe Substratkonzentrationen, wie sie an der Phasengrenzfläche auftreten, zu rascher Enzyminaktivierung führen. Auch kam es im Reaktor bei Kristallisation des intermediär gebildeten Benzoin, schnell zum Verblocken der Leitungen und Abbruch des Experiments.



Für die Simulation wurde zusätzlich zu den im homogenen Reaktionsmedium gemachten Annahmen angenommen, dass im Reaktionsweg 4 (Abbildung 2.18) nur HPP entsteht (und kein Benzaldehyd). Durch den hohen Überschuss ( $\gg 10$ fach in der wässrigen Phase) an aliphatischem Aldehyd – im Vergleich zum gelösten Benzoin – ist die Freisetzung von HPP begünstigt. Somit besteht die untersuchte Synthese aus zwei relevanten Schritten, die eine Folgereaktion darstellen. Gleichzeitig erfolgen ein Phasentransfer der beteiligten Reaktanden, sowie die Kristallisation des intermediär gebildeten Benzoins. Dies wird am Beispiel der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP im Zwei-Phasensystem in Abbildung 6.10 veranschaulicht.

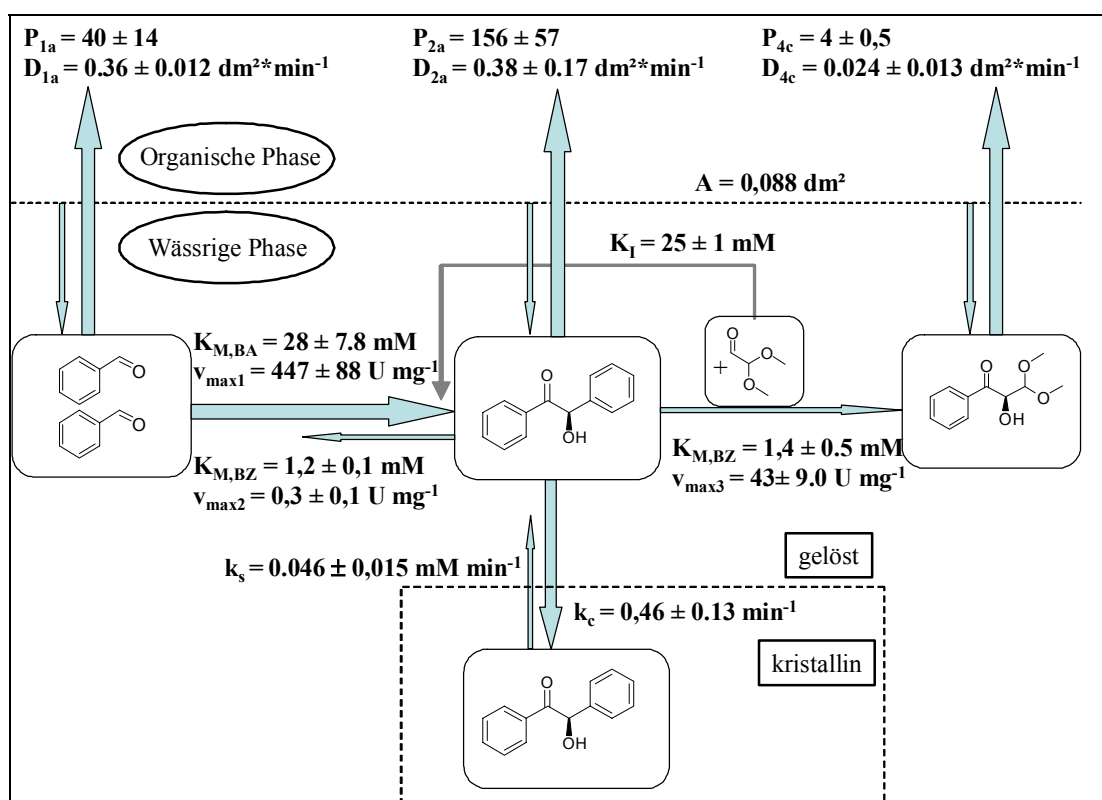


Abbildung 6.10: Schema der Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP im Zwei-Phasensystem

Die Abbildung 6.10 verdeutlicht die Geschwindigkeit der Reaktionen und des Massentransfers durch die Pfeilstärke und Angabe der ermittelten Parameter. Im Folgenden werden das im Zwei-Phasensystem untersuchte Reaktionssystem sowie mögliche Optimierungen diskutiert.

### Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt

Die BAL ist ein hydrophiles Protein, das nicht in MTBE löslich ist. Deshalb verbleibt der Katalysator in der wässrigen Phase und die Umsetzung von Substrat zum Produkt erfolgt in der wässrigen Phase. Während der gesamten Reaktion liegt eine zwar niedrige, aber messbare Konzentration an aromatischem Aldehyd als Substrat in der wässrigen Phase vor. Somit ist der Massentransport des Substrats aus der organischen in die wässrige Phase nicht limitierend für die Reaktion. Jedoch bedingt die niedrige Konzentration an Benzaldehyd in der wässrigen Phase eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit, wodurch es zu langen Reaktionszeiten kommt.

Zusätzlich wurde die Umsetzung von Benzaldehyd durch eine vergleichsweise hohe Konzentration an Dimethoxyacetaldehyd inhibiert.

Weiteren Aufschluss ergab eine Sensitivitätsanalyse der Parameter anhand des Modells. Es zeigte sich, dass der Massentransport ( $D_{BA}$ ,  $D_{BZ}$ ,  $D_{DHPP}$ ) für den Reaktionsverlauf nicht limitierend ist (Abbildungen 5.73 und 5.74). Entscheidende Parameter sind  $P_{BA}$ ,  $E$ ,  $K_{I,DALD}$  und  $K_{M,BA}$ . Somit liegen durch das Lösungsmittel bedingt ein hoher Verteilungskoeffizient und damit eine niedrige Substratkonzentration in der wässrigen Phase vor. Die daraus resultierende geringe Geschwindigkeit der Reaktion ist somit limitierend für den Prozessverlauf. Die Reaktionsgeschwindigkeit könnte durch Erhöhung der Substratkonzentration in der wässrigen Phase gesteigert werden. Die Möglichkeit der erhöhten Substratzufuhr wurde zuvor diskutiert und hat sich als eher nachteilig erwiesen. Alternativ könnte der Verteilungskoeffizient durch die Wahl eines anderen Lösungsmittels optimiert werden, worauf in diesem Kapitel noch näher eingegangen wird.

Wie Abbildung 5.24 zeigt, werden auch die Produkte weitgehend in die organische Phase extrahiert, so dass zu untersuchen war, ob während der Reaktion kein Produkt ausfällt, was die In-Prozessanalytik und die Aufarbeitung erleichtern würde. Abbildungen 5.67 und 5.68 deuten auf eine schnelle Extraktion des Benzaldehyds und langsame Extraktion des Benzoin hin.

Im Reaktorlauf wurde sichtbar, dass das Intermediat Benzoin ausfällt, d.h. die Kristallisation und Ausfällung des Benzoin erfolgt schneller als der Benzoinverbrauch durch Extraktion in die organische Phase und Umsetzung zum HPP. Die geringe Extraktion weist darauf hin, dass die Enzymreaktion nicht an der membrangestützten Grenzfläche erfolgt, wo eine schnelle Benzoinextraktion zu erwarten wäre, sondern in der wässrigen Bulk-Phase. Auch die Hatta-Zahl von  $< 0,3$  deutet darauf hin, dass die Reaktion in der Bulk-Phase erfolgt. Somit befindet sich auch die BAL in der wässrigen Bulk-Phase und ist nicht an der Phasengrenzfläche angelagert.

Durch die Ausfällung von Benzoin kommt es zur Bildung und Anreicherung einer dritten, festen Phase im wässrigen Teil des Reaktors, was zu einem wesentlich komplexeren Reaktionssystem führt.

Die geringe Löslichkeit des Benzoin und damit konstante, aber niedrige Konzentration an Benzoin wirkt sich limitierend auf die nachfolgende Synthese des HPPs aus. Entscheidend für die Geschwindigkeit der Synthese des HPPs ist jedoch die geringe maximale Geschwindigkeit ( $V_{max_3}$ ) im Reaktionsweg 3 des Reaktionsschemas (Abbildung 2.18). Für einen hohen Umsatz wirkt sich die Extraktion des Benzoin aus der wässrigen Phase in die organische Phase nachteilig auf die HPP-Synthese aus.

Besonders sensitiv ist PBA, das durch die Wahl eines anderen Lösungsmittels beeinflusst werden kann. Abbildung 6.11 zeigt die Steigerung der Produktkonzentration von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP nach 450 min Reaktionszeit, bei verkleinertem Verteilungskoeffizienten für Benzaldehyd.

