

Forschungszentrum Jülich

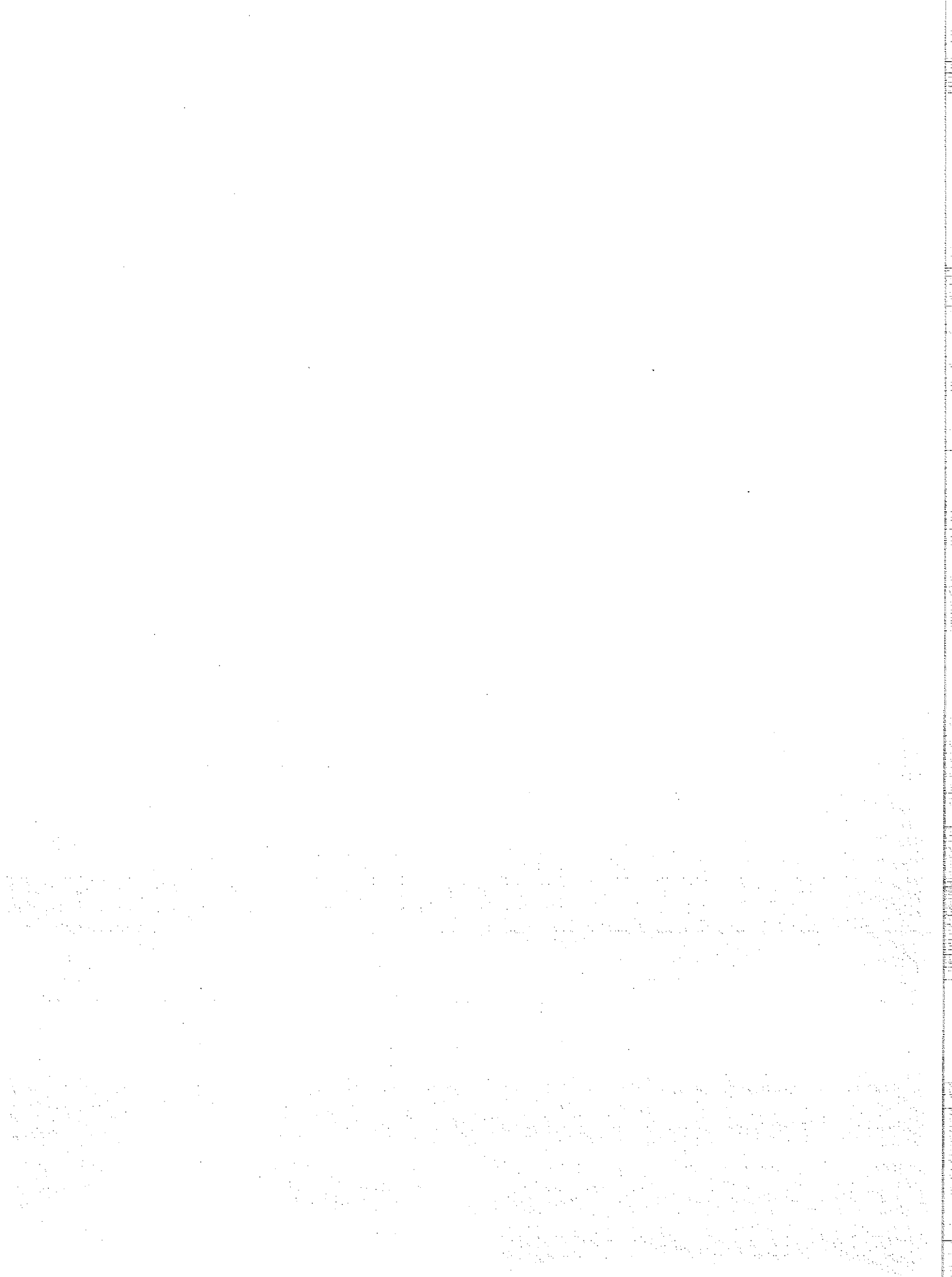


Institut für Biotechnologie

Membranverfahren für Redoxenzyme
Gasversorgung – Reaktion – Produktextraktion

Sebastian Rissom

JÜL-3682



Membranverfahren für Redoxenzyme

Gasversorgung – Reaktion – Produktextraktion

Sebastian Rissom

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3682
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3682
D 5 (Diss. Univ. Bonn, 1999)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Membranverfahren für Redoxenzyme

Substratversorgung - Reaktion - Produktextraktion

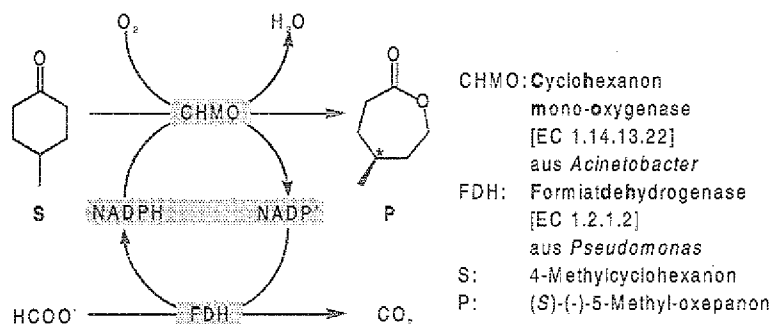
Zusammenfassung

Oxidoreduktasen sind Enzyme, die die Oxidation bzw. Reduktion chemischer Verbindungen katalysieren. Ihre Anwendung in der organischen Synthese eröffnet den Zugang zu einer Reihe wichtiger chiraler Bausteine in hoher Enantiomerenreinheit.

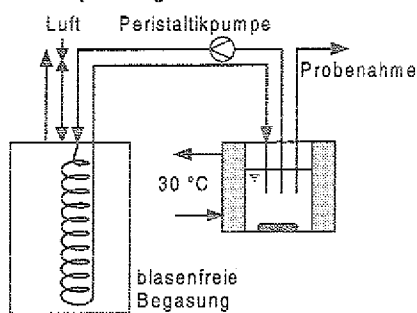
Im Rahmen der Arbeiten wurden zwei interessante Enzyme ausgewählt, die den Zugang zu zwei unterschiedlichen Substanzklassen eröffnen. Der dazu benötigte Nicotinamid-Cofaktor wird effektiv und günstig mit Hilfe von Formiatdehydrogenasen (FDH) regeneriert.

Die enzymatische *Baeyer-Villiger-Oxidation* eines prochiralen Ketons zum entsprechenden Lacton gelingt enantioselektiv mit einer Cyclohexanon Monooxygenase (CHMO). Sowohl für das Regenerierungsproblem des Cofaktors - durch Einsatz einer punktmutierten FDH -, als auch für die blasenfreie und somit scherarme Sauerstoffversorgung des Reaktionsgemisches - durch eine blasenfreie Begasung mit Hilfe des diffusiven Gastransportes durch einen dünnwandigen Silikon-schlauch - wurden elegante Problemlösungen gefunden.

Reaktionsschema

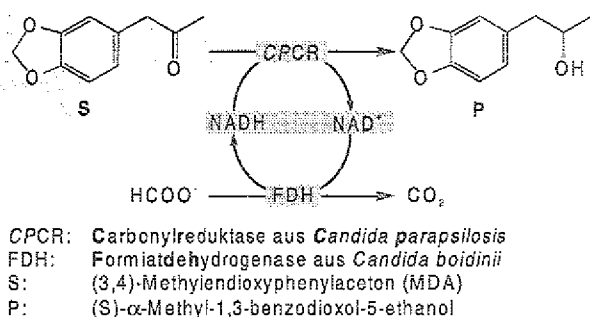


Prinzip des genutzten Reaktors

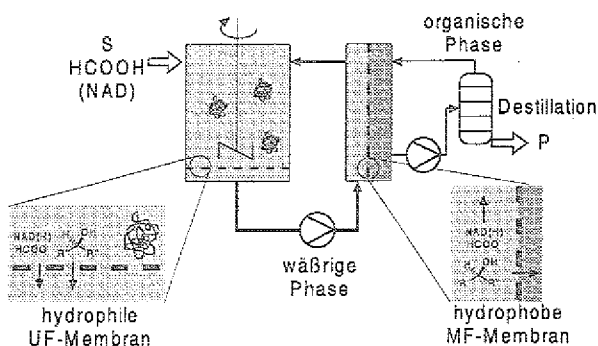


Die Carbonylreduktase aus der Hefe *Candida parapsilosis* (CPCR) reduziert eine Reihe unterschiedlicher Ketoverbindungen zu enantiomerenreinen Alkoholen. Als Beispielsubstrate wurden das schlechtlösliche 3,4-Methylenedioxyphenylacetone (MDA, erste Stufe eines vielversprechenden AMPA-Blockers) und das gut lösliche 2,5-Hexandion (Vorstufe für DuPHOS-Ligand) gewählt. Am Beispiel des schlechtlöslichen MDA zeigte sich die außergewöhnliche Betriebsstabilität des Systems und konnte der Cofaktorverbrauch durch Einsatz eines Bimembranreaktors mit kontinuierlicher Produktextraktion begrenzt werden. Für die Produktion von (2S,5S)-Hexandiol konnte ein wirtschaftlicher und scale-up-fähiger biokatalytischer Produktionsprozeß entwickelt werden.

Reaktionsschema



Extraktiver Bimembranreaktor



In allen Fällen wurden präparative Umsetzungen, teilweise bis in den kg-Maßstab, durchgeführt und die Produkte mit hoher Enantiomerenreinheit erhalten. Die entwickelten Verfahren wurden mit anderen katalytischen Verfahren verglichen und stellten sich mindestens als konkurrenzfähig dar.

Membrane Processes for Redox Enzymes

Substrate Delivery - Reaction - Product Extraction

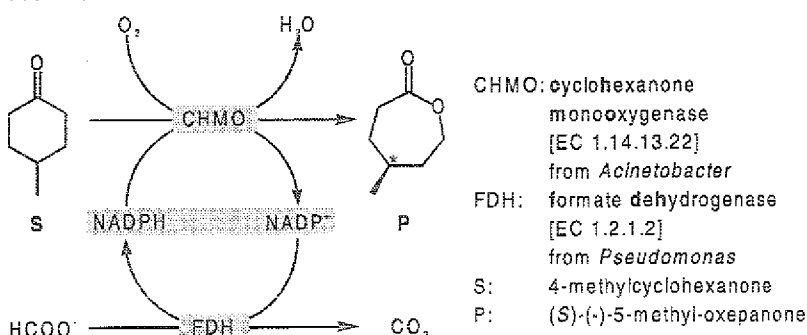
Abstract

Oxidoreductases are enzymes that catalyse the oxidation or reduction of chemical compounds. Their application in chemical synthesis offers the access to a multitude of chiral synthons of high optical purity.

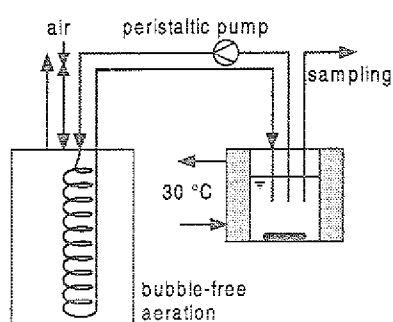
In the scope of this thesis two interesting enzymes were selected, which offer the access to two different classes of compounds. The nicotinamide-cofactors needed were regenerated effectively using formate dehydrogenases (FDH).

The enzymatic *Baeyer-Villiger-Oxidation* of prochiral ketones to form the corresponding lactones was performed enantiospecifically using cyclohexanone monooxygenase (CHMO). For the problem of cofactor regeneration - using a FDH obtained by site-directed mutagenesis - and for the bubble-free aeration - by means of diffusive gas transfer through a silicone membrane - elegant solutions have been found.

reaktion scheme

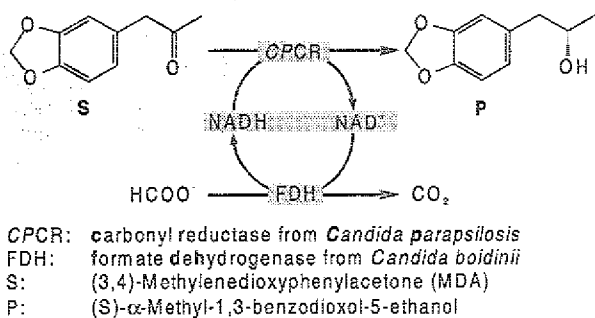


scheme of the reactor used

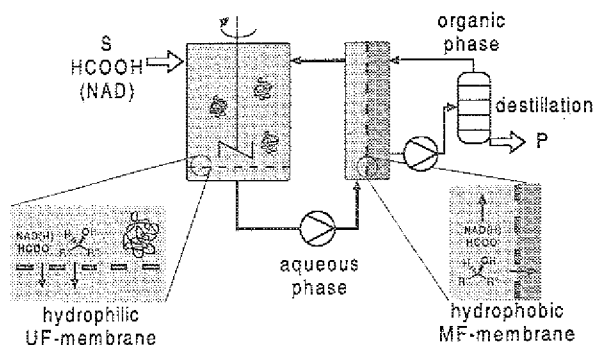


A carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* (CPCR) reduces numerous ketones to form the corresponding enantiopure alcohols. As model substrates the poorly soluble 3,4-methylenedioxyphenylacetone (MDA, first step in the synthesis of a promising AMPA-blocker at Eli Lilly) and the readily soluble 2,5-hexanedione (precursor of the DuPHOS-Ligand) were selected. With MDA as a substrate the extraordinary operational stability of the system was demonstrated and the cofactor consumption minimised by use of a biphasic membrane reactor with integrated product extraction. For the production of (2S,5S)-hexanediol an economic and scalable biocatalytic process was developed.

reaction scheme



biphasic membrane reactor with extraction



In all cases preparative conversions, in part up to the kg-scale, were performed and the products were isolated in high enantiomeric purity. The processes developed were compared to other catalytical processes and presented themselves as competitive.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1996 bis Dezember 1998 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. WANDREY angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. C. WANDREY für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Arbeitsmitteln und die stete Unterstützung während der gesamten Zeit in Jülich
- Herrn Prof. Dr. J. BARGON, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferats.
- Herrn Prof. Dr. U. KRAGL für seine hilfreichen Diskussionen und Anregungen sowie die kritische Durchsicht der Arbeit auch während des Umzugs nach Rostock.
- Herrn Dr. A. LIESE für seine stete Diskussionsbereitschaft, wertvolle Tips und die kritische Durchsicht der Arbeit. Viel Erfolg weiterhin mit den Diolen!
- Frau D. HAHN, Frau H. OFFERMANN und ganz besonders Frau U. MACKFELD für die unermüdliche Hilfe im Labor, auch wenn die kinetischen Messungen sicher teils frustrierend waren.
- Frau Dr. M. VOGEL und Herrn Dr. U. SCHWARZ-LINEK für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der BAEYER-VILLIGER Oxidation.
- Frau Dipl.-Biol. M. BÖNITZ, Institut für Enzymtechnologie (IET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die erstklassige Zusammenarbeit in allen Fragen der *CPCR*, für manche gemeinsame Fermentation, Poster,... Die *rec-CPCR* kommt!
- Frau Prof. D. VASIC-RACKI, Universität Zagreb für Ihre Hilfe bei der kinetischen Beschreibung der Hexandion-Reduktion.
- Herrn Prof. Dr. V. I. TISHKOV, Universität Moskau, für die freundliche Überlassung der Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas*.
- Frau Prof. Dr. M.-R. KULA, IET, für ihre Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung von Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*.
- Herrn Dr. W. HUMMEL, IET, für (R)-spezifische Vergleichsexperimente.
- Herrn Dr. R. FURSTOSS und seiner Arbeitsgruppe, besonders Frau Dipl.-Biol. Y. GENZEL für eine interessante Zeit in Marseille und die gemeinsame Durchführung des Epoxid-hydrolase-Projektes.
- Frau M. DITTRICH und Herrn Dr. J. WÖLTINGER für die kritische Durchsicht der Arbeit.

- Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, ganz besonders denen der „Enzymgruppe“ für die vielen Hilfestellungen und Diskussionen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dem „Fermentationsteam“ aus IBT und IET für die Hilfe bei Enzymfermentationen und -aufreinigung.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Werkstätten, des Elektronik- und Photolabors für die stets prompte Bearbeitung meiner Wünsche.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilungen der Universität Bonn und des Forschungszentrums Jülich.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Stabsstelle Öffentlichkeitsarbeit, besonders Frau G. MÜSGEN, für die problemlose Zusammenarbeit bei der Planung und Durchführung der Besucherführungen.
- Herrn Dipl.-Chem G. DUDZIAK für 3 Jahre WG „auf dem Rübenacker“.
- Meinem SU-BU für treue Fahrdienste.
- Frederik für Scans und Design.
- Meinen Eltern für die kontinuierliche ideelle und finanzielle Unterstützung meines Studiums und meiner Promotion.

Nature is a wonderful chemist

E.J. Corey

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Verzeichnis der Abbildungen	iv
Verzeichnis der Tabellen	vi
Abkürzungen	vii
Glossar	ix
1 Einleitung	1
1.1 Asymmetrische Synthese mit isolierten Enzymen	1
1.2 Reaktionstechnik in der Enzymkatalyse	3
1.3 Membranverfahren und Membranreaktoren	6
1.3.1 Membranen und ihre Anwendung	6
1.3.2 Membranreaktoren	7
1.3.3 Der Enzymmembranreaktor	9
2 Aufgabenstellung	10
3 Reaktorkonzept für die enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation mit integrierter blasenfreier Begasung	12
3.1 Einleitung	12
3.1.1 Die BAEYER-VILLIGER Oxidation: Chemisch und enzymatisch	12
3.1.2 Cyclohexanon Monooxygenase aus <i>Acinetobacter</i> NCIMB 9871: Metabolische Bedeutung, Mechanismus und Selektivität	14
3.1.3 Cofaktorregenerierung von NAD(P)H	16
3.2 Gewinnung des Enzyms	20
3.2.1 Fermentation	20
3.2.2 Aufreinigung	20
3.3 Bedeutung der Sauerstoffversorgung, blasenfreie Begasung	21
3.4 Kinetische Untersuchungen, Suche nach günstigen Reaktionsbedingungen	22
3.4.1 Auswahl eines Modellsubstrates	22
3.4.2 Einfluß von pH-Wert und Temperatur	23
3.4.3 Kinetische Parameter der Enzyme	23
3.5 Synthesen im Zweienzymsystem	24
3.5.1 Reaktor mit integrierter blasenfreier Begasung	24
3.5.2 Betrachtung der maximalen Zyklenzahl des Cofaktors, Einsatz von Nanofiltrationsmembranen	27
3.6 Ausblick	29
3.7 Zwischenbilanz	32
4 Verfahren zur biokatalytischen asymmetrischen Ketonreduktion	33
4.1 Einleitung	33
4.1.1 Methoden der katalytischen asymmetrischen Ketonreduktion	33
4.2 Die Carbonylreduktase aus <i>Candida parapsilosis</i> : Ein effektiver Biokatalysator für die enzymatische Ketonreduktion	36
4.2.1 Fermentation der <i>Candida parapsilosis</i>	37
4.2.2 Aufarbeitung der Carbonylreduktase	39
4.3 Reduktion leichtlöslicher Substrate am Beispiel der Synthese von (2S,5S)-Hexandiol	42
4.3.1 Beschreibung des Reaktionssystems	42

4.3.2	Verwendung von enantiomerenreinem 2,5-Hexandiol	42
4.3.3	Kinetische Beschreibung und Modellierung des Reaktionssystems	44
4.3.3.1	Einführung	44
4.3.3.2	Im kinetischen Modell enthaltene Reaktionen	45
4.3.3.3	Erstellung eines kinetischen Modells	46
4.3.3.4	Ermittlung der kinetischen Parameter	50
4.3.3.5	Kinetik der Formiatdehydrogenase	53
4.3.3.6	Aufstellung der Stoffbilanzen für die Synthese in Satzreaktor und EMR	53
4.3.4	Synthesereaktionen	55
4.3.4.1	Synthesen im Satzreaktor	55
4.3.4.2	Synthesereaktion im EMR	57
4.3.5	Diskussion der enzymatischen Reaktion	58
4.4	Verfahren zur biokatalytischen asymmetrischen Verfahrensvergleich der Hexandiol synthese	64
4.4.1	Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe	64
4.4.2	Scale-up der Hefereduktion	66
4.4.3	Diskussion der Verfahrensalternativen und Ausblick	69
4.4.4	Zwischenbilanz	72
4.5	Reduktion schwerlöslicher Substrate	74
4.5.1	Reduktion von Acetylbuttersäureethylester (ABEE)	75
4.5.1.1	Substratauswahl	75
4.5.1.2	Kinetische Beschreibung des Systems	76
4.5.1.3	Kontinuierliche Synthese im EMR	78
4.5.2	Reduktion von (3,4)-Methylenedioxyphenylacetone (MDA)	79
4.5.2.1	Substratauswahl	79
4.5.2.2	Kinetische Beschreibung des Systems	81
4.5.2.3	Synthese im EMR	82
4.5.2.4	Reaktorkonzept des Zweiphasenmembranreaktors (ZPMR)	84
4.5.2.5	Synthese in ZPMR	90
4.5.3	Reduktion von Acetophenon	92
4.5.3.1	Substratauswahl	92
4.5.3.2	Kinetische Beschreibung des Systems	92
4.5.3.3	Synthese in ZPMR	94
4.6	Reduktion von Acetophenon: Ein Verfahrensvergleich	95
4.6.1	Die Reaktionssysteme	95
4.6.2	Kinetisches Verhalten	96
4.6.3	Verwendete Reaktoren	97
4.6.4	Diskussion und Vergleich signifikanter Parameter	97
4.7	Zwischenbilanz	100
5	Diskussion und Ausblick	102
5.1	Übergreifende Diskussion der Verfahren	102
5.2	Enzymverfügbarkeit	103
5.3	Erweiterung der Substratspektren: Chemische Herausforderungen	104
6	Zusammenfassung	106
7	Material und Methoden	109
7.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	109
7.1.1	Chemikalien	109
7.1.2	Geräte	109
7.2	Analysenbedingungen	112
7.2.1	Umsatzbestimmung	112

7.2.2	Bestimmung des Enantiomerenüberschusses	113
7.2.3	Kernresonanzspektren	114
7.2.4	Massenspektren	115
7.2.5	Infrarotspektren	115
7.2.6	Drehwertmessungen	115
7.2.7	Röntgenpulverdiffraktometrie	115
7.2.8	Photometrische Messungen	115
7.3	Versuchsvorschriften	116
7.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	116
7.3.2	BAEYER-VILLIGER Oxidation	116
7.3.3	Fermentation und Aufreinigung der <i>CPCR</i>	118
7.3.4	Enzymatische Reduktion von Hexandion	121
7.3.5	Hefereduktion von 2,5-Hexandion	122
7.3.6	Reduktion von ABEE	123
7.3.7	Reduktion von MDA	124
7.3.8	Reduktion von Acetophenon	127
8	Literatur	128
Anhang A: Kinetische Daten		139
Anhang B: Analytische Daten		155

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1-1: Methoden des Zugangs zu enantiomerenreinen Verbindungen	2
Abb. 1-2: Synthese von 7-ACA	3
Abb. 1-3: Synthese von <i>L</i> -tert-Leucin	3
Abb. 1-4: Schwerpunkte biokatalytischer Reaktionstechnik	4
Abb. 1-5: Schritte einer Verfahrensentwicklung für enzymatische Biotransformationen	5
Abb. 1-6: Anwendungsfelder für Membranen	6
Abb. 1-7: Membranfiltration	7
Abb. 1-8: Bauformen von Membranreaktoren	8
Abb. 2-1: Enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation mit CHMO	10
Abb. 2-2: Enzymatische Ketonreduktion mit <i>CPCR</i>	11
Abb. 3-1: BAEYER-VILLIGER Oxidation mit Persäuren	12
Abb. 3-2: Cyclohexanol-Metabolismus von <i>Acinetobacter</i> NCIMB 9871	15
Abb. 3-3: Mechanismus der enzymatischen BAEYER-VILLIGER Oxidation	15
Abb. 3-4: Enzymatische Regenerierung von NADH	18
Abb. 3-5: Reaktionsschema des Zweienzymsystems aus CHMO und FDH	22
Abb. 3-6: pH- und Temperaturabhängigkeit der CHMO	23
Abb. 3-7: Schema des Satzreaktors mit integrierter blasenfreier Begasung	25
Abb. 3-8: Foto des Reaktoraufbaus	25
Abb. 3-9: Prinzip eines <i>Repetitive Batch</i> -Reaktors	26
Abb. 3-10: Synthese von 5-Methylcaprolacton im begasten <i>Repetitive Batch</i>	27
Abb. 3-11: Erhöhung der maximalen Zyklenzahl durch Nanofiltration	28
Abb. 3-12: EMR-Aufbau mit integrierter blasenfreier Begasung	29
Abb. 3-13: Foto des EMR-Aufbaus	30
Abb. 3-14: Syntheseversuch im EMR mit integrierter blasenfreier Begasung	31
Abb. 3-15: Synthese von Lardolure und Supellapyron	31
Abb. 4-1: Ketoester-Hydrierung mit Ru-BPE-Katalysator	34
Abb. 4-2: Ausschnitt aus dem Substratspektrum der <i>CPCR</i>	37
Abb. 4-3: Fermentation der <i>Candida parapsilosis</i>	38
Abb. 4-4: Aufreinigung der <i>CPCR</i>	39
Abb. 4-5: Lyophilisat der <i>CPCR</i> nach der PEG-Fällung	40
Abb. 4-6: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie	40
Abb. 4-7: Reaktionsschema der Reduktion von 2,5-Hexandion	42
Abb. 4-8: Synthese von Me-DuPHOS und Me-BPE	43
Abb. 4-9: Anwendungsbeispiele der DuPHOS- und BPE-Lignaden	44
Abb. 4-10: Reaktionen, die im kinetischen Modell berücksichtigt werden	45
Abb. 4-11: Sequentieller <i>bi-bi</i> -Mechanismus der <i>CPCR</i>	47
Abb. 4-12: Kinetik der Reduktionsreaktion R_1	50
Abb. 4-13: Kinetik der Oxidationsreaktion R_4	51

Abb. 4-14: Integralkinetik zur Bestimmung des K_M -Wertes von Hydroxyhexanon	52
Abb. 4-15: Satzreaktorversuch zur enzymatischen Reduktion von Hexandion	56
Abb. 4-16: pH-statisierter Satzreaktorversuch	57
Abb. 4-17: Reduktion von Hexandion im EMR	58
Abb. 4-18: Simulation der Gleichgewichtslage bei Satzreaktorversuchen	60
Abb. 4-19: Parametervergleich zwischen Satzreaktor und EMR	61
Abb. 4-20: Alternativverfahren zur Darstellung von enantiomerenreinem Hexandiol	62
Abb. 4-21: Verfahrensfliessbild der Hefereduktion	67
Abb. 4-22: Umsatzgraph einer Hefereduktion mit 150 L Anfangsvolumen	67
Abb. 4-23: Aufarbeitungsschema für Hexandiol	68
Abb. 4-24: Nadelförmige Kristalle von Hexandiol, Feinkristallines Hexandiol	68
Abb. 4-25: 1 kg enantiomerenreines Hexandiol	69
Abb. 4-26: ttn des Cofaktors als Funktion von Umsatz und Substratkonzentration	74
Abb. 4-27: Substrate und Verfahren der Reduktion schwerlöslicher Ketone	75
Abb. 4-28: Totalsynthese von ($\pm$)-Diplodialid A	76
Abb. 4-29: Kinetik der <i>CPCR</i> mit ABEE als Substrat	77
Abb. 4-30: Kontinuierliche Synthese von HHEE im EMR	78
Abb. 4-31: Synthese von LY300164	80
Abb. 4-32: Reduktionskinetik der <i>CPCR</i> mit MDA als Substrat	81
Abb. 4-33: Reduktion von MDA im EMR	83
Abb. 4-34: Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit vom Umsatz	83
Abb. 4-35: Schema des ZPMR	85
Abb. 4-36: Foto der Reaktoranlage	85
Abb. 4-37: Bezeichnung der Komponenten im ZPMR	86
Abb. 4-38: Prinzip der membrangestützten Extraktion	88
Abb. 4-39: Schnitt des verwendeten LIQUICEL-Moduls 2,5 x 8 in.	88
Abb. 4-40: Simulation der Extraktionseffektivität	90
Abb. 4-41: Reduktion von MDA im ZPMR	91
Abb. 4-42: Parameter des ZPMR	91
Abb. 4-43: Simulation der Reaktionsgeschwindigkeit über Umsatz und [NADH]	93
Abb. 4-44: Reduktion von Acetophenon im Satzreaktor mit Simulationskurve	93
Abb. 4-45: Reduktion von Acetophenon um ZPMR	94
Abb. 4-46: Reaktionsschemata	96
Abb. 4-47: Kinetiken der Reduktion	96
Abb. 4-48: Genutzte Reaktoren	97
Abb. 4-49: Umsatzgraphen von kontinuierlichen Synthesen	98
Abb. 4-50: Durch biokatalytische Reduktion dargestellte Produkte	101
Abb. 5-1: Dreiphasenmembranreaktor	103
Abb. 5-2: Chemoenzymatische Synthese von (S)-8-O-Methylmellein	105
Abb. 5-3: Selektive Reduktion von Carbonylfunktionen	105

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3-1: Preise von Cofaktoren	16
Tabelle 3-2: Kinetische Parameter der CHMO	24
Tabelle 3-3: Retention an ROM 375	28
Tabelle 4-1: Aufreinigung der <i>CPCR</i>	41
Tabelle 4-2: Parameter der <i>CPCR</i> -katalysierten Reaktionen	52
Tabelle 4-3: Kinetische Parameter der FDH	53
Tabelle 4-4: Parameter der Reduktionsverfahren	70
Tabelle 4-5: Materialkosten beider Verfahren berechnet auf 1 kg Produkt	71
Tabelle 4-6: Kinetische Parameter der Reduktion von ABEE	77
Tabelle 4-7: Parameter der Kinetik der <i>CPCR</i> mit MDA als Substrat	82
Tabelle 4-8: Parameter der Kinetik der <i>CPCR</i> mit Acetophenon als Substrat	92
Tabelle 4-9: Signifikante Parameter beider Reaktionen	98

Abkürzungen

1. Enzyme

ADH	Alkoholdehydrogenase
BVMO	BAEYER-VILLIGER-Monooxygenase
CHMO	Cyclohexanon-Monooxygenase
CPCR	Carbonylreduktase aus <i>Candida parapsilosis</i>
DAAO	D-Aminosäureoxidase
FDH	Formiatdehydrogenase
GDH	Glycerindehydrogenase
HLADH	Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber
LDH	Lactatdehydrogenase
LeuDH	Leucindehydrogenase
MO	Monooxygenase
RECR	Carbonylreduktase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>
TBADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobium brockii</i>
YADH	Alkoholdehydrogenase aus Hefe

2. Chemikalien

4-MeCHon	4-Methylcyclohexanon
5-MeClac	5-Methyloxepan-2-on = 5-Methylcaprolacton
7-ACA	7-Aminocephalosporansäure
ABEE	5-Oxohexansäureethylester = Acetylbuttersäureethylester
AcPhe	Acetophenon
BPE	2',5',2'',5''-Tetraalkyl-1,2-bis(phospholanyl)ethan - Ligand
CoA	Coenzym A
DTT	Dithiothreitol
DuPHOS	2',5',2'',5''-Tetraalkyl-1,2-bis(phospholanyl)benzol - Ligand
FAD	Flavinadenindinucleotid
FALD	Formaldehyd
FOR	Formiat
HD	2,5-Hexandion
HDL	2,5-Hexandiol
HHEE	5-Hydroxyhexansäureethylester
HYH	5-Hydroxyhexan-2-on
MDA	3,4-Methylenedioxyphenylacetone
MDI	3,4-Methylenedioxyphenyl-2-propanol
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
OAB	Oxazaborolidin
PheEt	1-Phenylethanol

3. Sonstige Abkürzungen

(R), (S)	Angabe der absoluten Konfiguration
Abb.	Abbildung
CF	Cofaktor
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor = continuously stirred tank reactor
d.h.	das heißt
de	Diastereomerenüberschuß
EC	Enzyme Classification
ee	Enantiomerenüberschuß
EMR	Enzymmembranreaktor
Exp.	Experiment
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
i.V.	im Vakuum
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie = high pressure liquid chromatography
Kap.	Kapitel
Kat.	Katalysator
K_D	Dissoziationskonstante
K_I	Inhibitorkonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel
max.	maximal
MF	Mikrofiltration
min.	minimal
MS	Massenspektrometrie
NF	Nanofiltration
NMR	Kernmagnetische Resonanz = nuclear magnetic resonance
OD	Optische Dichte
org.	organisch
P	Produkt
R, R', ...	nicht näher bezeichneter Rest
rac.	racemisch
RO	Reversosmose
RT	Raumtemperatur
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
S	Substrat
Sim.	Simulation
STR	Rührkesselreaktor = stirred tank reactor
Tab.	Tabelle
tof	Wechselzahl = turnover frequency
ttn	maximale Zyklenzahl = total turnover number
UF	Ultrafiltration
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ZPMR	Zweiphasenmembranreaktor

Glossar

Enzymverbrauch (EV)	[U kg ⁻¹]	Gibt die Enzymaktivität an, die zur Herstellung einer gegebenen Stoffmenge Produkt benötigt wird.
Enzymaktivität (Akt.)	[U] = [μmol min ⁻¹]	Bezeichnet die Stoffmenge Produkt, die durch enzymatische Katalyse pro Zeiteinheit gebildet wird. Aus Gründen der Handhabbarkeit wird meist, wie auch in dieser Arbeit, statt der SI-Einheit <i>katal</i> die Einheit <i>Unit</i> verwendet.
Enantiomerenüberschuß (ee)	[%]	Bezeichnet den Überschuß des vornehmlich gebildeten Enantiomers gegenüber des untergeordnet gebildeten Enantiomers: $\Delta(\text{Enantiomere}) / \Sigma(\text{Enantiomere})$.
Diastereomerenüberschuß (ee)	[%]	Bezeichnet den Überschuß des vornehmlich gebildeten Diastereomers gegenüber des untergeordnet gebildeten Diastereomers: $\Delta(\text{Diastereomere}) / \Sigma(\text{Diastereomere})$.
maximale Zyklenzahl (ttn)	-	Gibt das Verhältnis zwischen der Stoffmenge Produkt zu verbrauchter Stoffmenge Katalysator oder Cofaktor an. Sie ist ein Maß für die Ausnutzung des Katalysators oder Cofaktors.
Wechselzahl (tof)	[s ⁻¹]	Gibt an, wie häufig ein Katalysator pro Zeiteinheit ein Substratmolekül umsetzt.
Raum-Zeit-Ausbeute (RZA)	[kg L ⁻¹ d ⁻¹]	Gibt die Produktmenge an, die pro Reaktorvolumen und Zeiteinheit gebildet wird.
Umsatz (U)	[%]	Ist die umgesetzte Menge eines Reaktionspartners bezogen auf die eingesetzte Menge.
Verweilzeit (τ)	[min]	Ist die mittlere Aufenthaltsdauer eines Stoffes im Reaktionsraum; gegeben durch Quotient aus Reaktionsvolumen und Volumenstrom.
Ausbeute (η)	[%]	Menge an Zielprodukt pro Menge an Ausgangsprodukt.
Selektivität (σ)	[%]	Beschreibt, wie selektiv das Zielprodukt aus einer Menge des Substrates gebildet wird: Quotient aus Ausbeute und Umsatz.

1 Einleitung

1.1 Asymmetrische Synthese mit isolierten Enzymen

Die Biokatalyse ist eine sehr alte Wissenschaft! Bereits im alten Ägypten war zum Beispiel die alkoholische Gärung oder die Essigherstellung bekannt und wurde genutzt¹. Die systematische Beschäftigung mit Enzymen und ihrer Anwendung in der organischen Synthese ist hingegen erheblich jüngeren Datums.

Enzyme sind Proteine. Sie katalysieren im lebenden Organismus die meisten biologischen Reaktionen. Ebenso wird die Umsetzung natürlicher und nichtnatürlicher Substrate außerhalb des Organismus katalysiert. Man spricht dann vom Einsatz isolierter Enzyme.

Als Katalysatoren haben Enzyme unter anderem folgende Eigenschaften:

- Sie beschleunigen Reaktionen unter milden Bedingungen. Sie sind somit als wichtiger Beitrag zu einer „grünen Chemie“ aufzufassen. Enzyme sind vollständig „biologisch abbaubar“!
- Reaktionsbedingungen verschiedener Enzyme sind häufig ähnlich, so daß eine Kombination mehrerer Biokatalysatoren in einem Reaktionssystem möglich ist.
- Verglichen mit den meisten chemischen Katalysatoren arbeiten sie hochselektiv sowohl in Hinblick auf Chemo-, Regio- und Stereoselektivität.
- Sie sind aufgrund ihrer Molekülstruktur chiral und zeigen daher häufig eine hohe Enantiodifferenzierung.

Neben diesen Vorteilen werden aber auch immer wieder eine Reihe von Nachteilen genannt, die gegen den Einsatz isolierter Enzyme sprechen². Von ihnen sind sicher die Instabilität, hohe Kosten und geringe Substratbreite die wichtigsten. Diese Nachteile konnten allerdings durch die intensive Forschung der letzten Jahre deutlich verringert werden, so daß heute die Anwendung isolierter Enzyme zu einem gebräuchlichen Verfahren in Forschung³ und industrieller Produktion geworden ist. Wirtschaftlich wichtige Anwendungen stellen zum Beispiel die Stärkehydrolyse mit Amylase, die Isomerisierung von Glucose zu Fructose mit Glucoseisomerase ($8 \cdot 10^6$ t/a) oder die Produktion von Acrylamid aus Acrylnitril mit Nitrilhydratase (30.000 t/a)⁴ dar.

¹ Fonds der Chemischen Industrie (1996): *Folienserie Biotechnologie / Gentechnik*, FCI, Frankfurt.

² Knowles (1991): *Nature*, **350**, 121.

³ Roberts (1998): *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 157.

⁴ Drauz et al. (1995): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim. 373.

In –mengenmäßig– weitaus kleinerem Maßstab, dafür aber mit viel höherer Wertschöpfung wird die hohe Enantiospezifität der Enzyme genutzt. Das Entwicklungspotential dieser Anwendungen ist enorm hoch, wenn man bedenkt, daß allein in einem Jahr zwischen 1996 und 1997 der Markt für enantiomerenreine Pharmazeutika um 21 % auf 90 Mrd. \$ gestiegen ist⁵. Bereits 50 der 100 meistverkauften Präparate enthalten enantiomerenreine chirale Verbindungen als Wirkstoffe und die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hat angekündigt, keine racemischen Präparate mehr auf dem Markt zuzulassen⁵.

Der Zugang zu solchen enantiomerenreinen Verbindungen kann von drei Seiten her erfolgen, wie dies in Abb. 1-1 dargestellt ist.

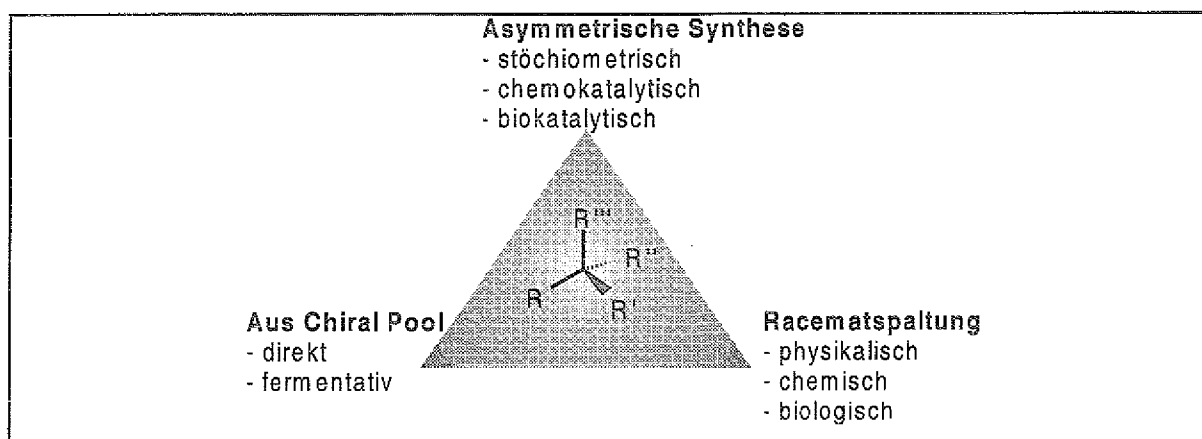


Abb. 1-1: Methoden des Zugangs zu enantiomerenreinen Verbindungen

Es sollen hier nun zwei ausgewählte Beispiele des Zugangs zu enantiomerenreinen Stoffen unter Biokatalyse⁶ mit isolierten Enzymen angeführt werden, die den Durchbruch in die industrielle Produktion geschafft haben. In beiden Verfahren kommen Redoxenzyme zum Einsatz.

Synthese von 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) aus Cephalosporin C⁷

Das bei BOEHRINGER MANNHEIM und HOECHST eingesetzte Verfahren zur Produktion von 7-ACA aus dem fermentativ erhältlichen Cephalosporin C ist ein schönes Beispiel eines Verfahrens mit zwei konsekutiven enzymatischen Schritten, das einen aufwendigeren und umweltschädlicheren chemischen Prozeß abgelöst hat. Im ersten Schritt wird die Aminofunktion der Seitenkette mit D-Aminosäureoxidase (DAAO) zum Keton oxidiert, das spontan decarboxyliert. Anschließend wird mit Hilfe von Glutaryl-7-ACA-Acylase die Seitenkette abgespalten.

⁵ Stinson (1998): Chem. Eng. News, 21.9., 83.

⁶ Godfrey et al. (1996): *Industrial Enzymology- Application of Enzymes in Industry*, Macmillan, London, 271.

⁷ Drauz et al. (1995): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim. 387.

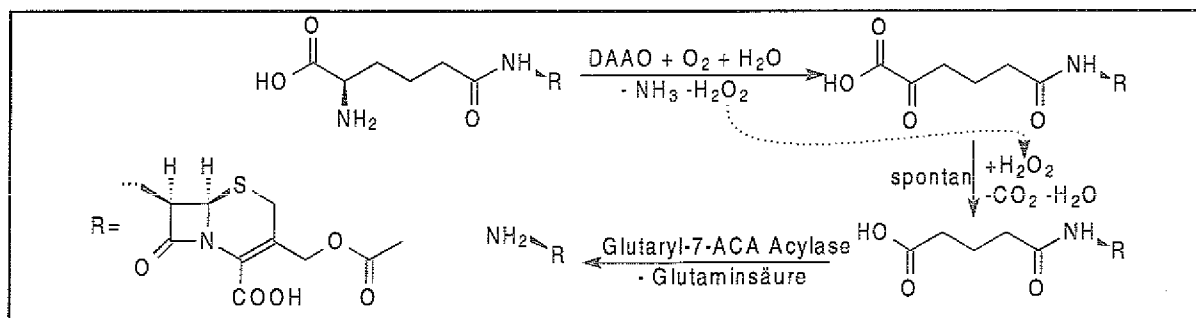


Abb. 1-2: Synthese von 7-ACA

Produktion von L-tert-Leucin durch reduktive Aminierung⁸

Selbst wenn immer noch die Meinung besteht, daß cofaktorabhängige Enzyme keinen Eingang in die industrielle Synthese gefunden hätten⁹, hat die DEGUSSA mit ihrem Verfahren zur Produktion unnatürlicher Aminosäuren durch reduktive Aminierung bereits vor Jahren das Gegenteil bewiesen. Die Reaktion wird durch L-Leucin Dehydrogenase (LeuDh) katalysiert, der Cofaktor NADH durch Formiatdehydrogenase (FDH) regeneriert, wobei Ammoniumformiat gleichzeitig als Ammonium- und Formiatquelle für die Reaktion eingesetzt wird.