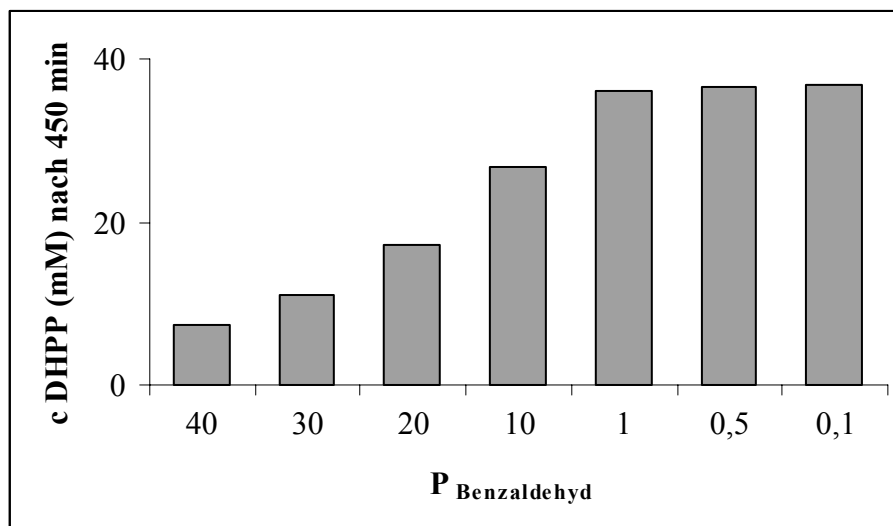
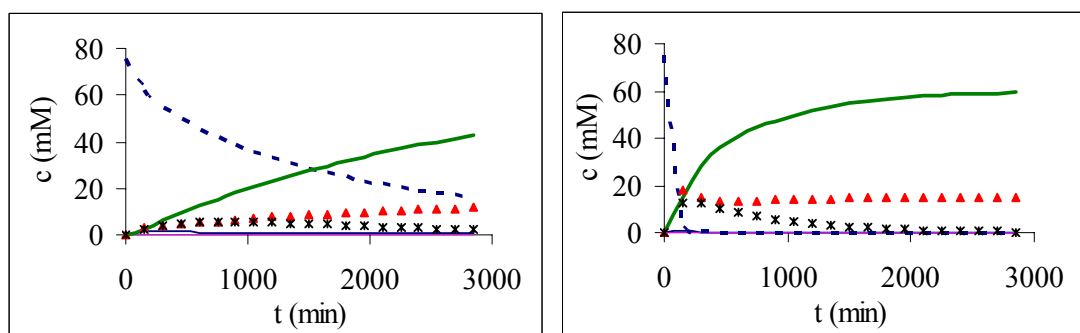


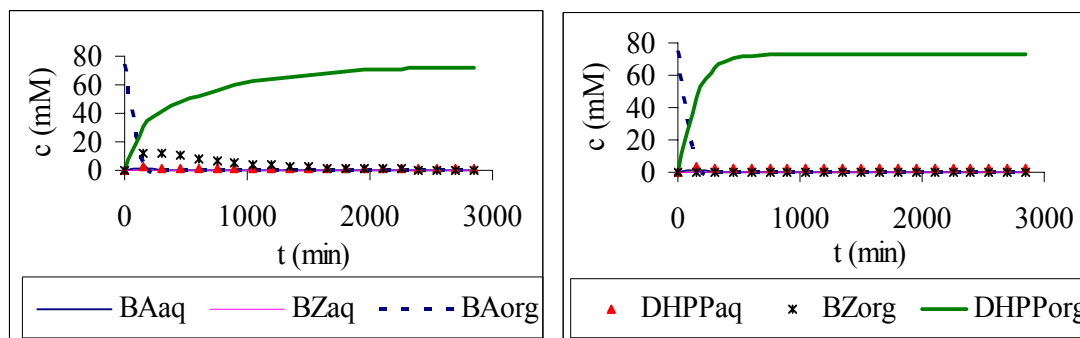
Abbildung 6.11: Produktkonzentration (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP (DHPP) als Funktion des Verteilungskoeffizienten ( $P$ ) von Benzaldehyd

Wie Abbildung 6.11 zeigt, hat das optimale Lösungsmittel für Benzaldehyd einen Verteilungskoeffizienten von kleiner oder gleich eins. Abbildung 6.12 zeigt den Reaktionsverlauf aus Abbildung 5.71 im Vergleich mit Reaktionsverläufen bei optimierten Verteilungskoeffizienten für Benzaldehyd, (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP und (*R*)-Benzoin.



1. Ausgangssituation im Experiment

2.  $P_{\text{Benzaldehyd}}$  von 40 auf 1 gesenkt



3.  $P_{(R)\text{-3,3-Dimethoxy-HPP}}$  von 4 auf 40 erhöht

4.  $P_{(R)\text{-Benzoin}}$  von 157 auf 1 gesenkt

Abbildung 6.12: Reaktionsverläufe im Zweiphasensystem mit optimierten Verteilungskoeffizienten

Wird ausschließlich der Verteilungskoeffizient von Benzaldehyd optimiert, wird kein vollständiger Umsatz erreicht. Dies kann durch Anhebung des Verteilungskoeffizienten von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP um den Faktor 10 verbessert werden, wodurch die Extraktion des (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP erhöht wird. Vollständiger Umsatz zum (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP wird erreicht, wenn der Verteilungskoeffizient von Benzoin den Wert 1 annimmt.

### **Die Enzymstabilität**

Die Aktivität des Enzyms nimmt zu Beginn der Reaktion rasch um etwa 75% ab und bleibt danach nahezu konstant. Möglicherweise erfolgt eine „Active Site Communication“, sodass nur jeweils eines der aktiven Zentren in jedem Tetramer aktiv ist, während die anderen drei inaktiv sind [18, 29, 79, 81]. Im Modell wurde dies als ein Gleichgewicht aus aktivem und inaktivem Enzym berücksichtigt. Um die Reaktionsgeschwindigkeit im Reaktor zu erhöhen, wurde versucht, mehr Enzym in der wässrigen Phase einzusetzen. Dies gelang jedoch nicht, da es zu einer schnellen Ausfällung der BAL kam und damit zur Verstopfung der Leitungen des Reaktors.

Die BAL fiel bereits bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  aus. In der Regel ist die Löslichkeit von Proteinen erst bei einer Konzentration limitiert, die eine Größenordnung darüber liegt ( $> 20 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Die wässrige Phase wird durch das verwendete MTBE hydrophober und dadurch sinkt möglicherweise die Löslichkeit der BAL. Weiterhin werden Enzyme an hydrophoben Flächen adsorbiert [187] und dadurch häufig deaktiviert. Ursache dafür kann eine intramolekulare Umlagerung sein. Üblicherweise sind Proteine von wässrigen Lösungen umgeben und präsentieren deshalb nach außen hydrophile Aminosäuren. In Gegenwart von hydrophoben Flächen werden vermehrt hydrophobe Aminosäuren nach außen präsentiert. Infolgedessen kommt es zu intramolekularen Umlagerungen im Enzym und schließlich zum Verlust der katalytischen Aktivität. Durch Belegung der hydrophoben Flächen im Reaktor mit BSA kann dieser Effekt vermindert werden (Abbildung 5.69). Daher wirkt sich im Prozess eine hohe Proteinkonzentration vorteilhaft auf die Enzymeffizienz aus.

In vorherigen Untersuchungen war der Hauptfaktor für die Stabilität der BAL die Umsetzung von Substrat (Abbildung 5.29). Lokale hohe Konzentrationen im Zweiphasensystem sind jedoch häufig nachteilig für die Enzymaktivität. Deshalb könnte die BAL möglicherweise auch durch die erhöhten Konzentrationen an Benzaldehyd an der Phasengrenzfläche deaktiviert worden sein [144].

### **Zusammenfassung**

Bei der Modellentwicklung wurde die physikalische Erklärbarkeit der eingeführten Parameter besonders berücksichtigt. Da im Experiment ein komplexes Dreiphasensystem vorliegt, wurde die Kristallisation von Benzoin in der wässrigen Phase in die Simulation integriert, sowie die Reaktion durch eine Folgereaktion beschrieben. Die Benzoinkristallisation ist in den analytischen Daten nur indirekt durch einen Defekt in der Massenbilanz erkennbar. Deshalb kann dieser Wert nicht über die experimentell untersuchten Konzentrationsbereiche hinaus extrapoliert werden.

Das Modell beschreibt die Konzentrationsverläufe aller Reaktanden in beiden Phasen. Da die Parameter durch Minimierung der Fehlerquadratsumme angepasst wurden, werden die höheren

Konzentrationen in der organischen Phase besser beschrieben als die Verläufe in der wässrigen Phase.

Das Benzoin und das Enzym überschreiten im Verlauf der Reaktion zeitweise die Löslichkeitsgrenze, wodurch der Prozess in einem engen Fenster geführt werden muss. Die Geschwindigkeit der Benzoinbildung sollte hoch sein, aber nicht größer als die Folgesynthese zu HPP und die Extraktion in die organische Phase zusammen sind.

Zusammen mit der langsamen Umsetzung von Benzoin zu HPP befindet sich der gesamte Prozess an einem Limit. Häufig führte das Überschreiten der Löslichkeitsgrenze eines Reaktanden zum Abbruch des Prozesses, da es zu Verstopfung in den Zu- und Abläufen bzw. der Hohlfasermembran kam. Bereits bei einer Enzymkonzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  war häufig die Ausfällung von Protein zu beobachten. Dadurch kann die Enzymkonzentration nur bedingt erhöht werden, bzw. eine Erhöhung führt zu einem schwer quantifizierbaren Prozessverlauf.

In der Simulation wurde die direkte HPP-Bildung aus Benzaldehyd ausgeschlossen und der Weg über Benzoin als Intermediat angenommen. Nach der derzeitigen Ergebnislage, mit einer guten Simulation der Reaktionsverläufe in beiden Phasen, ist das Benzoin daher als Intermediat zu betrachten. Diese Annahme wird durch die kinetischen Untersuchungen unterstützt, da keine direkte Umsetzung von Benzaldehyd zu HPP messbar war.

Die zuvor beschriebenen Phänomene machen das System sehr komplex und sind teilweise nicht isoliert messbar oder überhaupt quantifizierbar. Weiterhin machen die hydrophoben Substrate die Reaktion ungeeignet für eine Anwendung im wässrig-organischen Zweiphasensystem

### **Wünschenswerte Optimierungen**

Im Folgenden sollen Möglichkeiten zur Verbesserung des Zweiphasensystems betrachtet werden. Dabei ist von Bedeutung, dass aufgrund der Komplexität des Systems bei Änderung einer Systemkomponente meist auch andere relevante Größen beeinflusst werden.

Die Benzoinextraktion in die organische Phase sollte reduziert bzw. die Rückextraktion in die wässrige Phase sollte erhöht werden. Durch Wahl eines anderen Lösungsmittels könnte der Prozess verbessert werden. Dieses Lösungsmittel sollte die Stabilität des Enzyms nicht beeinträchtigen und möglichst selektiv das Produkt aus der wässrigen Phase extrahieren. Das Substrat und das Intermediat sollten dagegen möglichst vollständig, bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze in der wässrigen Phase verbleiben. Weiterhin sollte die Produktabtrennung aus der organischen Phase einfach sein, da das Produkt empfindlich gegenüber extremen Bedingungen ist und beispielsweise bereits bei Temperaturen über  $40^\circ\text{C}$  racemisiert.

Auch könnte das Enzym modifiziert werden, wobei die Geschwindigkeit der HPP-Bildung aus Benzoin erhöht werden sollte und die Inhibierung durch den aliphatischen Aldehyd reduziert werden sollte.

### **6.4.3 Enzym-Membran-Reaktor**

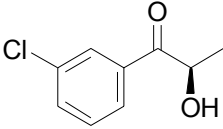
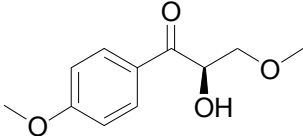
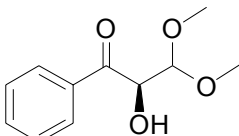
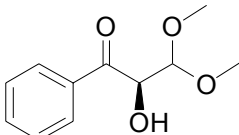
Die vorigen Untersuchungen zeigten, dass Benzoin im Satzreaktor intermediär ausfällt und die Synthese von HPP durch einen Überschuss an aliphatischem Aldehyd thermodynamisch begünstigt ist. In der Simulation ist der aliphatische Aldehyd ein kompetitiver Inhibitor. Der CSTR ist aufgrund seiner Charakteristik ein geeignetes Reaktorkonzept bei Substratinhibierung

und bei einer Folgereaktion mit der Bildung von Intermediaten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die BAL bei homogener Reaktionsführung und bei hohen Proteinkonzentrationen eine höhere Stabilität hat. Für die Synthese von HPPs, ausgehend von aromatischem und aliphatischem Aldehyd, war der CSTR somit gut geeignet, da das Reaktorvolumen optimal ausgenutzt werden kann. In der Literatur wird die Reaktionsführung der Synthese von (*R*)-HPP im kontinuierlichen EMR als geeigneten Reaktortyp beschrieben [183]. Dem EMR liegt das Prinzip eines CSTR zugrunde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der EMR als geeignetes Reaktorkonzept für die Synthese von substituierten HPPs untersucht. Weiterhin wurde ein *Scale up* des Reaktorvolumens für die kontinuierliche Reaktionsführung im EMR durchgeführt.

Bei der Synthese der HPPs im EMR wird die intermediäre Benzoinbildung vermieden. Dadurch konnte das Reaktionssystem durch ein einfaches Modell simuliert werden. Die Simulation ist in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (Abbildungen 5.75 und 5.79). Für die Synthese von (*R*)-3-Chlor-HPP wurden hohe Raum-Zeit-Ausbeuten von  $330 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  mit einer Selektivität von über 95 % im EMR erzielt. Auch für die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP konnte bei einer kurzen Verweilzeit eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $188 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erzielt werden. Bei beiden Reaktionssystemen konnte eine hohe Enzymeffizienz von  $ttn = 43.000$  (3Cl-HPP) bzw.  $25.000$  (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP erreicht werden [68]. Tabelle 6.2 fasst die wichtigsten Parameter der Experimente im EMR zusammen und zeigt zum Vergleich die Ergebnisse für die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP im Zwei-Phasensystem.

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Experimente im EMR und Zwei-Phasensystem

Produkt	Menge	$\tau$	Reaktor-Laufzeit [h]	RZA [ $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ]	<i>ttn</i>
<b>EMR</b>					
	2,6 g 7,9 mmol	100	60	330	43.000
	0,25 g 1,2 mmol	100	15	--	1.200
	2,8 mg 13,3 mmol	80	50	188	25.000
<b>Zwei-Phasensystem</b>					
	12 mmol	-	48	1,26	3.600

Die Enzymausbeute ist im EMR höher als im Zwei-Phasensystem und konnte durch die Verwendung von MTBE als Cosolvens bei der Synthese von (*R*)-3-Chlor-HPP auf  $ttn = 60.000$  gesteigert werden. Da DMSO bei der Aufarbeitung der Produkte schwer zu entfernen ist, stellt die Verwendung von MTBE als Cosolvens somit eine gute Alternative dar.

Für die Synthese von (*R*)-3',4-Dimethoxy-HPP wurde durch die Deaktivierung der BAL im EMR nur kurzzeitig vollständiger Umsatz erreicht. Da die BAL in Gegenwart von Methoxyacetaldehyd eine geringe Stabilität aufweist (Abbildung 5.77), ist die BAL für die Synthese von (*R*)-3',4-Dimethoxy-HPP nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht geeignet.

Für die Synthese von (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP und (*R*)-3-Chlor-HPP ist der EMR der Reaktortyp der Wahl. Er verhindert die intermediäre Kristallisation von Benzoin, ermöglicht eine effiziente Nutzung des Katalysators und erlaubt hohe Umsätze und Selektivitäten bei hervorragenden Standzeiten.

### 6.4.4 Folgechemie

Abbildung 5.80 zeigt die Synthese von Hydroxybupropion aus (*R*)-3-Chlor-HPP. Hydroxybupropion ist ein hydroxylierter und biologisch aktiver Metabolit von Bupropion, das unter anderem als Medikament zur Raucherentwöhnung verwendet wird. (*R*)-3-Chlor-HPP kann durch eine einstufige Synthese zur Herstellung von Hydroxybupropion verwendet werden [53]. Die in der Literatur angegebene Vorschrift wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert und 0,8 g Hydroxybupropion wurden synthetisiert (Ausbeute 40 %). Es konnte gezeigt werden, dass die durch die Synthese mit der BAL zugänglichen Hydroxyketone chirale Intermediate für relevante pharmazeutische Produkte darstellen. Durch weitere Optimierung der Reaktionsführung kann der Kostennachteil von 20 % gegenüber der konventionellen Synthese möglicherweise weiter verringert werden.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die enzymatische C-C-Knüpfung durch die BAL reaktionstechnisch charakterisiert. Die Untersuchungen wurden stets im Hinblick auf technologische Anforderungen unter reelle Bedingungen durchgeführt und folgende Ergebnisse erzielt.