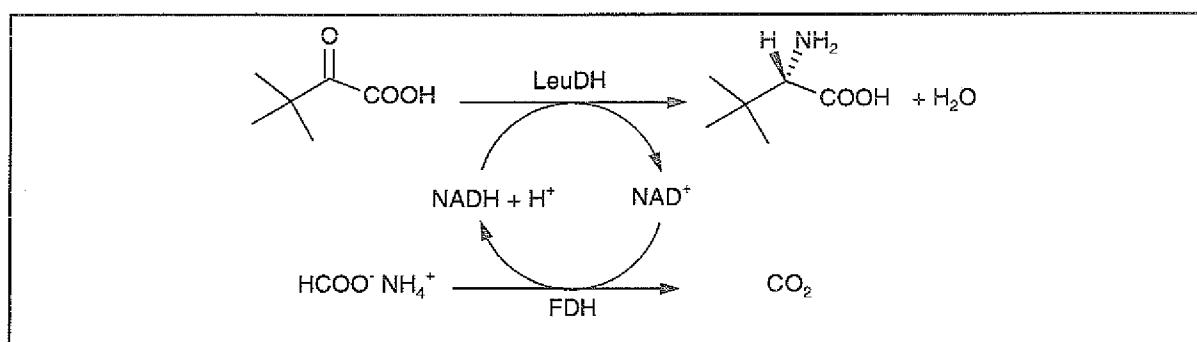


Abb. 1-3: Synthese von L-tert-Leucin

Diese Beispiele zeigen deutlich, daß die Anwendung asymmetrischer biokatalytischer Prozesse ein aufstrebender Bereich ist, der eine weitere intensive Forschung gerade in Hinblick auf die Umsetzbarkeit solcher Synthesen rechtfertigt.

1.2 Reaktionstechnik in der Enzymkatalyse

Zur erfolgreichen Durchführung katalytischer Prozesse ist nicht nur der eigentliche Reaktionsschritt, sondern sind vielmehr auch die Operationen vor der Reaktion, z.B. Katalysatorgewinnung und nach der Reaktion, das sog. *downstream processing* oder die Aufarbeitung

⁸ Kragl et al. (1992): Chem.-Ing.-Tech., 64, 499.

⁹ Thomas et al. (1998): 2nd European Symposium on Biochemical Engineering Science, Porto, 201.

von Bedeutung. Leider beschäftigt sich der synthetisch arbeitende Chemiker im Labor viel zu häufig nur mit der Reaktion und läßt andere Fragestellungen unbearbeitet. Die Technische Chemie verfolgt hier einen umfassenderen Ansatz und fragt nicht nur nach dem Produkt einer Synthese, sondern genauso nach dem Weg dorthin, also dem Prozeß. Als wichtiges Teilgebiet der Technischen Chemie beschäftigt sich die Reaktionstechnik mit zwei Hauptthemen:

- Analyse und Modellierung chemischer Reaktionen
- Chemische Reaktoren und deren Auslegung.

Die Reaktionstechnik ist neben der Prozeßkunde und den mechanischen und thermischen Grundoperationen ein Hauptgebiet der Technischen Chemie¹⁰.

Gerade bei katalytischen, also auch bei biokatalytischen, Prozessen kommt der Reaktionsführung eine herausragende Rolle zu. Abb. 1-4 zeigt graphisch die Schwerpunkte, bei der Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses von Bedeutung sind.

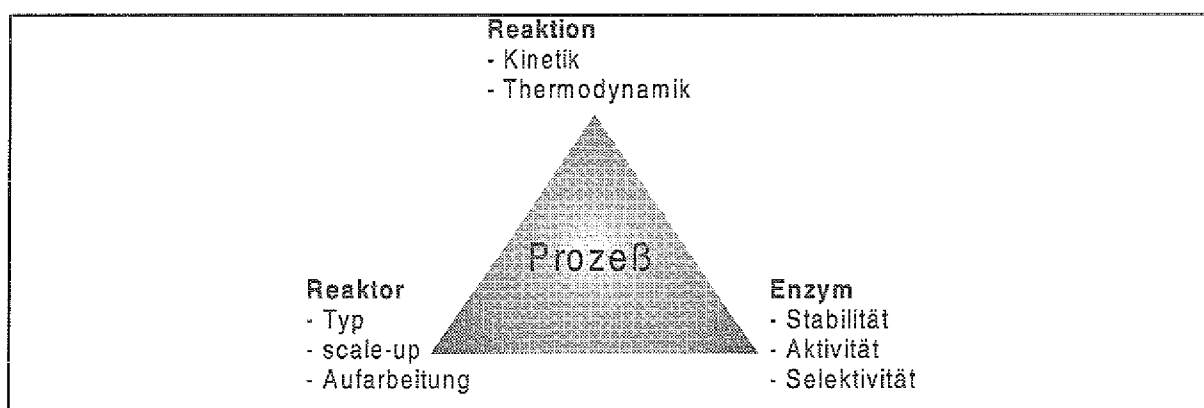


Abb. 1-4: Schwerpunkte biokatalytischer Reaktionstechnik

Eine genaue Kenntnis sowohl von Kinetik als auch Thermodynamik der betrachteten *Reaktion* bzw. des Reaktionssystems ist notwendig.

Diese ist eng verbunden mit den Eigenschaften des eingesetzten Katalysators, hier also des *Enzyms*. Die Frage nach Aktivität und Selektivität versteht sich von selbst. Die Stabilität eines Katalysators hingegen ist ebenso wichtig, da ohne einen stabilen Katalysator keine ökonomische Reaktionsführung möglich ist.

Die Festlegung auf einen sinnvollen *Reaktor*, verbunden mit der Abwägung, ob ein kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Prozeß anzustreben ist, ist gerade dann von Wichtigkeit, wenn die Maßstabsvergrößerung der Reaktion, das sog. *scale-up*, berücksichtigt wird. Hier kommt es nicht nur auf einen ökonomischen Einsatz von Substraten und Katalysator an,

¹⁰ DECHEMA (1994): *Lehrprofil Technische Chemie*.

sondern es erlangen auch Fragestellungen wie der Verbrauch von Lösungsmitteln oder Hilfs- und Zusatzstoffen und vor allem der Produktaufarbeitung eine große Bedeutung.

Die Reaktionstechnik berücksichtigt auf dem Weg zu einem Prozeß alle diese Fragestellungen sowohl bei den experimentellen Arbeiten im Labor als auch bei der theoretischen Simulation am Computer. Im Idealfall können Simulation und Modellierung dem Experimentator viele Versuche abnehmen, so daß nur wenige gezielte Experimente zur Überprüfung der Theorie ausreichen.

In Abb. 1-5 sind noch einmal die wesentlichen Schritte der Vorgehensweise auf dem Weg zu einem biokatalytischen Verfahren dargestellt¹¹, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

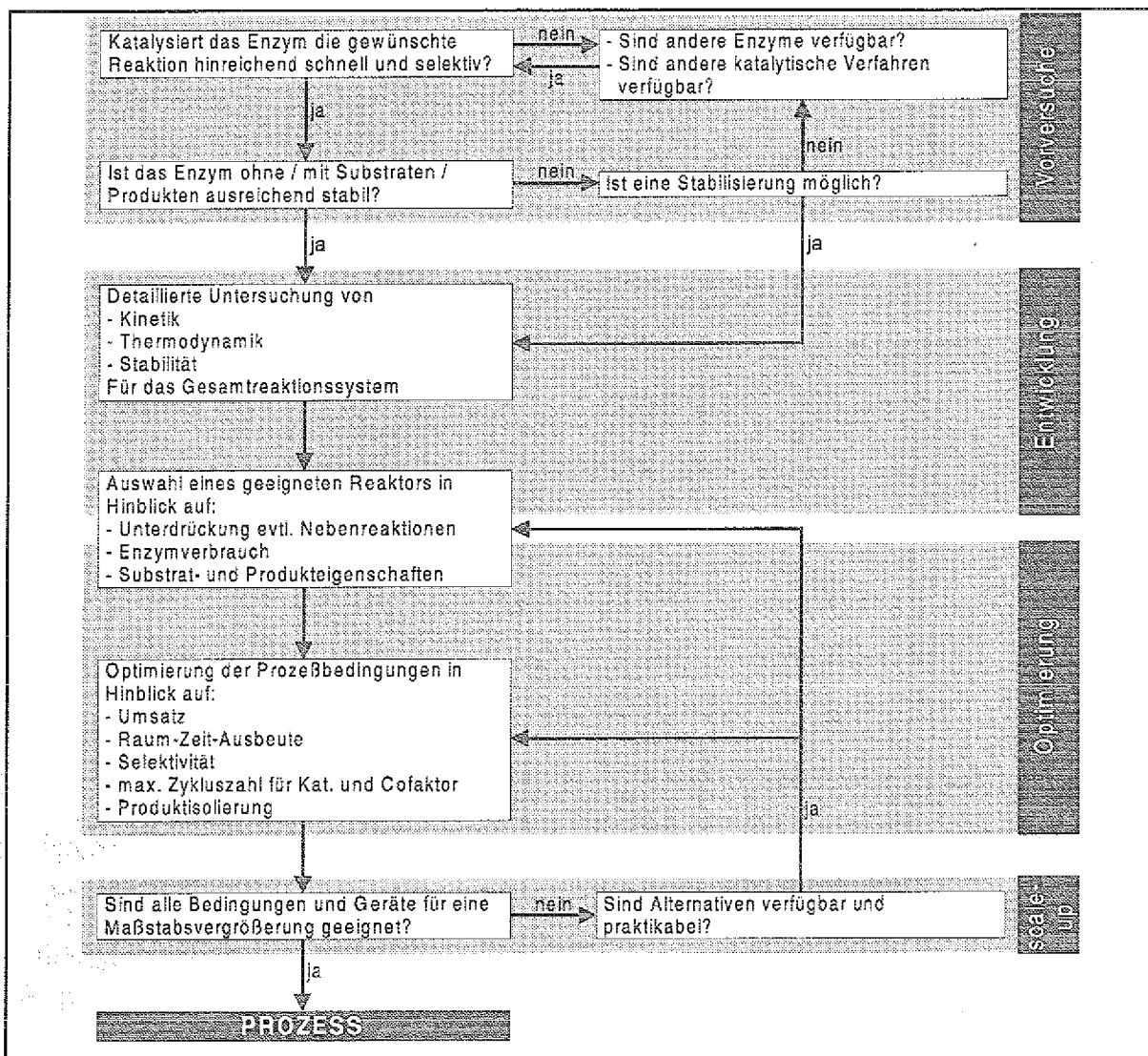


Abb. 1-5: Schritte einer Verfahrensentwicklung für enzymatische Biotransformationen

¹¹ Nach: Kragl (1997): Habilitationsschrift, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

1.3 Membranverfahren und Membranreaktoren

1.3.1 Membranen und ihre Anwendung¹²

Als Membranen werden „natürliche oder künstlich hergestellte flächige Gebilde, die fluide Phasen oder auch zwei Volumina einer Phase mit unterschiedlicher Zusammensetzung voneinander zu trennen imstande sind und deren Fähigkeit darin besteht, den Stoffaustausch zwischen ihnen zu ermöglichen“¹³ bezeichnet. In dieser Definition ist der bivalente Charakter der Membran enthalten: Zum einen die physikalische Separation von zwei Phasen und zum anderen der chemische Kontakt der Phasen oder ihrer Bestandteile.

Technische Membranen bestehen im allgemeinen aus synthetischen oder natürlichen organischen Polymeren oder, seit neuerer Zeit, auch aus keramischen Werkstoffen. Sie besitzen definierte Eigenschaften wie Dicke, Porengröße, chemische Beständigkeit oder elektrische Eigenschaften.

Wie Abb. 1-6 zeigt, kann die Anwendung von Membranen in zwei grobe Klassen geteilt werden:

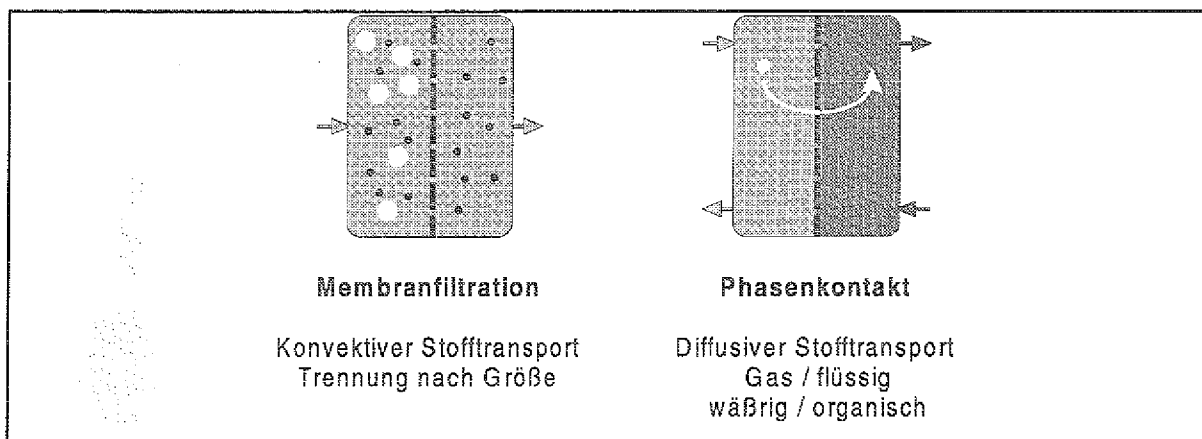


Abb. 1-6: Anwendungsfelder für Membranen

➤ Membranfiltration

Bei der Membranfiltration wird die spezifische Porengröße und die Ladung der Membran ausgenutzt, um Stoffe vor allem nach ihrer physikalischen Größe aufzutrennen. Es liegt ein konvektiver Stofftransport über die Membranfläche vor, der durch einen Druckunterschied Δp über die Membran erreicht wird. Kleinere Teilchen können die Membran

¹² weiterführende Literatur: Ho et al. (1992): *Membrane Handbook*, Chapman & Hall, New York, 954.
Noble et al. (1995): *Membrane Separations Technology. Principles and Applications*, Elsevier, Amsterdam.

Mulder (1996): *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
¹³ Staude (1992): *Membranen und Membrantrennprozesse*, VCH, Weinheim.

durch ihre Poren ungehindert passieren, während größere teilweise oder vollständig zurückgehalten werden. Die Klassifizierung der Membranfiltrationstypen geordnet nach der Porengröße bzw. Ausschlußgrenze ist in Abb. 1-7 dargestellt. Es sind dort auch einige ausgewählte Beispiele der abzutrennenden angegeben.

Art der Filtration	Rückhaltung:	Porengröße/ Ausschlußgrenze
Mikrofiltration (MF)	suspendierte Teilchen Mikroorganismen	0,2 - 2 μm
Ultrafiltration (UF)	Makromoleküle (z.B. Enzyme)	0,02 - 0,2 μm 2.000-100.000 g mol^{-1}
Nanofiltration (NF)	Cofaktoren Salze $^{2+/-}$	200 - 2.000 g mol^{-1}
Reversosmose (RO)	Salze $^{+/-}$ Lösungsmittel	< 200 g mol^{-1}

Abb. 1-7: Membranfiltration

Im Rahmen dieser Arbeit werden die vom Rahmen umgebenen Membranfiltrationsarten eingesetzt.

➤ Membrangestützter Phasenkontakt

Im Gegensatz zur Membranfiltration findet beim Phasenkontakt kein konvektiver Stoffstrom über die Membran statt. Vielmehr werden Fluide, also flüssige oder gasförmige Phasen, unterschiedlicher Zusammensetzung an der Membran vorbeigeführt. Es findet ein durch die Konzentrationsdifferenzen Δc getriebener diffusiver Stofftransport statt, der den Ausgleich dieser Konzentrationsdifferenzen zum Ziel hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik sowohl für flüssig / flüssig- als auch für flüssig / Gas-Phasenkontakte eingesetzt.

1.3.2 Membranreaktoren

Die Integration eines Trenn- oder Aufarbeitungsprozesses in den Reaktor kann eine erhebliche Vereinfachung des Verfahrens bedeuten, da ein komplettes, eigenständiges Gerät eingespart wird¹⁴. Dies steht im Gegensatz zur klassischen Anwendung von Membranen zur reinen Aufarbeitung von Produkt- oder vor allem Abfallströmen¹⁵.

¹⁴ Drioli et al. (1996): Chemistry & Industry, 19.

¹⁵ Crespo et al. (1996): NATO ASI Ser., Ser. E, 272, 505.

Die Membranen kommen in verschiedenen Formen zum Einsatz:

➤ Flachmembranen

Diese Form ist für Laborzwecke die gebräuchlichste. Sie ist problemlos zu handhaben und preisgünstig in großer Vielfalt kommerziell erhältlich.

Werden Flachmembranen unter Anwendung von Abstandhaltern und einer geeigneten Stromführung gestapelt, spricht man von „Plattenmodulen“.

Auch die Wicklung der Flachmembranen zu sog. „Spiralwickelmodulen“ ist gebräuchlich.

➤ Rohr- oder Kapillarmembranen

Diese Membranart ist ein technisches „Makkaroni“ und kann mit verschiedensten Durchmessern (ca. 2 cm, „Rohr“ bis 100 μm , „Kapillare“) gefertigt werden. Sie bietet sehr günstige Strömungseigenschaften.

Die Verarbeitung als „Hohlfasermodule“ ist die wohl günstigste Einsatzform von Membranen bis in den technischen Maßstab. Die Packungsdichten können bei der Verwendung von Kapillarmembranen bis zu 5000 m^2 pro m^3 erreichen und sind damit erheblich höher, als bei allen anderen Bauformen. Die Kapillaren werden an ihren Enden verklebt und somit wird die Faserseite und die Mantelseite voneinander getrennt. Dieser Modultyp kam bei vielen Versuchen im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz.

Neben der Bauform der Membran bzw. des Membranmoduls können zwei Formen des Reaktoraufbaus unterschieden werden, wie dies in Abb. 1-8 dargestellt ist.

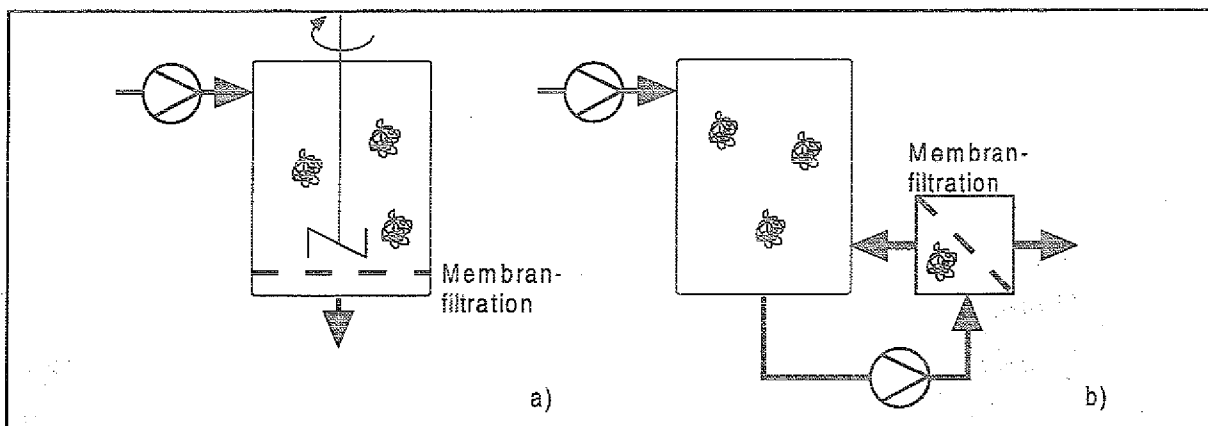


Abb. 1-8: Bauformen von Membranreaktoren

Bei einfachen Laborreaktoren (a) ist die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert. Im allgemeinen wird eine Flachmembran eingesetzt. Dieser Aufbau bietet den Vorteil der einfachen Handhabung, der hohen Variabilität der Membran und des geringen Preises von Flachmembranen. Nachteilig hingegen ist, daß sich selbst bei intensivem Rühren eine Kon-

zentrationpolarisation gegen die Membran ausbildet und die Membran somit leicht verstopfen kann oder zumindest der Filtratstrom abnimmt. Auch ist ein *scale-up* dieser Konfiguration nicht ohne weiteres möglich.

Die Trennung von Reaktions- und Filtrationsraum (b) wird in allen größeren Reaktoren verwirklicht. In einen Umlauf des Reaktors wird ein Membranmodul geschaltet, in dem die Trennung vollzogen wird. Dieser Aufbau hat folgende Vorteile:

- Tangentiale Anströmung der Membran führt zur vermindertem Membranfouling und gleichmäßigen Konzentrationsverteilung.
- Hoher Volumenstrom im Umlauf gegenüber dem Filtratstrom Rührkesselverhalten im gesamten Reaktor.
- Ein *scale-up* ist problemlos möglich, da sowohl Pumpen als auch Membranmodule in beliebiger Größe zur Verfügung stehen bzw. durch Parallelschaltung eine Kapazitätserweiterung erreicht werden kann.
- Durch Parallelschaltung kann ohne den Betrieb insgesamt zu unterbrechen ein einzelnes Membranmodul getauscht werden.

Neben den bisher aufgeführten kontinuierlichen Verfahren, können Membranprozesse selbstverständlich auch diskontinuierlich betrieben werden.

Einzelheiten zu den in den Synthesen verwendeten Reaktoren und der Betriebsweise finden sich im Rahmen der Besprechung der betreffenden Reaktionen.

1.3.3 Der Enzymmembranreaktor

Der Enzymmembranreaktor nutzt die oben beschriebene Technik der Membranfiltration zur Rückhaltung von Enzymen, die als löslicher Biokatalysator zum Einsatz kommen¹⁶. Dieser Typ des kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors beinhaltet eine Membran mit einer Ausschlußgrenze (*cut-off*), die den nahezu vollständigen Rückhalt (> 99,9 %) des oder der Biokatalysatoren im Reaktionsraum ermöglicht. Die niedermolekularen Substrate und Produkte können die Membran ungehindert passieren und durch den kontinuierlichen Substratstrom ersetzt werden. Somit werden die Verweilzeiten von Substraten und Katalysator voneinander entkoppelt. Der Reaktor arbeitet unter Auslaufbedingungen, d. h., daß die Konzentrationen nach Passieren der Membran, also nach Verlassen des Reaktionsraums denen im Reaktor entsprechen.

¹⁶ Kragl (1996): *Enzyme Membrane Reactors* in: Godfrey et al.: Industrial Enzymology- Application of Enzymes in Industry, Macmillan, London, 271.

2 Aufgabenstellung

Ziel der Dissertation ist die Entwicklung und der Einsatz von **Membranverfahren** in der **biokatalytischen Synthese**.

Als Katalysatoren sollen Oxidoreduktasen zum Einsatz kommen, die Nicotinamidadenindinucleotid-Cofaktoren (NAD(P)H) benötigen.

Um die Breite der Anwendbarkeit von Membranen zu demonstrieren, wurden die enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation und die enzymatische Ketonreduktion als exemplarische Reaktionstypen herausgenommen:

1. Die **enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation** von prochiralen Ketonen zu den entsprechenden chiralen Lactonen wird durch eine **Cyclohexanon Monooxygenase (CHMO)** aus *Acinetobacter NCIMB 9871* enantioselektiv katalysiert. Dieses Enzym benötigt NADPH als Cofaktor und setzt molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel ein. 4-Methylcyclohexanon soll als Substrat eingesetzt werden.

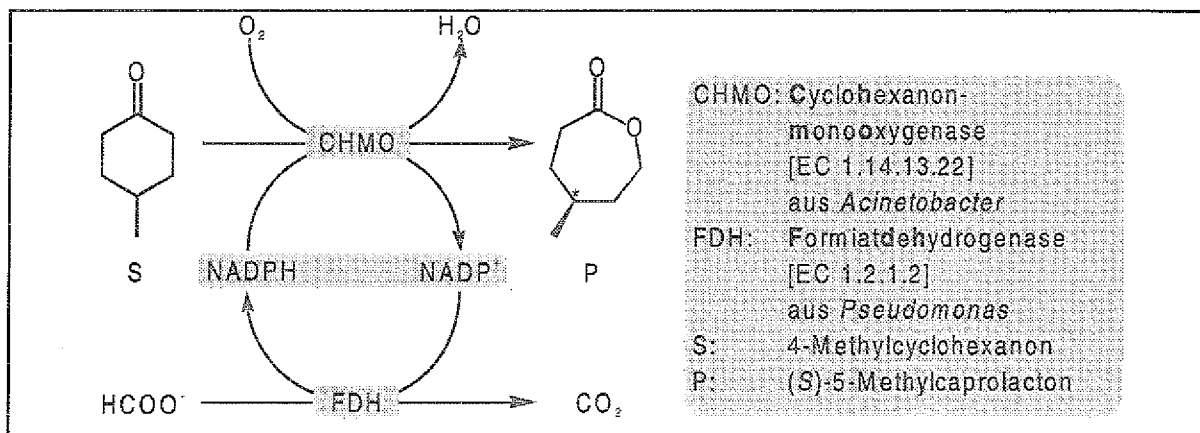


Abb. 2-1: Enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation mit CHMO

Es soll ein Verfahren entwickelt werden, das folgenden Anforderungen gerecht wird:

- Anwendung einer effektiven Cofaktorregenerierung für NADPH durch eine NADP-abhängige Formiatdehydrogenase.
- Integration einer schonenden Sauerstoffversorgung, die eine Desaktivierung der Enzyme verhindert.
- Präparative Durchführung der Synthese.

2. Die **enzymatische Ketonreduktion** von prochiralen Ketonen zu den entsprechenden chiralen Alkoholen wird durch eine **Carbonylreduktase** aus *Candida parapsilosis* (**CPCR**) enantioselektiv katalysiert. Dieses Enzym benötigt NADH als Cofaktor.

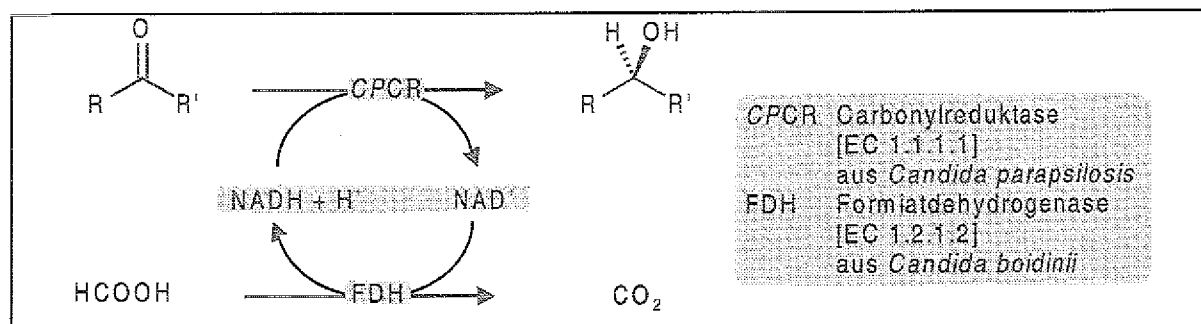


Abb. 2-2: Enzymatische Ketonreduktion mit CPCR

Nach fermentativer Gewinnung und optimierter Aufreinigung des Enzyms sollen Verfahren entwickelt werden, die folgenden Anforderungen gerecht werden:

- Die Reduktion leichtlöslicher Substrate soll am Beispiel des 2,5-Hexandiols kinetisch charakterisiert werden.
 - Es soll ein der Kinetik der Reaktion entsprechendes Verfahren erstellt werden.
 - Das enzymatische Verfahren soll mit einer Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe als Katalysator verglichen werden.
 - Eines dieser Verfahren soll zur Herstellung von enantiomerenreinem (2S,5S)-Hexandiol im kg-Maßstab verwendet werden, wobei auch die Produktaufarbeitung näher betrachtet werden soll.
- Die Reduktion schwerlöslicher Substrate soll am Beispiel des 3,4-Methylenedioxyphenylacetons und weiterer Substrate untersucht werden.
 - Ein geeignetes kontinuierliches Verfahren soll den Cofaktorverbrauch reduzieren.
 - Die Anwendung eines Verfahrens mit kontinuierlicher membrangestützter Extraktion soll demonstriert werden.
 - Drei Substrate sollen im g-Maßstab synthetisiert werden.
 - Das zu entwickelnde Verfahren soll mit einem chemischen Verfahren zur kontinuierlichen Ketonreduktion im Membranreaktor verglichen werden.

3 Reaktorkonzept für die enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation mit integrierter blasenfreier Begasung¹⁷

3.1 Einleitung

3.1.1 Die BAEYER-VILLIGER Oxidation: Chemisch und enzymatisch

Es sind nahezu 100 Jahre vergangen, seit 1899 Adolf VON BAEYER und Victor VILLIGER eine Reaktion berichteten, durch die beim Behandeln von zyklischen Ketonen mit Perschwefelsäure (CAROSche Säure) als Oxidationsmittel Lactone erhalten werden (Abb. 3-1)¹⁸. Sie ist unter dem Namen BAEYER-VILLIGER Oxidation in die Literatur eingegangen und ist seitdem zu einem wertvollen Werkzeug der chemischen Synthese geworden.

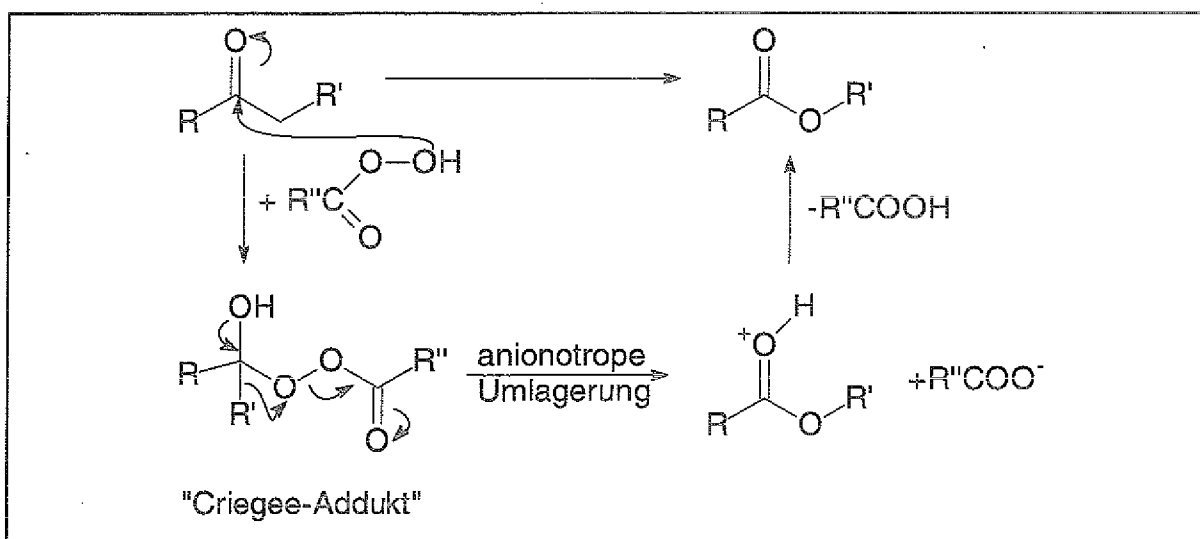


Abb. 3-1: BAEYER-VILLIGER Oxidation mit Persäuren

Nach anfänglichen Arbeiten unter Verwendung verschiedener Persäuren wurde mit der Zeit die Verwendung von Wasserstoffperoxid immer wichtiger, da dieses aufgrund seines hohen Anteils an aktivem Sauerstoff und seines problemlosen Nebenproduktes (Wasser) gerade im industriellen Maßstab ein besonders umweltfreundliches Oxidationsmittel ist.

¹⁷ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in einer Kooperation mit Dres. M. Vogel und U. Schwarz-Linck (AK Prof. Welzel, Universität Leipzig) erzielt, denen an dieser Stelle ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit, die wertvollen Diskussionen und die Bereitstellung der Monooxygenase gedankt sei. Teile der Ergebnisse sind veröffentlicht in: Rissom et al. (1997): Tetrahedron: Asymm., 8, 2523.

¹⁸ Baeyer et al. (1899): Ber. Dt. Chem. Ges., 32, 3625.

Neuere Entwicklungen¹⁹ führten zu katalytischen Varianten unter anderem unter Verwendung von Molybdän²⁰-, Platin²¹- oder Titansilikatkatalysatoren²² und H₂O₂ sowie von elementarem Sauerstoff mit Aldehyden und Nickelkatalysatoren nach MUKAIYAMA²³ oder mit Eisenoxiddkatalysatoren²⁴. Die Arbeitsgruppen von STRUKUL²⁵, und BOLM²⁶ berichten seit 1994 von asymmetrischen BAEYER-VILLIGER Oxidationen unter Übergangsmetallkatalyse, die jedoch auf ein enges Substratspektrum begrenzt blieben und meist nur mäßige Enantiomerenüberschüsse erzeugen.

Zum Erreichen hoher optischer Reinheiten bei einer ganzen Reihe von Substraten wurden hingegen biologische Methoden verwendet²⁷, die in einer kürzlich erschienenen Übersicht zusammengefaßt sind²⁸. Präparative Umsetzungen wurden mit einer Reihe von vor allem zyklischen und bizyklischen Ketonen als Substrat durchgeführt, die mit Ganzzellsystemen oder isolierten Enzymen Lactone in teilweise sehr guten Enantiomerenüberschüssen bilden. Biokatalysatoren der biologischen BAEYER-VILLIGER Oxidation sind die BAEYER-VILLIGER Monooxygenasen (BVMO). Diese Redoxenzyme gehören zur Klasse der Oxygenasen, die molekularen Sauerstoff in Substrate einbauen. Die Monooxygenasen verwenden hierbei ein Atom pro Sauerstoffmolekül, während das zweite Atom zu Wasser reduziert wird. Diese Enzyme wurden in einer ganzen Reihe von Mikroorganismen gefunden und katalysieren neben der BAEYER-VILLIGER Oxidation auch Oxidationen an Heteroatomen wie Schwefel, Phosphor, Stickstoff, Bor und Selen²⁹.

Eines der bestuntersuchten Enzyme wurde aus einer *Acinetobacter*-Spezies isoliert und kam bei allen im Rahmen dieses Kapitels beschriebenen Untersuchungen zur Anwendung.

¹⁹ Eine Übersicht über den Stand der chemischen BAEYER-VILLIGER-Oxidation unter Übergangsmetallkatalyse wurde kürzlich von STRUKUL veröffentlicht, auf die hier für weiterführende Informationen verwiesen sei: Strukul (1998): *Angew. Chem.*, **110**, 1252.

²⁰ Jacobsen et al. (1978): *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 888.

²¹ Michelin et al. (1979): *Inorg. Chim. Acta*, **37**, L491.

²² Notari (1989): *Synthesis and Catalytic Properties of Titanium Containing Zeolites* in: Grobet et al.: *Innovation in Zeolite Material Science*, Elsevier, Amsterdam, **37**, 413.

²³ Yamada et al. (1991): *Chem. Lett.*, 641.

²⁴ Murahashi et al. (1992): *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7557.

²⁵ Gusso et al. (1994): *Organometallics*, **13**, 3442.

²⁶ Bolm et al. (1994): *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1848.

Bolm et al. (1997): *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **117**, 347.

²⁷ Alphand et al. (1995): *Baeyer-Villiger Oxidations* in: Drauz et al.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **2**, 745.

²⁸ Roberts et al. (1998): *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, **4**, 111.

²⁹ Literaturangaben zu diesen Reaktionen finden sich in: Roberts et al. (1998): *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, **4**, 111.

3.1.2 Cyclohexanon Monooxygenase aus *Acinetobacter* NCIMB 9871: Metabolische Bedeutung, Mechanismus und Selektivität

1975 wurde von DONOGHUE, NORRIS und TRUDGILL³⁰ aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 eine Cyclohexanon Oxygenase beschrieben, die in der Lage ist, die Oxidation von Cyclohexanon zu ϵ -Caprolacton zu katalysieren [EC 1.14.13.22]³¹. Das Enzym wurde als Monomer von ca. 59 kDa charakterisiert, das NADPH und sauerstoffabhängig ist. Es enthält ein fest ($K_D=40$ nM), aber nicht kovalent an das Protein gebundenes Molekül Flavinadenindinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe. Die Oxidation wird optimal bei einem pH von 9,0 katalysiert. Im aktiven Zentrum befinden sich drei Thiolgruppen, von denen eine für die Aktivität essentiell ist. Es wurden K_M -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich sowohl für NADPH als auch für Cyclohexanon gemessen und eine Wechselzahl von 1390 min^{-1} bestimmt. Bei absoluter Spezifität gegenüber dem Elektronendonator NADPH und der prosthetischen Gruppe FAD wurde eine große Substratbreite gefunden³². Die aus 542 Aminosäuren bestehende Primärstruktur des Enzyms wurde aufgeklärt, das für die katalytische Aktivität verantwortliche Gen identifiziert und von CHEN et al. in *E. coli* kloniert und überexprimiert³³. Es war jedoch ein schneller Abbau der Enzymaktivität in der Gastzelle zu beobachten. STEWART et al. setzen eine als "BAEYER-VILLIGER-Hefe" bekannte Expression des Enzyms in Bäckerhefe für Ganzzellbiotransformationen ein³⁴. Eine Einschränkung des Nutzens ist darin zu sehen, daß *Acinetobacter*-Stämme in die Sicherheitsklasse 2 nach dem Bundesseuchengesetz eingeordnet sind und somit nur unter Beachtung der gültigen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden dürfen. Die kommerzielle Verfügbarkeit des Enzyms, wenn auch noch zu einem hohen Preis bei geringer Aktivität³⁵, läßt hingegen auf eine weitere Anwendbarkeit in der Zukunft hoffen.

Enzyme dieser Art sind vor allem in Bodenbakterien enthalten, die in der Lage sind, auf Cyclohexanol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Der Metabolismus der C-Quelle verläuft, wie Abb. 3-2 zeigt, zunächst oxidativ zu Cyclohexanon, bevor in einer BAEYER-VILLIGER Oxidation lactonisiert und danach hydrolytisch gespalten wird. Anschließend wird weiter in Richtung Acetyl- und Succinyl-Coenzym A metabolisiert.

³⁰ Donoghue et al. (1975): Eur. J. Biochem., 60, 1.

³¹ Der systematische Name lautet: Cyclohexanon,NADPH: Sauerstoff Oxidoreduktase (1,2-lactonisierend)

³² Donoghue et al. (1976): Eur. J. Biochem., 63, 175.

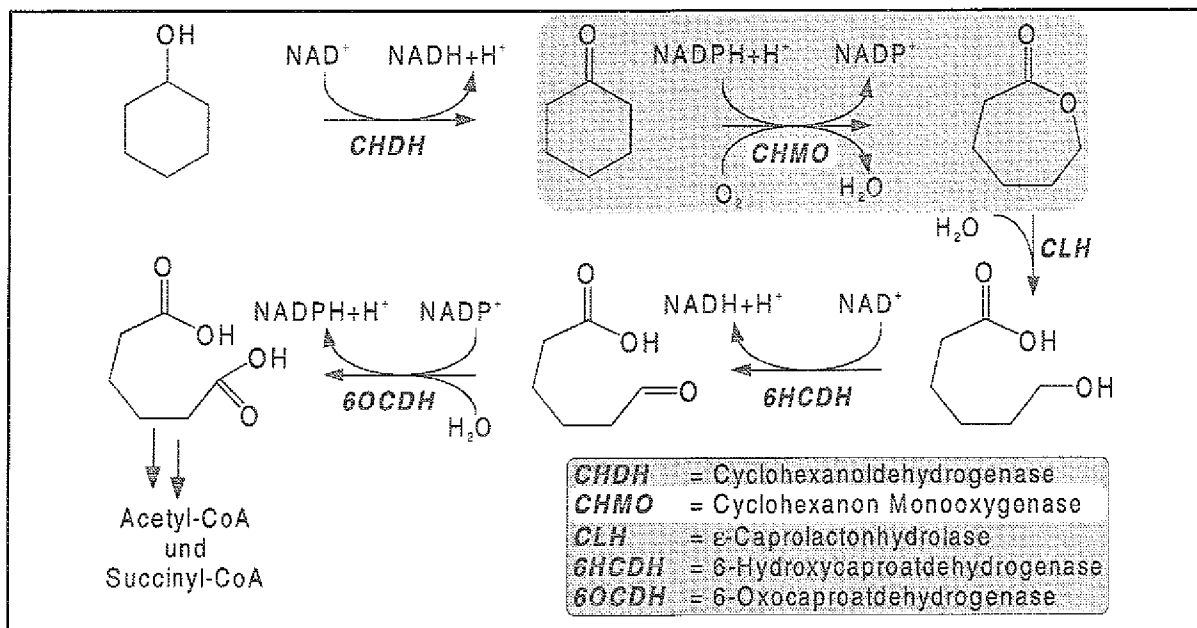
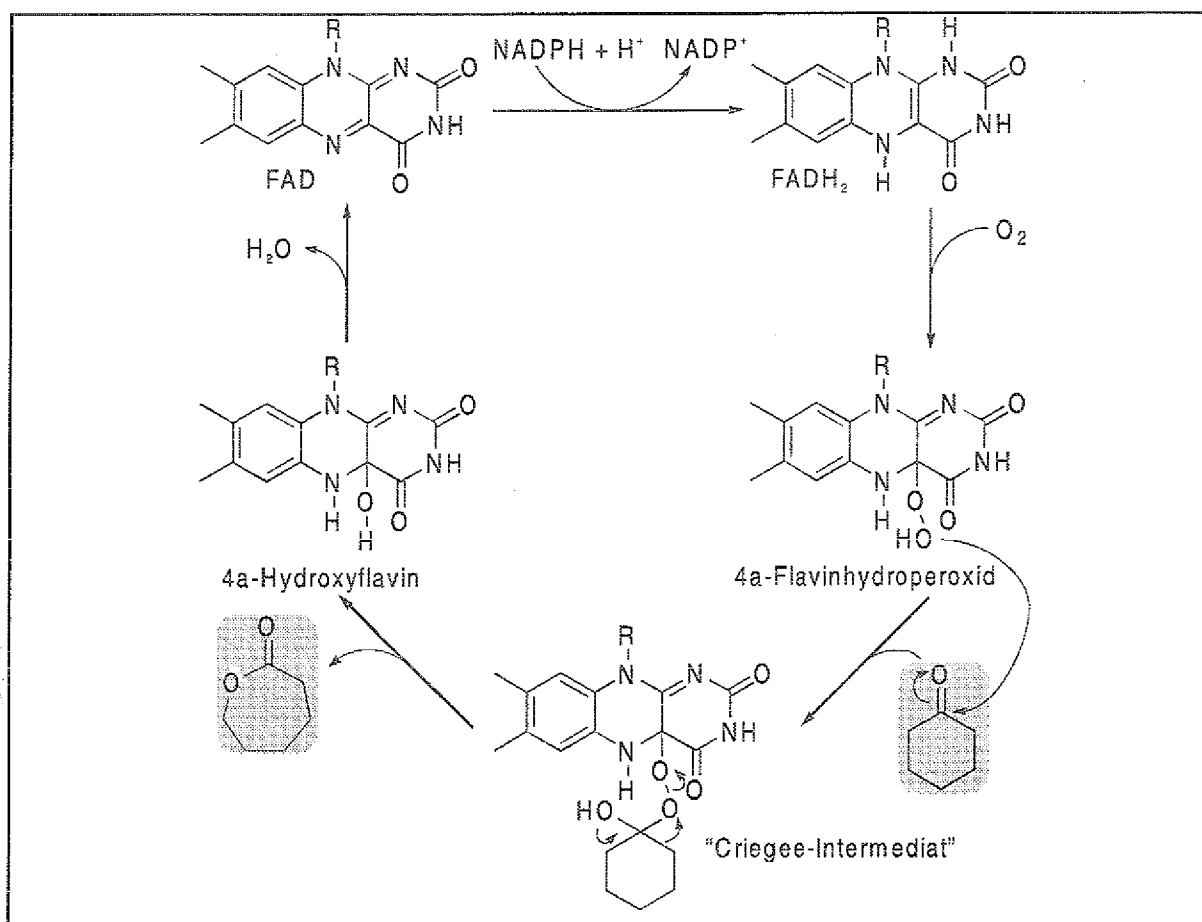
³³ Chen et al. (1988): J. Bacteriol., 170, 781.