### *Reaktionsbedingungen und Enzymstabilität*

- In Gegenwart von DMSO und MTBE ist die Lagerstabilität der BAL weit höher als die **Reaktionsstabilität**. Die Temperatur ist für die Reaktionsstabilität der BAL nicht entscheidend.
- Die Synthesen müssen unter **Sauerstoffausschluss** durchgeführt werden, da insbesondere die Benzoinen oxidationsempfindlich sind.
- Für die Reaktionsstabilität der BAL ist eine **hohe Proteinkonzentration** vorteilhaft.
- Für die Benzoin-synthese im Zwei-Phasensystem eignet sich das **Substrat** als organische Phase.
- Die Stabilität der BAL kann im **Zwei-Phasensystem** durch eine **Membran** erhöht werden.

### *Kinetik und Simulation*

- Bestimmung der kinetischen Parameter von **sechs Reaktionen** mit jeweils zwei bis sechs Teilreaktionen. Erstmals werden die kinetischen Parameter substituierter Substrate bestimmt.
- **Substituierte Substrate** werden von der BAL teilweise schneller umgesetzt, z.B. 3-Methoxybenzaldehyd ( $V_{\max} = 609 \text{ U mg}^{-1}$ ), als das natürliche Substrat Benzaldehyd ( $V_{\max} = 447 \text{ U mg}^{-1}$ ).
- Mit einem **Zwei-Substrat-Modell** werden die Lyase- und Ligase-Reaktion beschrieben.
- Durch **Berücksichtigung der Kristallisation**, wird die Gültigkeit der kinetischen Parameter aus den Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten gezeigt.

### *Synthese der Benzoinen*

- Zwei verschiedene Reaktoren werden zur Produktion realisiert:
  - **Zwei-Phasensystem** durch Substratüberschuss,
  - **Feststoffabtrennung** durch Filterkerze bzw. Zentrifuge
- Aus den Reaktoren werden mit hoher Enantioselektivität (> 99 %) folgende Produkte im Gramm-Maßstab erhalten:
  - 90 g (*R*)-Benzoin
  - 17 g (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin
  - 23 g (*R*)-3-Methoxy-2'-chlor-benzoin
- Ein Zwei-Phasensystem mit Substrat als organischer Phase ist das beste Reaktionssystem. Die Produktabtrennung durch gezielte **Kristallisation** ist für die Benzoin-synthese die Methode der Wahl [100].



- Bei der Synthese von (*R*)-3,3'-Dimethoxy-benzoin wird eine **volumetrische Produktivität** von bis zu **4.400 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>** erreicht und in einem weiteren Experiment eine **maximale Zyklenzahl (*ttn*)** von **250.100** gemessen.

### *Synthese der HPPs*

Drei verschiedene Reaktoren werden realisiert

- **Satzreaktor**
- **membrangestütztes Zwei-Phasensystem**
- **Enzym-Membran-Reaktor**
- Aus verschiedenen Reaktorläufen werden folgende Produktmengen erhalten:
  - 5g (*R*)-3-Chlor-HPP
  - 4g (*R*)-3,3-Dimethoxy-HPP
  - 1,2g (*R*)-3',4-Dimethoxy-HPP
- In einem **Enzym-Membran-Reaktor** wird mit MTBE als Cosolvens eine maximale Zyklenzahl (*ttn*) von 60.000 und eine Raum-Zeit-Ausbeute von 330 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erreicht.
- Für einen **membrangestützten Zwei-Phasenreaktor** werden lösungsmittelstabile Hohlfaserkontakoren entwickelt und ein *scale-up* durchgeführt. Intermediär gebildetes Benzoin wird effizient in die organische Phase extrahiert.
- Das Zwei-Phasensystem ist **nicht phasentransferlimitiert**.
- Eine **Folgesynthese für (*R*)-3-Chlor-HPP** zum pharmazeutisch wirksamen Hydroxybupropion wird gezeigt.

### **Ausblick**

In zukünftigen Untersuchungen sollte die BAL bezüglich ihres Mechanismus genauer untersucht und charakterisiert werden. Dazu könnten selektive Donoren verwendet werden, die keine Benzoinkondensation zulassen. Weiterhin könnten die während der Katalyse auftretenden Intermediate mit ThDP mittels NMR-Analytik identifiziert und so der Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden [159, 171, 172, 194].

Für die Benzoinen ist nach der bisherigen Ergebnislage ein Reaktorkonzept mit Feststoffabtrennung ideal, das die geringe Löslichkeit der Benzoinen nutzt. In zukünftigen Arbeiten sollten Möglichkeiten zur Erhöhung der Stabilität der BAL gegenüber den hydrophoben Substraten, beispielsweise durch molekularbiologische Methoden untersucht werden. Denkbar ist auch, dass zukünftig andere Lösungsmittel verwendet werden, die komplexe Anforderungen erfüllen müssen. Sie sollten die Löslichkeit und Stabilität des Enzyms nicht beeinträchtigen. Es sollte eine möglichst selektive Extraktion des hydrophoben Benzoinen und des hydrophileren HPPs erzielt werden, während der ebenfalls hydrophobe Benzaldehyd in der wässrigen Phase vorliegt. Weiterhin sollte eine einfache Abtrennung des Produkts aus der Extraktionsphase möglich sein, da beispielsweise die bei einer Destillation auftretenden hohen Temperaturen zu einer Racemisierung der chiralen Produkte führen. Ionische Flüssigkeiten bieten hier potentiell neue Eigenschaften, wenn die Aufarbeitung geklärt werden kann.

Der EMR ist für die HPP-Synthese optimal. Sollten zukünftige Arbeiten bestätigen, dass der Mechanismus der HPP-Synthese auf einer Folgereaktion mit intermediärem Benzoin beruht, ist

auch ein anderes Reaktorkonzept denkbar. Möglicherweise ist es vorteilhaft, Benzoin in einem ersten Schritt enzymatisch darzustellen. Anschließend werden sie als Substrat für die HPP-Synthese eingesetzt und dadurch die Inhibierung der Benzoinbildung durch den aliphatischen Aldehyd vermieden. Die HPP-Synthese könnte in diesem Fall in einem Reaktor mit Feststoffabtrennung durchgeführt werden.

## 8 Literatur

1. Adlercreutz, P., *Biocatalysis in non-conventional media*. Applied biocatalysis, 2000, Harwood Academic Press. Amsterdam, NL.
2. Ansorge-Schumacher, M.B., Greiner, Hischer, *Operational concept for the improved synthesis of (R)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase*. Biotechnology Journal, 2006. **1**: p. 564–568.
3. Antolini, M., et al., *Analogues of 4,5-bis(3,5-dichlorophenyl)-2-trifluoromethyl-1H-imidazole as potential antibacterial agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**(7): p. 1023-1028.
4. Balcao, V.M., A.L. Paiva, and F.X. Malcata, *Bioreactors with immobilized lipases: State of the art*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. **18**(6): p. 392-416.
5. Barreiro, E.J., V.F. Ferreira, and P.R.R. Costa, *Pure enantiomeric substances: The question of chiral drugs*. Quimica Nova, 1997. **20**(6): p. 647-656.
6. Barrowman, M.M. and C.A. Fewson, *Phenylglyoxylate Decarboxylase and Phenylpyruvate Decarboxylase from Acinetobacter-Calcoaceticus*. Current Microbiology, 1985. **12**(4): p. 235-239.
7. Barrowman, M.M., et al., *Immunological Comparison of Microbial Tpp-Dependent Nonoxidative Alpha-Keto Acid Decarboxylases*. Fems Microbiology Letters, 1986. **34**(1): p. 57-60.
8. Barta, T.E., et al., *Synthesis and pharmacological activity of some 4,5-diarylimidazole COX-2 inhibitors*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1998. **216**: p. U292-U292.
9. Bauer, M., et al., *The use of Lewis cell to investigate the enzyme kinetics of an (S)-hydroxynitrile lyase in two-phase systems*. Food Technology and Biotechnology, 2002. **40**(1): p. 9-19.
10. Bauer, M., H. Griengl, and W. Steiner, *Parameters influencing stability and activity of a S-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis in two-phase systems*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **24**(8-9): p. 514-522.
11. Bender, P.E., et al., *5,6-Diaryl-2,3-Dihydroimidazo[2,1-B]Thiazoles - a New Class of Immunoregulatory Antiinflammatory Agents*. Journal of Medicinal Chemistry, 1985. **28**(9): p. 1169-1177.
12. Bisswanger, H., *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*, 2000, Wiley-VCH. Weinheim, Vol. 3.
13. Boland, W., C. Frossl, and M. Lorenz, *Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic-Synthesis*. Synthesis-Stuttgart, 1991(12): p. 1049-1072.
14. Bommarius, S.A., Riebel, R. B., *Biocatalysis*. 2004, Wiley-VCH: Weinheim. p. 15-20.