³⁴ Stewart et al. (1996): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 755.

Stewart et al. (1996): J. Org. Chem., 61, 7652.

Stewart et al. (1998): J. Am. Chem. Soc., 120, 3541.

³⁵ Fluka (1998): 10 mg kosten 105,30 DM bei 0,5 U / mg dies entspricht 21 DM / U

Abb. 3-2: Cyclohexanol-Metabolismus von *Acinetobacter* NCIMB 9871Abb. 3-3: Mechanismus der enzymatischen BAEYER-VILLIGER Oxidation³⁶³⁶ Walsh et al. (1988): Angew. Chem., 100, 342.

Der Mechanismus der enzymatischen Reaktion entspricht weitgehend dem der chemischen (Abb. 3-1) und enthält die Insertion von Sauerstoff durch eine Peroxospezies. Der katalytische Zyklus, wie ihn WALSH et al.³⁶ postulierten, ist in Abb. 3-3 wiedergegeben. Es wird ein Flavinhydroperoxid als sauerstoffübertragende Spezies angenommen, dessen Sauerstoff nucleophil an den Carbonylkohlenstoff des Substrates angreift und so unter Generierung eines Hydroxyflavins das Lacton bildet. In der Zwischenstufe tritt das tetraedrische CRIEGEE-Intermediat auf.

Die enzymatische Reaktionsführung bietet bei mindestens ebenso hoher Chemo- und Regioselektivität wie die chemische den Vorteil der häufig hohen Stereoselektivität. Diese konnte bei der chemischen Reaktionsführung nur in wenigen speziellen Beispielen und nur mit mäßigen Enantiomerenüberschüssen realisiert werden³⁷.

Mit der durch die Cyclohexanon-Monooxygenase katalysierten enzymatischen BAEYER-VILLIGER Oxidation liegt also eine hochselektive Reaktion vor, die die Synthese von substituierten ϵ -Lactonen in hoher Enantiomerenreinheit erlaubt.

3.1.3 Cofaktorregenerierung von NAD(P)H

Zur Übertragung von Redoxäquivalenten benötigen Oxidoreduktasen sog. Cofaktoren. Dies sind zum Beispiel Nicotinamadenindinucleotide (NAD(H)) (80 % der Redoxenzyme) oder NADP(H) (10 %). Andere Cofaktoren wie Flavine (FAD oder FMN), Methoxatin (PQQ) oder Cytochrome sind vergleichsweise selten. Da diese Cofaktoren recht teuer (Tabelle 3-1) sind, ist ihre effektive *in situ* Regenerierung bei einem Einsatz in präparativen Umsetzungen unumgänglich³⁸.

Cofaktor	Molgewicht / g mol ⁻¹	Preis / DM g ⁻¹	Preis / DM mol ⁻¹	Preis bei 1000 Zyklen / DM mol _{Produkt} ⁻¹
NAD ⁺	717	36	25812	25,81
NADH	763	102	77826	77,83
NADP ⁺	837	322	269514	269,51
NADPH	905	797	721285	721,29

Tabelle 3-1: Preise von Cofaktoren³⁹

³⁷ Bolm et al. (1994): Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **33**, 1848.

Gusso et al. (1994): Organometallics, **13**, 3442.

Bolm et al. (1997): J. Mol. Catal. A: Chem., **117**, 347.

³⁸ Rissom et al. (1999): J. Mol. Cat. B Enzymatic, eingereicht.

³⁹ Biomol-Katalog 1997/98

Die angegebenen Preise beziehen sich, soweit verfügbar auf eine Pakungsgröße von 1 g. Im großen Maßstab verringern sich diese selbstverständlich erheblich. NAD⁺ kostet im kg-Maßstab z.B. \$2,25 pro g⁴⁰.

Eine Vielzahl von Regenerierungsmethoden für Nicotinamid-Cofaktoren wurden beschrieben und in Übersichtsartikeln⁴¹ zusammengefaßt. Für NAD(P)H sind neben chemischen⁴², biologischen⁴³, elektrochemischen⁴⁴ und photochemischen⁴⁵ Methoden vor allem enzymatische Methoden von praktischer Bedeutung.

Die Regenerierstrategien kann man, wie in Abb. 3-4 dargestellt, in zwei Klassen teilen:

- Die **substratgekoppelte** Regenerierung (Abb. 3-4a) nutzt nur ein Enzym zur Synthese und Regenerierung. Es wird ein Alkohol, z. B. Isopropanol als Cosubstrat eingesetzt, der im selben Maße oxidiert wird, wie das eingesetzte Keton reduziert wird. Vorteilhaft wird dieses Verfahren eingesetzt, wenn der Cofaktor sehr eng an das Enzym gebunden ist, wie dies z. B. bei der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase⁴⁶ der Fall ist. Es wird aber auch, aufgrund der einfachen Handhabung, bei Enzymen mit dissoziierbarem Cofaktor eingesetzt.
- Die **enzymgekoppelte** oder **gekoppelte** Regenerierung (Abb. 3-4b) nutzt ein zweites Enzym mit seinem Substrat zur Cofaktorregenerierung. Eines der am häufigsten, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, eingesetzten Systeme für die Regenerierung von NADH nutzt die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* als Regenerienzym mit Formiat als Substrat. Dieses System bietet eine Reihe von Vorteilen:
 - Durch die Entkopplung der Enzymaktivitäten kann eine effektive zu jedem Zeitpunkt gewährleistet werden.
 - Formiat ist nach molekularem Wasserstoff die günstigste Wasserstoffquelle, zudem ist es in Lösung stabil und unbedenklich für Enzyme und Cofaktoren auch in hoher Konzentration.

⁴⁰ Oriental Yeast, 1998

⁴¹ Chenault et al. (1987): Appl. Biochem. Biotechnol., 14, 147.

Chenault et al. (1988): Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 6, 221.

⁴² Ruppert et al. (1988): J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1150.

Steckhan et al. (1990): Angew. Chem., 102, 445.

Westerhausen et al. (1992): Angew. Chem., 104, 1496.

⁴³ Morita et al. (1994): J. Ferment. Bioeng., 77, 13.

⁴⁴ Fry et al. (1994): Tetrahedron Lett., 35, 5607.

Nakamura et al. (1988): *Electroenzymology Coenzyme Regeneration*, Springer Verlag, Berlin.

⁴⁵ Hilthorst et al. (1982): Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 3927.

Laane et al. (1987/88): Israel J. Chem., 28, 17.

⁴⁶ Zachariou et al. (1986): J. Bacteriol., 167, 863.

- Durch die Produktion von Kohlendioxid liegt das Gleichgewicht ($K_{eq} = 15.000$) der Reaktion sehr weit auf der Seite des CO_2 ⁴⁷ und die Aufarbeitung wird nicht durch Produkte der Regenerierungsreaktion kompliziert.
- Die FDH ist stabil und einfach in einem kontinuierlichen fermentativen Verfahren herzustellen und aufzuarbeiten⁴⁸. Das Enzym ist in großen Mengen zu günstigen Preisen⁴⁹ erhältlich, was bereits zu einem industriellen Einsatz dieses Verfahrens in der reduktiven Aminierung von Ketocarbonsäuren zur Synthese unnatürlicher Aminosäuren geführt hat⁵⁰.

Andere Regenerierenzyme wie die Glucosedehydrogenase oder eine zweite Alkoholdehydrogenase haben nur untergeordnete Bedeutung, genau wie die Verwendung einer Hydrogenase und elementarem Wasserstoff.

Ein Sonderfall der enzymgekoppelten Regenerierung nutzt zwei Enzyme, von denen das Produkt des Regenerienzyms gleichzeitig das Substrat des Synthesenzyms ist (Abb. 3-4c). Hierbei dienen das oxidierte Produkt und NAD(P)H, die durch die erste enzymatische Reaktion gebildet wurden, als Substrate für den zweiten Schritt, eine enzymatische Reduktion. Ein Beispiel für diese Strategie ist die Synthese von α -Aminosäuren aus α -Hydroxycarbonsäuren in einen Zweistufenprozeß⁵¹.

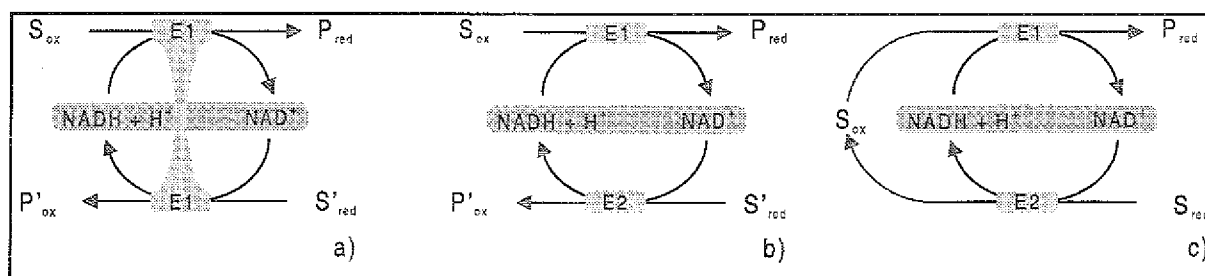


Abb. 3-4: Enzymatische Regenerierung von NADH

Die in diesem Kapitel verwendete Monooxygenase benötigt NADPH, den teuersten der Nicotinamid-Cofaktoren. Leider existierte bis vor kurzer Zeit kein so einfaches und günstiges Regeneriersystem wie für NADH.

Zurückgegriffen wird meist auf die Verwendung von Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

⁴⁷ Schütte et al. (1976): Eur. J. Biochem., **62**, 151.

⁴⁸ Weuster-Botz et al. (1994): Chem. Eng. Technol., **17**, 131.

Cordes et al. (1994): Methods Enzymol., **228**, 600.

⁴⁹ Preis bei Großabnahme: ca. 0,08 DM pro U

⁵⁰ Bommarius et al. (1995): Tetrahedron: Asymm., **6**, 2851.

⁵¹ Wandrey et al. (1986): Biotechnol. Bioind., **3**, 8.

Fujii et al. (1991): Biotechnol. Bioeng., **38**, 1166.

(EC 1.1.1.49), die isoliert aus *Leuconostoc mesenteroides* relativ preisgünstig kommerziell erhältlich ist. Die Regenerierungsstrategie nutzt die Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconolacton, das seinerseits spontan zu 6-Phosphogluconsäure hydrolysiert und somit das Gleichgewicht der Reaktion in die gewünschte Richtung verschiebt. Limitierend ist der Preis des Regeneriersubstrates, das bei präparativen Synthesen mit Hilfe der Hexokinase unter ATP-Regenerierung aus Glucose gewonnen wird, wobei sich allerdings ein recht komplexes Vierenzymsystem bildet, das verschiedene Nebenprodukte enthält.

Als weitere Alternative bietet sich der Einsatz von NADP⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenasen, zum Beispiel aus *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), an, jedoch konnten mit diesem System bis heute keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden.

1979 wurde von EGOROV et al. eine NAD⁺-abhängige Formiatdehydrogenase (FDH) aus dem methyilotrophen Stamm *Pseudomonas* sp. 101 als Homodimer mit zwei ca. 44 kDa großen Untereinheiten und zwei unabhängigen aktiven Zentren beschrieben⁵² und die Struktur geklärt⁵³. Nach Klonierung und Expression in *E. coli*⁵⁴ konnte durch Punktmutation eine geänderte Cofaktorabhängigkeit erreicht werden: Der Austausch von Asparagin 221 und von Glycin 203 gegen Alanin führten zur Entfernung einer negativen Ladung und der zusätzlichen Erweiterung der α -Helix im Bereich der Ribosebindungsstelle und schufen so Platz für die zusätzliche Phosphatbindungsstelle⁵⁵. Durch diese Mutationen konnte eine Aktivität gegenüber NADP⁺ erreicht werden, die ca. 60 % der Aktivität des nativen Enzyms gegenüber NAD⁺ entspricht. Die übrigen kinetischen Parameter des Enzyms blieben weitgehend unverändert wie auch die Stabilität, die bei 25 °C eine mehrwöchige Lagerung ohne nennenswerten Aktivitätsverlust genauso erlaubt⁵⁶, wie eine einjährige Lagerung bei 4 °C⁵⁷. Dieses neue Enzym eröffnete die Möglichkeit der Übertragung des für NADH etablierten Systems der Regenerierung mittels Formiat / FDH auf NADPH und der Nutzung der bekannten Effektivität. Die Methode fand bereits in Verbindung mit einer NADPH-abhängigen ADH seinen erfolgreichen Einsatz. Bei der Reduktion von Acetophenon wurden im Enzymmembranreaktor eine maximale Zyklenzahl des Cofaktors von 85 erreicht⁵⁶. Hier wird sie nun erstmals mit einer Monooxygenase kombiniert.

⁵² Egorov et al. (1979): Eur. J. Biochem., **99**, 569.

⁵³ Lamzin et al. (1992): Eur. J. Biochem., **206**, 441.

⁵⁴ Tishkov et al. (1993): Biotechnol. Appl. Biochem., **18**, 201.

⁵⁵ Tishkov et al. (1996): FEBS Lett., **390**, 104.

⁵⁶ Seelbach et al. (1996): Tetrahedron Lett., **37**, 1377.

⁵⁷ V.I.Tishkov, unveröffentlichte Ergebnisse

3.2 Gewinnung des Enzyms

Die Gewinnung der Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter* NCIMB 9871 wurde durch den Kooperationspartner in Leipzig durchgeführt. Für eine ausführliche Beschreibung der Verfahren sei auf die dort veröffentlichte Diplomarbeit⁵⁸ und Dissertation⁵⁹ und die darin zitierte Literatur verwiesen. Fermentation und Aufreinigung des Enzyms sind daraus im folgenden kurz zusammengefaßt.

3.2.1 Fermentation

Zur Gewinnung der enzymhaltigen Biomasse wird der *Acinetobacter*-Stamm auf Cyclohexanol als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert, wobei Cyclohexanol zur Induktion der Monooxygenase periodisch zugegeben wurde. Nach einer Fermentationszeit von durchschnittlich 8-10 h wurde durch Zentrifugation ca. 5 g feuchte Biomasse pro Liter Fermentationsmedium erhalten, die bei -20 °C gelagert wurde.

3.2.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung des Enzyms wurde nach einem gegenüber der Literatur⁶⁰ vereinfachten Verfahren durchgeführt und nutzt nach dem Zellaufschluß eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und eine Ionenaustauschchromatographie.

Der Zellaufschluß wurde mit Hilfe einer *french press* und anschließender Ultraschallbehandlung durchgeführt und ergab eine Aktivität, die ca. 100 U⁶¹ pro Liter Fermentationsbrühe entsprach (= ca. 0,5 U mg⁻¹).

In der Ammoniumsulfatfällung wurde die aktive Fraktion zwischen 50 % und 90 % Sättigung erhalten und eine Aufreinigung auf 1 U mg⁻¹ erreicht.

Nach anschließender Ultrafiltration zwecks Umpufferung wurde die Proteinlösung einer zweistufigen Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose unterzogen. Im ersten Schritt wurde durch Anwendung eines KCl-Stufengradienten eine weitgehende Reinigung erzielt. Die Feinreinigung erfolgte durch erneute Chromatographie am gleichen Säulenmaterial mit einem linearen Gradienten.

Durch dieses Protokoll konnte insgesamt ein Aufreinigungsfaktor von 22 zu einer spezifischen Aktivität von 11 U mg⁻¹ in einer Ausbeute von 30 % erreicht werden.

⁵⁸ Schwarz-Linek (1995): Diplomarbeit, Universität Leipzig, Leipzig.

⁵⁹ Schwarz-Linek (1998): Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig.

⁶⁰ Donoghue et al. (1976): Eur. J. Biochem., **63**, 175.

Trudgill (1990): Methods Enzymol., **188**, 70.

Latham et al. (1987): J. Am. Chem. Soc., **109**, 3421.

Es gelang eine Präparation zu erzielen, die weitgehend frei von unerwünschten Nebenaktivitäten (vor allem Cyclohexanoldehydrogenase und ϵ -Caprolactonhydrolase) und somit für alle Biotransformationen einsetzbar war.

3.3 Bedeutung der Sauerstoffversorgung, blasenfreie Begasung

Die enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation benötigt Sauerstoff in molaren Mengen als Oxidationsmittel. Der Eintrag dieses Gases durch Einblasen in das Reaktionsmedium führt allerdings aufgrund der hier auftretenden Scherkräfte an den Phasengrenzflächen zur Desaktivierung des aktiven Proteins.

Die Löslichkeit von molekularem Sauerstoff unter den angestrebten Reaktionsbedingungen ist mit 1,2 mM⁶² nur sehr gering, so daß gerade bei Synthesen oberhalb des Mikromaßstabes ein diffusiver Gastransport über die Oberfläche des Reaktionsgefäßes bei weitem nicht ausreichend. Es mußte folglich eine schonende und effektive Methode der Gasversorgung gefunden werden.

In der Zellkulturtechnik werden bereits seit einigen Jahren routinemäßig hydrophobe Silikonschläuche zur diffusiven blasenfreien Begasung von Zellkulturfermentern eingesetzt⁶³. Die dünne Schlauchwand erlaubt einen diffusiven Gasaustausch, der durch die Konzentrationsgradienten über die Wand getrieben wird⁶⁴. Die Übertragbarkeit auf enzymatische Systeme wurde kürzlich von BONGS⁶⁵ anhand einer Aminosäureoxidase demonstriert. Hier wird nun dieses Prinzip erstmalig auf eine Monooxygenase übertragen.

Bei den hier beschriebenen Versuchen kam ein Schlauch mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Wandstärke von 0,3 mm zum Einsatz. Für diesen Schlauchtyp wurde unter den gegebenen Bedingungen eine Sauerstofftransferrate Θ_M von 72 g Sauerstoff pro Tag und Quadratmeter Membranfläche bestimmt⁶⁶. Hieraus läßt sich mit der Kenntnis des Sauerstoffverbrauches der Reaktion die benötigte Membranfläche sowie die minimale Schlauchlänge berechnen. Bei einer angestrebten Raum-Zeit-Ausbeute von $RZA = 7,7 \text{ mmol h}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ergibt sich nach Gleichung 3-1 und 3-2 eine benötigte Fläche A_M von $0,107 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$, was bei einem angestrebten Reaktorvolumen von 30 mL einer

⁶¹ 1 U des Enzyms setzt pro Minute 1 μmol einer 2 mM Lösung aus Cyclohexanon bei 30 °C, pH 9,0 und 0,2 mM NADPH um. Gemessen wird die Abnahme von NADPH bei 340 nm.

⁶² Bei 30 °C in Wasser nach Battino (1981): *IUPAC Solubility Data Series*, Pergamon Press, Oxford, 7 (Oxygen and Ozone).

⁶³ Hambach et al. (1992): *Development of a Reactor-Integrated Aeration System for Cultivation of Animal Cells in Fluidized Beds* in: Spier et al.: *Animal Cell Technology, Developments, Processes and Products*, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 381.

⁶⁴ Schneider et al. (1995): *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 839.

⁶⁵ Bongs (1997): Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

⁶⁶ Schmidt (1997): Diplomarbeit, RWTH, Aachen.

Schlauchlänge von 25 cm entspricht, in dem sich mit 3,1 mL etwa 10 % der Reaktionslösung befinden.

$$A_M = \frac{\dot{m}_{O_2}}{\Theta_M}$$

Gleichung 3-1

$$\dot{m}_{O_2} = n \cdot RZA \cdot M_{O_2}$$

Gleichung 3-2

mit: A_M	= Membranfläche pro L Reaktorvolumen	$[m^2 L^{-1}]$
$\dot{m}_{O_2}$	= Verbrauchter Sauerstoff pro Zeit und L Reaktorvolumen	$[g L^{-1} d^{-1}]$
Θ_M	= Gastransferrate	$[g d^{-1} m^{-2}]$
n	= Stöchiometriefaktor (hier = 1)	$[-]$
RZA	= maximale Raum-Zeit-Ausbeute	$[mol L^{-1} d^{-1}]$
M_{O_2}	= Molare Masse von Sauerstoff (= 32 g mol ⁻¹)	$[g mol^{-1}]$

3.4 Kinetische Untersuchungen, Suche nach günstigen Reaktionsbedingungen

3.4.1 Auswahl eines Modellsubstrates

Als Modellsubstrat wurde 4-Methylcyclohexanon untersucht. TASCHNER⁶⁷ berichtet von der Oxidation dieses prochiralen Substrates unter Erzeugung des optisch aktiven (S)-5-Methylcaprolactons⁶⁸ in 80 % Ausbeute und > 98 % ee unter Cofaktorregenerierung durch Glucose-6-phosphatdehydrogenase.

Dieses Substrat sollte es erlauben, die Cofaktorregenerierung mittels FDH (§ 3.1.3) zu etablieren, einen Reaktor mit integrierter blasenfreier Begasung (§ 3.3) aufzubauen und hiermit das gewünschte Produkt zu synthetisieren. Das Reaktionsschema des Zweienzymsystems ist in Abb. 3-5 dargestellt.

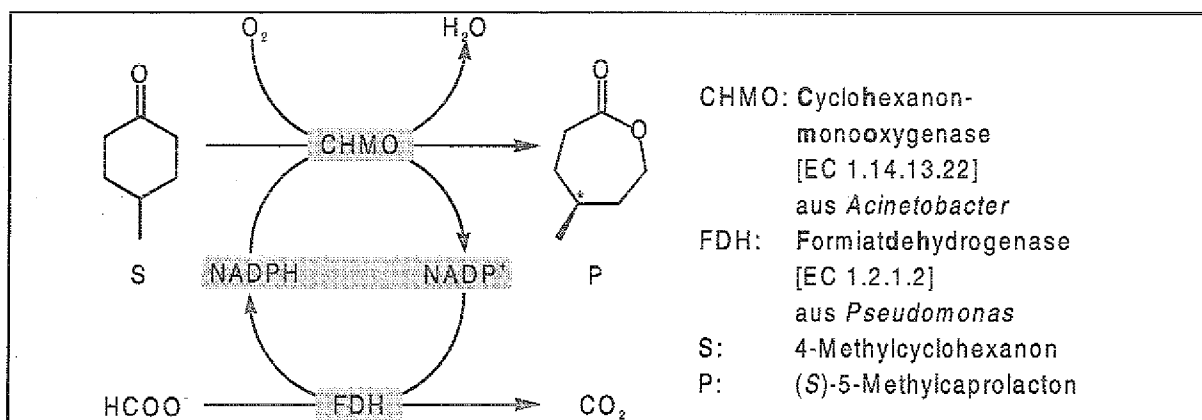


Abb. 3-5: Reaktionsschema des Zweienzymsystems aus CHMO und FDH

⁶⁷ Taschner et al. (1988); J. Am. Chem. Soc., 110, 6892.

⁶⁸ Systematischer Name nach IUPAC: (S)-(-)-5-Methyloxepan-2-on

3.4.2 Einfluß von pH-Wert und Temperatur

Die richtige Wahl von pH-Wert und Reaktionstemperatur sind essentiell für das Gelingen einer enzymatischen Reaktion. Hier kam vor allem der Wahl eines pH-Wertes eine wichtige Bedeutung zu, da die beiden verwendeten Enzyme deutlich unterschiedliche pH-Optima besitzen. Während, wie in Abb. 3-6a gezeigt, die CHMO eine maximale Aktivität bei pH 9,0 aufweist, die hin zum Neutralen deutlich abnimmt, steigt die Aktivität der FDH in dieser Richtung an. SEELBACH⁶⁹ fand ein Maximum bei pH 6,2.

Ein pH-Wert von 8,0 bietet einen günstigen Kompromiß zwischen den verwendeten Enzymen und wurde in allen hier beschriebenen Reaktionen eingesetzt.

Aus den ARRHENIUS-Darstellungen der Temperaturabhängigkeiten wurden Aktivierungsenergien⁷⁰ von 47,2 kJ mol⁻¹ für die CHMO und von 35,1 kJ mol⁻¹ für die FDH bestimmt.

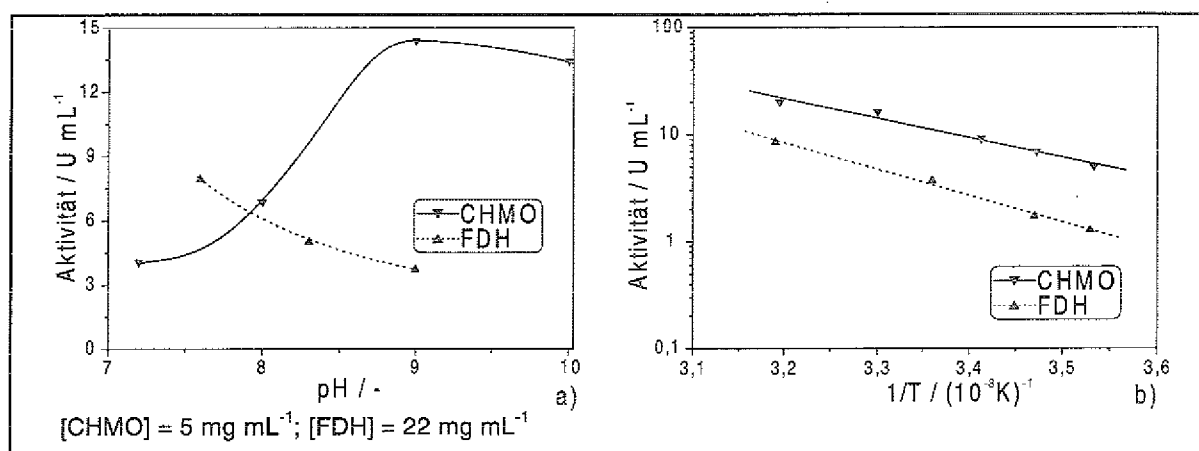


Abb. 3-6: a) pH-Abhängigkeit (CHMO: 2 mM Cyclohexanon, 0,2 mM NADPH, 30°C; FDH: 100 mM Formiat, 1 mM NADP⁺, 25 °C)
b) Temperaturabhängigkeit in ARRHENIUS-Darstellung⁷¹ (CHMO: 2 mM Cyclohexanon, 0,2 mM NADPH, pH 9,0; FDH: 100 mM Formiat, 1 mM NADP⁺, pH 9,0)

3.4.3 Kinetische Parameter der Enzyme

Viele der kinetischen Parameter der verwendeten Enzyme sind bereits literaturbekannt⁷², daher wurden nur einige wichtige Parameter unter Reaktionsbedingungen neu vermessen. Hier war vor allem der K_M-Wert der Formiatdehydrogenase gegenüber NADP⁺ von Bedeu-

⁶⁹ Seelbach et al. (1996): Tetrahedron Lett., **37**, 1377.

⁷⁰ Cornish-Bowden (1995): *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London.

⁷¹ Bergmeyer (1974): *Bestimmung der Aktivität von Enzymen* in: Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, VCH, Weinheim, **1**, 129.

⁷² CHMO: Donoghue et al. (1976): Eur. J. Biochem., **63**, 175.

FDH: Tishkov (1993): Enzyme Engineering XII, Deauville, France.
Seelbach et al. (1996): Tetrahedron Lett., **37**, 1377.

tung, da dieser die minimale Cofaktorkonzentration festlegt. Der gefundene Wert von 0,24 mM verbietet ein Arbeiten wesentlich unterhalb dieser Konzentration, um die Aktivität der FDH nicht zu stark zu limitieren. Die Kinetik der CHMO wurde unter Reaktionsbedingungen neu vermessen und die Werte der Parameter durch Anpassung an ein MICHAELIS-MENTEN Doppelsubstratmodell erhalten. Wie Tabelle 3-2 zeigt sind die MICHAELIS-MENTEN Konstanten der Substrate der Monooxygenase sehr gering. Es tritt eine leichte Substratüberschußinhibierung und eine Produktinhibierung durch den oxidierten Cofaktors auf. Die Meßdaten sind in Anhang A zu finden.

$$V = V_{\max}^{\text{CHMO}} \cdot \frac{[4-\text{MeCHon}]}{K_M^{4-\text{MeCHon}} + \frac{[4-\text{MeCHon}]^2}{K_I^{4-\text{MeCHon}}} + [4-\text{MeCHon}]} \cdot \frac{[\text{NADPH}]}{K_M^{\text{NADPH}} \left(1 + \frac{[\text{NADP}]}{K_I^{\text{NADP}}} \right) + [\text{NADPH}]} \quad \text{Gl. 3-3}$$

mit: [I] = Konzentration der Komponente I [mM]
 K_M^I = MICHAELIS-MENTEN-Konstante der Komponente I [mM]
 K_I^I = Inhibitorkonstante der Komponente I [mM]
 $V_{\max}^I$ = Maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion I [U mg⁻¹]

Parameter	Wert	Standardabweichung
$V_{\max}^{\text{CHMO}}$	0,45 U mg ⁻¹	± 6,6 %
$K_M^{4-\text{MeCHon}}$	2,9 µM	± 13,3 %
K_M^{NADPH}	4,85 µM	± 30,7 %
$K_I^{4-\text{MeCHon}}$	31,7 mM	± 14,8 %
K_I^{NADP}	516 µM	± 27,9 %

Tabelle 3-2: Kinetische Parameter der CHMO (5 mg mL⁻¹)

3.5 Synthesen im Zweienzymsystem⁷³

3.5.1 Reaktor mit integrierter blasenfreier Begasung

Zur präparativen Umsetzung von 4-Methylcyclohexanon zu 5-Methylcaprolacton wurde ein Reaktor entwickelt, der aus einem temperierten und gerührten Satzreaktor besteht und einen Umlauf besitzt, in den der oben beschriebene Silikonschlauch zur blasenfreien Begasung

⁷³ Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind veröffentlicht: Rissom et al. (1997): Tetrahedron: Asymm., 8, 2523.

integriert wurde. Ein Schema des verwendeten Reaktors ist in Abb. 3-7 gezeigt, ein Foto der Anlage in Abb. 3-8.

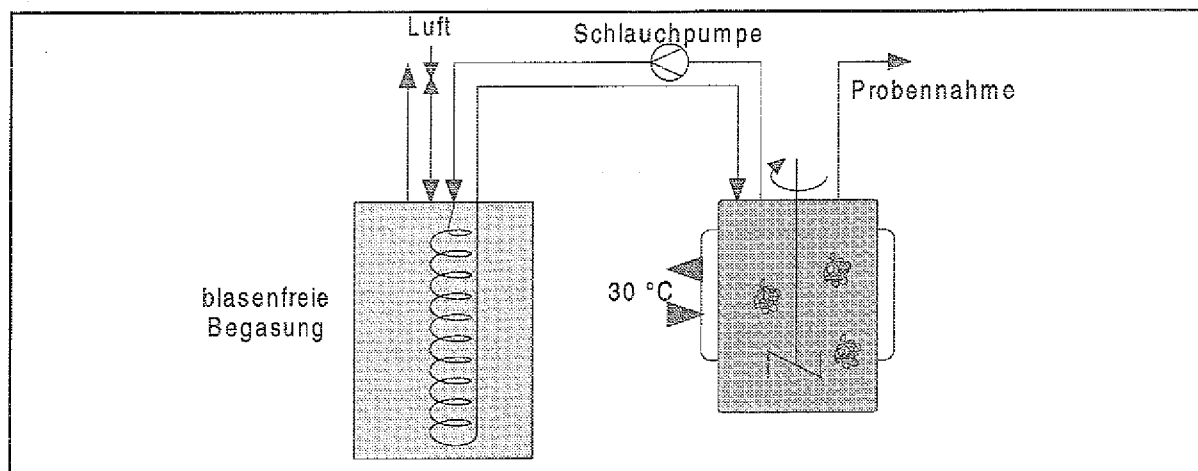


Abb. 3-7: Schema des Satzreaktors mit integrierter blasenfreier Begasung

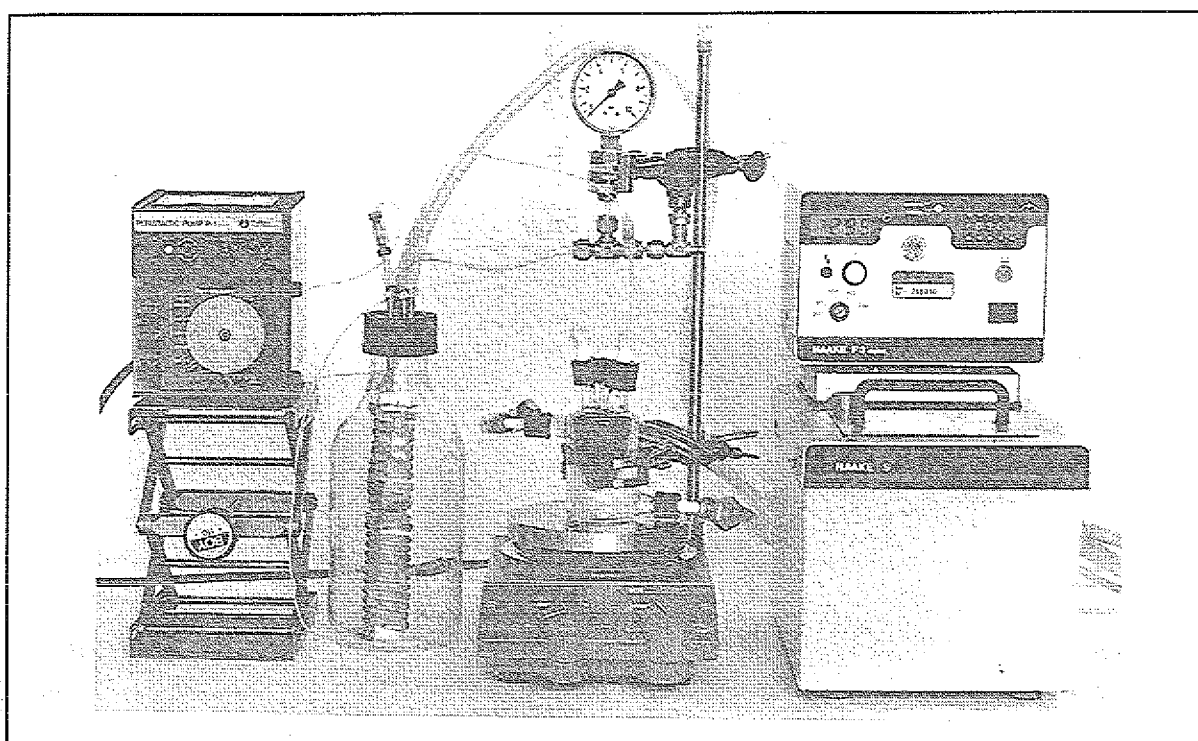


Abb. 3-8: Foto des Reaktoraufbaus

Es wurde eine Schlauchlänge von ca. 100 cm verwendet, die um den Faktor 4 über der berechneten Mindestlänge ($\varnothing 3.3$) liegt und somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu jedem Zeitpunkt der Reaktion sicherstellt. Das Gesamtreaktionsvolumen des Reaktors betrug 30 mL, von denen sich ca. 10 mL im Umlauf befanden und 20 mL im Rührgefäß. Die Umlaufgeschwindigkeit wurde mit 450 mL h^{-1} so hoch angesetzt, daß pro Umlauf weniger als 1 % des Substrates umgesetzt wird. Es kann folglich von einer gleichmäßigen Verteilung

aller Komponenten, auch des Sauerstoffes ausgegangen werden. Die Begasung erfolgte mittels Durchleitung von ca. 60 L h^{-1} Druckluft, wobei darauf geachtet werden muß, daß sich in der Begasungsflasche kein Druck aufbaut, der zum Ausgasen in der Lösung und somit zur zu vermeidenden Blasenbildung führen würde. Bei dieser Strömung wurde kein Austrag von Substrat oder Produkt beobachtet. In regelmäßigen Abständen werden dem Reaktor Proben zur gaschromatographischen Analyse entnommen.

Vollständiger Umsatz eines typischen Experiments wurde nach etwa 10 h Reaktionsdauer erreicht (Abb. 3-10). Um die vorhandene Enzymaktivität besser auszunutzen, wurde der Reaktor als *Repetitive Batch*⁷⁴ betrieben. Wie in Abb. 3-9 gezeigt, wird hierbei nach Beendigung der Umsetzung die Reaktionslösung durch eine Ultrafiltrationsmembran filtriert. Bei Verwendung einer Membran mit einer Ausschlußgrenze von $30.000 \text{ g mol}^{-1}$ wird eine nahezu vollständige Retention beider verwendeter Enzyme erreicht. Die niedermolekularen Substrate, Cofaktoren und Pufferbestandteile passieren die Membran hingegen ungehindert und werden im Filtrat gesammelt. Nach der Filtration wird das die Biokatalysatoren enthaltende Retentat mit neuen Substraten aufgefüllt und die Reaktion findet erneut statt. Dieses Verfahren kann theoretisch solange wiederholt werden, bis der Katalysator völlig deaktiviert ist.

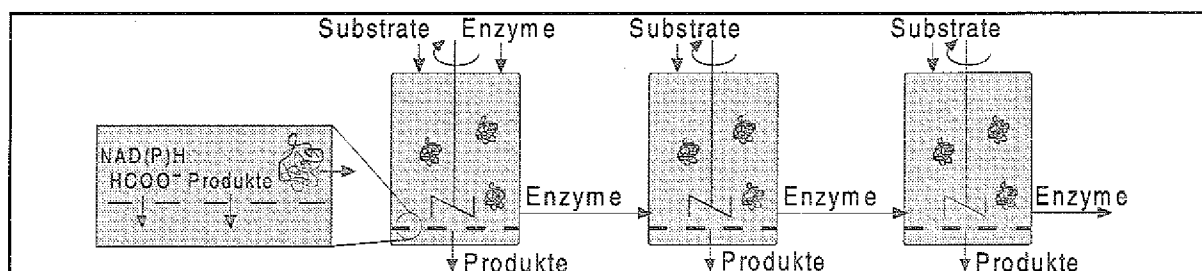


Abb. 3-9: Prinzip eines *Repetitive Batch*-Reaktors

Die Synthese von 5-Methylcaprolacton gelang im oben beschriebenen Reaktor in drei aufeinanderfolgenden Läufen. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm von Lauf zu Lauf nicht wesentlich ab, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit auch noch mehr Läufe durchgeführt werden können. Die Endumsätze waren bei jedem Lauf nahezu vollständig, so daß das gewünschte Produkt in hoher Enantiomerenreinheit ohne weitere Trennung durch einfache Extraktion mit Essigester aus dem Filtrat gewonnen werden kann.

⁷⁴ Kragl et al. (1993): *Tetrahedron: Asymm.*, 4, 1193.

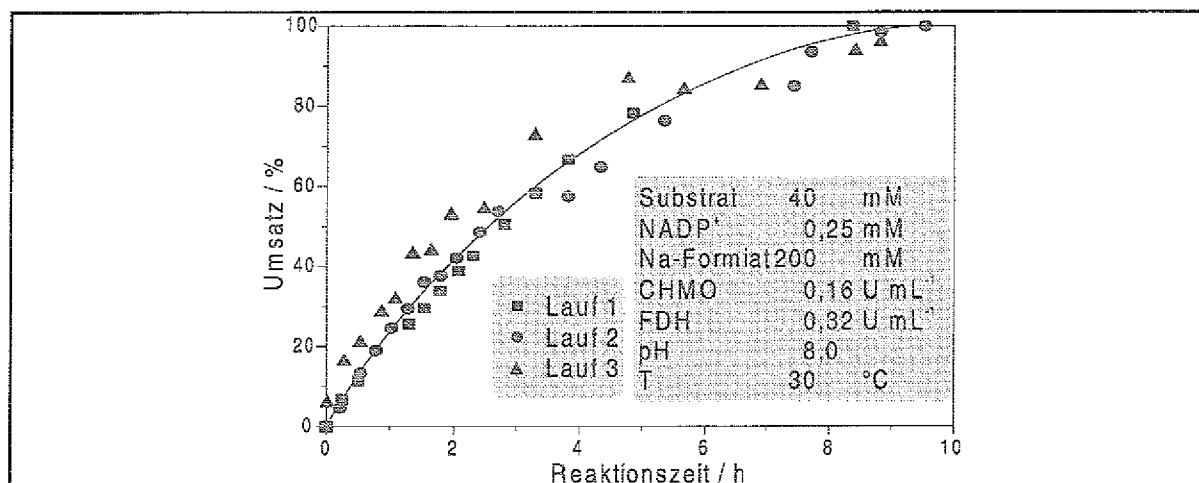


Abb. 3-10: Synthese von 5-Methylcaprolacton im begasten *Repetitive Batch*

Auffallend hoch war die Betriebsstabilität der Monooxygenase. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die Anwesenheit von NADPH im Reaktionsgemisch zurückzuführen, das, bedingt durch die effektive Cofaktorregenerierung, ständig vorliegt.

Aus dem ersten Lauf konnten 108 mg Produkt (70 %) isoliert werden.

3.5.2 Betrachtung der maximalen Zyklenzahl des Cofaktors, Einsatz von Nanofiltrationsmembranen

Die Reaktionsführung im *Repetitive Batch*, wie sie oben beschrieben wurde, erlaubt die mehrfache Nutzung der Enzyme, nicht jedoch der ebenfalls wertvollen Cofaktoren. Die maximale Zyklenzahl (*ttn*)⁷⁵ des Cofaktors ist also hier durch den Quotient aus Cofaktorkonzentration und Substratkonzentration gegeben.

Die hier durchgeführte Umsetzung von 40 mM Substrat bei einer Cofaktorkonzentration von 0,25 mM ergibt eine maximale Zyklenzahl des Cofaktors von 160. Dieser Wert ist jedoch bei weitem zu klein, um die, durch den hohen Preis des benötigten Cofaktors limitierte, Reaktion wirtschaftlich durchführen zu können.

Eine wiederholte Nutzung der Cofaktoren kann durch die Verwendung einer Membran mit geringerer Ausschlußgrenze erreicht werden, die neben den Enzymen auch die Cofaktoren zurückhält⁷⁶. Solche Nanofiltrationsmembranen sind käuflich erhältlich und bieten, wie die getestete Membran ROM 375 hervorragende Retentionseigenschaften, die allerdings bei gleicher Membranfläche durch einen höheren Transmembrandruck und geringere Flüsse erkauft werden, so daß die Filtration zwischen den Reaktionsschritten ein nicht mehr zu vernachlässigender Zeitfaktor wird.

⁷⁵ *ttn* von engl. *total turnover number*

⁷⁶ Seelbach et al. (1997): *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 389.

In Tabelle 3-3 sind die für die betrachtete Reaktion relevanten Retentionsraten zusammengefaßt.

Substanz	Retention
NADP ⁺	> 99 %
NADPH	99,4 %
Formiat	56 %
4-Methylcyclohexanon	< 50 %

Tabelle 3-3: Retention an ROM 375 (30 °C, pH 8,0, 3 mL-Plexiglas-EMR bei 3 mL h⁻¹)

Die Reaktion kann unter Verwendung der Nanofiltration in ähnlicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt werden. Abb. 3-11 zeigt, in welchem Maße die Zyklenzahl des Cofaktors durch diese Technik erhöht werden kann. Es ist neben der gleichbleibenden Zyklenzahl bei Verwendung der Ultrafiltrationsmembran (=160, weiß) der maximale theoretische Wert (=Anzahl der Läufe · 160, schwarz) und der praktisch erreichbare Wert (grau) gezeigt. Dieser ergibt sich durch Einrechnen der unvollständigen Retention von 99,4 % (Faktor 0,994) und einer Desaktivierung des Cofaktors bei einer Zykluszeit von 10 h von 5,6 % (Faktor 0,944).

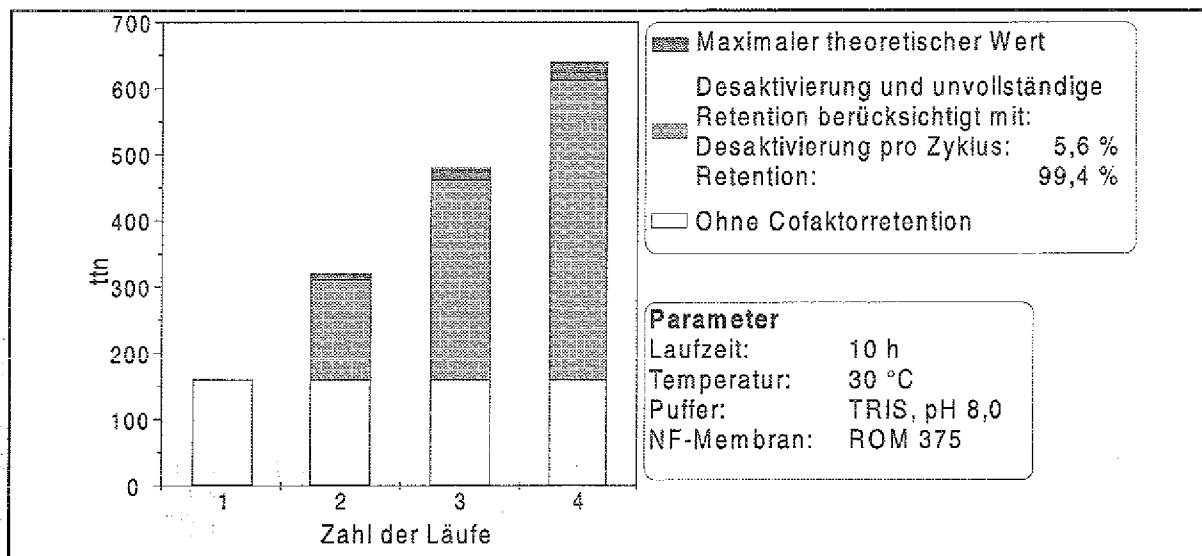


Abb. 3-11: Erhöhung der maximalen Zyklenzahl durch Nanofiltration

Die theoretische Fortführung bis zu einer großen Anzahl von Läufen ergibt bei Vernachlässigung der auftretenden Enzymdesaktivierung als Grenzwert der Entwicklung einer geometrischen Reihe⁷⁷ den maximal erreichbaren Wert für die Zyklenzahl $t_{n\infty}$:

⁷⁷ Sieber (1980): *Mathematische Formeln*, Klett, Stuttgart.

$$ttn_n = ttn_0 + ttn_0 \cdot R + ttn_0 \cdot R^2 + \dots + ttn_0 \cdot R^{n-2} + ttn_0 \cdot R^{n-1}$$

Gleichung 3-4

Die Summe bildet sich nach:

$$ttn_n = ttn_0 \frac{1-R^n}{1-R}$$

Gleichung 3-5

Dadurch ergibt sich durch Grenzwertbildung die maximal erreichbare Zyklenzahl durch:

$$ttn_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} (ttn_n) = \frac{ttn_0}{1-R} \quad (\text{wenn } |R| < 1, \text{ da hierf\"ur } \lim_{n \rightarrow \infty} R^n = 0)$$

Gleichung 3-6

mit: ttn_n = Zyklenzahl nach Lauf n

R = Retentions- und Desaktivierungsfaktor

Durch Einsetzen von $ttn_0 = 160$ und $R = 0,938$ ergibt sich eine maximal erreichbare Zyklenzahl von $ttn_\infty = 2580$. Hiermit könnten die Cofaktorkosten⁷⁸ bis auf 104 DM mol⁻¹ Produkt gesenkt werden, wodurch der Prozeß nicht mehr durch diesen Kostenfaktor, sondern vielmehr durch die Enzymkosten bestimmt wird.

3.6 Ausblick

Die erfolgreiche Durchführung der Synthesen im *Repetitive Batch* läßt einen Ausblick auf weiterführende Reaktorkonzepte zu. So kann durch die Verwendung eines Enzymmembranreaktors (EMR) die Reaktion kontinuierlich geführt werden.

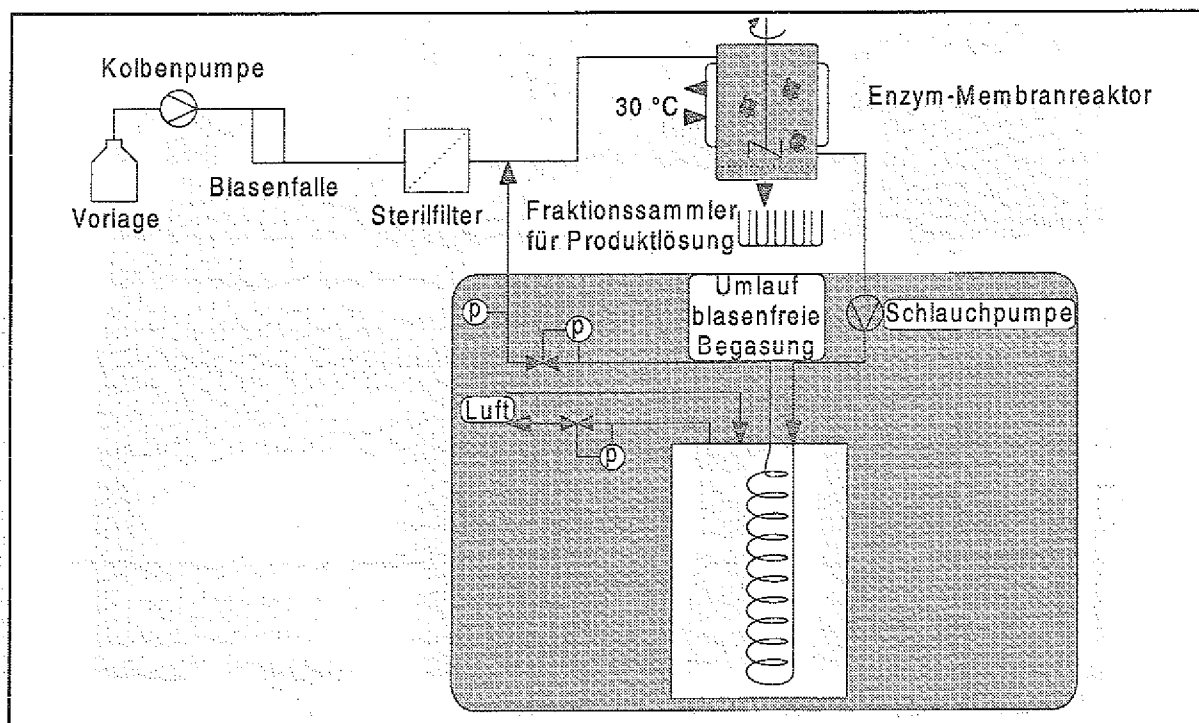


Abb. 3-12: EMR-Aufbau mit integrierter blasenfreier Begasung

⁷⁸ Siehe Tabelle 3-1

Dies hat den Vorteil, daß zum einen die synthetisch ungenutzte Zeit der Filtration (Rüstzeit) entfällt und vor allem der Reaktor durch den Betrieb unter Auslaufbedingungen bei konstant niedrigen Substratkonzentrationen betrieben werden kann, was positiv auf Enzymaktivität zurückwirkt. Die Integration der blasenfreien Begasung ist hier ebenfalls durch Einbau des Begasungsschlauches in einem Umlauf möglich, wie dies in Abb. 3-12 schematisch und in Abb. 3-13 fotografisch gezeigt wird.

Die technische Schwierigkeit dieses Reaktoraufbaus liegt in der Druckkontrolle auf beiden Seiten der Begasungsmembran. Da sich im Reaktor, vor allem bei Verwendung einer Nanofiltrationsmembran ein erheblicher Druck aufbaut, ist für einen präzisen Druckausgleich an der äußeren Seite der Begasungsmembran zu sorgen, um den diffusiven Gastransport zu gewährleisten. Selbst bei kleineren Druckdifferenzen kann entweder Reaktionsmedium durch die Membran treten oder es durch Überdruck zu einer Blasenbildung im Reaktor führen. Durch den Einsatz von elektronischen Druckreglern auf beiden Membranseiten konnte, wie in Abb. 3-14 gezeigt, bereits trotz dieser technischen Herausforderung ein gewisser Umsatz im EMR erreicht werden. Um das beschriebene Druckproblem mit dem Ziel einer über eine längere Zeit stabilen Reaktionsführung zu lösen, werden sicher in der Zukunft noch Fortentwicklungen der Begasungsapparatur notwendig sein.

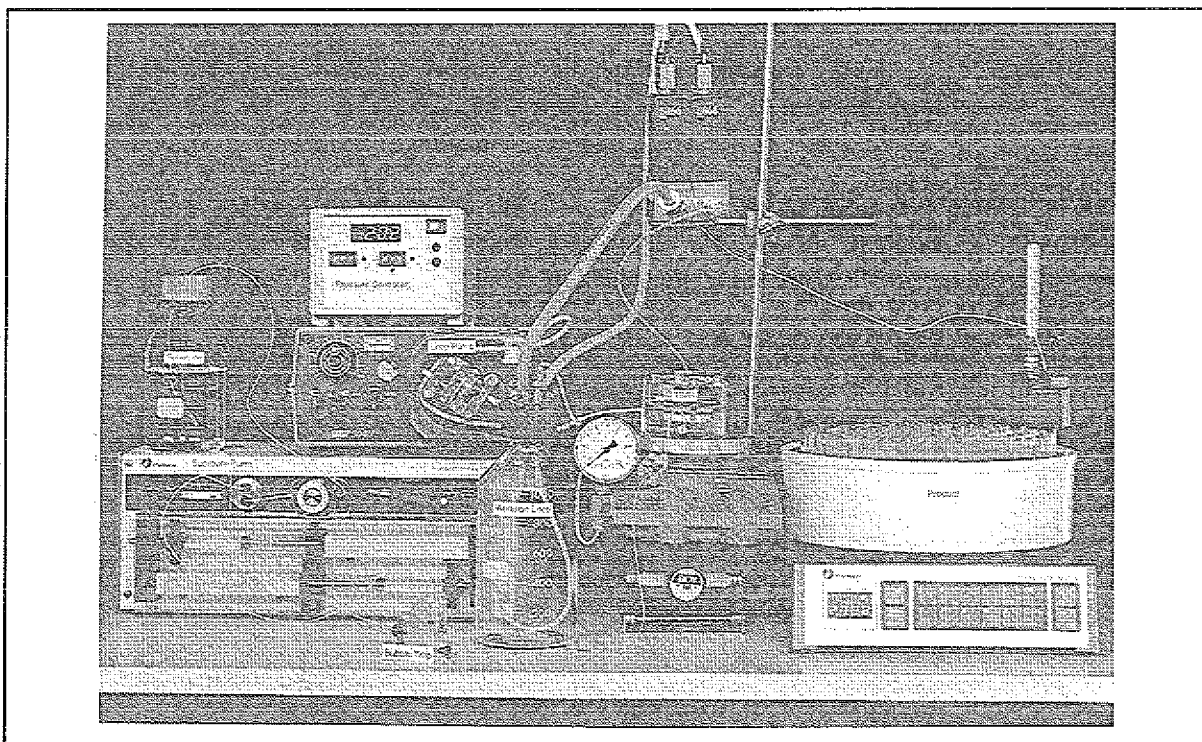


Abb. 3-13: Foto des EMR-Aufbaus

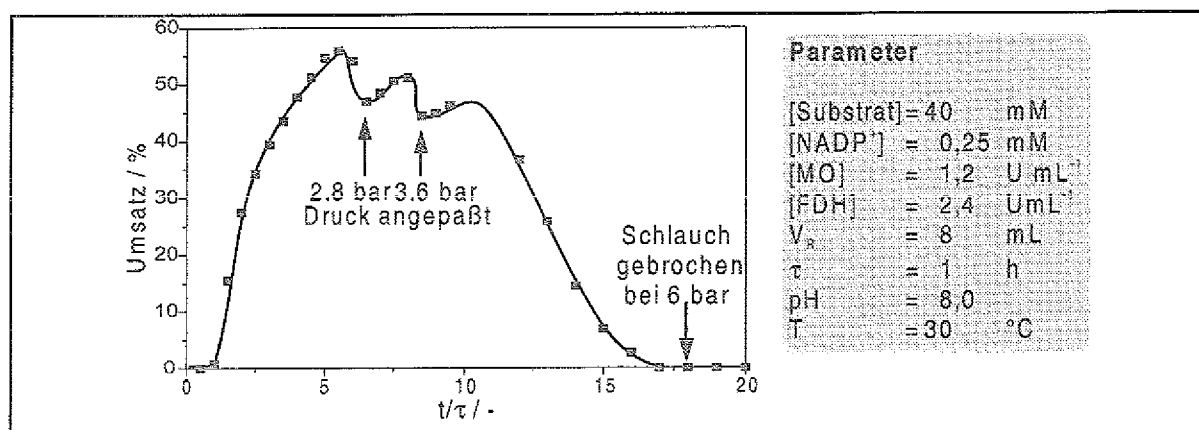


Abb. 3-14: Syntheserversuch im EMR mit integrierter blasenfreier Begasung

Ferner ist die Erweiterung der Substratbreite der Reaktion notwendig. Während das gewählte Substrat 4-Methylcyclohexanon eher Modellcharakter besitzt, sind eine ganze Reihe verschiedener Anwendungen von ϵ -Lactonen in der Naturstoffsynthese bekannt. Die bis heute durchgeführten Synthesewege verlaufen meist racemisch über nicht enantioselektive BAEYER-VILLIGER Oxidationen. Als Beispiele seien hier die von SCHWARZ-LINEK⁷⁹ vorgeschlagenen Synthesen des Spinnmilbenpheromons Lardolure⁸⁰ und des Schabenpheromons Supellapyron⁸¹ genannt, die von *meso*-2,4,6-Trimethylcyclohexanon als Substrat ausgehen. Von Lardolure ist bekannt, daß nur das (1R,3R,5R,7R)-Enantiomer wirksam ist⁸². Ein racemisches Präparat enthält folglich nur 6,25 % aktive Substanz!

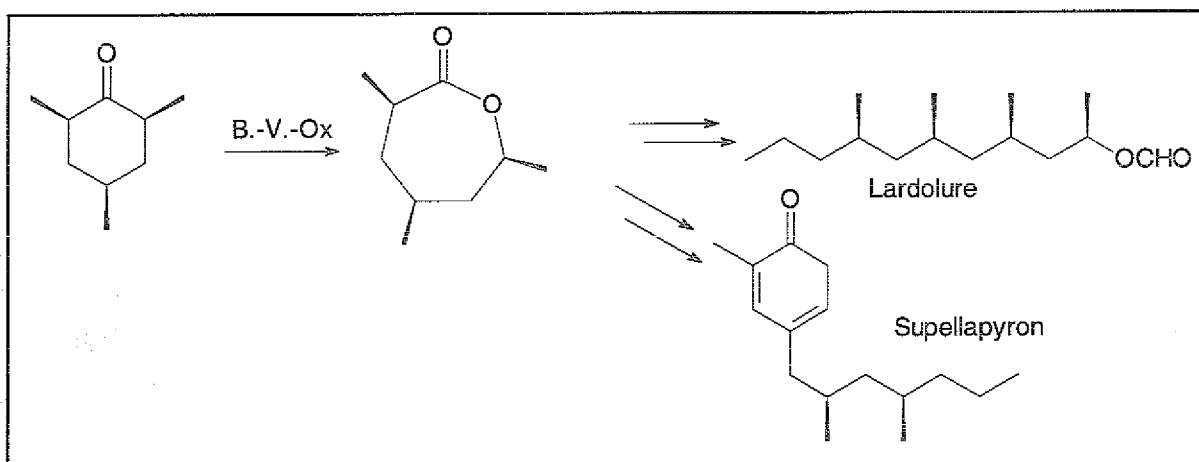


Abb. 3-15: Synthese von Lardolure und Supellapyron

⁷⁹ Schwarz-Linek (1998): Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig.

⁸⁰ Mori et al. (1986): Tetrahedron, **42**, 5539.

⁸¹ Shi et al. (1995): Tetrahedron Lett., **36**, 71.

⁸² Kuwahara et al. (1991): Appl Ent. Zool., **26**, 85.

Hier wurde ausschließlich die Anwendung des beschriebenen Reaktorkonzeptes und der Cofaktorregenerierungsstrategie auf die Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* beschrieben. Die Übertragbarkeit dieses Konzeptes auf andere Enzyme scheint jedoch problemlos möglich. Durch den diffusiven Gasaustausch könnte so, bei Verwendung von kohlendioxidfreier synthetischer Luft oder reinem Sauerstoff zur Begasung nicht nur der zur Reaktion benötigte Sauerstoff zugeführt werden, sondern im gleichen Schritt, durch den gegenläufigen Gradienten, das entstehende CO₂ aus der Reaktionslösung gestrippt werden.

3.7 Zwischenbilanz

- Die enantioselektive Lactonsynthese gelingt durch enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation mit einer NADPH-abhängigen Cyclohexanon-Monooxygenase mit molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel.
- Die Cofaktorregenerierung von NADPH wird effektiv durch eine NADP⁺-abhängige Formiatdehydrogenase und Formiat als Wasserstoffquelle durchgeführt. Dies ist die erste beschriebene Kombination eine NADPH-abhängigen Monooxygenase mit einer Formiatdehydrogenase.
- Das gasförmige Oxidationsmittel Sauerstoff wird blasenfrei mittels diffusiven Gas-transfer durch eine Silikonmembran eingebracht.
- Ein *Repetitive Batch*-Reaktor mit integrierter blasenfreier Begasung konnte mit 4-Methylcyclohexanon als Modellsubstrat über drei Läufe ohne signifikante Aktivitätsabnahme betrieben werden.
- Die Verwendung von Nanofiltrationsmembranen erlaubt die Rückhaltung des Cofaktors und so eine Steigerung seiner maximalen Zyklenzahl.
- (S)-5-Methylcaprolacton konnte extraktiv aus der Reaktionsmischung in hoher chemischer- und optischer Reinheit gewonnen werden (chemische Reinheit und ee > 99%).

4 Verfahren zur biokatalytischen asymmetrischen Ketonreduktion

4.1 Einleitung

4.1.1 Methoden der katalytischen asymmetrischen Ketonreduktion

Die enantioselektive Reduktion von Ketonen ist ein besonders interessantes Feld der organischen Chemie. Aus prochiralen Ketonen wird mit Hilfe dieser Reaktion ein neues Chiralitätszentrum gebildet. Es handelt sich also um einen Prozeß, bei dem im günstigsten Fall 100% Ausbeute erzielt werden können, im Gegensatz zu einer Racematspaltung, bei der mindestens die Hälfte des Substrates ungenutzt bleibt, soweit nicht das verbleibende Substrat racemisiert und wiederverwendet wird⁸³. Die Produkte, chirale Alkohole, finden als Synthesebausteine vielfältige Anwendung auch in industriellen Synthesen.

Über die Jahre ist eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden, mit deren Hilfe effektiv und in hoher Enantiomerenreinheit chirale Alkohole gewonnen werden können. Es werden verschiedene Chemo- oder Biokatalysatoren eingesetzt, die unterschiedliche Eigenschaften haben und verschiedene Wasserstoffquellen nutzen. Dadurch sind auch unterschiedliche Wege der Reaktionsführung notwendig. Hier seien aus dem weiten Spektrum der homogenen Chemokatalysatoren zwei Beispiele herausgegriffen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen und anschließend die gängigen biokatalytischen Verfahren genannt.

➤ Katalytische Hydrierung mit Ruthenium-DuPHOS oder -BPE-Katalysatoren⁸⁴.

Die katalytische Hydrierung nutzt die preisgünstigste verfügbare Wasserstoffquelle: Elementaren, gasförmigen Wasserstoff. Es handelt sich also um eine klassische Gas-flüssig Zweiphasenreaktion, die im allgemeinen unter erhöhtem Wasserstoffdruck im Autoklaven durchgeführt wird. Neben dem wohl bekanntesten Verfahren unter Verwendung von NOYORI⁸⁵ Ru-BINAP-Katalysatoren, die jedoch meist hohe Temperaturen und Drücke benötigen, stellen die von BURK entwickelten Katalysatoren eine wertvolle Alternative dar. Das Schema einer Reduktion von β -Ketoestern ist in Abb. 4-1 dargestellt. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Produkt (2S,5S)-Hexandiol ist

⁸³ Faber (1997): Pure Appl. Chem., 69, 1613.

⁸⁴ Burk et al. (1995): J. Am. Chem. Soc., 117, 4423.
Burk et al. (1996): Pure Appl. Chem., 68, 37.

ein wichtiger Baustein in der Synthese der Liganden für das Methylderivat dieser Katalysatoren.

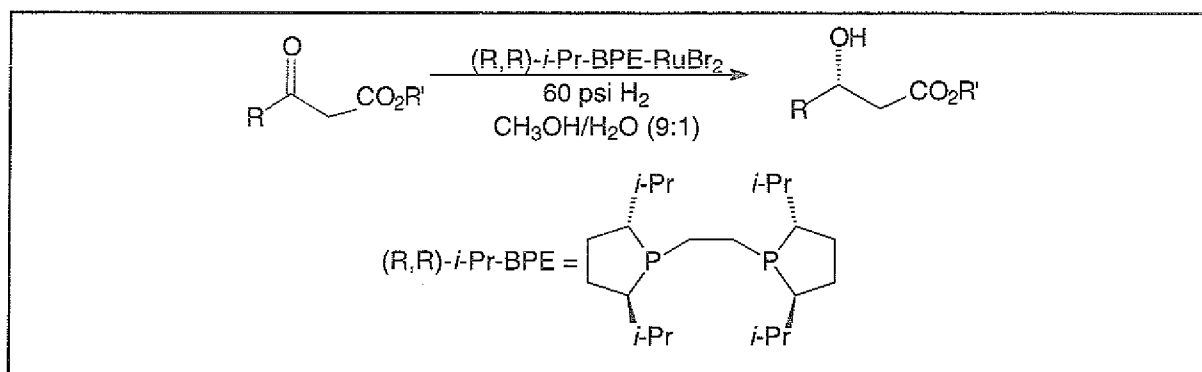


Abb. 4-1: Ketoester-Hydrierung mit Ru-BPE-Katalysator

➤ Asymmetrische Boranreduktion mit Oxazaborolidinen

Boran ist seit langem als edelmetallfreies LEWIS-saures Reduktionsmittel bekannt. Eine enantioselektive Variante dieser Reaktion wurde 1983 von ITSUNO⁸⁶ vorgeschlagen und in der Folge von COREY, BAKSHI und SHIBATA verbessert (CBS-Reduktion)⁸⁷.

Diese Reaktion erlaubt die Reduktion einer Vielzahl von Ketonen in guter Enantiodifferenzierung und wurde von GIFFELS mit einem polymervergrößerten Katalysator im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor durchgeführt⁸⁸. Sie wird in § 4.6 zu einem Verfahrensvergleich genutzt und in diesem Zusammenhang genauer beschrieben.

Biokatalytische Ketonreduktionen unterscheiden sich grundsätzlich im Einsatz ganzer Zellen oder isolierter Enzyme.

➤ Verwendung ganzer Zellen als Biokatalysator

Ganze Zellen werden zur Reduktion von Ketonen trotz der durch den komplexen Metabolismus der Zellen entstehenden Probleme und Einschränkungen häufig angewendet. Unter den verwendeten Mikroorganismen ist bis heute die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, gerade aufgrund ihrer extrem günstigen Verfügbarkeit, einer der am häufigsten verwendeten Stämme. Er wird auch im Rahmen dieser Arbeit als Vergleich zum enzymatischen Verfahren eingesetzt (§ 4.4). Bäckerhefe reduziert mit teils ausgezeichneter Enantiodifferenzierung eine Anzahl von Ketonen, Ketoestern und Diketo-

⁸⁵ Noyori (1994): *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York.

⁸⁶ Itsuno et al. (1983): J. Chem. Soc., Chem. Commun., 469.

⁸⁷ Corey et al. (1987): J. Am. Chem. Soc., 109, 5551.

Corey et al. (1992): Tetrahedron Lett., 33, 3431.

⁸⁸ Giffels (1997): Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

nen⁸⁹. Alternativen bieten ein leicht zu präparierendes Acetonpulver aus *Geotrichum candidum* (mit zugesetztem NADP⁺ und Isopropanol)⁹⁰ für (S)-Alkohole sowie der Einsatz von *Yarrowina lipolytica*⁹¹ oder *Pichia farinosa*⁹² für (R)-Alkohole. Die Verwendung ganzer Zellen ist meist ohne Zugabe von Cofaktoren und deren Regenerierung möglich. Auch die von ELI LILLY & CO berichtete Reduktion von 3,4-Methylenedioxyphenylaceton (MDA) durch *Zygosaccharomyces rouxii*⁹³, die den Anstoß zu einer Substratwahl für diese Arbeit gab (§ 4.5.2) ist unter dieser Rubrik zu fassen.

➤ Verwendung isolierter Enzyme⁹⁴

Die Verwendung isolierter Enzyme bietet eine höhere Reproduzierbarkeit und häufig bessere Selektivitäten als die Verwendung ganzer Zellen. Dem steht allerdings ein gewisser Aufwand für die Enzymisolierung und die Notwendigkeit der Cofaktorregenerierung (§ 3.1.3) gegenüber. Zu den am häufigsten eingesetzten Enzymen für die Ketonreduktion gehören vor allem die kommerziell erhältlichen aus Bäckerhefe (YADH), Pferdeleber (HLADH) oder *Thermoanaerobium brockii* (TBADH). Sie katalysieren in ihrer natürlichen Funktion NAD⁺- oder NADP⁺-abhängig (TBADH) die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd. Eine weite Vielfalt von Substraten wurde mit Hilfe dieser Enzyme reduziert, wobei gerade bei solchen Substraten, deren Struktur stark vom natürlichen Substrat abweicht, nicht immer ein guter Enantiomerenüberschuß erreicht werden konnte.

Für α -Ketosäuren stehen Lactatdehydrogenasen (LDH) für beide Enantioselektivitäten zur Verfügung, für 1,2-Diole eine Glyceroldehydrogenase (GDH).

Zur Vielfalt der in den letzten Jahren neu beschriebenen und noch nicht generell kommerziell erhältlichen Dehydrogenasen⁹⁵ für asymmetrische Ketonreduktionen gehört auch die aus *Candida parapsilosis*, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommt und in

⁸⁹ Zu Übersichten siehe: Drauz et al. (1995): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim. und Faber (1995): *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin.

⁹⁰ Nakamura et al. (1996): *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1629.

⁹¹ Fantin et al. (1996): *Tetrahedron*, **52**, 3547.

⁹² Ikeda et al. (1996): *Tetrahedron*, **52**, 8113.

⁹³ Anderson et al. (1995): *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12358.

⁹⁴ Faber (1995): *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin.

Wong et al. (1994): *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* in: Baldwin et al.: *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Elsevier Science, Oxford, **12**.

Drauz et al. (1995): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim.

Drioli et al. (1996): *Chemistry & Industry*, **19**, Carrea et al. (1995): *Enzyme Engineering* **13**, San Diego, CA, USA.

⁹⁵ Peters (1998): *Dehydrogenases - Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Applications* in: Kelly: *Biotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, **8a (Biotransformations I)**, 391.

Kap. 4.2 genauer beschrieben wird. Der Einsatz solcher Dehydrogenasen in der chemischen Synthese ist in neueren Übersichtsartikeln⁹⁶ zusammengefaßt.

Aus der Vielfalt der einsetzbaren Verfahren muß eine Auswahl getroffen werden, die sich stark nach dem umzusetzenden Substrat richten wird. Es kann also kein Patentrezept für alle möglichen Anwendungen geben, vielmehr ist die Kenntnis der Substratbreite jedes einzelnen Katalysators von großer Bedeutung.

4.2 Die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis*: Ein effektiver Biokatalysator für die enzymatische Ketonreduktion

Neben den in der Einleitung genannten allgemeiner bekannten und kommerziell verfügbaren Biokatalysatoren für die enzymatische Ketonreduktion wurden eine Reihe weiterer Enzyme nicht nur beschrieben, sondern auch präparativ eingesetzt. Zu ihnen gehören die (R)-spezifischen und NADPH-abhängigen Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir*⁹⁷ und *Lactobacillus brevis*⁹⁸ sowie (S)-spezifische und NADH-abhängige Enzyme aus *Candida boidinii* (CBADH)⁹⁹, *Rhodococcus erythropolis* (RECR)¹⁰⁰ und *Candida parapsilosis* (CPCR). Letzteres Enzym kommt im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz und soll nun näher beschrieben werden.

In einem Screening verschiedener Bakterien und Hefen auf ihre Fähigkeit, Ketosäuren und ihre Ester zu reduzieren wurden von PETERS und KULA im Jahre 1993 mehrere neue Oxidoreduktasen beschrieben¹⁰¹. Eines der aktivsten Enzyme stammt aus der Hefe *Candida parapsilosis* (Stamm: DSM 70125)¹⁰². Aufgrund der scheinbar höheren Affinität der Substrate der Reduktionsreaktion wurde es als Carbonylreduktase und nicht als Alkoholdehydrogenase bezeichnet. Das Enzym ist, wie neuere Untersuchungen¹⁰³ zeigen, ein in den Peroxysomen angesiedeltes homodimeres Protein mit einer Molmasse von etwa 78.000 g mol⁻¹. Es ist zu etwa 80 % sequenzzhomolog zu einer Alkoholdehydrogenase aus *Candida albicans*.

⁹⁶ Fang et al. (1995): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 967.

Hummel (1997): Adv. Biochem. Eng., 58, 145.

Devaux-Basseguy et al. (1997): Enzyme Microb. Technol., 20, 248.

⁹⁷ Hummel (1990): Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 15.

Hummel (1990): J. Biotechnol. Lett., 12, 403.

⁹⁸ Hummel (1997): Adv. Biochem. Eng., 58, 145.

⁹⁹ Schütte et al. (1982): Biochim. Biophys. Acta, 716, 298.

¹⁰⁰ Zelinski et al. (1994): New. J. Chem., 33, 283.

¹⁰¹ Peters et al. (1992): Appl. Biochem. Biotechnol., 38, 334.

Peters (1993): Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

Kula et al. (1996): US-Patent 5,523,223.

¹⁰² Peters et al. (1993): Enzyme Microb. Technol., 15, 950.

¹⁰³ M. Bönitz, IET der HHU Düsseldorf, unveröffentlichte Ergebnisse

Ungewöhnlich ist das breite Spektrum der Substrate, die von der *CPCR* umgesetzt werden. Wie Abb. 4-2 zeigt, werden nicht nur die zunächst untersuchten Ketosäureester umgesetzt, sondern darüber hinaus eine große Anzahl aliphatischer wie aromatischer Ketone bis hin zu Diketonen, Ketoacetalen und selbst reaktive Aldehyde.

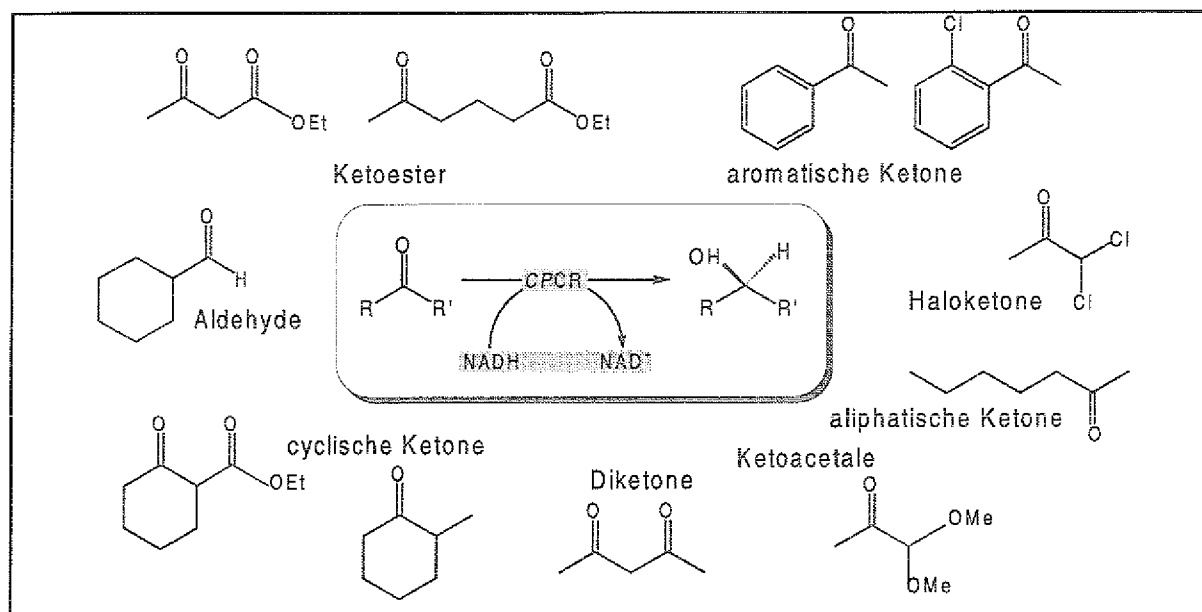


Abb. 4-2: Ausschnitt aus dem Substratspektrum der *CPCR*

Das Spektrum umfaßt bis heute an die 100 Substrate und ist wohl eher durch die Verfügbarkeit weiterer Substanzen, als die Beschränkung der Aktivität gegeben. Für eine gute Aktivität scheint ein kleiner Rest, wie Methyl an der einen Seite des zu reduzierenden Carbonyl-Kohlenstoffs eine recht wichtige Rolle zu spielen, während die Natur des anderen Restes flexibler ist. Das Enzym wurde bereits für synthetische Anwendungen eingesetzt¹⁰⁴. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym fermentiert und aufgereinigt, so daß für präparative Synthesen ausreichend Protein zur Verfügung stand.

4.2.1 Fermentation der *Candida parapsilosis*

Obwohl ein Verfahren zur Fermentation der Hefe bekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, dieses zu verbessern. Vor allem die Verbesserung der Zusammensetzung des Nährmediums, das Hefeextrakt als Komplexbestandteil und 3-Oxohexansäureethylester als Induktor enthielt, wurde untersucht. Während die Abwesenheit des Induktors für die

¹⁰⁴ Peters et al. (1993): Tetrahedron: Asymm., 4, 1683.

Peters et al. (1993): Tetrahedron: Asymm., 4, 1173.

Kragl et al. (1997): Dechema Jahrestagung der Biotechnologen, Münster.

Zelinski et al. (1997): Biocatal. Biotransform., 15, 57.

Liese et al. (1998): J. Mol. Cat. B Enzymatic, 4, 91.

Bildung der Enzymaktivität keine wesentliche Verschlechterung der Enzymausbeute zur Folge hatte, war die Suche nach einem rein synthetischen Medium wenig erfolgreich: Ein Wachstum der Zellen konnte, auch nach Zugabe aller essentiellen Aminosäuren und einer Reihe von Vitaminen sowie Spurenelementen, nur mit Hilfe von Glucose als Kohlenstoffquelle¹⁰⁵ erreicht werden, nicht jedoch mit Glycerin. Unter diesen Wachstumsbedingungen konnte nur eine minimale Enzymaktivität festgestellt werden, die die Vorteile durch den Wegfall von Hefeextrakt in keinsten Weise rechtfertigt. PETERS¹⁰⁶ berichtete ferner über erhöhte Enzymaktivitäten bei Wachstum auf Dodecansäure oder Tetradecan. Diese Erhöhungen konnten teilweise bestätigt werden, gehen jedoch mit einer teils drastischen Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit einher. Die Fermentation wurde daher nach den bestehenden Vorschriften, jedoch ohne die Zugabe von Induktor durchgeführt.

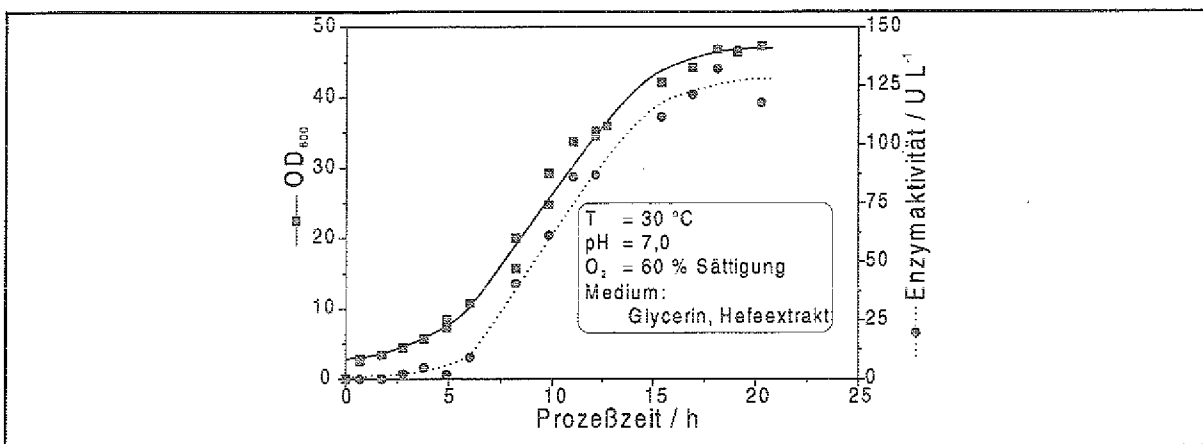


Abb. 4-3 Fermentation der *Candida parapsilosis*

In einen Maßstab von 300 L wurden insgesamt im Rahmen dieser Arbeit ca. 18 kg feuchter Zellmasse produziert, die ca. 70.000 U¹⁰⁷ CPCR enthielten. In Abb. 4-3 ist ein typischer Fermentationsverlauf dargestellt, der die wachstumsgekoppelte Enzymbildung zeigt.

Wird eine Vorkultur verwendet, die frisch aus der Stammsammlung bezogen wurde, kann sich die Fermentationszeit drastisch reduzieren und das Ende der exponentiellen Wachstumsphase und damit die maximale Enzymausbeute bereits nach 12-14 Stunden erreicht werden. Das Ende des Wachstums kann nicht nur durch Proben aus dem Fermenter bestimmt werden, sondern auch durch Verfolgen des Sauerstoffpartialdrucks p_{O_2} in der Lösung bzw. der Zuluftmenge. Sobald die Wachstumsgeschwindigkeit abnimmt, nimmt der p_{O_2}

¹⁰⁵ Guerin et al. (1989): Biochimie., 71, 887.

¹⁰⁶ Peters (1993): Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

¹⁰⁷ 1 U des Enzyms reduziert pro Minute 1 µmol einer 30 mM Lösung aus ABEE mit 0,25 mM NADH bei pH 7,0 und 25 °C.

drastisch zu bzw. bei Sauerstoffregelung die Zuluftmenge ab. Damit ist das Ende der Fermentation erreicht und die Kultur kann nach Abkühlung geerntet werden.

4.2.2 Aufarbeitung der Carbonylreduktase

Die Strategie der Aufarbeitung folgt in den wesentlichen Schritten der Literatur¹⁰⁸.

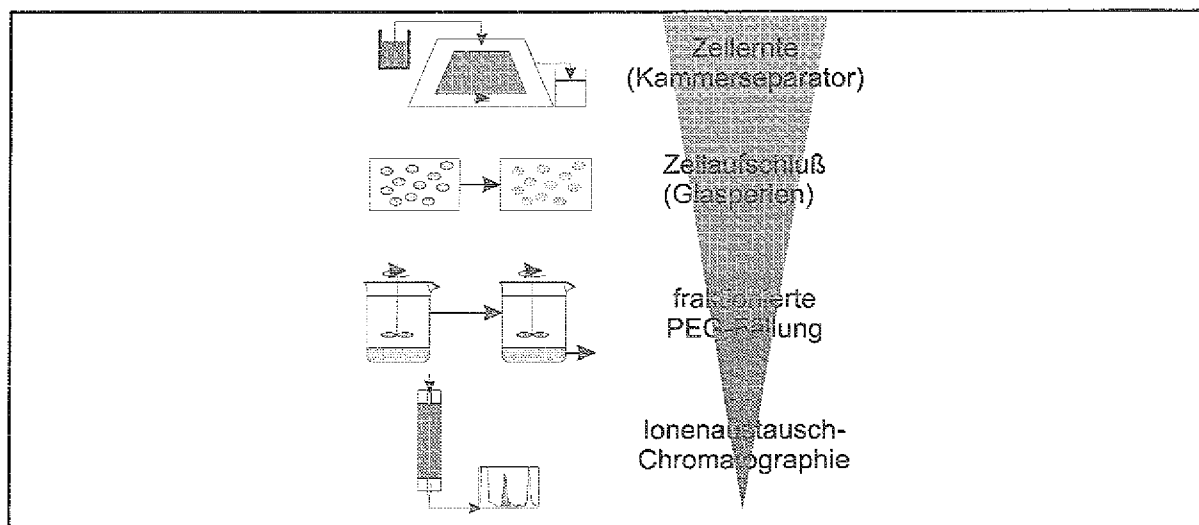


Abb. 4-4: Aufreinigung der CPR

Wie in Abb. 4-4 dargestellt, erfolgt nach der Zellernte ein Aufschluß durch Naßvermahlen mit Glasperlen. Die anschließende fraktionierte PEG-Fällung läßt im ersten Schritt neben Zelltrümmern auch einen Teil der Begleitproteine und Nukleinsäuren präzipitieren. Im zweiten Schritt wird das aktive Protein im Präzipitat erhalten und kann gefriergetrocknet werden (Abb. 4-5). Das Lyophilisat kann nahezu unbegrenzt bei -20°C gelagert werden. Die Enzymaktivität weist jedoch leider in wäßriger Lösung nur eine geringe Stabilität auf, so daß eine anschließende Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose notwendig ist, um eine ausreichende Stabilität der Proteinpräparation zu erhalten.

Das Verfahren zur chromatographischen Reinigung wurde im Vergleich zur Literatur vereinfacht. Statt des vorgesehenen linearen Salzgradienten wurde zur Elution ein Stufengradient verwendet, bei dem in der ersten Stufe Begleitprotein abgelöst wird und in der zweiten das aktive Protein. Die dritte Stufe wird zum Spülen der Säule verwendet. Dies erlaubt bei weitgehend gleichbleibender Trennleistung eine Vereinfachung des experimentellen Ablaufes gerade bei größeren Säulen. Abb. 4-6 zeigt das Elutionsprofil eines typischen Säulenlaufs.

¹⁰⁸ Peters et al. (1993): Enzyme Microb. Technol., 15, 950.