15. Bornscheuer, U.T. and K. Buchholz, *Highlights in biocatalysis - Historical landmarks and current trends*. Engineering in Life Sciences, 2005. **5**(4): p. 309-323.
16. Bosanac, T. and C.S. Wilcox, *Precipiton strategies applied to the isolation of alpha-substituted beta-ketoesters*. Tetrahedron Letters, 2001. **42**(26): p. 4309-4312.
17. Braun, M., Teichert, O., Zweck, A, *Übersichtsstudie: Biokatalyse in der industriellen Produktion*. VDI Technologie Zentrum Düsseldorf, 2006: p. 13-28.
18. BRESLOW, R., -B, *ON THE MECHANISM OF THIAMINE ACTION .4. EVIDENCE FROM STUDIES ON MODEL SYSTEMS*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(14): p. 3719-3726.
19. Bruggemann, O., et al., *New configurations and applications of molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 15-24.
20. Brustolim, D., et al., *A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: The antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice*. International Immunopharmacology, 2006. **6**(6): p. 903-907.
21. Buchholz, K., *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, 1997, VCH Verlag GmbH. Weinheim.
22. Buchner, E., *Alkoholische Gärung ohne Hefezellen*. Berichte Deutsche Chemische Gesellschaft, 1897. **30**: p. 117-124.
23. Buhler, B., et al., *Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(2): p. 560-568.
24. Buhler, M. and C. Wandrey, *Continuous Use of Lipases in Fat Hydrolysis*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1987. **64**(9): p. 1257-1258.
25. Cameron, J.F., C.G. Willson, and J.M.J. Frechet, *Photogeneration of amines from alpha-keto carbamates: Photochemical studies*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(51): p. 12925-12937.
26. Cantarella, L., Z.L. Nikolov, and P.J. Reilly, *Disaccharide Production by Glucoamylase in Aqueous Ether Mixtures*. Enzyme and Microbial Technology, 1994. **16**(5): p. 383-387.
27. Carrea, G., *Biocatalysis in Water-Organic Solvent 2-Phase Systems*. Trends in Biotechnology, 1984. **2**(4): p. 102-106.
28. Celik, D., E. Bayraktar, and D. Mehmetoglu, *Biotransformation of 2-phenylethanol to phenylacetaldehyde in a two-phase fed-batch system*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **17**(1): p. 5-13.
29. Ciszak, E., *Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(23): p. 21240-21246.
30. Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 1995, Portland Press Ltd: London.

31. Corrie, J.E.T. and D.R. Trentham, *Synthetic, Mechanistic and Photochemical Studies of Phosphate-Esters of Substituted Benzoin*s. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 1992(18): p. 2409-2417.
32. Costacurta, A., Keijers, V. & Vanderleyden, J., *Molecular cloning and sequence analysis of an Azospirillum brasiliense indole-3-pyruvate decarboxylase*. *Molecular Genetics and Genomics*, 1994. **243**: p. 463-472.
33. Dale, L.C., Glover, E.D, Sach, D.P.L., *Bupropion for smoking cessation - predictors of successful outcome*. *Chest*, 2001. **119**: p. 1357-1364.
34. De Faveri, D., et al., *Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulose hydrolyzates*. *Chemical Engineering Journal*, 2002. **90**(3): p. 291-298.
35. de Maria, P.D., et al., *Preparative enantio selective synthesis of benzoin*s and (R)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2006. **38**(1): p. 43-47.
36. Demir, A.S., et al., *Asymmetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase*. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1999. **10**(24): p. 4769-4774.
37. Demir, A.S., et al., *Enantioselective synthesis of hydroxy ketones through cleavage and formation of acyloin linkage. Enzymatic kinetic resolution via C-C bond cleavage*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 2001(7): p. 633-635.
38. Demir, A.S., Pohl, M., Müller, M., *Nukleotidsequenz kodierend für eine Benzaldehyd-Lyase und Verfahren zur stereoselektiven Synthese von 2-Hydroxyketonen*, in *Deutsche Patentanmeldung*. 2000: Germany.
39. Demir, A.S., et al., *Benzaldehyde lyase-catalyzed enantioselective carbonylation of aromatic aldehydes with mono- and dimethoxy acetaldehyde*. *Organic Letters*, 2003. **5**(12): p. 2047-2050.
40. Demir, A.S., et al., *Enantioselective synthesis of alpha-hydroxy ketones via benzaldehyde lyase-catalyzed C-C bond formation reaction*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002. **344**(1): p. 96-103.
41. Drauz, K., Waldmann, H, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Dortmund, 2002, Wiley-VCH.
42. Du, Y., et al., *Organic solvent-free process for the synthesis of propylene carbonate from supercritical carbon dioxide and propylene oxide catalyzed by insoluble ion exchange resins*. *Green Chemistry*, 2005. **7**(7): p. 518-523.
43. Dünkermann, P., *Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoin*e mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme. 2004, Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Bonn.
44. Dunkelmann, P., et al., *Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: The first asymmetric cross-benzoin condensation*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(41): p. 12084-12085.

45. Dunnwald, T., et al., *Enantioselective synthesis of (S)-2-hydroxypropanone derivatives by benzoylformate decarboxylase catalyzed C-C bond formation*. European Journal of Organic Chemistry, 2000(11): p. 2161-2170.
46. Duval, C. and N.D. Xuong, *Analyse Organique Fonctionnelle .2. Combinaisons Du Dimedon (Dimethyl-5,5 Cyclohexa-Nedione-1,3) Avec Les Aldehydes*. Analytica Chimica Acta, 1955. **12**(1): p. 47-49.
47. Effenberger, F., V. Null, and T. Ziegler, *Preparation of Optically Pure L-2-Hydroxyaldehydes with Yeast Transketolase*. Tetrahedron Letters, 1992. **33**(36): p. 5157-5160.
48. Eikeren, P.v., *Use and regeneration of reagents using coupled reactions and permselective barriers.*, in *Eur. Pat. Appl.* 1990.
49. Eisenmesser, E.Z., et al., *Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis*. Nature, 2005. **438**(7064): p. 117-121.
50. Enders, D. and U. Kallfass, *An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation*. Angewandte Chemie-International Edition, 2002. **41**(10): p. 1743-1744.
51. Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*, 1992, Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
52. Faber, K. and R. Patel, *Chemical biotechnology - A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry - Editorial overview*. Current Opinion in Biotechnology, 2000. **11**(6): p. 517-519.
53. Fang, Q.K., et al., *Rapid access to enantiopure bupropion and its major metabolite by stereospecific nucleophilic substitution on an alpha-ketotriflate*. Tetrahedron-Asymmetry, 2000. **11**(18): p. 3659-3663.
54. Federsel, H.J., *Searching for scalable processes: Addressing the challenges in times of increasing complexity*. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2003. **6**(6): p. 838-847.
55. Fessner, W.D., *Enzyme mediated C-C bond formation*. Current Opinion in Chemical Biology, 1998. **2**(1): p. 85-97.
56. Fox, A.M., Whitesell, J. K., *Organische Chemie*. 1995, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin Oxford. p. 769 -780.
57. Gala, D., et al., *Preparations of antifungal Sch 42427/SM 9164: Preparative chromatographic resolution, and total asymmetric synthesis via enzymatic preparation of chiral [alpha]-hydroxy arylketones*. Tetrahedron Letters, 1996. **37**(5): p. 611-614.
58. Ginzburg, R., Y. Wong, and J.S. Fader, *Effect of bupropion on sexual dysfunction*. Annals of Pharmacotherapy, 2005. **39**(12): p. 2096-2099.
59. Gonzales, V., *Benzaldehyde Lyase, a Novel Thiamine PPI-Requiring Enzyme, from Pseudomonas fluorescens Biovar I*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1989. **171**(5): p. 2401-2405.