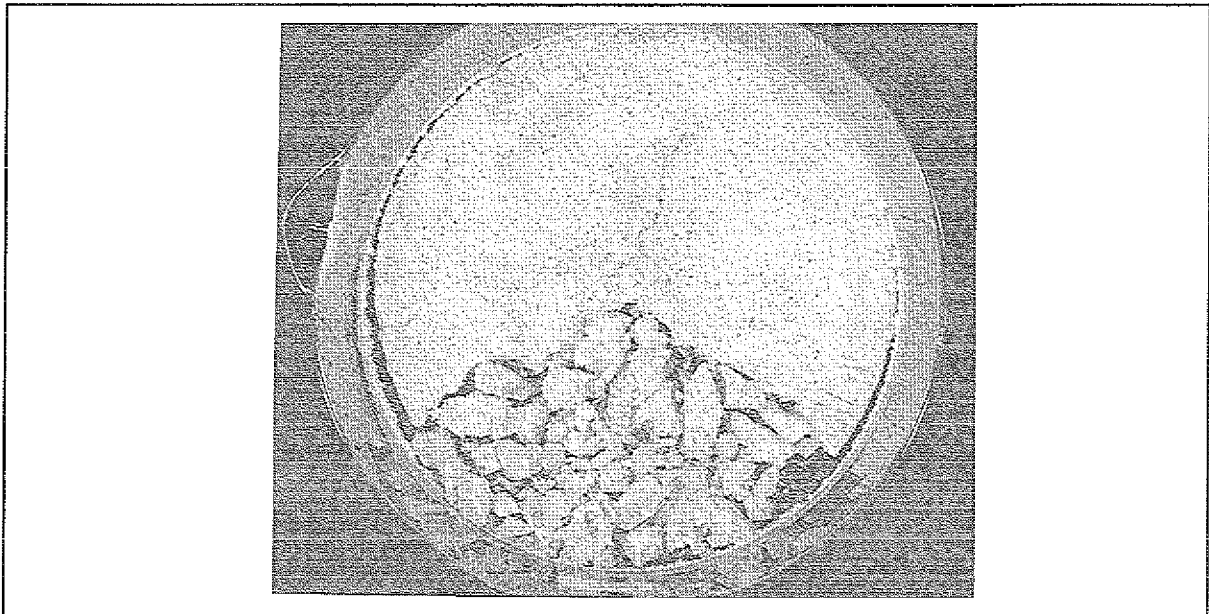


Abb. 4-5: Lyophilisat der CPCR nach der PEG-Fällung

Nach diesem Aufreinigungsschritt ist das Enzym ausreichend rein für präparative Umsetzungen. Dies ist jedoch nicht gleichzusetzen mit einer Aufreinigung bis zur Homogenität! Zur Steigerung der Stabilität des Enzyms wird dem verwendeten Puffer DTT als Antioxidans zugesetzt¹⁰⁸.

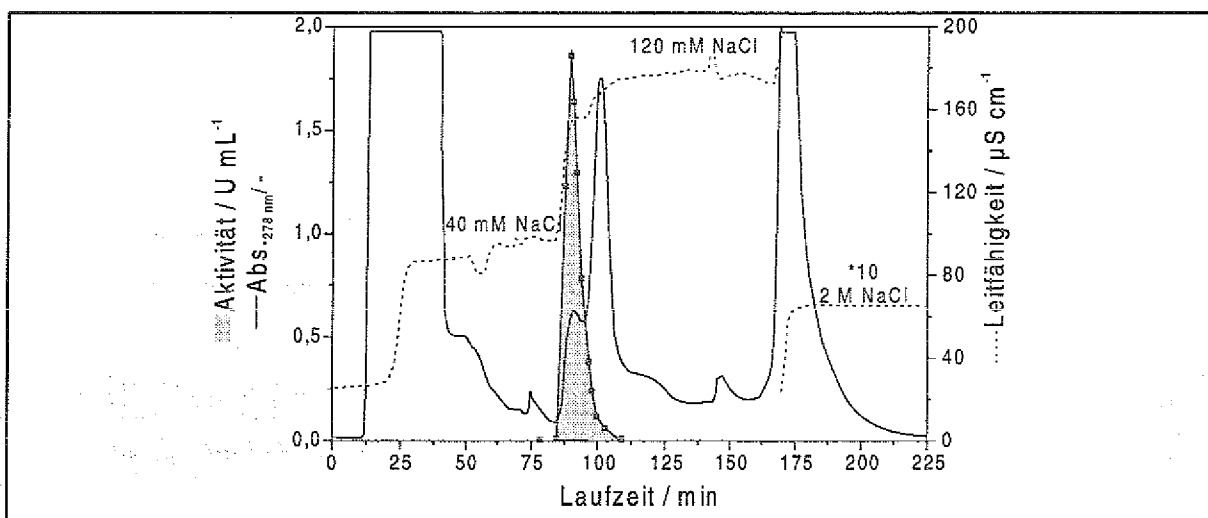


Abb. 4-6: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie

Vielmehr zeigt Tabelle 4-1, daß durch weitere chromatographische Schritte noch eine wesentliche Erhöhung der spezifischen Aktivität erreicht werden kann. Eine Affinitätschromatographie an NAD-Agarose bewirkt eine weitere enorme Aufreinigung und entfernt alle Begleitproteine bis auf eine ebenfalls NADH-abhängige Malatdehydrogenase, die in einer anschließenden Gelfiltration abgetrennt werden muß.

Schritt	spez. Aktivität U mg ⁻¹	Gesamtausbeute %	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	0,60	100	1
4% PEG-Fällung	0,71	90	1,2
30% PEG-Fällung	2,5	75	4,2
Q-Sepharose	39,9	70	66
Ultrafiltration	39,7	68	66
NAD-Agarose	1850	68	3083
Sephadex G 75	1889	65	3148

Tabelle 4-1: Aufreinigung der *CPCR*

Das reine Protein besitzt nach einer über 3000-fachen Aufreinigung eine sehr hohe spezifische Aktivität von fast 1900 U mg⁻¹, ist jedoch aufgrund der aufwendigen Reinigungsprozedur nur in geringen Mengen verfügbar.

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Ansätze und Messungen wurden Enzympräparationen verwendet, die bis zur Stufe der Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt waren. In dieser Präparation sind folglich neben dem aktiven Protein noch 98 % Fremdprotein enthalten.

4.3 Reduktion leichtlöslicher Substrate am Beispiel der Synthese von (2S,5S)-Hexandiol

4.3.1 Beschreibung des Reaktionssystems

Die Synthese von enantiomerenreinem (2S,5S)-Hexandiol wurde als Beispiel der Umsetzbarkeit leichtlöslicher Substrate mit Hilfe der *CPCR* herausgegriffen. Sowohl das Substrat 2,5-Hexandion¹⁰⁹ als auch das Produkt 2,5-Hexandiol sind in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar, so daß theoretisch eine Umsetzung bei hoher Substratkonzentration durchführbar ist. Die Regenerierung des Cofaktors, wird, wie in §3.1.3 beschrieben, mit Hilfe der *FDH* durchgeführt. Die Reaktion bietet die Herausforderung, daß in einem Molekül zwei Carbonylfunktionen zu reduzieren sind, die beide Alkoholfunktionen in der gleichen Konfiguration liefern müssen. Es handelt sich also um das klassische Beispiel einer Folgereaktion, wie das Reaktionsschema in Abb. 4-7 zeigt.

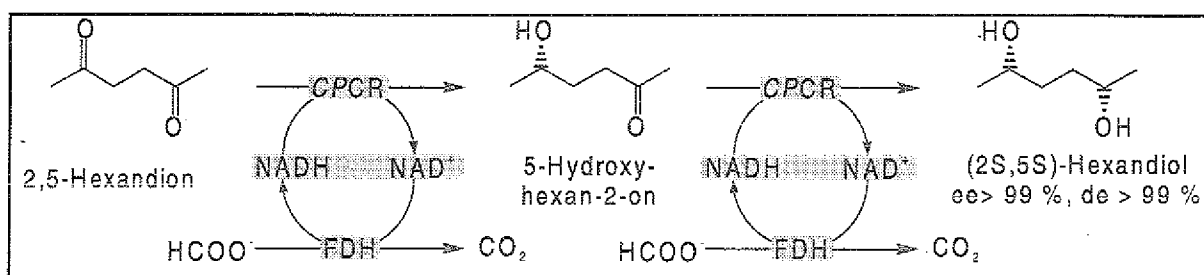


Abb. 4-7: Reaktionsschema der Reduktion von 2,5-Hexandion

Eine ausführliche kinetische und thermodynamische Beschreibung des Gesamtsystems wird einen recht weiten Raum einnehmen, bevor die eigentlichen Synthesereaktionen beschrieben werden.

4.3.2 Verwendung von enantiomerenreinem 2,5-Hexandiol

Das betrachtete Produkt (2S,5S)-Hexandiol ist der kleinste Vertreter einer Reihe chiraler C₂-symmetrischer 1,4-Diketone. Sie werden sowohl bei der Synthese chiraler Liganden für Homogenkatalysatoren (s.u.), in der sie die Träger der chiralen Information sind als auch als chirale Auxiliare¹¹⁰ eingesetzt. Meist werden sie zu Fünfringen zyklisiert. Hierfür kommen vor allem die Verbindungen mit Hauptgruppenelementen in Frage, durch die 2,5-Dimethyl-

¹⁰⁹ Auch als Acetonylacetone bezeichnet

¹¹⁰ Chen et al. (1990): *Tetrahedron Lett.*, **31**, 4467.

Chen et al. (1991): *Tetrahedron: Asymm.*, **2**, 1181.

derivate von Borolanen¹¹¹ (mit B), Nagai et al. (1994): Synlett, 289. Pyrrolidinen¹¹² (mit N), Phospholanen¹¹³ (mit P), Tetrahydrofuranen¹¹⁴ (mit O) oder Thiolanen¹¹⁵ (mit S) entstehen. Die wichtigsten Folgeprodukte des 2,5-Hexandiols sind sicher die durch BURK bei DU PONT entwickelten Liganden des DuPHOS und BPE-Typs¹¹⁶. Diese chelatisierenden zweizähligen Liganden tragen zwei Phospholan-Ringe in sich und werden vor allem mit Rhodium als Zentralatom für asymmetrische Hydrierungen eingesetzt. Diese Liganden werden heute im multi kg-Maßstab durch CHIROSCIENCE hergestellt. Die Folgechemie hin zu den genannten Liganden¹¹⁷ (Abb. 4-8) und zwei Beispiele ihrer Anwendung¹¹⁸ (Abb. 4-9) sind in den folgenden Abbildungen gezeigt.

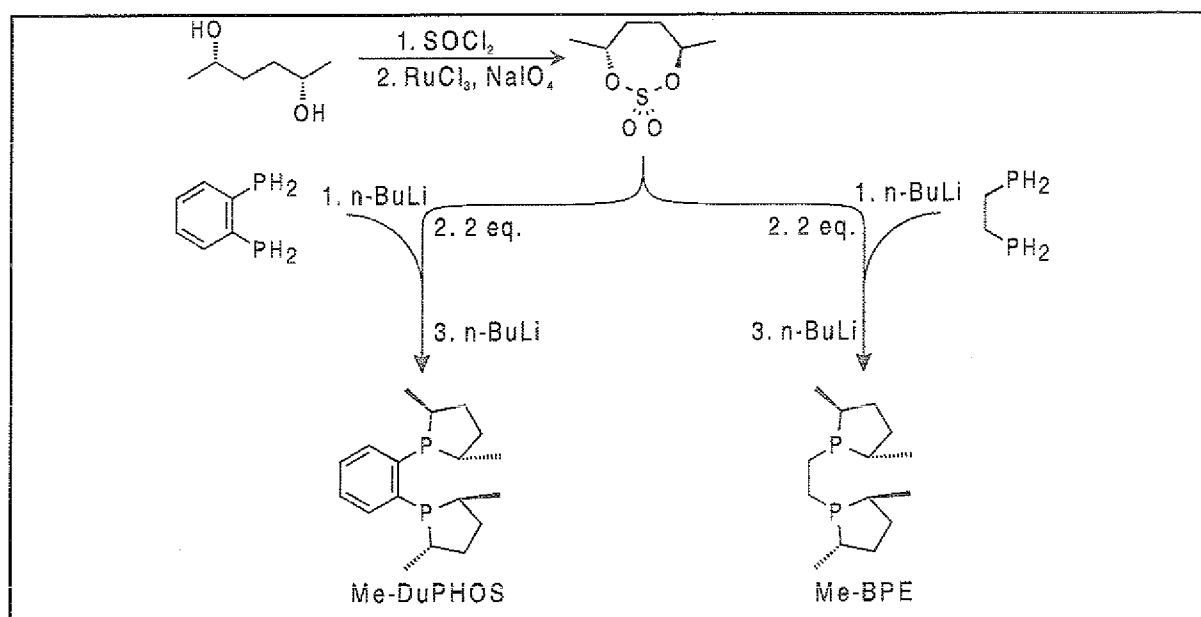


Abb. 4-8: Synthese von Me-DuPHOS und Me-BPE

Der Markt für enantiomerenreines (2S,5S)-Hexandiol bewegt sich in der Größenordnung 100-500 kg pro Jahr wobei ein Preis von etwa 10 DM pro g¹¹⁹ erzielt werden kann.

¹¹¹ Masamune (1985): US-Patent 85-807096.

¹¹² Kim et al. (1993): Synlett, 767.

Short et al. (1989): J. Org. Chem., 54, 1755.

Pichon et al. (1996): Tetrahedron: Asymm., 7, 927.

¹¹³ Burk et al. (1993): J. Am. Chem. Soc., 115, 10125.

Dierkes et al. (1998): Angew. Chem., 110, 3299.

¹¹⁴ Kim et al. (1993): J. Org. Chem., 58, 6483.

¹¹⁵ Otten et al. (1998): Tetrahedron: Asymm., 9, 189.

¹¹⁶ Burk et al. (1990): Organometallics, 9, 2653.

Burk et al. (1991): Tetrahedron: Asymm., 2, 569.

¹¹⁷ Burk (1992): US-Patent 5,171,892.

¹¹⁸ Burk et al. (1996): Pure Appl. Chem., 68, 37.

¹¹⁹ = Verkaufspreis Jülich Enzyme Products GmbH (JEP). Vergleiche dazu: Preis Aldrich (1998): 208 DM g⁻¹!

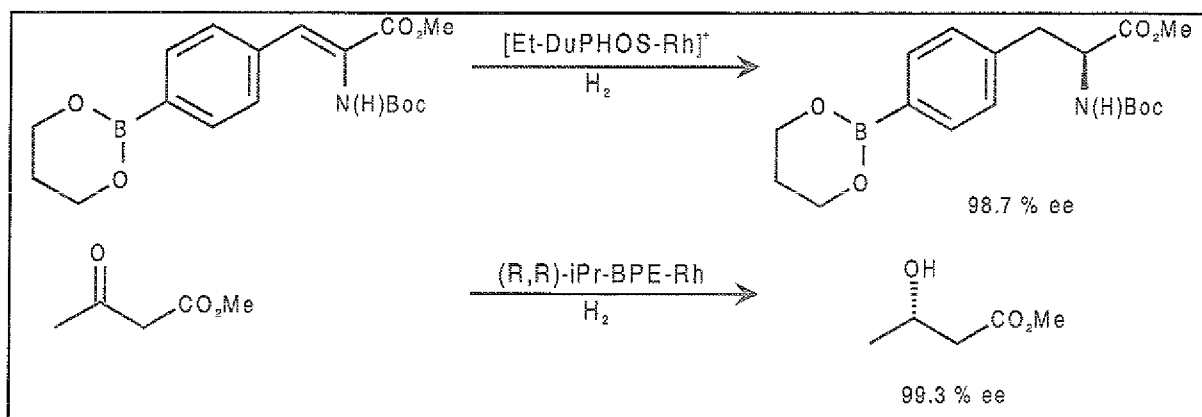


Abb. 4-9: Anwendungsbeispiele der DuPHOS- und BPE-Liganden

4.3.3 Kinetische Beschreibung und Modellierung des Reaktionssystems

4.3.3.1 Einführung

Während dem Chemiker meist eine empirische Versuchsvorschrift ausreicht, um seine Synthesen durchzuführen, die dann mit viel „Erfahrung“ optimiert werden kann, setzt der Reaktionstechniker auf einen theoretisch fundierten Ansatz. Die Basis hierfür bildet die kinetische Beschreibung des Gesamtreaktionssystems durch ein geeignetes Modell. Nach der Validierung dieses Modells sind somit fundierte Aussagen über das Reaktionsverhalten bei verschiedensten Bedingungen und über die Auswahl eines geeigneten Reaktors zu treffen.

Um das Reaktionssystem komplett erfassen zu können, sollten alle beteiligten Reaktionen bekannt sein und erfaßt werden und der Einfluß aller beteiligter Substrate auf die Aktivität der Katalysatoren bestimmt werden.

Hierfür bieten sich zwei Methoden an:

- Die Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten erlaubt es, den Einfluß einer Komponente auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Konstanz aller anderer Komponenten zu vermessen. Da alle betrachteten Reaktionen unter Bildung oder Abnahme des Cofaktors NADH ablaufen, können diese Messungen durch photometrische Messung der Konzentrationsänderung von NADH bei 340 nm durchgeführt werden.
- Die Messung von integralen Kinetiken erlaubt die Erfassung aller kinetischer Parameter mit einer Messung, indem der Umsatzverlauf von Experimenten im Satzreaktor verfolgt wird. Hier ist allerdings durch die gegenseitige Beeinflussung der Parameter eine größere Unsicherheit in der Parameterbestimmung gegeben.

Zum Ziel führte in diesem Fall eine Kombination aus beiden Verfahren, bei dem die Methode der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten dort angewandt wurde, wo immer es möglich war und die dann fehlenden Parameter, oder jene mit einem geringen Vertrauensbereich, mit Hilfe von Integralkinetiken bestimmt wurden. Für eine ausführlichere Beschreibung der genutzten Techniken sowie eine ausführliche Diskussion der kinetischen Modelle sei auf die einschlägige Literatur verwiesen¹²⁰.

4.3.3.2 Im kinetischen Modell enthaltene Reaktionen

Neben den eigentlichen bereits dargestellten Synthesereaktionen sind eine ganze Reihe weiterer Reaktionen in der kinetischen Beschreibung zu berücksichtigen, die auf Nebenaktivitäten der verwendeten Enzympräparation zurückzuführen sind. Abb. 4-10 zeigt die im Modell enthaltenen Reaktionen und ordnet ihnen die in der Folge verwendeten Kennziffern zu. Ebenfalls sind die Abkürzungen der beteiligten Stoffe erklärt.

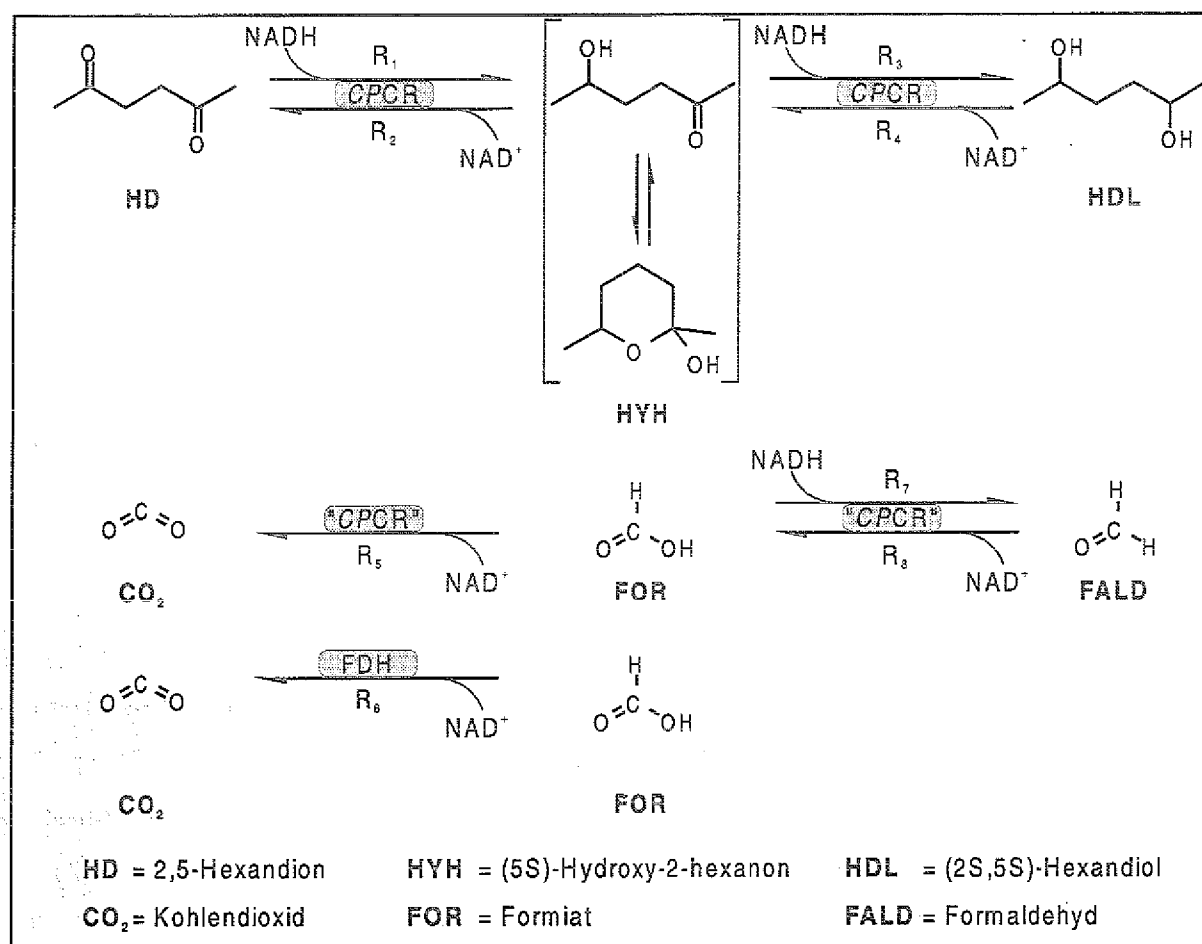


Abb. 4-10: Reaktionen, die im kinetischen Modell berücksichtigt werden

¹²⁰ Segel (1975): *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons Inc., New York.

Cornish-Bowden (1995): *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London.

Biselli et al. (1995): *Reaction Engineering for Enzyme-Catalyzed Biotransformations* in: Drauz et al.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, 1, 89.

Das Reaktionssystem besteht im einzelnen aus folgenden Reaktionen:

- Reduktion von Hexandion zu Hexandiol über Hydroxyhexanon (R_1, R_3). Dies ist die eigentlich betrachtete Synthesereaktion.
- Oxidation von Hexandiol zu Hexandion über Hydroxyhexanon unter Katalyse durch die *CPCR* (R_2, R_4). Dies ist die Rückreaktion zur Synthesereaktion. Ihr Ausmaß soll durch eine effektive Cofaktorregenerierung weitgehend unterdrückt werden.
- Nebenaktivität der *CPCR*-Präparation gegenüber Formiat. Es wird sowohl die Oxidation (R_5) als auch die Reduktion (R_7) von Formiat katalysiert. Ferner wird eine Oxidation von Formaldehyd (R_8) beobachtet. Nicht abschließend geklärt ist bis heute, ob die Aktivität von der *CPCR* selbst herrührt, oder durch eine während der Aufreinigung unzureichend abgetrennte Nebenaktivität verursacht wird.
- Die Cofaktorregenerierung wird durch die Formiatdehydrogenase durchgeführt. Sie katalysiert die Oxidation von Formiat zu CO_2 (R_6).
- Das Gleichgewicht des Hydroxyhexanons zwischen seiner offenkettigen- und Ringform wurde nicht näher untersucht. Vielmehr wurde die Konzentration des Zwischenproduktes als Summe dieser Formen gebildet.

Wie aus dem Reaktionsschema erkenntlich ist, konkurrieren verschiedene Reaktionen miteinander. Neben der Konkurrenz der verschiedenen Substrate um das aktive Zentrum der *CPCR* findet vor allem auch eine Konkurrenz von drei Reaktionen um das Formiat statt. Im Falle der Oxidation von Formiat durch die *CPCR*-Präparation unterstützt diese Reaktion die Aktion der FDH im Sinne einer Cofaktorregenerierung. Durch die Reaktion zum Formaldehyd hingegen geht Formiat der Reaktion verloren.

4.3.3.3 Erstellung eines kinetischen Modells

Nach der Identifizierung der im Reaktionssystem beteiligten Reaktionen ist die Aufstellung von kinetischen Gleichungen notwendig, die die Synthesereaktionen beschreiben. Hier ist zwischen zwei grundsätzlichen Arten von Modellen zu unterscheiden:

- Mechanistische Modelle beschreiben den exakten Mechanismus der Reaktion mit allen ihren Teilschritten in der korrekten zeitlichen Abfolge. Bei Enzymen, die zwei Substrate zur Reaktion benötigen (hier: Keton und reduzierter Cofaktor) und zwei Produkte bilden (hier: Alkohol und oxidiertes Cofaktor) –*bi-bi*-Reaktionen– kommen grundsätzlich mehrere Modelle in Frage, die sich durch Bindungsreihenfolge und Ablösungsreihenfolge der beteiligten Stoffe im aktiven Zentrum unterscheiden. Ferner ist die Bestimmtheit der

Bindungsreihenfolge von Bedeutung (*ordered bi-bi*, *random bi-bi* bzw. *ping-pong*)¹²¹. Für die *CPCR* konnte PETERS¹²² am Beispiel der Oxidation von 2-Butanol einen sequentiellen *bi-bi*-Mechanismus beweisen. Wie in Abb. 4-11 dargestellt, bindet zunächst der Cofaktor, dann der Alkohol, während das Keton vor dem Cofaktor das Enzym verläßt. Die Reaktion findet dann statt, wenn beide Substrate gleichzeitig am Enzym gebunden sind. Dieser Mechanismus wird auch für viele andere Alkoholdehydrogenasen angenommen und ist somit auch für die hier betrachtete Reduktionsreaktionen wahrscheinlich.

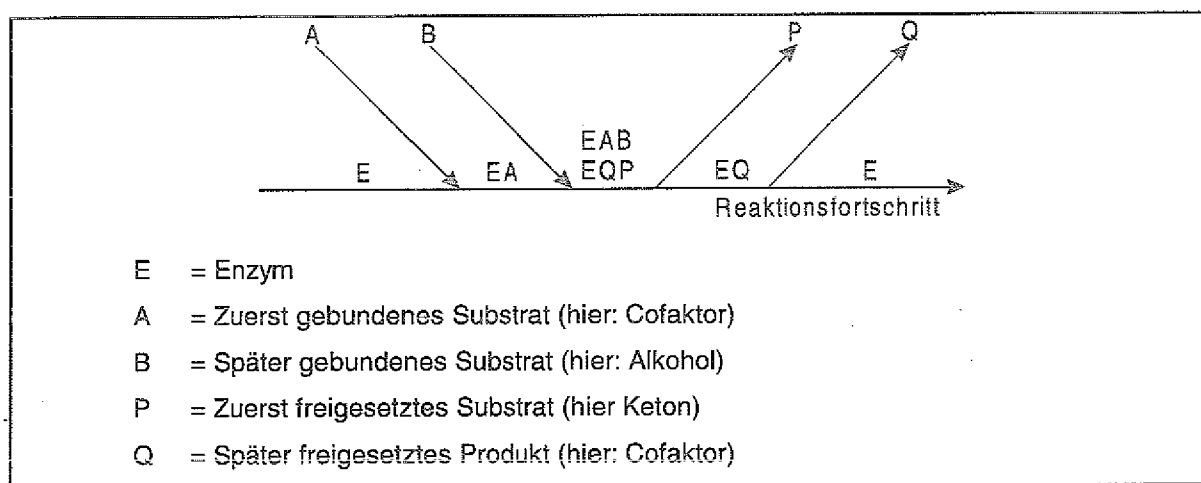


Abb. 4-11: Sequentieller *bi-bi*-Mechanismus der *CPCR*¹²³

- Formalkinetische Modelle hingegen enthalten keine Auskünfte über den Mechanismus der Reaktion, sondern sind eine multiplikative Verknüpfung von Einsubstratkinetiken nach MICHAELIS und MENTEN¹²⁴. Inhibierungen werden entsprechend eingefügt.

Ein solches Modell hat Vorteile in der praktischen Anwendung: Reale Reaktoren lassen sich häufig sehr gut mit ihm beschreiben¹²⁵, und die Parameter haben unabhängig von der Reaktionsrichtung eine anschauliche Bedeutung.

Hier kommen aufgrund der praktisch besseren Anwendbarkeit für alle Reaktionen die hier beschriebenen formalkinetischen Modelle zum Einsatz.

¹²¹ Ausführliche Diskussionen finden sich in: Cornish-Bowden (1995): *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London. und Biselli et al. (1995): *Reaction Engineering for Enzyme-Catalyzed Biotransformations* in: Drauz et al.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, 1, 89.

¹²² Peters et al. (1993): *Biocatalysis*, 8, 31.

¹²³ Nomenklatur nach Cleland (1963): *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104.

¹²⁴ Michaelis et al. (1913): *Biochem. Zeitschr.*, 49, 333.

¹²⁵ Beispiele in: Liese et al. (1996): *Dechema Jahrestagung*, Wiesbaden., Seelbach (1994): *Diplomarbeit*, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

Die angewandten Gleichungen konnten durch Einführung von entsprechenden Inhibitionen auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden. Dies ist möglich, wenn, wie BISELLI¹²⁶ gezeigt hat, für jeden Reaktionsteilnehmer die MICHAELIS-MENTEN-Konstanten der Hinreaktion gleich ihrer Inhibierungskonstante für die Rückreaktion angenommen wird. Dies ist plausibel, da für das Enzym zwischen einer Hin- und Rückreaktion kein Unterschied besteht und vielmehr nur die Bindung der jeweiligen Substrate an das Enzym betrachtet wird.

An der Reaktionsgleichung der Reaktion R_1 sei exemplarisch der Weg zu den beschriebenen Gleichungen dargestellt, um ihn dann analog auf alle anderen Gleichungen anwenden zu können:

Die Multiplikation zweier MICHAELIS-MENTEN-Terme ergibt:

$$R_1 = V_1 \cdot \frac{[HD]}{K_M^{HD} + [HD]} \cdot \frac{[NADH]}{K_M^{NADH} + [NADH]} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Die kompetitiven Inhibitionen durch die Reaktionsprodukte werden eingefügt:

$$R_1 = \frac{[HD]}{K_M^{HD} \cdot \left(1 + \frac{[HYH]}{K_M^{HYH}} + \frac{[HDL]}{K_M^{HDL}}\right) + [HD]} \cdot \frac{[NADH]}{K_M^{NADH} \cdot \left(1 + \frac{[NAD]}{K_M^{NAD}}\right) + [NADH]} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Durch Erweitern mit K_M^{HD} bzw. K_M^{NADH} :

$$R_1 = \frac{[HD]/K_M^{HD}}{K_M^{HD} \cdot \left(1 + \frac{[HYH]}{K_M^{HYH}} + \frac{[HDL]}{K_M^{HDL}}\right) + [HD]} \cdot \frac{[NADH]/K_M^{NADH}}{K_M^{NADH} \cdot \left(1 + \frac{[NAD]}{K_M^{NAD}}\right) + [NADH]} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

Bildung eines gemeinsamen Nenners A:

$$A = \frac{1}{\left(1 + \frac{[HD]}{K_M^{HD}} + \frac{[HYH]}{K_M^{HYH}} + \frac{[HDL]}{K_M^{HDL}}\right)} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[NADH]}{K_M^{NADH}} + \frac{[NAD]}{K_M^{NAD}}\right)} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

Es ergibt sich durch Einsetzen von A:

$$R_1 = V_1 \cdot A \cdot [HD]/K_M^{HD} \cdot [NADH]/K_M^{NADH} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Diese Umformung erlaubt es, für alle Reaktionen mit diesen Substraten ($R_1 - R_4$) den gleichen Inhibitionsterm zu verwenden und ausschließlich die Quotienten aus Konzentration und K_M -Wert der jeweiligen Substrate einzusetzen. Die multiplikative Verknüpfung mit der Formiatkonzentration beschreibt die beobachtete Abhängigkeit der Synthesereaktion von der Formiatkonzentration. Es ergibt sich somit für die Synthesereaktionen:

¹²⁶ Biselli (1991): Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

$$R_1 = V_1 \cdot A \cdot [\text{FOR}] \cdot [\text{HD}] / K_M^{\text{HD}} \cdot [\text{NADH}] / K_M^{\text{NADH}} \quad \text{Gleichung 4-6}$$

$$R_2 = V_2 \cdot A \cdot [\text{FOR}] \cdot [\text{HYH}] / K_M^{\text{HYH}} \cdot [\text{NAD}] / K_M^{\text{NAD}} \quad \text{Gleichung 4-7}$$

$$R_3 = V_3 \cdot A \cdot [\text{FOR}] \cdot [\text{HYH}] / K_M^{\text{HYH}} \cdot [\text{NADH}] / K_M^{\text{NADH}} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

$$R_4 = V_4 \cdot A \cdot [\text{FOR}] \cdot [\text{HDL}] / K_M^{\text{HDL}} \cdot [\text{NAD}] / K_M^{\text{NAD}} \quad \text{Gleichung 4-9}$$

$$\text{mit: } A = \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{HD}]}{K_M^{\text{HDH}}} + \frac{[\text{HYH}]}{K_M^{\text{HYH}}} + \frac{[\text{HDL}]}{K_M^{\text{HDL}}}\right)} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{NADH}]}{K_M^{\text{NADH}}} + \frac{[\text{NAD}]}{K_M^{\text{NAD}}}\right)}$$

Analoges ergibt sich für die Reaktion der *CPCR*-Präparation mit Formiat, wobei die aus diesen Reaktionen separat optimierten Parameter für NAD^+ und NADH eingesetzt werden, da nicht gesichert das gleiche Enzym für die Reaktion verantwortlich ist. Der Einfluß von Formaldehyd auf die Reaktionen, die Formiat als Substrat haben, wurde nicht in das Modell eingebracht. Es konnte hier zum einen zwischen einer Inhibierung der Reaktion und einer Desaktivierung nicht klar unterschieden werden und zum anderen kein signifikanter Einfluß auf die Simulationen festgestellt werden. Hieraus ergibt sich allerdings für R_8 ein anderer Nenner:

$$R_5 = V_5 \cdot B \cdot [\text{FOR}] / K_M^{\text{FOR}} \cdot [\text{NAD}] / K_M^{\text{NADF}} \quad \text{Gleichung 4-10}$$

$$R_7 = V_7 \cdot B \cdot [\text{FOR}] / K_M^{\text{FOR}} \cdot [\text{NADH}] / K_M^{\text{NADHF}} \quad \text{Gleichung 4-11}$$

$$\text{mit: } B = \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{FOR}]}{K_M^{\text{FOR}}}\right)} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{NADH}]}{K_M^{\text{NADHF}}} + \frac{[\text{NAD}]}{K_M^{\text{NADF}}}\right)}$$

$$R_8 = V_8 \cdot C \cdot [\text{FALD}] / K_M^{\text{FALD}} \cdot [\text{NAD}] / K_M^{\text{NADF}} \quad \text{Gleichung 4-12}$$

$$\text{mit: } C = \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{FALD}]}{K_M^{\text{FALD}}}\right)} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{NAD}]}{K_M^{\text{NADF}}}\right)}$$

Für die Regenerierungsreaktion der *FDH* wurde die klassische Form der Kinetik genutzt. Da die Reaktion nahezu irreversibel ist, ist es nicht sinnvoll einen K_M -Wert für NADH anzusetzen.

$$R_6 = V_6 \frac{[\text{FOR}]}{K_{M,\text{FDH}}^{\text{FOR}} + [\text{FOR}]} \cdot \frac{[\text{NAD}]}{K_{M,\text{FDH}}^{\text{NAD}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{NADH}]}{K_{I,\text{FDH}}^{\text{NADH}}}\right) + [\text{NAD}]} \quad \text{Gleichung 4-13}$$

Durch diesen Ansatz der Reaktionsgeschwindigkeitsgleichungen wird eine Erfassung des gesamten Reaktionssystems aus acht untersuchten Reaktionen und acht beteiligten Komponenten mit nur acht Geschwindigkeitskonstanten V (1 pro Reaktion) und 13 MICHAELIS-MENTEN-Konstanten K_M (1 pro Komponente und Enzym) erreicht. Im Vergleich zu einem Modell, das zwischen MICHAELIS-MENTEN-Konstanten und Inhibitorkonstanten unterscheidet, ist dies eine Reduktion der Parameterzahl um 13.

4.3.3.4 Ermittlung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter wurden weitgehend aus der Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (§ 4.3.3.1) hinreichend genau bestimmt. Exemplarisch seien einige Messungen sowohl für die Reduktion von Hexandion als auch für die Oxidation von Hexandiol aufgezeigt. Der komplette Datensatz mit den zugehörigen Graphen befindet sich im Anhang A.

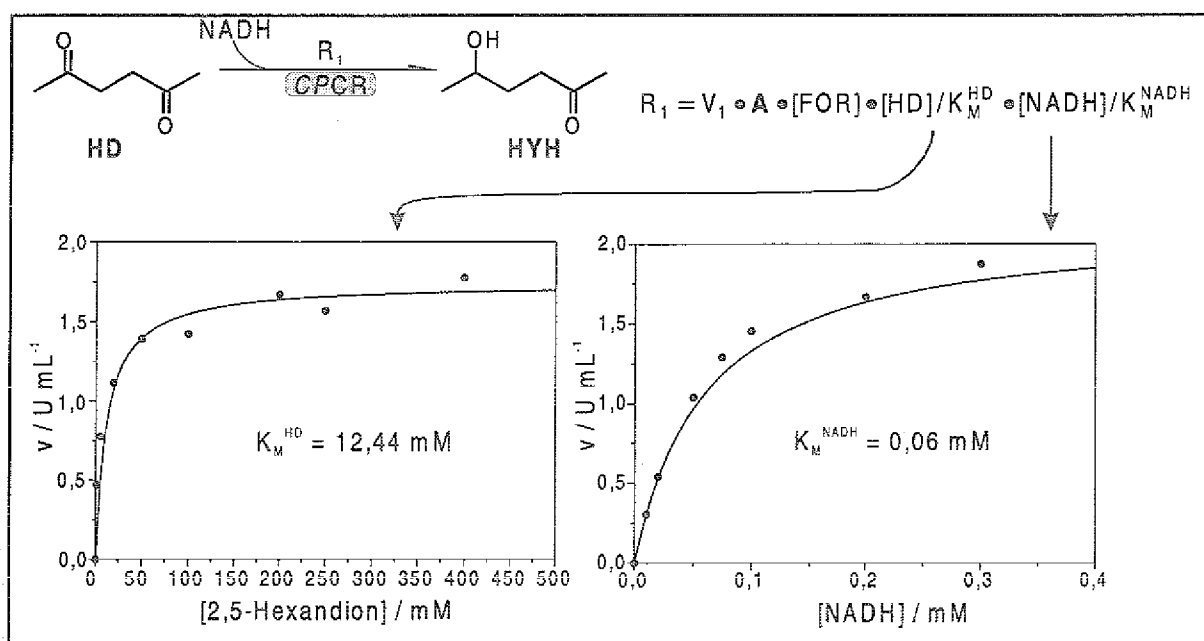


Abb. 4-12: Kinetik der Reduktionsreaktion R_1 : Bedingungen: 0,2 mM NADH bzw. 200 mM Hexandion, pH 7,0, 25 °C, 1 mM DTT

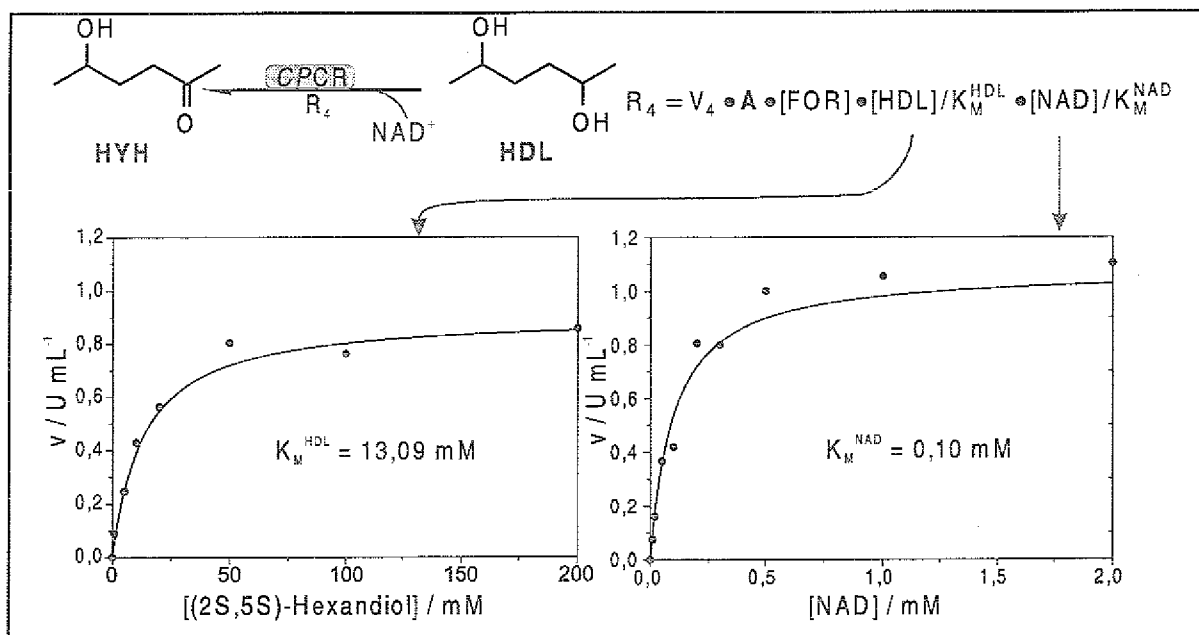


Abb. 4-13: Kinetik der Oxidationsreaktion R_4 : Bedingungen: 0,2 mM NAD^+ bzw. 50 mM (2S,5S)-Hexandiol, pH 7,0, 25 °C, 1 mM DTT

Analog hierzu konnten die Messungen für die Formiatkinetik der CPCR-Präparation durchgeführt werden. Die ausführlichen Daten zu diesen Meßreihen befinden sich ebenfalls in Anhang A.

Der K_M -Wert für das Zwischenprodukt Hydroxyhexanon konnte mit Hilfe der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten nicht befriedigend bestimmt werden. Das ist darauf zurückzuführen, daß sich im isolierten Produkt das Gleichgewicht zwischen der offenkettigen und Ringform des Hydroxyhexanons deutlich anders ausbildet als während der Durchführung der enzymatischen Reaktion. Daher wurden zur Bestimmung dieses Parameters Integralkinetiken gemessen. Durch das Konstanthalten aller anderen Parameter wurde der fehlende Wert ermittelt. Die betrachteten Ansätze wurden sowohl als Reduktion als auch als Oxidation unter Zusatz stöchiometrischer Mengen Cofaktor durchgeführt. Durch die Abwesenheit von Formiat und FDH konnte so das Reaktionsschema auf die Reaktionen R_1 bis R_4 beschränkt werden. Aus beiden Ansätzen konnten nahezu gleiche K_M -Werte für das Zwischenprodukt bestimmt werden. In Abb. 4-14 sind besonders bei der Oxidationsreaktion zum Ende der Laufzeit Differenzen zwischen den berechneten und gemessenen Kurven festzustellen. Dies liegt vor allem an der Änderung des pH-Wertes während der Reaktion durch die Bildung von CO_2 . Hierdurch verringert sich die Aktivität des Enzyms. Für die kinetische Modellierung haben diese Abweichungen allerdings nur eine geringe Bedeutung, da die Hauptinformation im ersten Teil der Kurve enthalten ist.

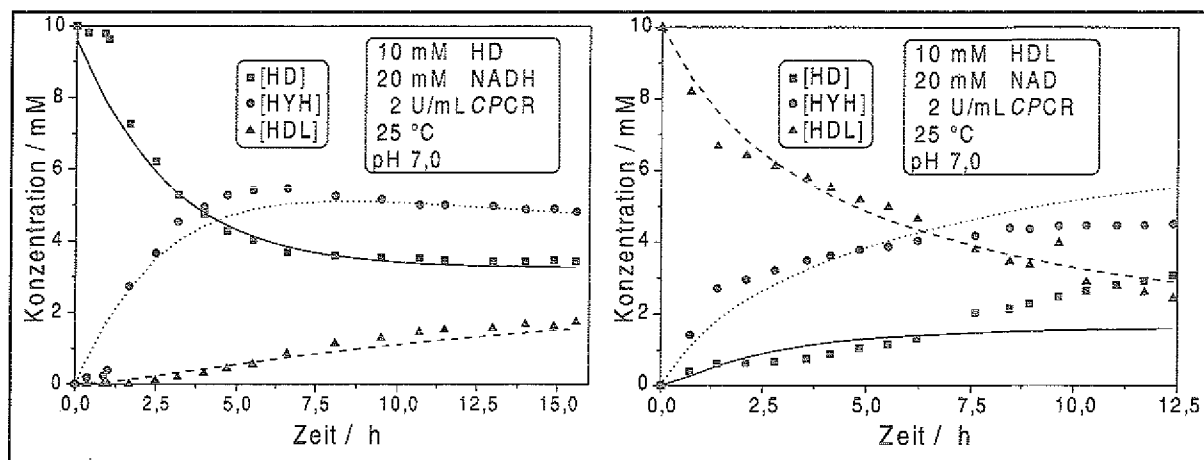


Abb. 4-14: Integralkinetik zur Bestimmung des K_M -Wertes von Hydroxyhexanon

Somit sind für die Reaktionen der CPCR alle Parameter bestimmt. Sie sind in Tabelle 4-2 zusammen mit ihren Standardabweichungen zusammengefasst.

Parameter	Wert	Standardabweichung	
K_M^{HD}	12,44 mM	$\pm 40,6 \%$	
$K_M^{HYH \ddagger}$	18,57 mM	$\pm 12,7 \%$	
K_M^{HDL}	13,09 mM	$\pm 30,9 \%$	
K_M^{NAD}	0,10 mM	$\pm 15,8 \%$	
K_M^{NADH}	0,06 mM	$\pm 15,6 \%$	
K_M^{NADF}	0,03 mM	$\pm 31,0 \%$	
K_M^{NADHF}	0,01 mM	$\pm 61,2 \%$	
K_M^{FOR}	59,65 mM	$\pm 16,1 \%$	
K_M^{FALD}	0,98 mM	$\pm 61,4 \%$	
$V_1 \ddagger$	20,5 U mg ⁻¹	$\pm 7,8 \%$	(= 100 %)
$V_2 \ddagger$	30,2 U mg ⁻¹	$\pm 18,5 \%$	(= 147 %)
$V_3 \ddagger$	2,5 U mg ⁻¹	$\pm 19,0 \%$	(= 12 %)
$V_4 \ddagger$	13,1 U mg ⁻¹	$\pm 7,9 \%$	(= 64 %)
$V_5 \ddagger$	1,0 U mg ⁻¹	$\pm 3,3 \%$	(= 5 %)
$V_7 \ddagger$	1,2 U mg ⁻¹	$\pm 5,7 \%$	(= 6 %)
$V_8 \ddagger$	1,0 U mg ⁻¹	$\pm 6,6 \%$	(= 5 %)

Tabelle 4-2: Parameter der CPCR-katalysierten Reaktionen (0,11 mg mL⁻¹)

†: Bestimmt aus Integralkinetik als Mittelwert der Messung für Reduktion und Oxidation

‡: Angegeben auch als relative Aktivität gegenüber V_1 (= 100 %). Die Umrechnung auf die effektive Enzymkonzentration in U mL⁻¹ Reaktorvolumen ergibt sich dann durch Multiplikation mit der Enzymkonzentration in der Stoffbilanz.

4.3.3.5 Kinetik der Formiatdehydrogenase

Neben den Reaktionen, die durch die *CPCR*-Präparation katalysiert werden nimmt das Regenerierenzym *FDH* einen wichtigen Platz ein. Die Kinetik der Reaktion wurden unter Reaktionsbedingungen bestimmt. Die Meßwerte wurden an die in §4.3.3.3 genannte Gleichung für R_6 durch nichtlineare Regression angepaßt. Die aus der Anpassung erhaltenen Werte sind in Tabelle 4-3 zusammengefaßt. Der vollständige Datensatz und alle Graphen der Messung befinden sich ebenfalls in Anhang A.

Parameter	Wert	Standardabweichung
$K_{M,FDH}^{FOR}$	11,2 mM	$\pm 8,5 \%$
$K_{M,FDH}^{NAD}$	34,4 μ M	$\pm 8,1 \%$
$K_{I,FDH}^{NADH}$	12,0 μ M	$\pm 10,6 \%$
V_6	1,95 U mg^{-1}	$\pm 1,5 \%$

Tabelle 4-3: Kinetische Parameter der *FDH* (24,8 $mg\ mL^{-1}$)

4.3.3.6 Aufstellung der Stoffbilanzen für die Synthese in Satzreaktor und EMR

Die Simulation von Versuchen im Satzreaktor (STR)¹²⁷ und im EMR als kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR)¹²⁸ werden zu zwei Zwecken durchgeführt:

- Die Gültigkeit des aufgestellten kinetischen Modells wird anhand von Satzreaktorversuchen überprüft. Zur Validierung des Modells ist eine möglichst große Übereinstimmung des experimentellen Umsatz-Zeit-Verlaufes mit dem berechneten Verlauf wichtig.
- Durch die Anwendung von Simulationen lassen sich optimale Reaktionsansätze vorausberechnen. Es ist somit möglich, das experimentelle „Probieren“ auf eine modellgestützte Grundlage zu verlagern und somit unnötige Experimente einzusparen. Dies befreit jedoch nicht davon, die optimierten Reaktionsbedingungen experimentell zu verifizieren.

Zur Simulation der Versuche ist es notwendig, für den gegebenen Reaktortyp Stoffbilanzen für alle an der Reaktion beteiligten Komponenten zu erstellen. Dies sind Differentialgleichungen, die die zeitliche Änderung der Konzentrationen der Komponenten im Reaktionsraum beschreiben.

In ihrer allgemeinsten Form kann eine solche Stoffbilanz wie folgt angesetzt werden:

¹²⁷ STR für engl. stirred tank reactor

¹²⁸ CSTR für engl. continuously operated stirred tank reactor

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} + \text{Diffusion} \quad \text{Gleichung 4-14}$$

mit: Akkumulation = Konzentrationsänderung der betrachteten Komponente im Volumenelement in der Zeiteinheit

Konvektion = Konzentrationsänderung der Komponente durch Strömung in den Reaktor hinein oder aus dem Reaktor heraus

Reaktion = Konzentrationsänderung durch chemische Reaktion im Reaktor

Diffusion = Konzentrationsänderung der Komponente durch Diffusion im Reaktor

Für die beiden hier betrachteten Reaktoren können in dieser allgemeinen Form folgende Vereinfachungen eingebracht werden:

➤ Satzreaktor:

1. Konvektion = 0: Der Satzreaktor wird vor Beginn der Reaktion einmalig befüllt. Während der Reaktion tritt kein Austausch von Masse mit der Umgebung ein.
2. Diffusion = 0: Der Satzreaktor wird als ideal durchmischter Reaktor angenommen. Daher ist die Konzentration jeder Komponente in jedem Volumenelement des Reaktors zu gegebener Zeit gleich. Eine Diffusion, die der Ausgleich von Konzentrationsunterschieden zwischen den Volumenelementen ist, findet folglich nicht statt.

➤ Kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR)

1. Akkumulation = 0: Befindet sich ein CSTR im stationären Zustand, findet keine zeitliche Änderung der Konzentrationen der Komponenten im Reaktorraum statt.
2. Diffusion = 0: Auch der CSTR wird als ideal durchmischter Reaktor angenommen.

Die Gleichungen vereinfachen sich für die beiden betrachteten Reaktoren zu:

STR:

$$\text{Akkumulation} = 0 \quad + \quad \text{Reaktion} \quad + 0 \quad \text{Gleichung 4-15}$$

$$-\frac{d[X]}{dt} = 0 \quad + \quad \sum R_i \quad + 0 \quad \text{Gleichung 4-16}$$

CSTR:

$$0 = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} + 0 \quad \text{Gleichung 4-17}$$

$$0 = \frac{[X]_0 - [X]}{\tau} + \sum R_i + 0 \quad \text{Gleichung 4-18}$$

mit: R_i = Konzentrationsänderung der Komponente X durch Reaktion i

$[X]$ = Konzentration der Komponente X im Reaktor [mM]

$[X]_0$ = Konzentration der Komponente X im Zulauf [mM]

τ = Verweilzeit der Komponente X im Reaktor [min]

Die im Reaktionsterm aufgeführte Summierung der Reaktionen kann im betrachteten Reaktionssystem (Abb. 4-7) für die an der Reaktion beteiligten Komponenten wie folgt angeschrieben werden¹²⁹:

2,5-Hexandion (HD):

$$\sum R_i^{\text{HD}} = A(\text{CPCR}) \cdot (-R_1 + R_2) \quad \text{Gleichung 4-19}$$

5-Hydroxyhexan-2-on (HYH):

$$\sum R_i^{\text{HYH}} = A(\text{CPCR}) \cdot (R_1 - R_2 - R_3 + R_4) \quad \text{Gleichung 4-20}$$

2,5-Hexandiol (HDL):

$$\sum R_i^{\text{HDL}} = A(\text{CPCR}) \cdot (R_3 - R_4) \quad \text{Gleichung 4-21}$$

Formiat (FOR):

$$\sum R_i^{\text{FOR}} = A(\text{CPCR}) \cdot (-R_5 - R_7 + R_8) + [\text{FDH}] \cdot (-R_6) \quad \text{Gleichung 4-22}$$

Formaldehyd (FALD):

$$\sum R_i^{\text{FALD}} = A(\text{CPCR}) \cdot (R_7 - R_8) \quad \text{Gleichung 4-23}$$

NADH:

$$\sum R_i^{\text{NADH}} = A(\text{CPCR}) \cdot (-R_1 + R_2 - R_3 + R_4 + R_5 - R_7 + R_8) + A(\text{FDH}) \cdot R_6 \quad \text{Gleichung 4-24}$$

NAD⁺:

$$\sum R_i^{\text{NAD}^+} = A(\text{CPCR}) \cdot (R_1 - R_2 + R_3 - R_4 - R_5 + R_7 - R_8) + A(\text{FDH}) \cdot (-R_6) \quad \text{Gleichung 4-25}$$

mit: $A(\text{CPCR})$ = Aktivität der CPCR-Präparation

[U mL⁻¹ Reaktorvolumen]

$A(\text{FDH})$ = Aktivität der FDH

[U mL⁻¹ Reaktorvolumen]

4.3.4 Synthesereaktionen

Die Synthese von (2S,5S)-Hexandiol wurde sowohl im Satzreaktor als auch im kontinuierlich betriebenen Enzymmembranreaktor durchgeführt. Hier seien ausgewählte Experimente dargestellt, die zum einen der Verifizierung der kinetischen Messungen dienen sollen, zum anderen aber auch die Synthese von Hexandiol im g-Maßstab erlaubten. Es sollen Chancen und Limitierungen der Verfahren aufgezeigt werden.

4.3.4.1 Synthesen im Satzreaktor

Im Rahmen der kinetischen Messungen wurden eine Vielzahl von Satzreaktorversuchen durchgeführt, die hier nicht einzeln ausgeführt werden können. Vielmehr sollen exemplarisch zwei Versuche beschrieben und mit ihrer Simulation dargestellt werden, die das kinetische Verhalten deutlich beschreiben.

¹²⁹ Vorzeichenkonvention: Die Abnahme der Konzentration wird negativ, die Zunahme der Konzentration wird positiv angeschrieben.

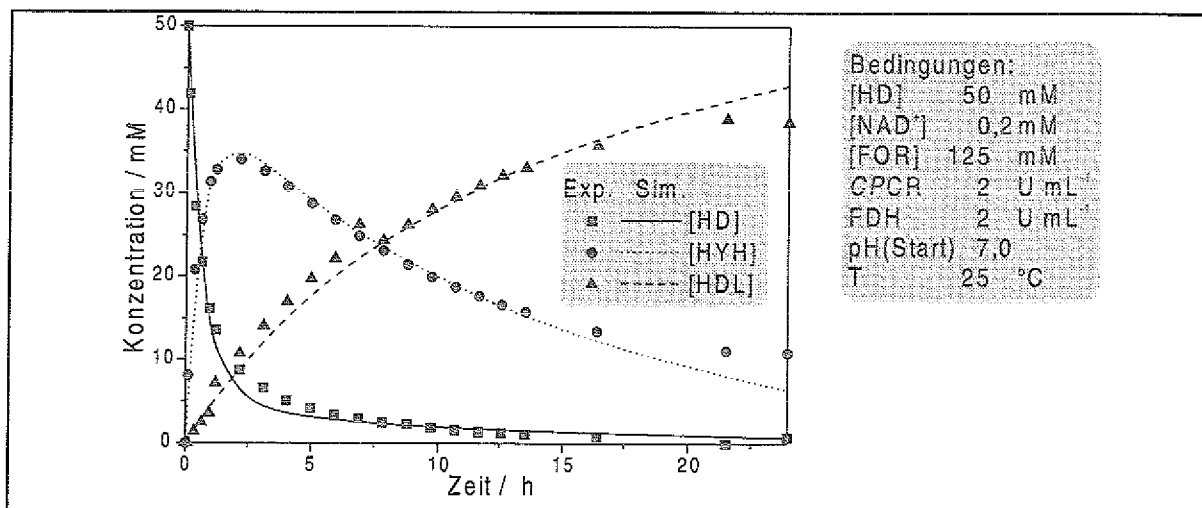


Abb. 4-15: Satzreaktorversuch zur enzymatischen Reduktion von Hexandion

Die in Abb. 4-15 gezeigte Umsatz-Zeit-Kurve des Satzreaktorversuchs zeigt das erwartete Bild einer Folgereaktion, deren erster Schritt sehr viel schneller abläuft als der zweite. Das Substrat Hexandion nimmt schnell ab und ist bereits nach 3 h zu über 90 % umgesetzt. Hingegen akkumuliert das Zwischenprodukt Hydroxyhexanon, so daß dieses einen Anteil von max. 70 % der Reaktionsteilnehmer ausmacht. Der zweite Reaktionsschritt von Hydroxyhexanon zu Hexandiol ist hingegen geschwindigkeitsbestimmend und somit werden selbst bei höheren Enzymkonzentrationen lange Reaktionszeiten notwendig. Am Ende der Reaktion wird ein Gleichgewicht erreicht, das durch das Modell nur teilweise korrekt erfaßt wird. Ursache hierfür ist, daß der pH-Wert der Reaktion durch das Entstehen von CO_2 verändert wurde. Bei einer Substratkonzentration von 50 mM entstehen bei vollem Umsatz 100 mM CO_2 , zu deren Pufferung der verwendete 100 mM Puffer nicht vollständig in der Lage ist. Es wird folglich ein Anstieg des pH-Wertes auf bis zu 8,6 beobachtet, ein Wert, bei dem vor allem die CPCR einen Großteil ihrer Aktivität verloren hat, hingegen die Oxidationsreaktion verstärkt katalysiert wird.

Um die Aktivitätsabnahme durch pH-Änderung zu vermeiden, wurde eine pH-Statisierung der Reaktion eingeführt. Der Ansatz wird kontinuierlich mit Salzsäure auf den gewünschten Wert rücktitriert und somit durch Konstanz des pH-Wertes das oben beschriebene Problem vermindert. Der Umsatzgraph eines pH-statisierten Versuches ist in Abb. 4-16 gezeigt. Hier wird auch der spätere Teil der Umsetzung recht gut vom Modell beschrieben. Die Korrelationen zwischen Meßwerten und Modell liegen bei [HD] und [HYH] über 96 % und bei der entscheidenden [HDL] sogar bei 98,8 %. Es ist also von einer recht guten Anpassung zu sprechen. Auch bei der pH-kontrollierten Reaktionsführung wird kein vollständiger Umsatz erreicht. Dies ist auf die infolge der Reduktion zu Formaldehyd abnehmende Formiatkon-

zentration und die damit einhergehende Enzymdesaktivierung durch Formaldehyd zurückzuführen. Diese Reaktion tritt besonders dann auf, wenn die Synthesereaktion sehr langsam wird. Eine Simulation der Gleichgewichtszustände ist in der Diskussion (§ 4.3.5) zu finden.

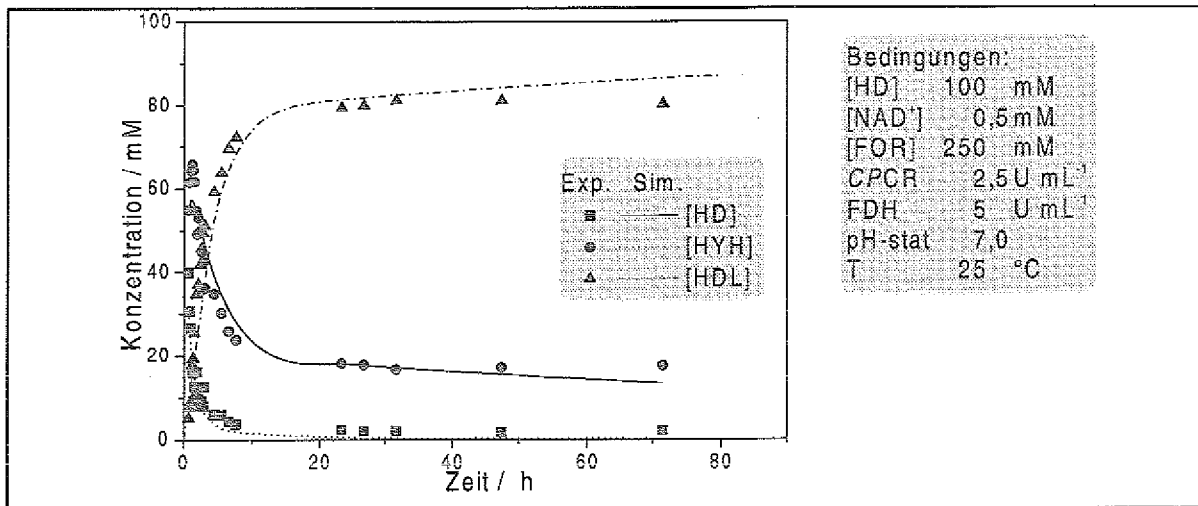


Abb. 4-16: pH-statisierter Satzreaktorversuch

4.3.4.2 Synthesereaktion im EMR

Die Synthese im kontinuierlich betriebenen Enzymmembranreaktor bietet gegenüber der Satzreaktorreaktion eine bessere Ausnutzung der Enzyme. Durch den kontinuierlichen Austausch der Substrate können so höhere Zyklenzahlen für die wertvollen Biokatalysatoren erreicht werden. Es wurde daher auch in diesem Fall versucht, eine kontinuierliche Reaktionsführung durchzuführen. Hierbei werden die kinetischen und bereits im Satzreaktor beobachteten Limitierungen deutlich: Durch die langsame zweite Stufe der Reaktion akkumuliert sich im Reaktionsgemisch das Zwischenprodukt. Während es im Satzreaktor über die Reaktionszeit, wenn auch langsam, weiter umgesetzt wird, wird es im EMR kontinuierlich ausgespült. Daher können unter vertretbarem Enzymeinsatz keine sehr hohen Ausbeuten an HDL erreicht werden. Es gelingt jedoch über längere Zeit, den Umsatz der Reaktion bei einer Verweilzeit von 1 h auf ca. 80 % zu halten. Dieser Umsatz kann auch nach dem Anfahren verschiedener Betriebspunkte, wie dies in Abb. 4-17 dargestellt ist, wieder erreicht werden. Abb. 4-17 unten zeigt die entsprechende Auftragung von Umsatz und Ausbeute gegen das Produkt aus Enzymkonzentration und Verweilzeit. Die Ausbeute liegt in diesem Fall nur bei knapp 50 %. Dies führt dazu, daß in diesem Fall die Hälfte an Substrat ungenutzt bliebe. Dieser Anteil kann zwar durch eine Erhöhung der Formiatkonzentration, die hier nur stöchiometrisch angesetzt wurde, noch verkleinert werden. Um eine hohe Ausbeute zu erreichen, muß die Enzymkonzentration jedoch bis zu nicht realistischen Zahlen

erhöht werden. Dies ist in der Verfahrensdiskussion (§ 4.3.5) modelliert und wird dort mit dem Satzreaktor verglichen.

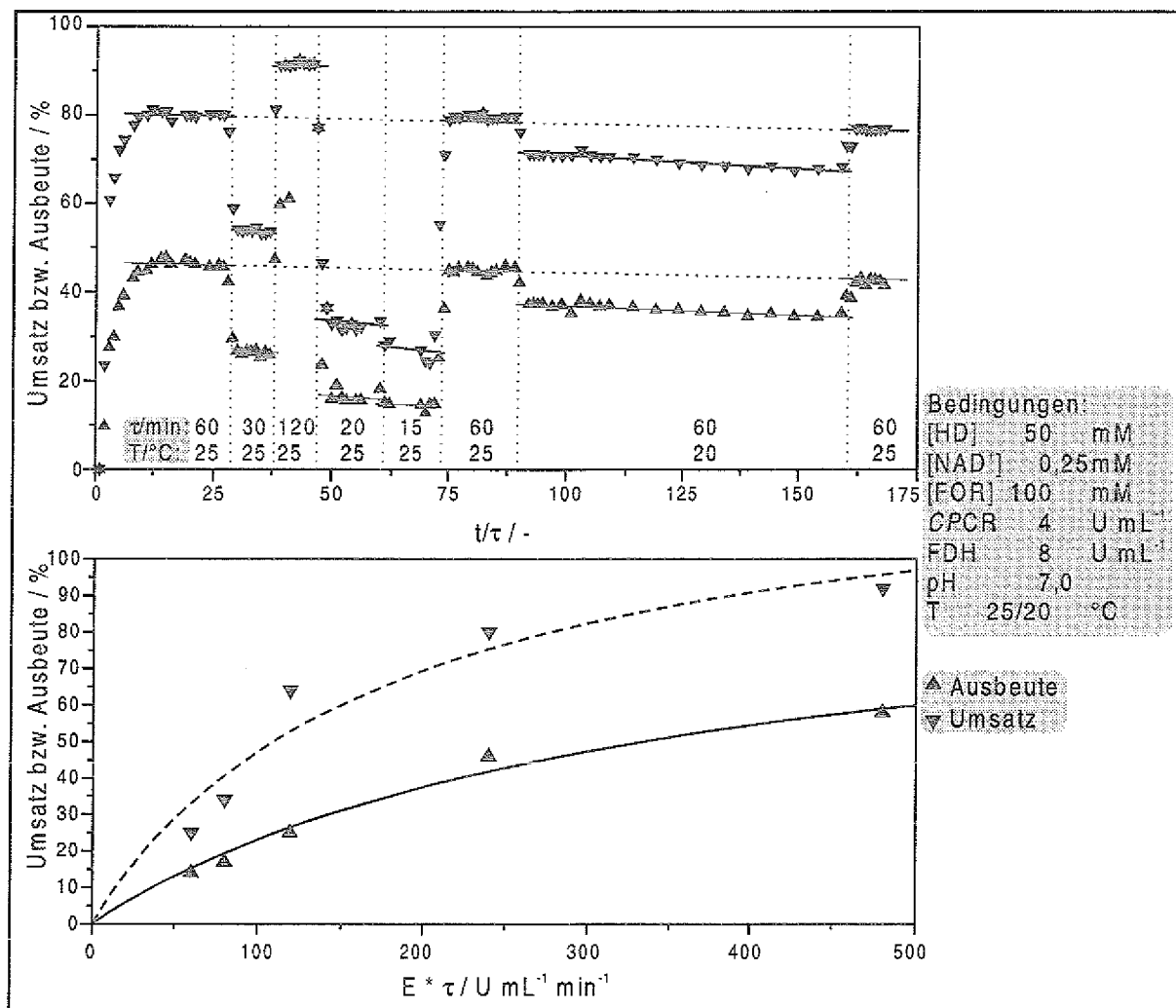


Abb. 4-17: Reduktion von Hexandion im EMR

Die Synthese von (2S,5S)-Hexandiol im Zweienzymsystem von CPCR und FDH konnte mit den beschriebenen Methoden im 10 g Maßstab durchgeführt werden. Da nur ein Stereoisomer des Diols gaschromatographisch nachgewiesen werden konnte, können sowohl Enantiomerenüberschuß als auch Diastereomerenüberschuß mit > 99,8 % angegeben werden.

4.3.5 Diskussion der enzymatischen Reaktion

In diesem Abschnitt wird das kinetische Verhalten und die verfahrenstechnischen Alternativen zur Synthese von enantiomerenreinem Hexandiol durch die enzymatische Reduktion diskutiert. Besonderer Wert wird auf folgende Punkte gelegt:

- Welche Schlüsse läßt die Kinetik der Synthesereaktion auf die Reaktionsführung zu?

- Welchen Einfluß haben die Eigenschaften des Reaktionssystems auf die Reaktionsführung?
- Welchen Einfluß hat die Formiat-Konzentration auf Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität?
- Welcher Reaktor ist für diese Umsetzung geeignet?
- Ist eine Maßstabsvergrößerung mit diesem Reaktionssystem denkbar?
- Welche Verfahrensalternativen sind möglich?
- Gibt es eine Möglichkeit auch das (2R,5R)-Produkt enzymatisch herzustellen?

Die kinetische Beschreibung des Reaktionssystems zeigt deutlich das Problem der Folge-reaktion auf, die durchlaufen werden muß, um das gewünschte Zielprodukt zu erhalten. Hier ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß die kinetischen Messungen eindeutig zeigen konnten, daß die geringe maximale Reaktionsgeschwindigkeit des zweiten Schrittes die ausschlaggebende Bedeutung auf die Reaktion hat und nicht die Inhibierung des ersten Schrittes durch das Zwischenprodukt. Ausgedrückt in kinetischen Konstanten heißt dies: kleines $V_{\max}$ des Zwischenproduktes und nicht kleiner K_M des Diols. Diese Limitierung führt dazu, daß die Reaktion nicht durch ein Zudosieren von Substraten oder kontinuierliches Entfernen von Produkten beschleunigt werden kann. Die Akkumulation des Zwischenproduktes in der Reaktionslösung führt gleichzeitig zum Auftreten des Gleichgewichtes zwischen offenkettiger Form und zyklischem Halbacetal des Hydroxyhexanons, das nicht näher untersucht wurde. Jedoch beeinflußt es mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit die zweite Stufe der Reduktion.

Die Komplexität des Reaktionssystems, namentlich Nebenreaktion mit Formiat sowohl in oxidativer wie auch in reduktiver Reaktionsrichtung, macht eine Modellierung des Reaktionssystems aufwendig. Jedoch konnte deutlich gezeigt werden, daß eine Simulation der Experimente gelingt. Somit steht ein Werkzeug zur Verfügung, die Experimente zu erweitern und theoretisch zu fundieren.

So gelingt zum Beispiel die Modellierung des Gleichgewichtsumsatzes, der bei Reaktionen im Satzreaktor auftritt. Die Lage dieses Gleichgewichtes wurde ausgedrückt als Umsatz und Ausbeute der Reaktion sowie als Ausnutzungsgrad des Formiats für die Synthesereaktion. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-18 gezeigt. Hier sind für zwei verschiedene Formiatkonzentrationen sowohl Umsatz¹³⁰ als auch Ausbeute der Reaktion im Gleichgewicht berechnet. Es ist klar ersichtlich, daß selbst bei geringen Substratkonzentrationen zwar der Umsatz nahezu

¹³⁰ Zu Definition von Umsatz und Ausbeute → Glossar

quantitativ wird, jedoch die Ausbeute, trotz der effektiven Cofaktorregenerierung, nie 100 % erreicht. Dies liegt an der konkurrierenden Reduktion von Formiat zu Formaldehyd, dessen Rückreaktion, ebenso wie die Oxidation von Hexandiol durch die Lage des Cofaktor-Gleichgewichtes auf Seiten des NADH unterdrückt wird. Diese Konkurrenzreaktion wird besonders dann bedeutsam, wenn, bedingt durch die langsame Reduktionsgeschwindigkeit des Hydroxyhexanons, die Synthesereaktion langsam wird. Sie führt zu einem unproduktiven Abreagieren des Formiats.

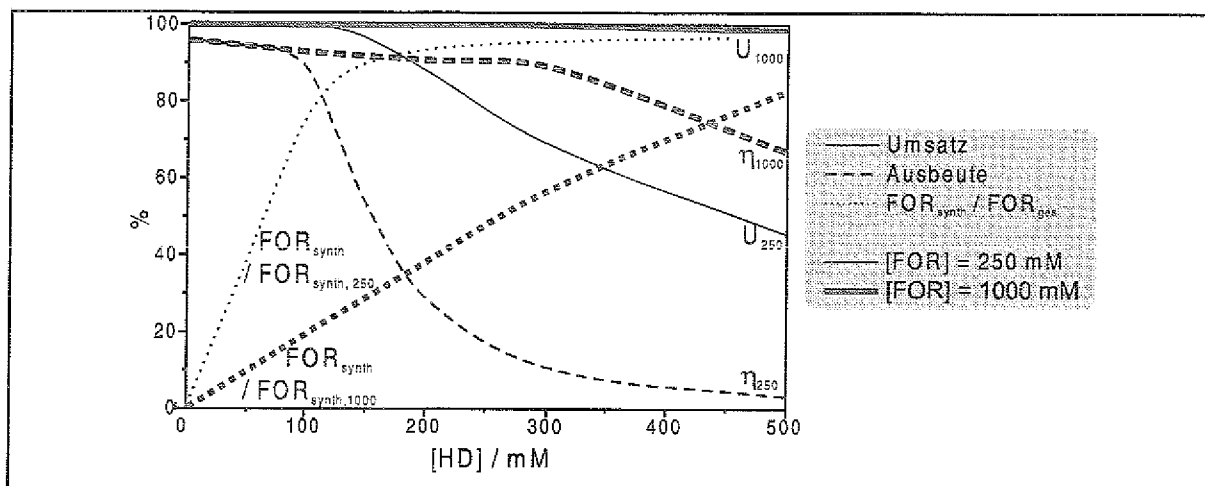


Abb. 4-18: Simulation des Endumsatzes bei Satzreaktorversuchen

Deutlich ersichtlich ist die Lage des Ausbeutegleichgewichtes auf recht konstantem Niveau bis zu einem drastischen Einknicken. Bei hoher Formiatkonzentration tritt dieser Effekt erst bei höheren Hexandionkonzentrationen auf und ist weniger abrupt. Dies ist nicht durch einen stöchiometrischen Unterschuß an Formiat zu erklären, sondern auf die Konkurrenzreaktion der Formiatreduktion zurückzuführen, die für eine nicht mehr ausreichende Formiatkonzentration sorgt. Abhilfe schaffen könnte eine kontinuierliche Formiatdosierung

Die Ausnutzung des Formiats (also der Anteil an Formiat, der für die Synthesereaktion verbraucht wird) hat im Labormaßstab weniger Bedeutung als bei Überlegungen zur Maßstabsvergrößerung. Da es natürlich ökonomisch weder sinnvoll ist die, wenn auch preisgünstige, Wasserstoffquelle in hohem Überschuß einsetzen zu müssen, noch eine Reaktion bei unvollständigem Umsatz abubrechen und somit Aufarbeitungskosten in Kauf zu nehmen, ist ein Kompromiß zu finden.

Die Frage der Reaktorwahl kann anhand einiger Kennzahlen für Satzreaktor und EMR getroffen werden. In Abb. 4-19 sind einige Parameter für beide Reaktorsysteme gegenübergestellt, wobei je zwei Betriebspunkte berücksichtigt wurden.

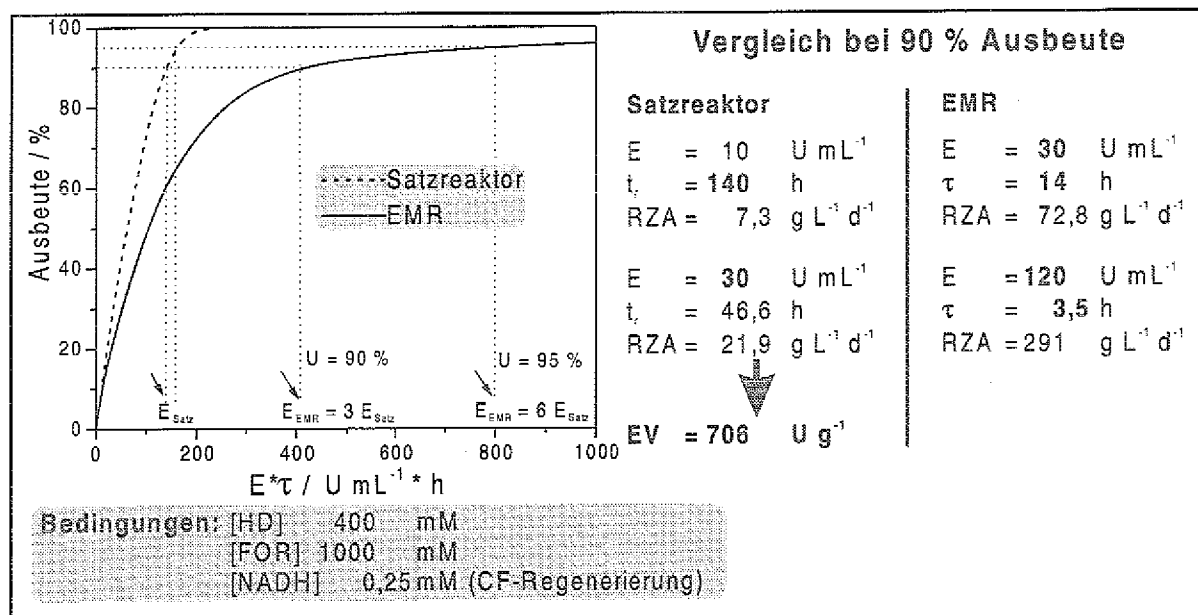


Abb. 4-19: Parametervergleich zwischen Satzreaktor und EMR

Die wichtigen Ergebnisse dieses Vergleiches sind hervorgehoben:

- Sowohl im Satzreaktor als auch im EMR sind sehr hohe Enzymkonzentrationen notwendig, um die Verweil- bzw. Reaktionszeit im Rahmen zu halten. Besonders deutlich wird dies im Fall des EMRs, wo bereits bei einer hohen Verweilzeit von 3,5 h eine Enzymkonzentration von 120 U mL^{-1} zum Erreichen eines Umsatzes von 90 % notwendig ist.
- Die Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) dieser Reaktion sind im Falle des Satzreaktors mäßig.
- Bei 90 % Umsatz ist bei gleicher Verweilzeit die im EMR benötigte Menge Enzym dreimal höher als im Satzreaktor. Bei 95 % Umsatz verschlechtert sich dieses Verhältnis bereits auf 1:6.
- Der Enzymverbrauch (EV) im Falle des Satzreaktors ist dann zu hoch, wenn keine Wiederverwendung des Enzyms vorgesehen ist. Es müßte, um das Syntheseverfahren wirtschaftlich werden zu lassen, unbedingt eine Synthese im *Repetitive Batch* (§3.5) durchgeführt werden.

Diese Limitierungen lassen es zur Zeit nicht zu, das enzymatische Verfahren wirtschaftlich auf eine Produktion von enantiomerenreinem Hexandiol im kg-Maßstab oder darüber hinaus anzuwenden. Vielmehr muß nach Verfahrensalternativen gesucht werden. Die literaturbekannten Alternativverfahren sind in Abb. 4-20 zusammengefaßt.

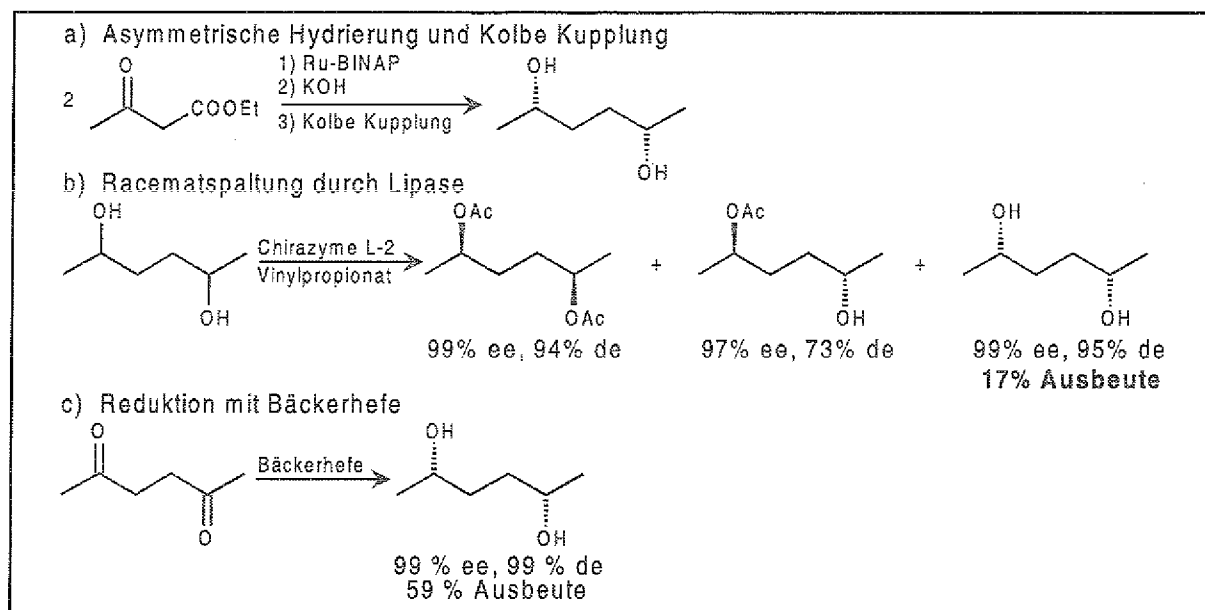


Abb. 4-20: Alternativverfahren zur Darstellung von enantiomerenreinem Hexandiol

Am Beispiel von Hexandiol zeigt sich, daß bis heute trotz der Vielfalt an Methoden keine zufriedenstellende chemische Reduktionsmöglichkeit für Hexandion gefunden werden konnte. Während Direktreduktionen¹³¹ an geringer optischer Reinheit des Produktes leiden, setzten andere Verfahren mehrstufige Synthesen voraus. Ein übliches Verfahren (a)¹³² reduziert zunächst einen β -Ketoester mit NOYORI'S BINAP-Reagens. Nach anschließender Verseifung wird eine KOLBE-Kupplung durchgeführt. Dieses elektrochemische Verfahren ist im Labor gut anwendbar, leidet aber unter dem Problem des Elektrodenfoulings bei der Maßstabsvergrößerung¹³³.

Eine weitere Synthese¹³⁴ benötigt fünf Stufen ausgehend von Mannitol.

Die verfügbaren biokatalytischen Verfahren bieten hier eine wertvolle Alternative. Bereits heute wird 2,5-Hexandiol im kg-Maßstab durch lipasekatalysierte Racematspaltung (b) dargestellt¹³⁵. Dieses Verfahren weist allerdings nur eine Ausbeute von 17 % auf (theoretisches Maximum: 25%!), ist also mit der Erzeugung von großen Mengen unerwünschten Nebenproduktes behaftet.

¹³¹ Fan et al. (1997): Tetrahedron: Asymm., 8, 4041.

Schils et al. (1998): The Impact of Organic Synthesis on Drug Discovery, Springer, Heidelberg, 91.

Bach et al. (1998): Tetrahedron, 54, 14947.

¹³² Burk et al. (1991): Tetrahedron: Asymm., 2, 569.

¹³³ U. Berens, CHIROSCIENCE LTD., persönliche Mitteilung, 1997

¹³⁴ Saravanan et al. (1997): J. Org. Chem., 62, 2669.

¹³⁵ Nagai et al. (1994): Synlett, 289.

Holt et al. (1997): Biotrans '97, La Grande Motte, Frankreich, C 20.

Die Reduktion von Hexandion durch Bäckerhefe (c) stellt eine der enzymatischen Reduktion analoge Reaktion unter Anwendung ganzer Zellen als Katalysator dar. Die bereits literaturerzielte Ausbeute von 59 % und die hohe optische Reinheit des Produktes sowie die weitere Optimierbarkeit des Verfahrens ermutigten zu einer weiteren Untersuchung dieser Methode, um sie dann mit der enzymatischen Reduktion vergleichen zu können. Die Ergebnisse dieses Vergleiches werden in § 4.4 dargestellt. Hier wird dann auch die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches genauer behandelt.

All diese Verfahren waren ausgerichtet auf die Synthese von Hexandiol in der (2S,5S)-Konfiguration. Während das meso-Produkt für den katalytisch arbeitenden Chemiker weitgehend uninteressant ist, scheint sich in jüngster Zeit auch ein Markt für das (2R,5R)-Enantiomer zu entwickeln. Die Veränderung eines Enzyms mit Hinblick auf die Umkehr der Stereospezifität ist, im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren, schwer. Jedoch stehen im reichhaltigen Fundus der Natur ausreichend Katalysatoren zur Verfügung, die dieses Problem beseitigen helfen. Eine Alkoholdehydrogenase, die aus *Lactobacillus brevis* isoliert wurde¹³⁶ und rekombinant zur Verfügung steht, erlaubt die Umsetzung von Hexandion. Das Produkt (2R,5R)-Hexandiol wird in hoher optischer Reinheit (ee und de > 99 %) generiert¹³⁷.

¹³⁶ Hummel (1997): Adv. Biochem. Eng., **58**, 145.

¹³⁷ Dr. W. Hummel, unveröffentlichte Ergebnisse.

4.4 Verfahren zur biokatalytischen asymmetrischen Verfahrensvergleich der Hexandiol synthese

Im vorangegangenen Kapitel wurde die enzymatische Reduktion von 2,5-Hexandion als Methode zur Darstellung enantiomerenreinen (2S,5S)-Hexandiols vorgestellt, aber auch auf die Schwierigkeiten, die sich bei einer Maßstabsvergrößerung des Verfahrens ergeben, hingewiesen.

In diesem Abschnitt soll nun die Reduktion mit ganzen Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*¹³⁸ vorgestellt werden. Dieses Verfahren wurde zur Produktion von Hexandiol im kg-Maßstab erfolgreich eingesetzt und soll mit dem oben beschriebenen Verfahren verglichen werden.

4.4.1 Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe

Bäckerhefe ist ein gebräuchlicher Biokatalysator der organischen Synthese¹³⁹. Sie wird nicht nur zum Backen verwendet, sondern auch zur Vergärung von alkoholischen Getränken wie Bier und Wein, zur industriellen Produktion von Ethanol, in Öl- und Fettproduktion und -abbau sowie im Bereich der Abwasserreinigung¹⁴⁰.

Die Fähigkeit, auch unnatürliche Substrate zu akzeptieren und diese stereoselektiv zu reduzieren, wurde bereits früh erkannt, so daß schon 1949 ein erster Übersichtsartikel erschien¹⁴¹. Die Substratbreite und Anwendungsbereiche sind in einer Anzahl von Übersichtsartikeln¹⁴² sowie Büchern¹⁴³ beschrieben, auf die für Substrattabellen und weitere Literatur verwiesen sei.

Die Anwendung einer Ganzzellbiotransformation, die durch Bäckerhefe katalysiert wird, bietet eine ganze Reihe von Vorteilen:

¹³⁸ Wird in diesem Kapitel von „Bäckerhefe“ oder „Hefe“ gesprochen, so ist stets *Saccharomyces cerevisiae* gemeint.

¹³⁹ Hoffmann (1996): Chem. unserer Zeit, **30**, 201.

¹⁴⁰ Verachtert et al. (1990): *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc., New York.

Kometani et al. (1996): J. Mol. Cat. B Enzymatic, **1**, 45.

¹⁴¹ Neuberg (1949): Adv. Carbohydr. Chem., **4**, 75.

¹⁴² Sih et al. (1984): Angew. Chem., **96**, 570.

Servi (1990): Synthesis, **1**.

¹⁴³ Poppe et al. (1992): *Selective Biocatalysis*, VCH, Weinheim.