60. Gonzalez, B., et al., *Comparative Growth of Natural Bacterial Isolates on Various Lignin-Related Compounds*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. **52**(6): p. 1428-1432.
61. Halling, P.J., *Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic-Systems - Predictions of Effects on Equilibrium Position*. Biotechnology and Bioengineering, 1990. **35**(7): p. 691-701.
62. Harris, N.V., et al., *Acyl-Coa-Cholesterol O-Acyl Transferase (Acat) Inhibitors .1. 2-(Alkylthio)-4,5-Diphenyl-1h-Imidazoles as Potent Inhibitors of Acat*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(23): p. 4384-4392.
63. Hatch, L.F. and S.S. Nesbitt, *Preparation of Alkoxyacetaldehydes*. Journal of the American Chemical Society, 1945. **67**(1): p. 39-41.
64. Hecquet, L., J. Bolte, and C. Demuynck, *Enzymatic synthesis of "natural-labeled" 6-deoxy-L-sorbose precursor of an important food flavor*. Tetrahedron, 1996. **52**(24): p. 8223-8232.
65. Hegeman, G.D., *Benzoylformiate decarboxylase (Pseudomonas putida)*. Methods in Enzymology, 1970. **17**: p. 674-678.
66. Hegeman, G.D., *Synthesis of Enzymes of Mandelate Pathway by Pseudomonas Putida .2. Isolation and Properties of Blocked Mutants*. Journal of Bacteriology, 1966. **91**(3): p. 1155-1156.
67. Hertzberg, S., et al., *Alginate as Immobilization Matrix and Stabilizing Agent in a 2-Phase Liquid-System - Application in Lipase-Catalyzed Reactions*. Enzyme and Microbial Technology, 1992. **14**(1): p. 42-47.
68. Hildebrand, F., *The production of (R)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from Pseudomonas fluorescens in a continuously operated membrane reactor*. Biotechnology and bioengineering, 2006. **96**(5): p. 835-843.
69. Hobbs, G.R., et al., *Enzyme-catalysed carbon-carbon bond formation: Large-scale production of Escherichia coli transketolase*. Journal of Biotechnology, 1996. **45**(2): p. 173-179.
70. Holmberg, K., *Organic and Bioorganic Reactions in Microemulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, 1994. **51**: p. 137-174.
71. Huang, X.F., et al., *Homogenous enzymatic synthesis using a thermo-responsive water-soluble polymer support*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2001. **343**(6-7): p. 675-681.
72. Hurt, R.D., Sachs, D.P.L, Glover, E.B. Offord KP, Johnston JA, Dale LC, Khayrallah MA, Schroeder DR, Glover PN, Sullivan CR, Croghan IT, Sullivan PM, *A comparison of sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation*. The New England Journal of Medicine, 1997. **337**: p. 1195-1202.
73. Iding, H., et al., *Benzoylformate decarboxylase from Pseudomonas putida as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones*. Chemistry-a European Journal, 2000. **6**(8): p. 1483-1495.

74. Iding, H., et al., *Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. **1385**(2): p. 307-322.
75. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*. Gold Book, 1997, Blackwell Science. Vol. 2.
76. Janzen, E., *Die Benzaldehydlyase aus Pseudomonas fluoreszens: biochemische Charakterisierung und die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen*. 2002, Biologie, Universität Düsseldorf.
77. Jensen, V.J. and S. Rugh, *Industrial-Scale Production and Application of Immobilized Glucose-Isomerase*. Methods in Enzymology, 1987. **136**: p. 356-370.
78. Jeromin, E.G., Bertau, M., *Bioorganikum*, 2005, Wiley-VCH. Weinheim.
79. Jordan, F., *Biochemistry - How active sites communicate in thiamine enzymes*. Science, 2004. **306**(5697): p. 818-820.
80. Jordan, F., *Current mechanistic understanding of thiamin diphosphatedependent enzymatic reactions*. Natural Product Reports, 2003. **20**(2): p. 184-201.
81. Jordan, F., N.S. Nemeria, and E. Sergienko, *Multiple modes of active center communication in thiamin diphosphate-dependent enzymes*. Accounts of Chemical Research, 2005. **38**(9): p. 755-763.
82. Jorenby, D.E., Leischow, S.J, Nides, M.A., *A controlled trial of sustained release bupropion, a nicotine patch or both for smoking cessation*. The New England Journal of Medicine, 1999. **340**: p. 685-691.
83. Kakeya, H., et al., *Cytoxazone: A novel cytokine modulator containing a 2-oxazolidinone ring produced by Streptomyces sp.* Journal of Organic Chemistry, 1999. **64**(3): p. 1052-1053.
84. Khalifa, F.A., et al., *Benzoin in Heterocyclic Synthesis - Synthesis and Reactions of 4-Cyano-2,3-Diphenyl-2h-Pyrrol-5-Thione*. Tetrahedron, 1991. **47**(38): p. 8243-8250.
85. King, E.L. and C. Altman, *A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions*. Journal of Physical Chemistry, 1956. **60**(10): p. 1375-1378.
86. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(4): p. 345-351.
87. Kitzaki, T., et al., *Optically active antifungal azoles. VIII. Synthesis and antifungal activity of 1-[1R,2R)-2-(2,4-difluoro- and 2-fluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3(1H-1,2,4-triazol-1yl)propyl]-3-(4-substituted phenyl)-2-(1H,3H)-imidazones and 2-imidazolidinones*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1999. **47**(3): p. 351-359.
88. Klibanov, A.M., *Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic-Solvents*. Accounts of Chemical Research, 1990. **23**(4): p. 114-120.
89. Klibanov, A.M., *Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic-Solvents*. Trends in Biochemical Sciences, 1989. **14**(4): p. 141-144.



90. Klibanov, A.M., *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 241-246.
91. Knight, R.L. and F.J. Leeper, *Synthesis of and asymmetric induction by chiral bicyclic thiazolium salts*. Tetrahedron Letters, 1997. **38**(20): p. 3611-3614.
92. Koeller, K.M. and C.H. Wong, *Enzymes for chemical synthesis*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 232-240.
93. Kolp, S., et al., *Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2006. **1764**(7): p. 1234-1242.
94. Kragl, U., et al., *Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example*. Biotechnology and Bioengineering, 1996. **52**(2): p. 309-319.
95. Kragl, U., et al., *Engineering Aspects of Enzyme Engineering - Continuous Asymmetric C-C Bond Formation in an Enzyme-Membrane-Reactor*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **613**: p. 167-175.
96. Kragl, U., D. Vasicracki, and C. Wandrey, *Continuous-Processes with Soluble Enzymes*. Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 1993. **32**(1): p. 103-117.
97. Kreis, W., Baron, D., Stoll, G., *Biotechnologie und Arzneistoffe*, 2001, Apotheker Verlag. Stuttgart.
98. Krieger, N., et al., *Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems*. Food Technology and Biotechnology, 2004. **42**(4): p. 279-286.
99. Kuebrich, J.P., et al., *Mechanism of Benzoin Condensation*. Journal of the American Chemical Society, 1971. **93**(5): p. 1214-&.
100. Kühn, S., et al., *Process development for enzyme catalysed asymmetric C-C-bond formation*. Chemical Engineering Science, 2007. **62**: p. 5201-5205.
101. Kuhn, M.W., *4,4'-Diamino-benzil und seine Einwirkung auf Bakterien*. Ber.Dtsch. Chem. Ges., 1943. **76**: p. 405-412.
102. Laane, C., S. Boeren, and K. Vos, *On Optimizing Organic-Solvents in Multi-Liquid-Phase Biocatalysis*. Trends in Biotechnology, 1985. **3**(10): p. 251-252.
103. Laane, C., et al., *Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic-Solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. **30**(1): p. 81-87.
104. Lantos, I., et al., *Antiinflammatory Activity of 5,6-Diaryl-2,3-Dihydroimidazo[2,1-B]Thiazoles - Isomeric 4-Pyridyl and 4-Substituted Phenyl Derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry, 1984. **27**(1): p. 72-75.
105. Larsson, M., V. Arasaratnam, and B. Mattiasson, *Integration of Bioconversion and Downstream Processing - Starch Hydrolysis in an Aqueous 2-Phase System*. Biotechnology and Bioengineering, 1989. **33**(6): p. 758-766.

106. Leblanc, Y., et al., *Synthesis and Biological Evaluation of 2,3-Diarylthiophenes as Selective Cox-2 and Cox-1 Inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995. **5**(18): p. 2123-2128.
107. Lee, J.C. and Y.C. Lee, *A novel efficient synthesis of alpha-keto triflates*. *Synthetic Communications*, 2003. **33**(22): p. 3943-3946.
108. Lehninger, N., Cox, in *Prinzipien der Biochemie*. 1998, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford. Vol. 2. p. 242ff.
109. Leuenberger, H.G., P.K. Matzinger, and B. Wirz, *Synthesis and metabolism of drugs by means of enzyme-catalysed reactions*. *CHIMIA*, 1999. **53**(11): p. 536-540.
110. Liese, A., Lütz, S., *Nonimmobilized Biocatalysts in Industrial Fine Chemical Synthesis*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH: Weinheim.
111. Liese, A., Lütz, S., *Nonimmobilized Biocatalysts in Industrial Fine Chemical Synthesis*. 7th edition ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2004, Wiley-VCH. Weinheim.
112. Liu, C.L., Y.J. Nikas, and D. Blankschtein, *Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. **52**(2): p. 185-192.
113. Lombardi, Jg and E.H. Wiseman, *Preparation and Antiinflammatory Activity of Some Nonacidic Trisubstituted Imidazoles*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1974. **17**(11): p. 1182-1188.
114. Luisi, P.L., *Enzymes Hosted in Reverse Micelles in Hydrocarbon Solution*. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1985. **24**(6): p. 439-450.
115. Luisi, P.L., et al., *Hydrocarbon Micellar Solutions in Enzymatic-Reactions of Apolar Compounds*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1984. **434**(DEC): p. 549-557.
116. Lütz, S., *Persönliche Mitteilung*. 2006.
117. Lütz, S., *Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase*. 2004, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn. Bonn.
118. Lutz, S., N. Rao, and C. Wandrey, *Membranes in biotechnology*. *Chemie Ingenieur Technik*, 2005. **77**(11): p. 1669-1682.
119. Mahapatro, A., A. Kumar, and R.A. Gross, *Mild, solvent-free omega-hydroxy acid polycondensations catalyzed by Candida antarctica Lipase B*. *Biomacromolecules*, 2004. **5**(1): p. 62-68.
120. Manning, M.P., et al., *Enantioselective adsorption of hydrobenzoin on zeolite beta*. *Recent Advances in the Science and Technology of Zeolites and Related Materials, Pts a - C*, 2004. **154**: p. 1957-1960.
121. Mattiasson, B., *Extractive bioconversions*, in *Bioprocess Technology*. 1991: New York.