Bertschy et al. (1995): *Reduction of Aldehydes and Ketones* in: Drauz et al.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **2**, 595.

Faber (1995): *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin.

- Bäckerhefe ist außerordentlich billig¹⁴⁴ und kann in nahezu unbegrenzten Mengen¹⁴⁵ bezogen werden. Sie ist entweder als hier verwendete Frischbackhefe mit ca. 70 % Feuchtigkeit oder als Lyophilisat erhältlich.
- Die Zellen sind unkompliziert zu behandeln. Es wird weder eine sterile Fermentationsanlage benötigt noch brauchen teure Zusatzstoffe zugegeben zu werden. Als Kohlenstoffquelle kann Glucose oder Saccarose eingesetzt werden. Bäckerhefe ist weder giftig noch pathogen.
- Die Vielzahl der in der Hefe enthaltenen Enzyme erlaubt die Umsetzung einer breiten Substratpalette.
- Eine separate Cofaktorregenerierung bei Nutzung der in der Zelle enthaltenen NAD(P)H abhängigen Dehydrogenasen ist nicht notwendig, da der Cofaktor durch den Metabolismus der Zelle regeneriert wird.

Andererseits birgt die Verwendung von ganzen Zellen als Katalysator jedoch auch eine Reihe von Problemen und Risiken:

- Die oben als Vorteil genannte Vielfältigkeit der Enzymaktivitäten kann dann zum Problem werden, wenn mehrere Enzyme das gewünschte Substrat mit unterschiedlicher Stereoselektivität umsetzen. So wird teilweise nur eine geringe Enantiodifferenzierung beobachtet.
- Da Hefe nur in wässriger Umgebung leben kann, ist die Umsetzung von sehr schlecht wasserlöslichen oder in Wasser zersetzlichen Substraten oder Produkten schlecht möglich.
- Die Reproduzierbarkeit von Hefereduktionen kann ungenügend sein, insbesondere dann, wenn Zellen aus verschiedenen Chargen oder gar verschiedener Hersteller benutzt werden, da die Enzymaktivitäten sehr stark vom Herstellungsprozeß abhängig sind.
- Das Verhältnis von Zellmasse zu Substratmenge ist im allgemeinen ungünstig. Hier wurden pro kg Produkt etwa 8 kg feuchte Zellmasse eingesetzt.
- Substrat und/oder Produkt können Zellgifte darstellen und die Reduktion verhindern oder stark verlangsamen.

Während die Reduktion von einfachen aliphatischen oder aromatischen Ketonen, von Ketoestern und selbst 1,2- und 1,3-Diketonen weithin bekannt ist, finden sich nur wenige Hinweise auf die Umsetzung von 1,4-Diketonen.

¹⁴⁴ Sie wurde beim Bäckereigroßhandel zu DM 1,80 pro kg bezogen.

¹⁴⁵ Die Jahresproduktion beträgt z. Zt. ca. 500 000 t/a

Die Reduktion von 2,5-Hexandion wurde erstmals 1983 von LIESER¹⁴⁶ beschrieben. Es wurde die Synthese von 3 g Diol in einer Ausbeute von 57 % mit einem ee von 95 % beschrieben. Andere Autoren berichteten von Ausbeuten zwischen 50 und 75 % sowie ee-Werten bis >99 % im Maßstab bis 30 g¹⁴⁷. Die Röntgenstruktur des Produktes wurde kürzlich veröffentlicht¹⁴⁸.

Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es nun, eine Maßstabsvergrößerung der literaturbeschriebenen Reaktion durchzuführen und vor allem die recht aufwendige Aufarbeitung des Produktes aus der Reaktionslösung zu vereinfachen, um einen Prozeß zur Verfügung zu stellen, der die Produktion enantiomerenreinen (2S,5S)-Hexandiols im kg-Maßstab wirtschaftlich erlaubt.

4.4.2 Scale-up der Hefereduktion

Wie bereits HAUPE¹⁴⁸ berichtete, ist die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität der Reaktion durch Erhöhung der Substratkonzentration möglich. Nach Reproduktion der literaturbeschriebenen Vorschrift wurden mehrere Parameter erfolgreich verändert.

- Der bis jetzt verwendete Rohrzucker wird durch Glucose ersetzt. Somit wird der Zelle die Zuckerspaltung abgenommen und ein einfacherer Zugang zur Nährstoffquelle gewährleistet.
- Die einmalige Zugabe von Substrat zu Beginn der Umsetzung mit höchstens einmaliger Nachdosierung wurde durch eine kontinuierliche Zudosierung des Substrates ersetzt. Hierdurch wird nicht nur die Substratkonzentration, sondern auch die Konzentration des Zwischenproduktes Hydroxyhexanon, das hier wie bei der enzymatischen Reduktion auftritt, gering gehalten. Selbst bei einem vorzeitigen Abbruch der Umsetzung wird somit ein nicht zu großer Substratverlust gewährleistet.
- Die Kohlenstoffquelle Glucose wird ebenfalls kontinuierlich zudosiert. Die Menge der Dosierung wird so eingestellt, daß die C-Quelle der limitierende Stoff der Fermentation ist. Somit wird zum einen erreicht, daß das Zellwachstum recht gering bleibt und vor allem am Ende der Fermentation selbst bei vorzeitigem Abbruch nahezu keine vorhanden ist, was die Aufarbeitung erleichtert. Nach Zugabe der gewünschten Menge Substrat

¹⁴⁶ Lieser (1983): *Synth. Commun.*, **13**, 765.

¹⁴⁷ McKinstry et al. (1995): *Tetrahedron*, **51**, 7655.

Short et al. (1989): *J. Org. Chem.*, **54**, 1755.

Otten et al. (1998): *Tetrahedron: Asymm.*, **9**, 189.

¹⁴⁸ Otten et al. (1998): *Tetrahedron: Asymm.*, **9**, 189.

wird die Glucosedosierung solange aufrechterhalten bis die Umsetzung zum Erliegen kommt. Die Zellernte wird durchgeführt sobald der Test auf Glucose negativ verläuft.

Die Reaktion wurde ausgehend vom literaturbeschriebenen Maßstab von 1 L bis auf ein Arbeitsvolumen von 230 L vergrößert. Ein Verfahrensfließbild der Produktionsanlage ist in Abb. 4-21 dargestellt. Sie besteht aus einem 300 L Edelstahl-Rührkessel, in den mittels Kolbenpumpen aus einer 60 L-Vorlage konzentrierte Glucoselösung und Substrat in Substanz zudosiert werden konnte. Der Reaktor wurde nicht temperiert, jedoch sorgte die Wärmeentwicklung der Reaktion für eine selbständige Erwärmung der Reaktion bis auf 32 °C.

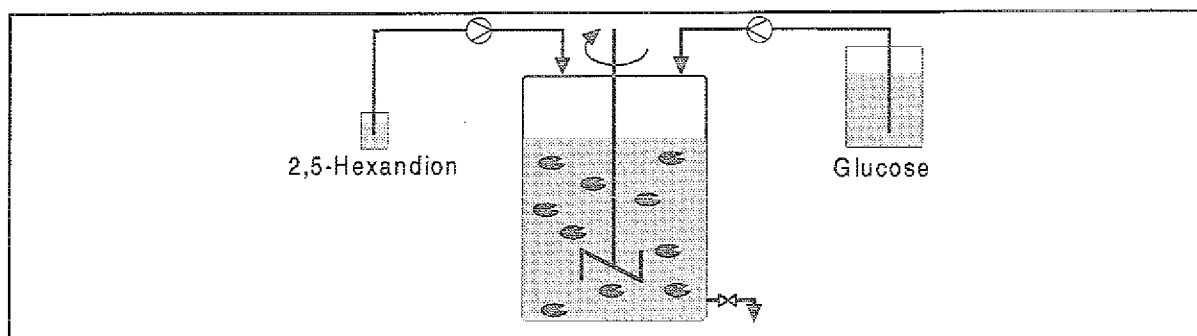


Abb. 4-21: Verfahrensfließbild der Hefereduktion

Durch die oben ausgeführten Veränderungen konnte ein Endumsatz von 87 % erreicht werden (Abb. 4-22). Das Absinken der Ausbeute bzgl. Diol ab 50 h ist auf die erneute Substratdosierung zurückzuführen. Die isolierte Ausbeute lag bei bis zu 70 %.

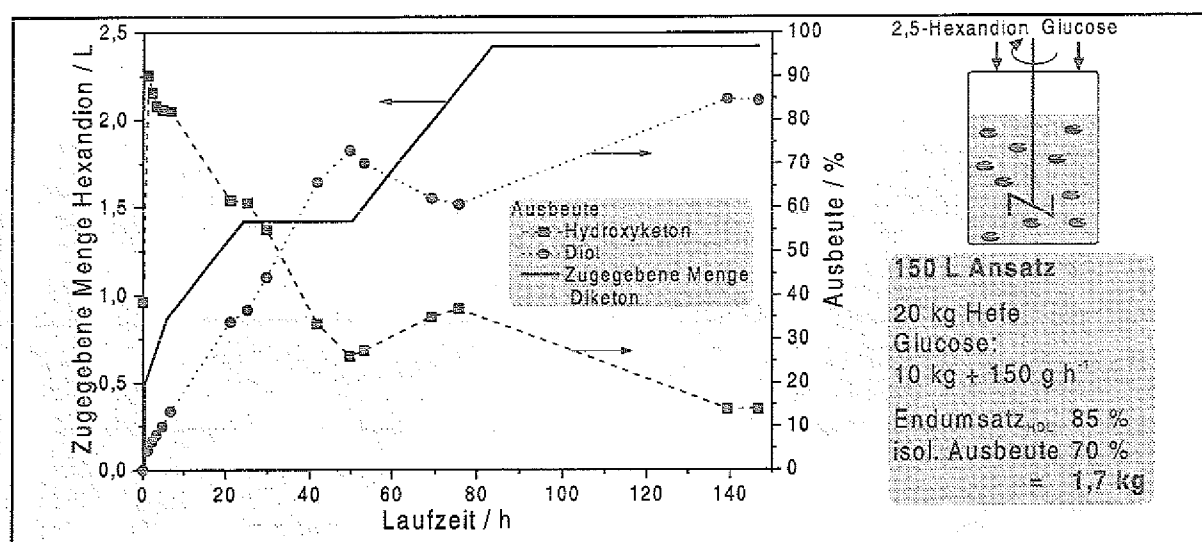


Abb. 4-22: Umsatzgraph einer Hefereduktion mit 150 L Anfangsvolumen

Das in der Literatur beschriebene Aufarbeitungsprotokoll schloß eine Extraktion des Produktes aus der wäßrigen Lösung und meist eine anschließende chromatographische Trennung des Produktgemisches ein. Dieses Verfahren ist nicht auf größere Ansätze anwendbar und sollte hier vereinfacht werden. Es gelang, ein einfaches Protokoll (Abb. 4-23) zu erstellen.

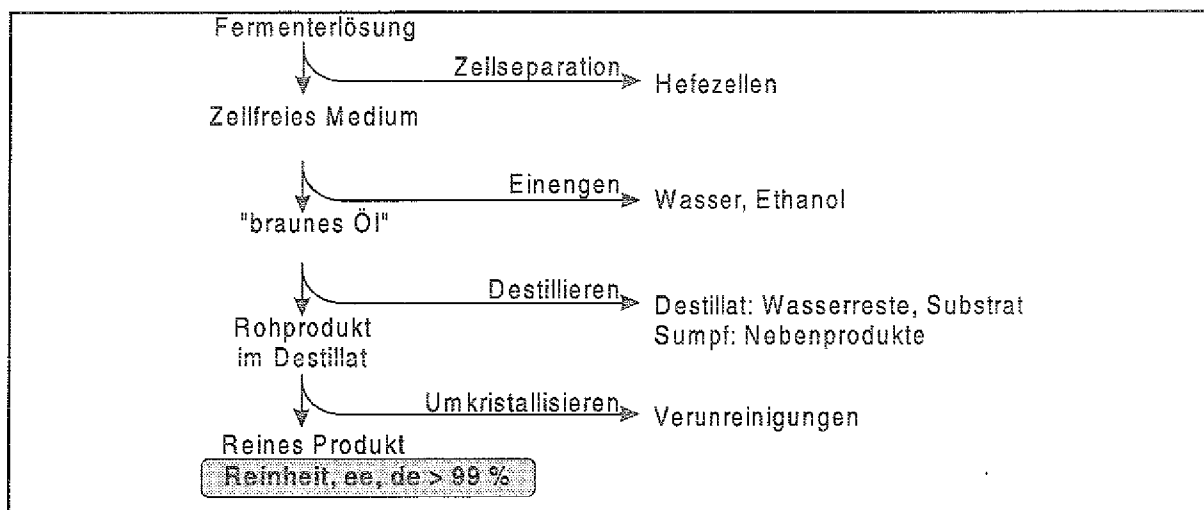


Abb. 4-23: Aufarbeitungsschema für Hexandiol

Da das Verfahren keine Extraktion nutzt, sondern direkt aus der wäßrigen Lösung destilliert, ist dieses Verfahren auch im kg-Maßstab einsetzbar und wurde auch erfolgreich angewandt. Eine Erhöhung der Produktreinheit wird durch Umkristallisieren erreicht. Hexandiol kristallisiert in feinen weißen sechseckigen Nadeln (Abb. 4-24a) und wird nach Umfällen in Hexan reinweiß und feinkristallin gewonnen (Abb. 4-24b).

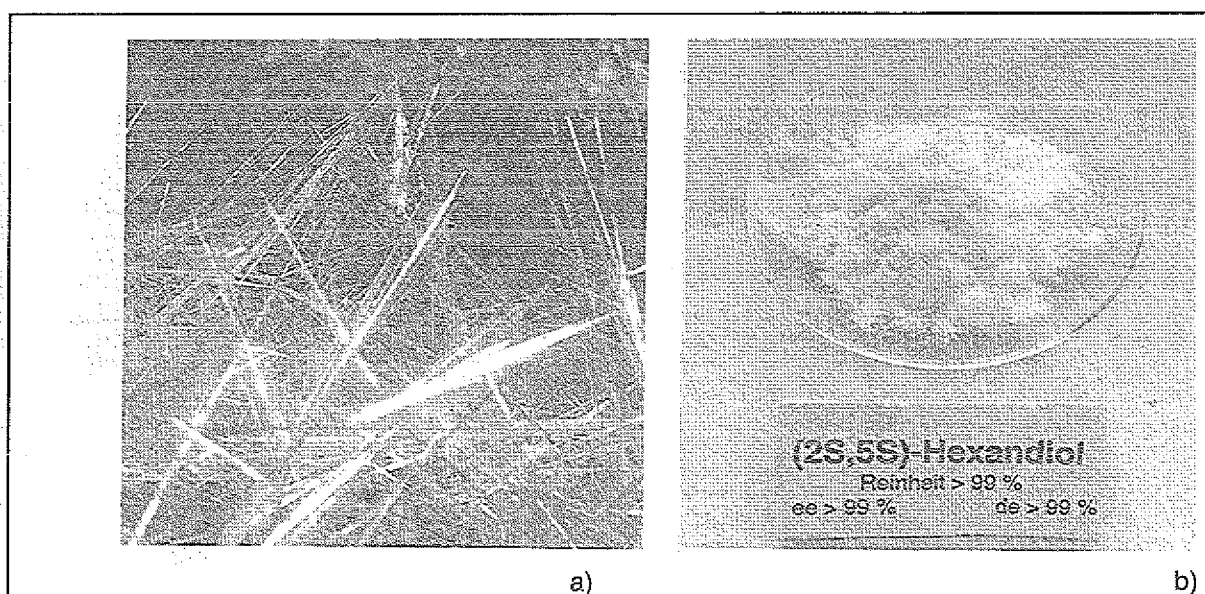


Abb. 4-24: a) Nadelförmige Kristalle von Hexandiol, b) Feinkristallines Hexandiol

Die Produkt- und Enantiomerenanalytik bestätigten die hohe Qualität des Produktes. Eine Röntgenstrukturanalyse ergab folgende Gitterparameter in einer monoklinen Raumgruppe: $a = 5,9925 \text{ \AA}$, $b = 7,3821 \text{ \AA}$, $c = 8,8905 \text{ \AA}$, $\beta = 107,32^\circ$, $V = 375,46 \text{ \AA}^2$. Sie stehen in Einklang mit den Literaturdaten¹⁴⁹. Auf diese Weise wurde 1,7 kg enantiomerenreines Hexandiol erhalten, wobei sowohl die chemische Reinheit als auch Enantiomeren- und Diastereomerenüberschuß jeweils über 99 % lagen.

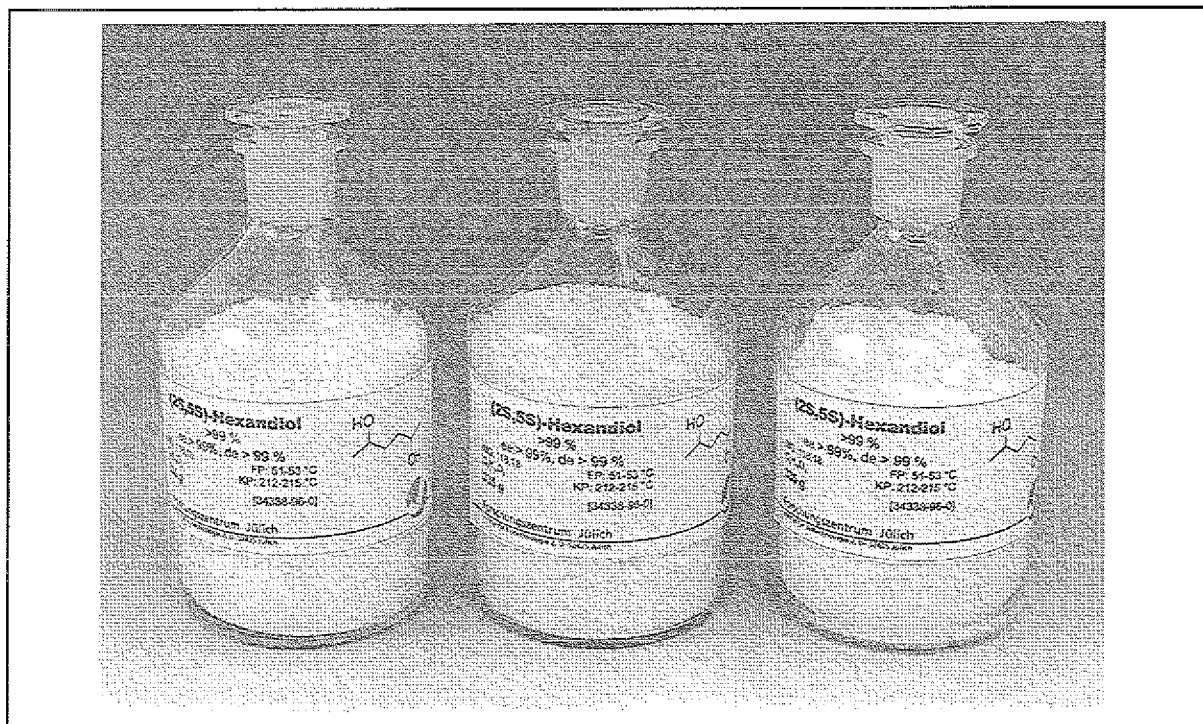


Abb. 4-25: 1 kg enantiomerenreines Hexandiol

4.4.3 Diskussion der Verfahrensalternativen und Ausblick

Die beiden beschriebenen Verfahren zur biokatalytischen Reduktion von Hexandion sollen in diesem Abschnitt verglichen werden. Besonderer Wert wird auf die praktische Anwendbarkeit des jeweiligen Prozesses und auf die entstehenden Kosten gesetzt. Es können allerdings nur die Materialkosten exakt angegeben werden, während bei den Verfahrenskosten höchstens eine grobe Schätzung erfolgen kann.

Beide Verfahren nutzen das gleiche Substrat und produzieren das gleiche Produkt. Nach gleichartiger Aufarbeitung ist auch die erreichbare Produktqualität ähnlich. Eine Unterscheidung kann somit nur aufgrund des reinen Syntheseschrittes erfolgen, wobei beide Verfahren im *batch* bzw. *fed batch* betrachtet werden.

¹⁴⁹ Otten et al. (1998): *Tetrahedron: Asymm.*, **9**, 189.

Einige Parameter der Verfahren sind in Tabelle 4-4 zusammengefaßt. Hingewiesen sei hier besonders auf die größere Spezifität des enzymatischen Verfahrens, verbunden mit einem sehr viel geringeren Katalysatorbedarf. Durch die Reinigung des Enzyms wird der überwiegende Teil der Zellbestandteile verworfen und nur ein geringer Teil, der das aktive Protein enthält, bleibt zurück. Damit wird gleichzeitig der natürliche Stoffwechsel der Zelle verworfen. Es muß also eine separate Cofaktorregenerierung genutzt werden, jedoch treten im Produkt auch keine störenden Stoffwechselprodukte auf.

Parameter	Isolierte Enzyme	Ganze Hefezellen
[Produkt] _{Ende}	270 mM	130 mM
maximale Ausbeute	95 %	85 %
Raum-Zeit-Ausbeute	32 g L ⁻¹ d ⁻¹	1,5 g L ⁻¹ d ⁻¹
m _{Kat} / m _{Produkt}	0,007 g/g	11,8 g/g
[Cofaktor]	0,25 mM NADH	kein Cofaktor zugegeben
Wasserstoffquelle	Formiat	Glucose
m _{H₂-Quelle} / m _{Produkt}	2,1 g/g	18,2 g/g
Prozeßzeit	0,2 bis 1 Tag	4-7 Tage
Katalysatorbeschaffung	kompliziert und teuer	einfach und preiswert
Nebenprodukte	-	div. aus Stoffwechsel
Reproduzierbarkeit	hoch	gering

Tabelle 4-4: Parameter der Reduktionsverfahren (beste Ergebnisse)

Auf der Kostenseite hingegen ist die Hefereduktion klar überlegen. Wie eine Materialkostenschätzung (Tabelle 4-5) zeigt, muß weder ein teures Enzym gekauft oder selbst fermentiert und aufgereinigt werden noch sind andere teure Hilfsstoffe notwendig. Vielmehr wird ein sehr preisgünstiger Katalysator und Glucose als Cosubstrat eingesetzt.

Material	Preis pro Einheit	Isolierte Enzyme		Ganze Hefezellen	
		Σ Einheiten	Preis	Σ Einheiten	Preis
2,5-Hexandion	190 DM / kg	1,1	209 DM	1,4	266 DM
NAD ⁺	4,1 DM / g	12,2	50 DM	0	0
Natriumformiat	5 DM / kg	1,4	7 DM	0	0
Puffer	0,07 DM / L	85	6 DM	0	0
Glucose	1 DM / kg	0	0	18	18 DM
CPCR	0,1-1 DM / U [†]	1000 [‡]	100-1000 DM	0	0
FDH	0,08 DM / U	1000 [‡]	80 DM	0	0
Hefe	1,8 DM / kg	0	0	12	22 DM
Summe			452-1352 DM		306 DM

Tabelle 4-5: Materialkosten beider Verfahren berechnet auf 1 kg Produkt

†: 1 DM bei konventioneller Produktion, 0,1 DM für rekombinantes Enzym

‡: Enzymverbrauch, der im EMR erreichbar wäre

Die in Tabelle 4-5 angegebenen Preise beruhen auf dem Beschaffungspreis der Substanzen in einer Größenordnung, die für die Produktion von Hexandiol im kg-Maßstab notwendig ist. Es sind also keine Weltmarktpreise für Großabnehmer! Die benötigte Substratmenge ist auf eine isolierte Ausbeute von 90 % für das enzymatische Verfahren bzw. 70 % für die Hefereduktion berechnet. Die Preisberechnung des enzymatischen Verfahrens steht und fällt mit dem sehr unsicheren Preis der CPCR. Zur Zeit ist von Herstellungskosten von ca. 1 DM pro U auszugehen, die jedoch nach der erfolgreichen Klonierung und Überexpression des Gens auf einen Preis gesenkt werden dürfte, der dem der FDH nahekommt. Zu diesem Zeitpunkt dürfte auch eine für die Produktion im kg-Maßstab ausreichende Enzymmenge zur Verfügung stehen.

Einen Marktpreis für enantiomerenreines Hexandiol von ca. 10 DM / g zugrundegelegt, dürften beide Verfahren mit einem optimierten Materialkostenanteil von unter 5 % des Produktpreises, durchaus konkurrenzfähig sein. Dies trifft auch zu, wenn man die Prozeß- und vor allem die Aufarbeitungskosten (hier ist vor allem die destillative Entfernung großer Wassermengen zu nennen) einrechnet.

Die Optimierung der Verfahren ist bei weitem nicht abgeschlossen. Das enzymatische Verfahren bietet Ansätze in der Cofaktorregenerierung. Hier ist der Ersatz des Systems FDH/Formiat durch eine substratgekoppelte Regenerierung mit einem niederen Alkohol wie 2-Propanol. Das entstehende Aceton könnte dann destillativ oder membrangestützt entfernt

werden. Hierdurch würde der Einsatz eines zweiten Enzyms überflüssig und die Nebenaktivitäten der *CPCR*-Präparation belanglos. Es wäre allerdings auf eine Desaktivierung durch große Mengen an Regeneriersubstrat und die Gleichgewichtslage der Reaktion zu achten.

Die Hefereduktion kann im Hinblick auf Substrat-, Katalysator- und Glucosekonzentration weiter optimiert werden. Insbesondere die Feedstrategie dürfte interessante Ansatzpunkte bilden. Ferner ist eine Übertragung in ein kontinuierliches Verfahren denkbar. Hier ist zum Beispiel an eine kontinuierliche Fermentation unter Zellrückhaltung oder an einen Säulenreaktor mit immobilisierter Hefe zu denken. MORAN und Mitarbeiter beschrieben z.B. kürzlich einen kontinuierlichen Prozeß zur Ketonreduktion mit auf Chrytosilfasern immobilisierter Hefe, der über 30 Tage stabile Umsätze lieferte.¹⁵⁰ Stets ist jedoch der hiermit verbundene Mehraufwand gegen den geringen Preis des Katalysators abzuwägen. Aber auch eine Steigerung der Reproduzierbarkeit ist im Auge zu behalten.

Auch die Aufarbeitung ist nicht frei von Optimierungspotential. Hier ist sicher zuerst die Abtrennung des Wassers vom Produkt zu nennen. Wenn ein geeignetes Adsorbtionsmaterial gefunden werden könnte, das selektiv das Produkt, nicht jedoch das Wasser oder den entstehenden Alkohol bindet, könnte die destillative Entfernung des Wassers, die mit hohen Energiekosten verbunden ist, entfallen.

4.4.4 Zwischenbilanz

In den Kapiteln 4.3 und 4.4 wurden zwei Verfahren vorgestellt und verglichen, die die biokatalytische Synthese von enantiomerenreinem (2S,5S)-Hexandiol erlauben.

- Das enzymatische System wurde intensiv kinetisch charakterisiert und beschrieben. Eine Modellierung der Umsetzungen ist möglich.
 - Die Reaktion geschieht in zwei Schritten über 5-Hydroxyhexan-2-on als Zwischenprodukt.
 - Der zweite Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend mit nur 15 % der Geschwindigkeit des ersten.
 - Dadurch erfolgt die Akkumulation des Zwischenproduktes, das nur langsam abreagiert.
- Enzymatisch wurden Synthesen im Satzreaktor mit und ohne pH-Statisierung durchgeführt sowie ein kontinuierlich betriebener Enzymmembranreaktor betrieben. Es wurden 30 g Hexandiol enzymatisch dargestellt.

¹⁵⁰ Wendhausen Jr. et al. (1998): J. Mol. Cat. B Enzymatic, 5, 69.

- Die Reduktion mit Bäckerhefe wurde in einem *fed batch*-Prozeß durchgeführt und bis zu einem Maßstab von 230 l vergrößert.
- Das Aufarbeitungsprotokoll konnte gegenüber der Literatur durch Wegfall einer Extraktion wesentlich vereinfacht werden.
- Durch Hefereduktion wurden 1,7 kg (2S,5S)-Hexandiol synthetisiert.
- Das Produkt beider Verfahren weist hohe chemische Reinheit sowie einen Enantiomeren- und Diastereomerenüberschuß von jeweils > 99 % auf.

4.5 Reduktion schwerlöslicher Substrate

Die in §4.2 beschriebene Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* besitzt ein weites Substratspektrum, dem nicht nur, wie in §4.3 beschrieben, gut wasserlösliche Substrate angehören, sondern auch eine Reihe schlecht löslicher Carbonylverbindungen. Da die enzymatische Synthese mit Oxidoreduktasen in organischen Medien¹⁵¹, ganz im Gegensatz zu Lipasen, noch nicht allgemein anwendbar ist, ist man auf ein wässriges Reaktionsmedium angewiesen, in dem die maximal erreichbare Konzentration nur gering ist.

Diese Limitierung führt zu einer Reihe von Problemen:

- Es fallen große Flüssigkeitsvolumina an, die nur recht geringe Produktmengen enthalten. Dadurch wird eine recht aufwendige und kostspielige Aufarbeitung notwendig.
- Die Konzentration des Cofaktors darf mit Rücksicht auf die Sättigung im Enzym nicht beliebig verkleinert werden, dadurch bleiben die maximale Zyklenzahl (ttn) des Cofaktors¹⁵² klein und somit die Cofaktorkosten hoch. Dies ist schematisch in Abb. 4-26 dargestellt, wo bei gleichbleibendem Umsatz von 90 % und Cofaktorkonzentration von 0,1 mM bei einer Substratkonzentration von 10 mM nur eine ttn von 90 erreicht wird, während bei verzehnfachter Substratkonzentration bereits 900 erreicht wird, was eine Senkung der Cofaktorkosten um Faktor 10 bedeutet.
- Zur Produktion einer gegebenen Produktmenge sind bei gleicher Reaktionszeit erheblich größere und damit teurere Apparate notwendig.

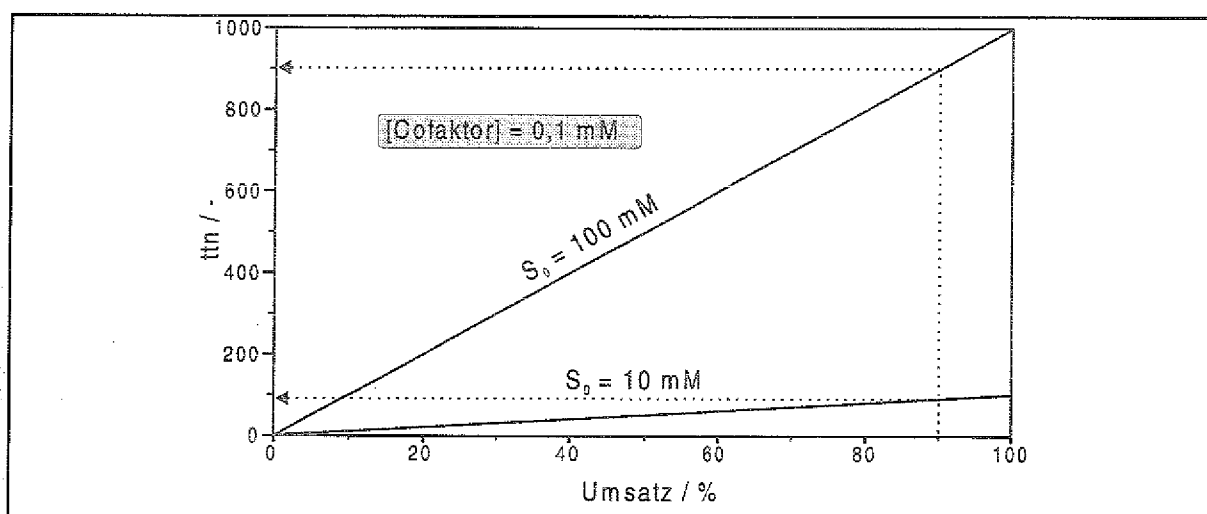


Abb. 4-26: ttn des Cofaktors als Funktion von Umsatz und Substratkonzentration

¹⁵¹ Adlercreutz (1996): Biocatal. Biotransform., 14, 1.

¹⁵² ttn für engl. total turnover number; zur Definition §Glossar

Zur Umgehung dieser Limitierungen kann die Reaktionstechnik einen bedeutenden Beitrag leisten. Nicht nur durch geeignete Wahl von Lösungsvermittlern oder Komplexbildnern kann die Löslichkeit erhöht werden, vielmehr kann auch durch ein geeignetes Reaktordesign das Flüssigkeitsvolumen reduziert und die t_{in} des Cofaktors erheblich gesteigert werden.

In diesem Kapitel soll nun die Reduktion von drei verschiedenen schwerlöslichen Substraten beschrieben werden, die mit zwei verschiedenen kontinuierlichen Membranverfahren durchgeführt wurden.

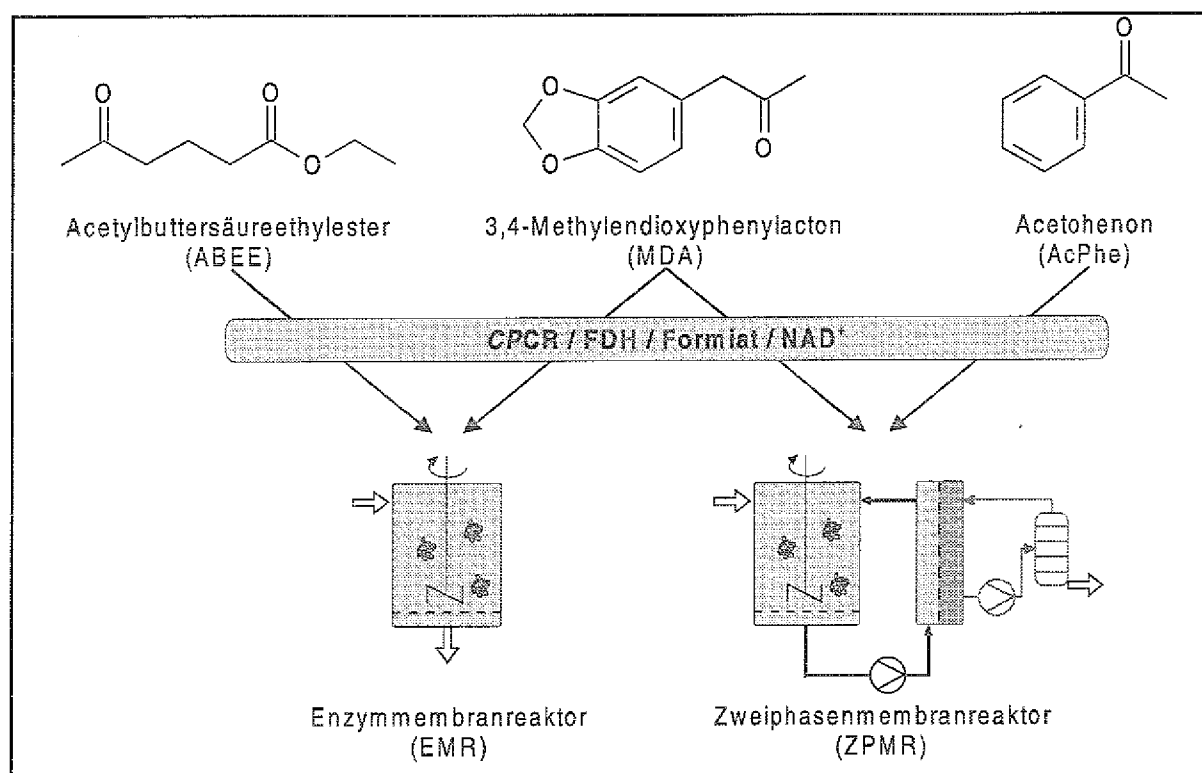


Abb. 4-27: Substrate und Verfahren der Reduktion schwerlöslicher Ketone

4.5.1 Reduktion von Acetylbuttersäureethylester (ABEE)

4.5.1.1 Substratauswahl

Das zu ersten Untersuchungen gewählte Substrat Acetylbuttersäureethylester (ABEE) ist das Standardsubstrat für die CPCR und ist so bereits im Screening, das zur Entdeckung der CPCR führte verwendet worden. ABEE ist mäßig (bis ca. 80 mM) in Wasser löslich und erlaubt so eine Reaktion im einphasigen wässrigen System. Anhand dieses Standardsystems sollen erste Erkenntnisse über das Reaktionssystem in der kontinuierlichen Synthese gewonnen werden. Die erreichbaren Größenordnungen verschiedener Kenngrößen des Systems, wie Enzymkonzentration, Betriebsstabilität, Zyklenzahlen und Raum-Zeit-Aus-

beuten sollen bestimmt werden. Die Verwendung dieses Substrates bietet eine gute Vergleichbarkeit zu bestehenden Untersuchungen.

Jedoch nicht nur wegen der Vergleichbarkeit ist dieses System interessant, vielmehr bietet das Produkt Hydroxyhexansäureethylester (HHEE) mit seinen beiden Funktionalitäten, zum einen die Ester-Funktion und zum anderen die Hydroxyfunktion, zahlreiche Anknüpfungspunkte, die das Molekül zu einem interessanten chiralen Synthone machen. Ein Beispiel für den synthetischen Einsatz bietet die in Abb. 4-28 schematisch dargestellte Totalsynthese der Pentaketids ($\pm$)-Diplodialid A¹⁵³, eines Steroidhydroxylase-Inhibitors, der aus *Diplodia pinea* isoliert wurde und einen zehngliedrigen Lactonring als Strukturmerkmal enthält. Die Verwendung von enantiomerenreinem HHEE sollte die Synthese des natürlich vorkommenden (+)-Diplodialid A erlauben.

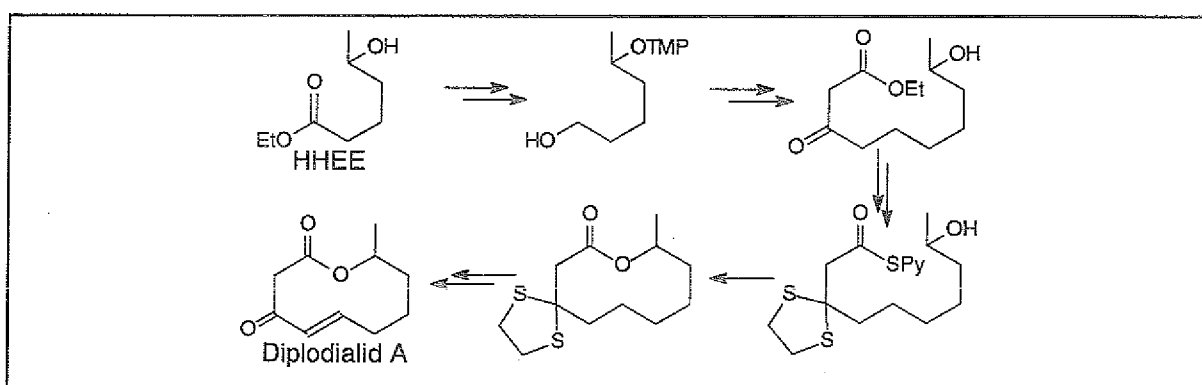


Abb. 4-28: Totalsynthese von ($\pm$)-Diplodialid A

4.5.1.2 Kinetische Beschreibung des Systems

Die Kenntnis elementarer kinetischer Parameter ist für die Festlegung der Reaktionsbedingungen in der anschließenden Synthese wichtig. Jedoch ist es nicht unbedingt erforderlich, alle Parameter genau zu bestimmen. Es wurden daher nur die K_M -Werte für Substrat und Cofaktor zusammen mit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} bestimmt. Diese drei Parameter erlauben es, sinnvolle Konzentrationsniveaus für eine präparative Synthese ausreichend genau abzuschätzen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 4-29 dargestellt und die Parameter in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

¹⁵³ Ishida et al. (1977): J. Chem. Soc., Chem. Commun., 337.
Ishida et al. (1978): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 323.

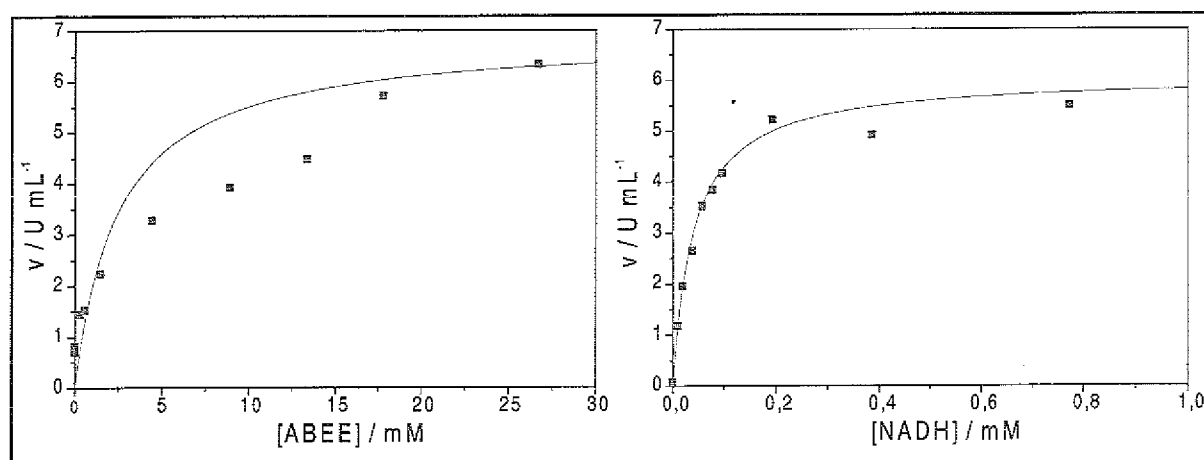


Abb. 4-29: Kinetik der CPCR ($0,17 \text{ mg mL}^{-1}$) mit ABEE als Substrat

Parameter	Wert	Standardabweichung
K_M^{ABEE}	2,5 mM	$\pm 32,9 \%$
K_M^{NADH}	41 μM	$\pm 25,4 \%$
V_{max}	39,9 U mg^{-1}	$\pm 8,1 \%$

Tabelle 4-6: Kinetische Parameter der Reduktion von ABEE

Die Cofaktorregenerierung wird mit Hilfe des in § 3.1.3 beschriebenen Systems mit der FDH und Formiat als Substrat durchgeführt. Die Kinetik der FDH ist bereits in § 4.3.3.5 beschrieben worden, so daß die Parameter hier übernommen werden können, da gleiche Reaktionsbedingungen herrschen.

Unter Berücksichtigung der kinetischen Parameter sollte zur synthetischen Umsetzung eine Cofaktorkonzentration von 0,25 mM günstig sein, um auf der einen Seite eine möglichst hohe Zyklenzahl des Cofaktors zu erreichen, auf der anderen Seite aber die Sättigung vor allem des Syntheseenzym zu erreichen.

Die erforderliche Enzymkonzentration und Verweilzeit kann mit Hilfe eines sehr einfachen Modells simuliert werden. Unter der Annahme einer effektiven Regenerierung wird das Cofaktorgleichgewicht vollständig auf der Seite des NADH angenommen und somit nur eine Abhängigkeit der Substratkonzentration betrachtet. Dies ist als erste Näherung zulässig, da das Gleichgewicht der durch die FDH katalysierten Reaktion mit einer Gleichgewichtskonstante von über 10.000^{154} auf Seiten des NADH liegt und die FDH im Überschuß eingesetzt wird.

¹⁵⁴ Wichmann et al. (1981): Biotechnol. Bioeng., 23, 2789.

4.5.1.3 Kontinuierliche Synthese im EMR

Die kontinuierliche Synthese von HHEE wurde in einem Enzymmembranreaktor (EMR) durchgeführt, wie er in 1.3.3 beschrieben wurde.