122. Matzke, S.F., et al., *Mechanisms of Protein Solubilization in Reverse Micelles*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **40**(1): p. 91-102.
123. Meanwell, N.A., et al., *Structure-Activity-Relationships Associated with 3,4,5-Triphenyl-1h-Pyrazole-1-Nonanoic Acid, a Nonprostanoid Prostacyclin Mimetic*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(2): p. 389-397.
124. Michaelis, L. and M.L. Menten, *The kinetics of the inversion effect*. Biochemische Zeitschrift, 1913. **49**: p. 333-369.
125. Miyake, T. and T. Shibamoto, *Quantitative-Analysis of Acetaldehyde in Foods and Beverages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(11): p. 1968-1970.
126. Montheit, M.J., *Speciality Chemicals*, 1999. **19**: p. 276-278.
127. Mopper, K., W.L. Stahovec, and L. Johnson, *Trace Analysis of Aldehydes by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography and Precolumn Fluorogenic Labeling with 5,5-Dimethyl-1,3-Cyclohexanedione*. Journal of Chromatography, 1983. **256**(2): p. 243-252.
128. Morazzoni, P. and E. Bombardelli, *Silybum marianum (Carduus marianus)*. Fitoterapia, 1995. **66**(1): p. 3-42.
129. Mortimer, C.E., *Chemie*, 1996, Georg Thieme Verlage. Stuttgart, New York,, Vol. 6.
130. Mosbacher, T.G., M. Mueller, and G.E. Schulz, *Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from Pseudomonas fluorescens*. Febs Journal, 2005. **272**(23): p. 6067-6076.
131. Mukataka, S., et al., *Extractive Bioconversions in Aqueous 2-Phase Systems - Enzymatic-Hydrolysis of Casein Proteins*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. **40**(2): p. 195-206.
132. Myles, D.C., P.J. Andrulis, and G.M. Whitesides, *A Transketolase-Based Synthesis of (+)-Exo-Brevicomine*. Tetrahedron Letters, 1991. **32**(37): p. 4835-4838.
133. Nam, N.H., et al., *Combretoxazolones: Synthesis, cytotoxicity and antitumor activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001. **11**(23): p. 3073-3076.
134. Neuberg, C., *Biochemical Reductions at the Expense of Sugars*. Advances in Carbohydrate Chemistry, 1949. **4**: p. 75-117.
135. Oehme, G., et al., *Complex catalyzed hydrogenation and carbon-carbon bond formation in aqueous micelles*. Coordination Chemistry Reviews, 1999. **186**: p. 585-600.
136. Oh, K.J., Park, E. J., Yoon, M. Y., Han, T. R. & Choi, J. D., *Roles of histidine residues in tobacco acetolactate synthase*. Biochemical and Biophysical REsearch Communications, 2001. **282**(5): p. 1237 - 1243.
137. Papageorgiou, G. and J.E.T. Corrie, *Synthesis and properties of carbamoyl derivatives of photolabile benzoin*. Tetrahedron, 1997. **53**(11): p. 3917-3932.

138. Petersson, A.E.V., et al., *Wax esters produced by solvent-free energy-efficient enzymatic synthesis and their applicability as wood coatings*. Green Chemistry, 2005. **7**(12): p. 837-843.
139. Pirrung, M.C. and J.C. Bradley, *Comparison of Methods for Photochemical Phosphoramidite-Based DNA-Synthesis*. Journal of Organic Chemistry, 1995. **60**(20): p. 6270-6276.
140. Pirrung, M.C. and J.C. Bradley, *Dimethoxybenzoin Carbonates - Photochemically-Removable Alcohol Protecting Groups Suitable for Phosphoramidite-Based DNA-Synthesis*. Journal of Organic Chemistry, 1995. **60**(5): p. 1116-1117.
141. Pirrung, M.C., et al., *(Benzoinverwendung) Inverse phosphotriester DNA synthesis using photochemically-removable dimethoxybenzoin phosphate protecting groups*. Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(6): p. 2129-2136.
142. Pirrung, M.C. and S.W. Shuey, *Photoremovable Protecting Groups for Phosphorylation of Chiral Alcohols - Asymmetric-Synthesis of Phosphotriesters of (-)-3',5'-Dimethoxybenzoin*. Journal of Organic Chemistry, 1994. **59**(14): p. 3890-3897.
143. Pohl, M., B. Lingen, and M. Muller, *Thiamin-diphosphate-dependent enzymes: New aspects of asymmetric C-C bond formation*. Chemistry-a European Journal, 2002. **8**(23): p. 5289-5295.
144. Pohl, M., Martina, *Persönliche Mitteilung*, S. Kühl, Editor. 2006: Jülich.
145. Pohl, M., G.A. Sprenger, and M. Muller, *A new perspective on thiamine catalysis*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**(4): p. 335-342.
146. Pommersheim, R., J. Schrezenmeir, and W. Vogt, *Immobilization of Enzymes by Multilayer Microcapsules*. Macromolecular Chemistry and Physics, 1994. **195**(5): p. 1557-1567.
147. Popa, A., et al., *Organic synthesis by phosphorus groups supported polymers*. Revista De Chimie, 2002. **53**(3): p. 232-238.
148. Prazeres, D.M.F., F.A.P. Garcia, and J.M.S. Cabral, *Continuous Lipolysis in a Reversed Micellar Membrane Bioreactor*. Bioprocess Engineering, 1994. **10**(1): p. 21-27.
149. Procopiou, P.A., et al., *Inhibitors of Cholesterol-Biosynthesis .2. 3,5-Dihydroxy-7-(N-Pyrrolyl)-6-Heptenoates, a Novel Series of Hmg-Coa Reductase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**(23): p. 3658-3662.
150. Prosen, E. and O.P. Ward, *Optimization of Reaction Conditions for Production of S-(-)-2-Hydroxypropiophenone by Acinetobacter-Calcoaceticus*. Journal of Industrial Microbiology, 1994. **13**(5): p. 287-291.
151. Quioco, F.A. and F.M. Richards, *Intermolecular Cross Linking of Protein in Crystalline State - Carboxypeptidase-A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1964. **52**(3): p. 833-&.
152. Reddy, I.K., et al., *Chirality and its implications in transdermal drug development*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2000. **17**(4): p. 285-325.

153. Robinson, B.H., Chun, K., *The relationship between transketolase, yeast pyruvate decarboxylase and pyruvate dehydrogenase of the pyruvate dehydrogenase complex*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1993. **328**(1-2): p. 99-102.
154. Rock, R.S. and S.I. Chan, *Synthesis and photolysis properties of a photolabile linker based on 3'-methoxybenzoin*. Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(4): p. 1526-1529.
155. Rodehutschord, M., et al., *Review article - Consequences of the ban of by-products from terrestrial animals in livestock feeding in Germany and the European Union: Alternatives, nutrient and energy cycles, plant production, and economic aspects*. Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung, 2002. **56**(2): p. 67-91.
156. Rushton, A., Ward, A.S, Holdich, R.G., *Solid-Liquid Filtration and Separation Technology*. 1 ed, 1996, VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Vol. 1.
157. Sanchezferrer, A. and F. Garciacarmona, *Reverse Vesicles as a New System for Studying Enzymes in Organic-Solvents*. Biochemical Journal, 1992. **285**: p. 373-376.
158. Sauer, T. and E.A. Galinski, *Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes*. Biotechnology and Bioengineering, 1998. **57**(3): p. 306-313.
159. Schellenberger, A., *Sixty years of thiamin diphosphate biochemistry*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. **1385**(2): p. 177-186.
160. Schenck, F.W., *High fructose syrups - a review*. International Sugar Journal, 2000. **102**(1218): p. 285-288.
161. Schenk, G., R.G. Duggleby, and P.F. Nixon, *Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998. **30**(12): p. 1297-1318.
162. Schloss, J.V., *Chemistry and plant production: Herbicides inhibiting branches chain amino acids biosynthesis - recent developments*, 1984, Springer-Verlag. Berlin.
163. Schmid, A., et al., *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 258-268.
164. Schmid, A., et al., *Developments toward large-scale bacterial bioprocesses in the presence of bulk amounts of organic solvents*. Extremophiles, 1998. **2**(3): p. 249-256.
165. Schomacker, R. and G.A. Braun, *Ultrafiltration of reverse micelles in the ternary system AOT/isooctane/water*. Langmuir, 1996. **12**(10): p. 2362-2366.
166. Schomaecker, R., B.H. Robinson, and P.D.I. Fletcher, *Interaction of Enzymes with Surfactants in Aqueous-Solution and in Water-in-Oil Microemulsions*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I, 1988. **84**: p. 4203-4212.
167. Schorken, U. and G.A. Sprenger, *Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998. **1385**(2): p. 229-243.

168. Schroen, C.G.P.H., et al., *Process design for enzymatic adipyl-7-ADCA hydrolysis*. Biotechnology Progress, 2002. **18**(4): p. 745-751.
169. Schubert, T., W. Hummel, and M. Muller, *Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks*. Angewandte Chemie-International Edition, 2002. **114**(4): p. 656-659.
170. Schügerl, K., *Extraction of Primary and Secondary Metabolites*, in *Technology Transfer in Biotechnology*, U.K. T. Scheper, Editor. 2005, Springer: Berlin, Heidelberg.
171. Schutz, A., et al., *Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates*. Biochemistry, 2005. **44**(16): p. 6164-6179.
172. Schutz, A., et al., *Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from Enterobacter cloacae, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid*. European Journal of Biochemistry, 2003. **270**(10): p. 2312-2321.
173. Selim, S., *Separation and Quantitative-Determination of Traces of Carbonyl-Compounds as Their 2,4-Dinitrophenylhydrazones by High-Pressure Liquid-Chromatography*. Journal of Chromatography, 1977. **136**(2): p. 271-277.
174. Sello, G., et al., *Organic phase effect in the biphasic bioconversion of substituted naphthalenes by engineered E-coli containing P-fluorescens N3 dioxygenase*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2004. **29**(1-6): p. 181-186.
175. Seoane, G., *Enzymatic C-C bond-forming reactions in organic synthesis*. Current Organic Chemistry, 2000. **4**(3): p. 283-304.
176. Sheehan, J.C. and F.S. Guziec, *4,5-Diphenyl-4-Oxazolin-2-One Ring-System as an Amine Protecting Group*. Journal of the American Chemical Society, 1972. **94**(18): p. 6561-6563.
177. Sheldon, R., *Industrial Synthesis of Optically-Active Compounds*. Chemistry & Industry, 1990(7): p. 212-219.
178. Sheldon, R.A., *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art*. Green Chemistry, 2005. **7**(5): p. 267-278.
179. Shin, H.S. and P.L. Rogers, *Biotransformation of benzaldehyde to L-phenylacetylcarbinol, an intermediate in L-ephedrine production, by immobilized Candida utilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **44**(1-2): p. 7-14.
180. Stanier, R.Y., Ornston, L. N., *The beta-ketoadipate pathway*. Advances in Microbial Physiology, 1973. **9**: p. 89-151.
181. Stermitz, F.R., et al., *Synergy in a medical plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhynocarpin, a multidrug pump inhibitor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(4): p. 1433-1437.

182. Stillger, T., *Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen*. 2004, Chemie, Bonn. Bonn.
183. Stillger, T., et al., *Reaction Engineering of Benzaldehyde Lyase from Pseudomonas fluorescens Catalyzing Enantioselective C-C Bond Formation*. Organic Process Research & Development, 2006. **10**: p. 1172-1177.
184. Stinson, S.C., *Chiral drug interactions*. Chemical & Engineering News, 1999. **77**(41): p. 101-105.
185. Stinson, S.C., *Counting on chiral drugs*. Chemical & Engineering News, 1998. **76**(38): p. 83-87.
186. Stone, F.S., *Research Perspectives during 40 years of the Journal of Catalysis*. Journal of Catalysis, 2003. **216**(1-2): p. 2-11.
187. Straathof, A.J.J., *Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **83**(4): p. 371-375.
188. Straathof, A.J.J., S. Panke, and A. Schmid, *The production of fine chemicals by biotransformations*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(6): p. 548-556.
189. Strong, M., *FDA policy and regulation of stereoisomers: Paradigm shift and the future of safer, more effective drugs*. Food and Drug Law Journal, 1999. **54**(3): p. 463-487.
190. Summer, H.B., *The isolation and crystallization of the enzyme Urease*. Journal of Biological Chemistry, 1926: p. 435-441.
191. Tan, K.H. and R. Lovrien, *Enzymology in Aqueous-Organic Cosolvent Binary-Mixtures*. Journal of Biological Chemistry, 1972. **247**(10): p. 3278-3282.
192. Tao, Y., W.E. Bentley, and T.K. Wood, *Phenol and 2-naphthol production by toluene 4-monooxygenases using an aqueous/dioctyl phthalate system*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **68**(5): p. 614-621.
193. Theil, F., *Enzyme in der organischen Synthese*, 1997, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
194. Tittmann, K., et al., *Activation of thiamine diphosphate in pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis*. Febs Letters, 1998. **441**(3): p. 404-406.
195. Traube, M., *On the theory of fermentation and decay phenomena, also of ferment activity in general*. Annalen der Physik und Chemie, 1858. **103**: p. 331.
196. Trost, B.M., F.D. Toste, and A.B. Pinkerton, *Non-metathesis ruthenium-catalyzed C-C bond formation*. Chemical Reviews, 2001. **101**(7): p. 2067-2096.
197. Uebori, M. and K. Imamura, *Analysis of aliphatic and aromatic carbonyl compounds in ambient air by LC/MS/MS*. Analytical Sciences, 2004. **20**(10): p. 1459-1462.
198. Vasic-Racki, D., et al., *Modeling of reaction kinetics for reactor selection in the case of L-erythrose synthesis*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2003. **25**(5): p. 285-290.

199. Vauck, W. and H. Müller, *Gundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*, 2000, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. Stuttgart, Vol. 11.
200. Vilella, M., et al., *Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?* *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003. **42**(26): p. 2993-2996.
201. Viscidi, K.A., et al., *Complex phenolic compounds reduce lipid oxidation in extruded oat cereals*. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 2004. **37**(7): p. 789-796.
202. Vogel, M., A. Buldt, and U. Karst, *Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis - a critical review*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **366**(8): p. 781-791.
203. Wandrey, C., *Persönliche Mitteilung*, S. Kühl, Editor. 2006: Jülich.
204. Wibowo, C., W.C. Chang, and K.M. Ng, *Design of integrated crystallization systems*. *Aiche Journal*, 2001. **47**(11): p. 2474-2492.
205. Wilcocks, R., et al., *Acyloin Formation by Benzoylformate Decarboxylase from Pseudomonas-Putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992. **58**(5): p. 1699-1704.
206. Wöhler, F. and J. Liebig, *Untersuchungen über das Radikal der Benzoessäure*. *Justus Liebigs Ann. Chem*, 1832. **3**: p. 249 - 287.
207. Wong, C. and G. Whitesides, *Enzymes in synthetic organic chemistry*. *Tetrahedron organic chemistry series*, 1994, Elsevier Science. Oxford, Vol. 12.
208. Wubbolts, M.G., et al., *Efficient Production of Optically-Active Styrene Epoxides in 2-Liquid Phase Cultures*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994. **16**(10): p. 887-894.
209. Yang, H., et al., *The enantiomeric purity of alcohols formed by enzymatic reduction ketones can be improved by optimisation of the temperature and by using a high co-substrate concentration*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1997. **1336**(1): p. 51-58.
210. Yuki, Y., et al., *Novel Chiral Stationary Phases for the Resolution of the Enantiomers of Amino-Acids by Ligand-Exchange Chromatography*. *Chemistry Letters*, 1986(8): p. 1347-1350.
211. Zaks, A. and A.M. Klibanov, *Substrate-Specificity of Enzymes in Organic-Solvents Vs Water Is Reversed*. *Journal of the American Chemical Society*, 1986. **108**(10): p. 2767-2768.
212. Zaks, A. and A.J. Russell, *Enzymes in Organic-Solvents - Properties and Applications*. *Journal of Biotechnology*, 1988. **8**(4): p. 259-270.
213. Zelinski, T. and M.R. Kula, *Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1997. **15**(1): p. 57-74.



214. Zelinski, T., et al., *Asymmetric reductions in aqueous media: enzymatic synthesis in cyclodextrin containing buffers*. Tetrahedron-Asymmetry, 1999. **10**(9): p. 1681-1687.
215. Zelinski, T. and H. Waldmann, *Cross-linked enzyme crystals (CLECs): Efficient and stable biocatalysts for preparative organic chemistry*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1997. **36**(7): p. 722-724.
216. Zurek, G., A. Buldt, and U. Karst, *Determination of acetaldehyde in tobacco smoke using N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan by liquid chromatography/mass spectrometry*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000. **366**(4): p. 396-399.