In den hier beschriebenen Synthesen kam ein gerührter und temperierter Edelstahlreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 10 mL zum Einsatz. Die verwendete Polyamid-Membran UF-PA 20 hat eine nominale Ausschlußgrenze von $20.000 \text{ g mol}^{-1}$. Diese erlaubt die nahezu vollständige ($> 99,9 \%$) Rückhaltung der Enzyme. Die Enzymkonzentration wurde auf einen Anfangsumsatz von 90 % eingestellt, der bei einer Verweilzeit τ von 1 h erreicht werden soll (Abb. 4-30a). Zum besseren Verständnis des Systems wurden nach einer Betriebsdauer von knapp 5 Tagen (112τ) verschiedene Verweilzeiten eingestellt, um den Umsatzverlauf zu studieren (Ausschnitt Abb. 4-30b). Die Simulation des Systems mit dem oben beschriebenen Modell zeigt eine recht gute Übereinstimmung mit den experimentell erhaltenen Umsätzen, wenn eine Desaktivierungskonstante von $5,2 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ für das Enzym eingesetzt wird. Dies entspricht einer Halbwertszeit von 9,3 d. Nach Einstellen der Ursprungsverweilzeit wird das erwartete Umsatzniveau erneut erreicht. Der Reaktorauslauf wird fraktionierte und gaschromatographisch analysiert.

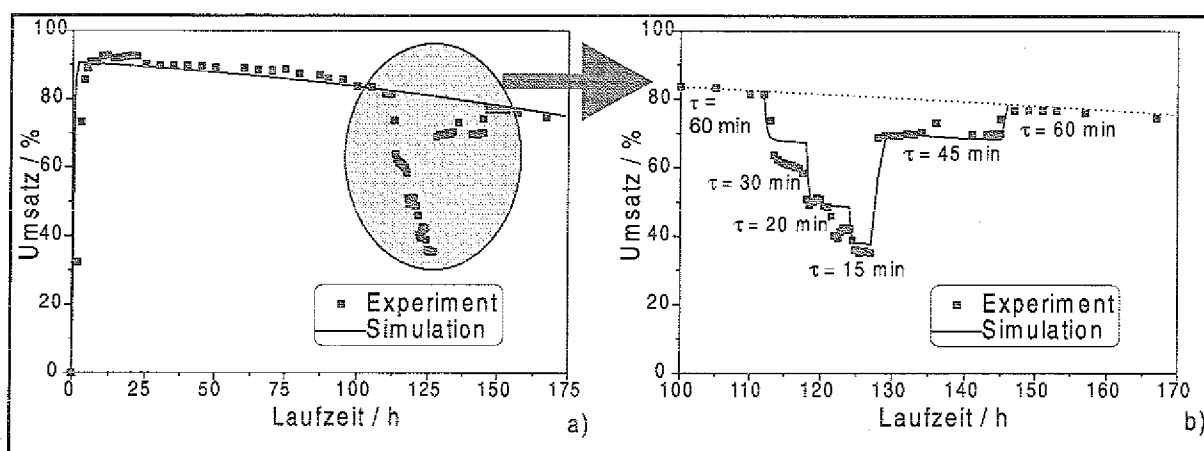


Abb. 4-30: Kontinuierliche Synthese von HHEE im EMR:

30 mM ABEE, 0,2 mM NAD^+ , 100 mM Formiat, 100 mM TEA-HCl-Puffer pH 7,8 mit 1 mM DTT¹⁵⁵, 1 U mL^{-1} CPCR, 2 U mL^{-1} FDH, 25 °C, $V_R=10 \text{ mL}$, $\tau=1 \text{ h}$ oder wie angegeben.

Die erreichbare maximale Zyklenzahl des Cofaktors ist gegeben durch den Quotienten aus Substrat- und Cofaktorkonzentration. Sie beträgt demnach bei vollem Umsatz $t_{\text{in}}=150$. Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) bei einer Verweilzeit von 1 h und einem Umsatz von 90 % beträgt $102 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Bei einer Verweilzeit von 15 min und einem Umsatz von 37 % werden

¹⁵⁵ Diese Konzentrationen wurden gewählt, um die Vergleichbarkeit zu kinetischen Assays zu wahren

bei sonst gleichen Verhältnissen $168 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht. Ob hier allerdings trotz höherer RZA ein solcher Betriebspunkt bei geringem Umsatz vorteilhaft ist, bleibt zweifelhaft. Extrapoliert man unter den gegebenen Bedingungen den Umsatzverlauf bis zur vollständigen Desaktivierung, ergibt sich als Integral die mit diesem Reaktor ohne Enzymdosierung maximal darstellbare Produktmenge von 13,7 g, für die 10 U *CPCR* eingesetzt wurden. Umgerechnet auf ein kg Produkt ergibt dies einen Enzymverbrauch von nur 730 U *CPCR*.

Die Aufarbeitung der ultrafiltrierten Produktlösungen erfolgt durch Extraktion der wäßrigen Phase mit Methylenchlorid. Nach Trocknung und Entfernung des Lösungsmittels wird das Substrat/Produktgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Es konnten insgesamt 8 g reines HHEE gewonnen werden. Die gaschromatographische Untersuchung des Trifluoressigsäurederivats auf einer chiralen Kapillarsäule (FS Lipodex E) ergab einen Enantiomerenüberschuß des Produktes von >99%. Die übrigen analytischen Daten zeigen Übereinstimmung mit der racemischen Referenzverbindung und der Literatur¹⁵⁶.

4.5.2 Reduktion von (3,4)-Methylenedioxyphenylaceton (MDA)

4.5.2.1 Substratauswahl

Während das oben beschriebene Substrat ABEE nur einen Modellcharakter hatte, soll in diesem Abschnitt auf ein wirtschaftlich wichtiges Substrat eingegangen werden.

Die Verwendung von enantiomerenreinen Wirkstoffen gewinnt gerade in der pharmazeutischen Industrie eine immer größere Bedeutung. Da meist nur ein Enantiomer therapeutisch aktiv ist, während das andere im besten Fall ungenutzt bleibt, im ungünstigen Fall jedoch starke Nebenwirkungen erzeugen kann, ist selbst bei racemisch in den Markt eingeführten und jahrelang bewährten Wirkstoffen der Übergang auf enantiomerenreine Verbindungen ein verbreitetes Anliegen. Diese, als *racemic switch*¹⁵⁷ bezeichnete Technik bietet neben den verbesserten therapeutischen Wirkungen auch erneuten Patentschutz für den Hersteller. Bei der Entwicklung neuer, chiraler Wirkstoffe hingegen wird direkt auf eine asymmetrische Syntheseroute geachtet.

Die hier untersuchte Reduktion von MDA zum entsprechenden enantiomerenreinen Alkohol MDI ist der erste und entscheidende Schritt einer Synthese des 2,3-Benzodiazepins LY300164, das sich in der klinischen Untersuchung bei ELI LILLY & CO. befindet. Es gehört

¹⁵⁶ Ishida et al. (1978): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 323.

Deslongchamps et al. (1975): Canad. J. Chem., 53, 1601.

¹⁵⁷ Stinson (1995): Chemical & Engineering News, 9.10., 44.

zu einer Substanzklasse, deren pharmakologische Aktivität in den frühen 90er Jahren am ungarischen Arzneimittelforschungsinstitut entdeckt wurde¹⁵⁸.

Die Erregbarkeit von Nervenzellen und die Weiterleitung der Reize ist eine zentrale Funktion des lebenden Organismus. Zur Erregungsübertragung setzt der Körper sog. Neurotransmitter ein, die an entsprechenden Rezeptoren, die in den Synapsen lokalisiert sind, registriert werden können. Wichtige Überträgerstoffe sind neben Acetylcholin, ATP und Monoaminen wie Adrenalin auch eine Reihe von sog. exzitatorischer Aminosäuren, unter ihnen besonders Glutaminsäure. Die entsprechenden Glutamatrezeptoren lassen sich in Subtypen aufteilen unter ihnen die Ionenkanalrezeptoren vom NMDA- (=N-Methyl-D-Aspartat), AMPA- (=α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-propionsäure) und Kainat Subtyp¹⁵⁹.

Die untersuchten 2,3-Benzodiazepine wirken als nichtkompetitive Antagonisten der Rezeptoren vom AMPA-Subtyp. Sie können daher als muskelentspannende und -entkrampfende Medikamente eingesetzt werden und schützen somit neuroprotektiv gegen Beschädigungen durch eine Blutunterversorgung des Gehirns, dem sog. ischämischen Schock.

Im Gegensatz zur ursprünglichen Synthese mit einer späten Racemattrennung verläuft die Synthese zur Bereitstellung von kg-Mengen für klinische Studien über eine siebenstufige Synthese, deren erster Schritt die enantioselektive Reduktion von MDA ist¹⁶⁰. Sie wird bei LILLY als Ganzzellbiotransformation mit *Zygosaccharomyces rouxii* durchgeführt¹⁶¹. Ein Adsorberharz, der sowohl Substrat als auch Produkt bindet, wird zur Erhöhung der Konzentration eingesetzt¹⁶².

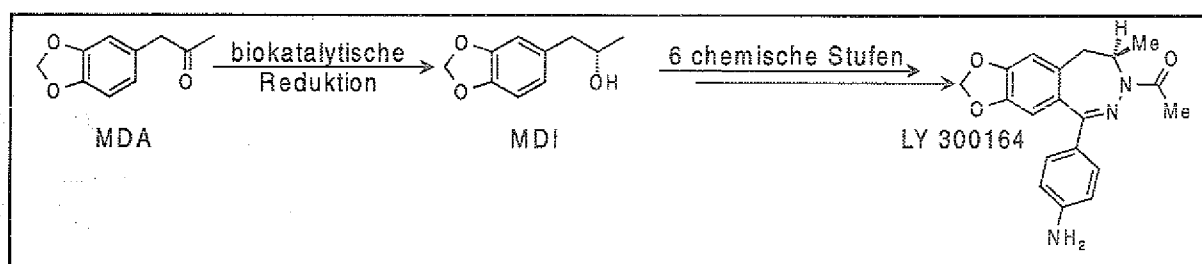


Abb. 4-31: Synthese von LY300164

¹⁵⁸ Taranava et al. (1993): Bioorg. Med. Chem. Lett., 3, 99.

Ling et al. (1995): Int. Patent WO 95/01357.

Ling et al. (1995): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 1423.

¹⁵⁹ Mutschler (1996): *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart.

¹⁶⁰ Anderson et al. (1995): J. Am. Chem. Soc., 117, 12358.

Anderson et al. (1996): Abstracts of the Papers of the American Chemical Society, 211, 11.

¹⁶¹ Zmijewski et al. (1997): Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, 162.

¹⁶² Vicenzi et al. (1997): Enzyme Microb. Technol., 20, 494.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die gleiche Reaktion unter Einsatz isolierter Enzyme als alternatives Katalysatorsystem untersucht werden.

4.5.2.2 Kinetische Beschreibung des Systems

Die Beschreibung des Reaktionssystems erfolgt, wie bereits in § 4.3.3.3 ausgeführt, nach einem formalen Doppelsubstratmodell nach MICHAELIS und MENTEN unter Berücksichtigung sowohl der Reduktionsreaktion als auch der Oxidationsreaktion mit ihren jeweiligen kompetitiven Inhibierungen.

$$V = \frac{V_{\max}^{\text{RED}} \cdot \frac{[S]}{K_M^S} \cdot \frac{[\text{NADH}]}{K_M^{\text{NADH}}} - V_{\max}^{\text{OX}} \cdot \frac{[P]}{K_M^P} \cdot \frac{[\text{NAD}]}{K_M^{\text{NAD}}}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M^S} + \frac{[P]}{K_M^P}\right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{NADH}]}{K_M^{\text{NADH}}} + \frac{[\text{NAD}]}{K_M^{\text{NAD}}}\right)} \quad \text{Gleichung 4-26}$$

mit: $[I]$ = Konzentration der Komponente I [mM]
 K_M^I = MICHAELIS-MENTEN-Konstante der Komponente I [mM]
 $V_{\max}^I$ = Maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion I [U mg⁻¹]

Zur Bestimmung der Einflüsse der einzelnen Komponenten wurden Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten durchgeführt und die gesammelten Meßwerte an das oben genannte Modell angepaßt. Abb. 4-32 zeigt ausgewählte Abhängigkeiten. In Tabelle 4-7 sind diese durch nichtlineare Regression erhaltenen Parameter dargestellt. Anhang A enthält die der Optimierung zugrundeliegenden Meßwerte und ein Listing des Optimiermodells.

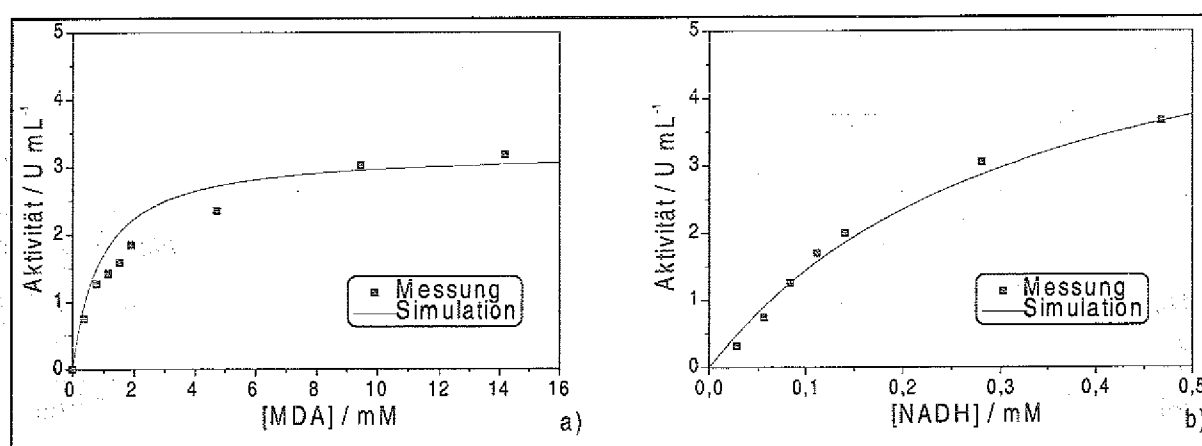


Abb. 4-32: Reduktionskinetik der CPCR (1,53 mg mL⁻¹) mit MDA als Substrat
 pH 7,0 (50 mM TEA/HCl), 25 °C, 340 nm
 a): Substratabhängigkeit: 0,3 mM NADH
 b) NADH-Abhängigkeit: 10 mM MDA

Parameter	Wert	Standardabweichung
$V_{\max}^{\text{RED}}$	4,3 U mg ⁻¹	± 9,0 %
$V_{\max}^{\text{OX}}$	2,2 U mg ⁻¹	± 10,0 %
K_M^{MDA}	0,88 mM	± 9,7 %
K_M^{MDI}	2,5 mM	± 20,3 %
K_M^{NADH}	0,32 mM	± 18,8 %
K_M^{NAD}	0,57 mM	± 14,0 %

Tabelle 4-7: Parameter der Kinetik der CPCR (1,53 mg mL⁻¹) mit MDA als Substrat

Die Reduktionsrichtung der Reaktion ist gegenüber der Oxidation klar bevorzugt. Nicht nur ist eine mehr als doppelt so hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten, vielmehr zeigen auch die K_M -Werte eine deutlich höhere Affinität des Ketons zum Enzym als die des Alkohols. Ähnliches ist beim Cofaktor zu beobachten. Verstärkt durch die Lage des Cofaktorgleichgewichtes bei Einsatz einer ausreichenden Menge FDH sollte ein nahezu vollständiger Umsatz an Substrat möglich sein. Erstaunlich ist, in Abweichung zum bisher Beschriebenen, der hohe K_M -Wert für die Cofaktoren. Es scheint auch das Substrat einen erheblichen Einfluß auf die Bindung des Cofaktors zu haben. Eine Absenkung der Cofaktorkonzentration weit unter den K_M -Wert ist aus kinetischen Gründen nicht sinnvoll. Ebenso wenig jedoch, in Hinblick auf die Zyklenzahl des Cofaktors, ein Anheben der Cofaktorkonzentration in die Sättigung. Die aus diesen Messungen gewonnenen Erkenntnisse wurden für die Simulation der Versuche eingesetzt, die mit den Ergebnissen beschrieben sind.

4.5.2.3 Synthese im EMR

Die Synthese im Enzymmembranreaktor wird analog zu § 4.5.1.3 durchgeführt.

Anhand dieser Synthese konnte die erstaunliche Betriebsstabilität des Zweienzymsystems erneut unter Beweis gestellt werden. Wie in Abb. 4-33 zu sehen, nimmt der Umsatz der Reaktion bei einer Prozeßdauer von nahezu drei Wochen nur geringfügig ab. Durch Simulation des Umsatzverlaufes konnte eine Desaktivierungskonstante von $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ errechnet werden, was einer Halbwertszeit von 27,8 d entspricht. Dieser Wert steht in Übereinstimmung mit denen von LIESE¹⁶³ bei der Reduktion von 2-Octanon erhaltenen Werten.

¹⁶³ Liese et al. (1998): J. Mol. Cat. B Enzymatic, 4, 91.

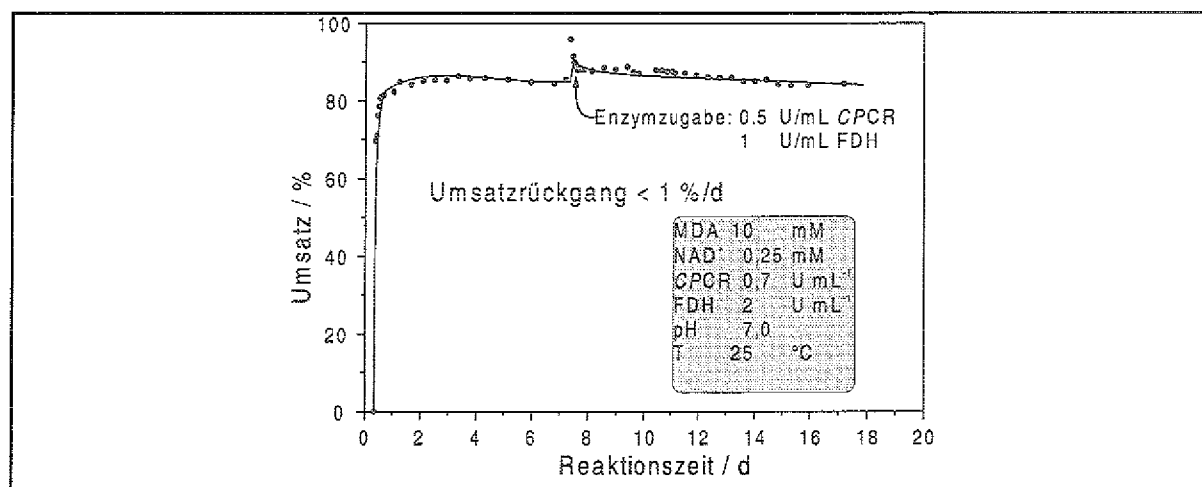


Abb. 4-33: Reduktion von MDA im EMR

Bedingt durch die geringe Substratlöslichkeit in der Größenordnung von 20 mM ist allerdings leider sowohl die Zyklenzahl des Cofaktors mit einem Maximum von 35 recht gering als auch das anfallende Wasservolumen recht hoch. Wie Abb. 4-34 zeigt, konnte die Raum-Zeit-Ausbeute des Reaktors durch Erhöhung der Enzymkonzentration auf 2 U mL^{-1} und durch stufenweise Verringerung der Verweilzeit auf 10 min bis zu einem Wert von $225 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht werden.

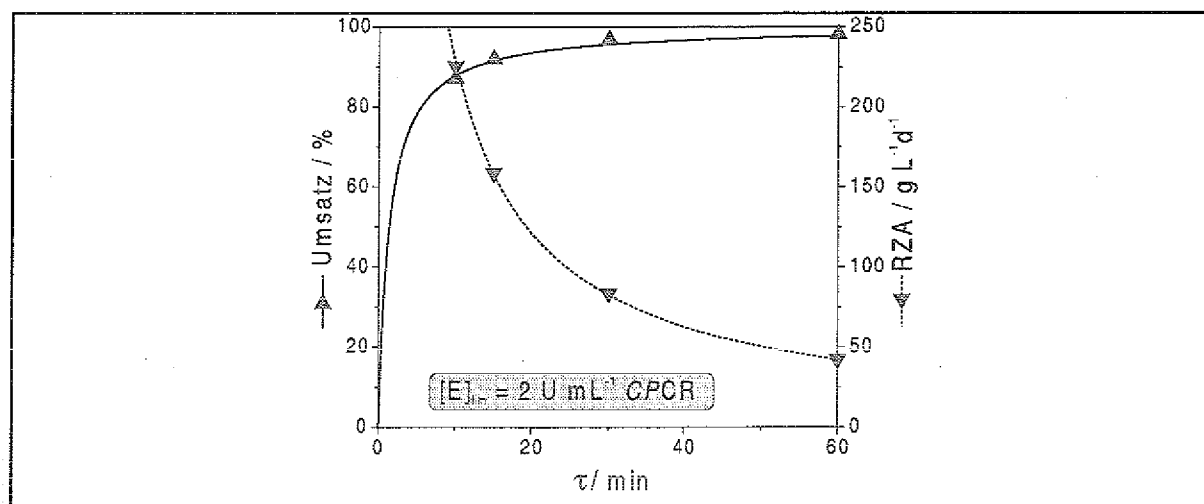


Abb. 4-34: Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit vom Umsatz

Um eine wirtschaftliche Synthese durchführen zu können, muß die Zyklenzahl des Cofaktors erheblich gesteigert werden. Dies ist unter anderem durch folgende Methoden möglich:

- Erhöhung der Substratkonzentration durch Zusatz von Lösungsvermittlern oder Komplexbildnern¹⁶⁴.
- Retention des nativen Cofaktors an einer Nanofiltrationsmembran¹⁶⁵ (§ 3.5.2) oder an einer geladenen Ultrafiltrationsmembran¹⁶⁶.
- Verwendung eines polymervergrößerten Cofaktors (z.B.: PEG-NADH)¹⁶⁷.
- Immobilisierung von Enzym und Cofaktor in Mikrokapseln¹⁶⁸ bei Einsatz in organischen Medien.
- Rezyklisierung der cofaktorhaltigen Phase¹⁶⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die letzten beiden Möglichkeiten untersucht.

Die Mikroverkapselung in auf Alginat basierende Mikrokapseln beeinträchtigte die Stabilität der Enzyme und führte zu Diffusionsproblemen beim Transport von Substrat und Produkt aus dem organischen Reaktionsmedium in die wässrige Mikrosphäre und zurück. Die Synthese in einem Festbett-Säulenreaktor aus Mikrokapseln konnte somit nicht zu konstantem Umsatz gebracht werden.

4.5.2.4 Reaktorkonzept des Zweiphasenmembranreaktors (ZPMR)

Um eine verbesserte Nutzung des Cofaktors zu erreichen und gleichzeitig das notwendige Wasservolumen zu reduzieren und einen Teil der Aufarbeitung in den Reaktor zu integrieren, wurde ein Zweiphasenmembranreaktor genutzt, dessen Schema in Abb. 4-35 dargestellt und im folgenden näher erläutert wird.

¹⁶⁴ Zelinski et al. (1997): *Biocatal. Biotransform.*, **15**, 57.

¹⁶⁵ Seelbach et al. (1997): *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 389.

Lin et al. (1997): *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 54.

¹⁶⁶ Röthig et al. (1990): *Biotechnol. Lett.*, **12**, 353.

Obon et al. (1996): *J. Biotechnol.*, **50**, 27.

Nidetzky et al. (1996): *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 389.

¹⁶⁷ Lin et al. (1997): *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 54, Larsson et al. (1974): *FEBS Lett.*, **46**, 119.

Bückmann et al. (1981): *J. Appl. Biochem.*, **3**, 301.

¹⁶⁸ Rilling et al. (1996): *International Workshop Bioencapsulation V*, Potsdam.

¹⁶⁹ Kruse et al. (1996): *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **115**, 239.

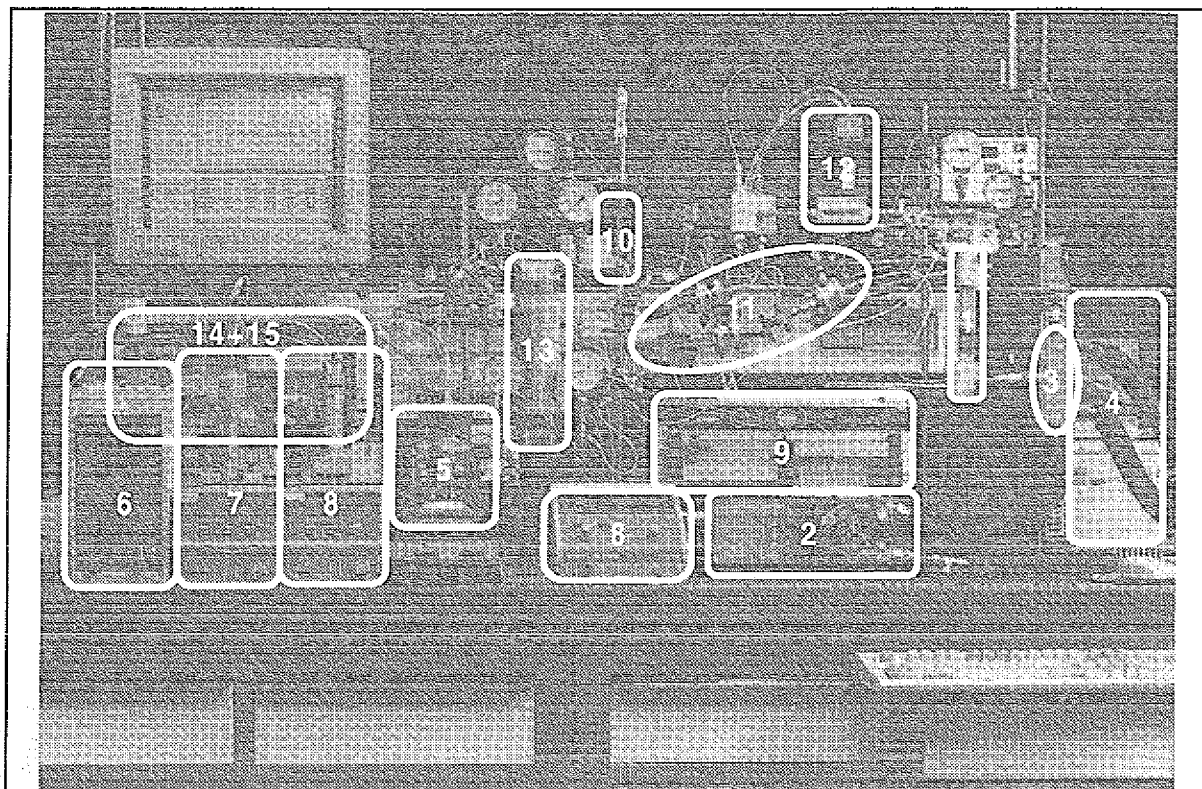


Abb. 4-37: Bezeichnung der Komponenten im ZPMR

Der Reaktor ist aus insgesamt drei Kreisläufen aufgebaut, die in ihrer Funktion und Konstruktion nun einzeln erläutert werden. Die Nummern im Text entsprechen den Bezeichnungen in Abb. 4-37.

1. EMR-Kreislauf

Das Reaktionsvolumen besteht aus einem Hohlfasermodul (1) mit hydrophiler Ultrafiltrationsmembran, an der die Trennung von Enzymen und übrigen Bestandteilen der Lösung durchgeführt wird. Die enzymhaltige Lösung wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe (2) durch isolierte Teflonschläuche in das Membranmodul gepumpt, an dessen Auslauf eine Blasenfalle und ein temperiertes Gefäß zur Volumenvergrößerung (3) angebracht ist. Der Druck im Kreislauf wird am Manometer angezeigt und elektronisch aufgenommen. Über einen Thermofühler wird die Temperatur im Reaktor gemessen und über ein angeschlossenes Heizbad (4) geregelt. Im Volumengefäß ist der Zulauf, an der Mantelseite des Hohlfasermoduls der Ablauf des Reaktors angebracht. Die Umpumprate wird auf 5 L h^{-1} eingestellt, so daß eine gleichmäßige Verteilung aller Komponenten im Reaktionsraum gewährleistet ist und der Reaktor sich wie ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR) verhält. Das Volumen des Kreislaufes beträgt minimal 39 mL. Es wurden Volumina von 39 und 78 mL genutzt. Nur in diesem Kreislauf sind die Enzyme enthalten und nur hier findet die Reaktion statt.

2. Wäßriger Kreislauf

In diesem Kreislauf werden Cofaktor und Formiat rezykliert. Der Kreislauf besteht aus einem auf 4°C gekühlten und intensiv gerührten Mischgefäß (5), in dem Substrat mit Hilfe eines Dispensers (6) und Cofaktor mit Hilfe eines Dosimaten (7) nachdosiert wird. Ferner wird der pH-Wert gemessen und durch Titration von 50 % (v/v) Ameisensäure titriert (8). Aus diesem

Mischgefäß wird die Reaktionslösung mit Hilfe einer Doppelkolbenpumpe (9) durch eine Blasenfalle (10) und eine zweistufige Sterilbarriere (11) in den EMR-Kreislauf gepumpt. Der Druck vor den Sterilfiltern wird angezeigt und aufgezeichnet, so daß ein Verstopfen dieser Filter an der steigenden Druckdifferenz zwischen Zulauf und EMR erkannt werden kann. Durch Umschalten auf den zweiten Sterilisationsweg kann ohne Unterbrechung der Reaktion und unter Garantie der Sterilität der Filter getauscht werden. Die Blasenfalle besitzt ein Septum, durch das Enzyme zugegeben werden können. Am Auslauf des EMR wird der Druck hinter der Membran elektronisch gemessen und geregelt (12). Dies ist notwendig, um ein Ausgasen von Kohlendioxid im EMR zu vermeiden. Auf der Niederdruckseite wird der Volumenstrom in ein Extraktionsmodul (13) mit einer hydrophoben Mikrofiltrationsmembran geführt. In ihm werden membrangestützt hydrophobe Bestandteile der Lösung durch Phasenkontakt mit dem organischen Kreislauf (s.u.) extrahiert. Funktion und Leistungsfähigkeit der membrangestützten Extraktion sind weiter unten beschrieben. Zwei 3-Wege-Magnetventile (14) erlauben den Kurzschluß der Extraktion. Am Auslauf des Extraktionsmoduls (13) ist ein zweiter Druckregler (12) angebracht, der einen konstanten Überdruck der wäßrigen Phase gegenüber der organischen von 0,25 bar aufrechterhält. Die extrahierte Lösung wird dann wieder in das Mischgefäß geleitet und der Kreislauf somit geschlossen. Die wäßrige Phase, also Kreisläufe 1 und 2, haben ein Gesamtvolumen von ca. 450 mL, von denen sich etwa 200 mL im Mischgefäß (5) befinden und 150 mL im Extraktionsmodul (13).

3. Organischer Kreislauf

Der organische Kreislauf dient der Extraktion des Produktes (neben nicht umgesetzten Substratresten). Als Extraktionsmittel wird *iso*-Octan genutzt. Er durchläuft die Mantelseite des Extraktionsmoduls (13) im Gegenstrom zum wäßrigen Kreislauf. Der Durchlauf durch das Modul verläuft nahezu ohne Druckverlust unter Normaldruck. Der Auslauf des Moduls wird in einem Kolben aufgefangen. Aus diesem pumpt eine Doppelkolbenpumpe (15) das Lösungsmittel in einen kontinuierlich betriebenen Rotationsverdampfer (nicht abgebildet), der unter vermindertem Druck betrieben wird. Das Kondensat wird mit einer zweiten Doppelkolbenpumpe (15) wieder in das Extraktionsmodul (13) gepumpt. Die Pumpen dienen als Druckbarrieren und erlauben den Betrieb des Extraktionsmoduls (13) unter Normaldruck. Das Volumen des organischen Kreislaufes beträgt ca. 800 mL, wobei sich 245 mL im Extraktionsmodul (13) und ca. 400 mL im Rotationsverdampfer befinden. Dies geringe Volumen erlaubt es, ohne besondere Vorkehrungen bzgl. Explosionsschutz, die brennbare Flüssigkeit in normalen Laborgeräten zu verwenden.

Meßdatenerfassung

Die Meßdaten des Reaktors werden mittels eines Siemens SMP[®]-Interfaces digitalisiert und mit Hilfe des Programms MEDUSA auf einem PC aufgezeichnet. Erfäßt werden alle Drücke, Soll- und Ist-Werte der Regler und die Temperatur im EMR. Dies erlaubt es, den Reaktor auch ohne ständige Anwesenheit kontrollieren zu können und evtl. auftretende Fehler diagnostizieren zu können.

Membrangestützte Extraktion mit LIQUICEL[®]-Modul

Die membrangestützte Extraktion bietet die Möglichkeit, durch Gegenstromführung mehrere Extraktionsstufen in einem besonders kompakten Gerät vereinen zu können. Eine mikroporöse hydrophobe Polypropylenmembran dient hierbei zur Stabilisierung der Pha-

sengrenze. Sie wird von der organischen Phase benetzt, die auch in die Poren eindringt. Durch leichten Überdruck der wäßrigen Phase wird ein Durchtritt (*wetting*) des organischen Lösungsmittels verhindert. Der direkte Phasenkontakt findet also in den Poren der Membran statt, wie dies Abb. 4-38 zeigt. Unter dem Markennamen LIQUICEL[®] vertreibt CELANESE Membrankontaktoren, die sowohl zum Gasstripping, wie zum flüssig-flüssig-Phasenkontakt eingesetzt werden können und in verschiedenen Größen erhältlich sind. Genutzt wird eine CELGARD[®] X30 240 Polypropylenmembran mit einer Porengröße von 0,3 µm und einer Porosität von 40 %. Die Hohlfasern haben einen Außendurchmesser von 300 µm und eine Wandstärke von 28 µm. Das verwendete 2,5 x 8 in-Modul (Abb. 4-39) weist eine effektive Membranfläche von 1,4 m² auf.

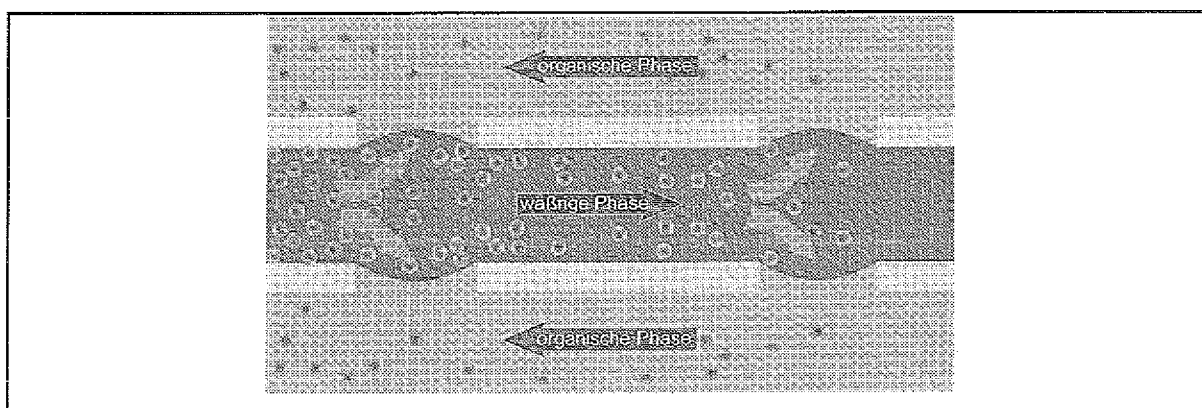


Abb. 4-38: Prinzip der membrangestützten Extraktion

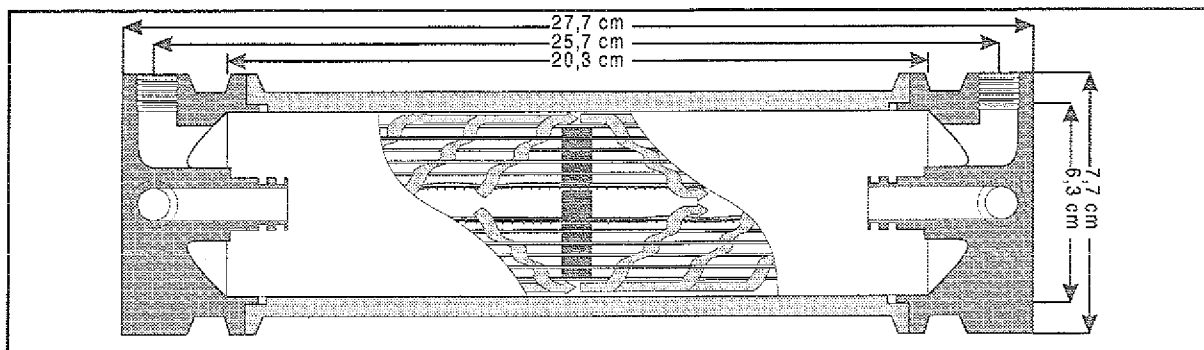


Abb. 4-39: Schnitt des verwendeten LIQUICEL-Moduls 2,5 x 8 in.

Die Theorie der Membranextraktion wurde vornehmlich durch die Arbeiten aus den Arbeitsgruppen um SIRKAR¹⁷⁰, CUSSLER¹⁷¹ und NITSCH¹⁷² beschrieben, die auch Modelle

¹⁷⁰ Prasad et al. (1986): J. Membrane Sci., 26, 79.

Prasad et al. (1988): AIChE J., 34, 177.

Prasad et al. (1990): J. Membrane Sci., 50, 153.

¹⁷¹ D'Elia et al. (1986): J. Membrane Sci., 29, 309.

Reed et al. (1995): Membrane Contactors in: Noble et al.: Membrane Separations Technology, Elsevier, Amsterdam, 2, 467.

¹⁷² Daiminger et al. (1995): Chem.-Ing.-Tech., 67, 217.

Geist et al. (1997): Chem.-Ing.-Tech., 69, 946.

zur Simulation von Membranextraktionen aufstellten. Eine Übersicht ist im „Membrane Handbook“¹⁷³ gegeben, auf der auch die folgenden Ausführungen basieren.

Die Effektivität eines Extraktionsmoduls wird in Analogie z.B. zu einer Rektifikationskolonne gegeben durch:

$$L = \text{LTU} \cdot \text{NTU}$$

Gleichung 4-27

mit: L = Länge des Extraktionsmoduls

LTU = Länge einer theoretischen Trenneinheit

NTU = Anzahl der theoretischen Trenneinheiten

Hierbei ist es möglich, durch die Gegenstromführung mehrere theoretische Trenneinheiten, die jeweils einem idealen *mixer-settler* entsprechen, in einem Apparat zu kombinieren. Diese Gleichung läßt sich als Abhängigkeit der Konzentrationsdifferenzen, Faser Eigenschaften und eines mittleren Stoffübergangskoeffizienten ausdrücken. Dieser wiederum wird als Summe der Stoffübergangswiderstände der beiden Phasen und der Membran erhalten. Für alle diese Teile sind experimentelle Gleichungen beschrieben, die in Abhängigkeit der jeweiligen Reynolds-, Schmidt- und Sherwoodzahlen zur Schätzung von Extraktionsleistungen herangezogen werden können. Es gilt:

$$L = \underbrace{\frac{Q_W}{K_W (\pi d_{fi} \cdot N)}}_{\text{LTU}} \cdot \underbrace{\frac{1}{1 - \frac{Q_W}{m_i Q_O}} \cdot \ln \left[\frac{C_{iW}^{\text{in}} - C_{iO}^{\text{out}} / m_i}{C_{iW}^{\text{out}} - C_{iO}^{\text{in}} / m_i} \right]}_{\text{NTU}}$$

Gleichung 4-28

mit: Q_W = Fluß auf der Wasserseite [mL s⁻¹]

Q_O = Fluß auf der organischen Seite [mL s⁻¹]

K_W = Gesamtmassentransferkoeffizient (Wasserphase) [cm s⁻¹]

d_{fi} = Faserinnendurchmesser [cm]

m_i = Verteilungskoeffizient der Komponente i [-]

C_i = Konzentration von i in der jeweiligen Phase am Ein- oder Auslaß [mM]

Das Listing eines Simulationsmodells, mit dem sich der Extraktionsgrad abschätzen läßt, ist in Kap. 7.3.7.4 (S. 125) gegeben. Hierin sind auch die Ausdrücke für die Bestimmung des Gesamtmassenübergangskoeffizienten enthalten.

Die so simulierte Extraktionseffektivitäten erlauben es, die notwendigen Flüsse der Extraktion abzuschätzen. Abb. 4-40 zeigt eine Simulation der Extraktion einer 10 mM Lösung

¹⁷³ Ho et al. (1992): *Membrane Handbook*, Chapman & Hall, New York, 954.

einer Komponente mit einem Verteilungskoeffizient von 2. Bei konstantem Fluß von 78 mL h^{-1} wird der Fluß auf der organischen Seite variiert.

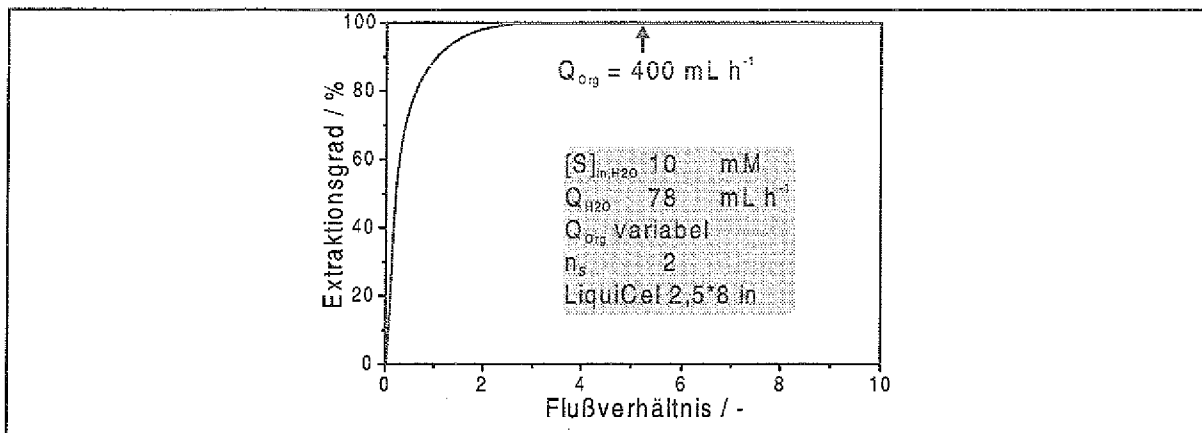


Abb. 4-40: Simulation der Extraktionseffektivität

Deutlich ergibt sich, daß das Leistungspotential des verwendeten Moduls bei den durchgeführten Extraktionen nicht ausgeschöpft wird. Bei dem verwendeten Flußverhältnis von 1:5,1 werden selbst bei diesem kleinen Verteilungskoeffizienten von 2, der dem des MDI entspricht, mehr als 99 % der Substanz extrahiert. Experimente mit den verschiedenen zu extrahierenden Substanzen konnten die theoretisch gefundenen Werte insofern bestätigen, daß eine nahezu vollständige Extraktion in allen Fällen gefunden wurde. Um das Modell genauer zu überprüfen, wären sehr viel höhere Flüsse notwendig, die jedoch weit über denen liegen, die zum Betrieb des ZPMR notwendig sind. Die Simulation gibt selbst bei einem Fluß von 5 L h^{-1} noch eine Extraktionsrate von 86 % bei sonst gleichen Bedingungen wie oben.

Bei Betrieb und Simulation des ZPMR kann somit von einer vollständigen Entfernung der hydrophoben Komponenten ausgegangen werden, während, auch experimentell, weder eine Extraktion von Formiat, noch von Cofaktor festgestellt werden konnte.

4.5.2.5 Synthese in ZPMR

Die Synthese von enantiomerenreinem MDI konnte erfolgreich im oben beschriebenen ZPMR durchgeführt werden. Abb. 4-41 zeigt nicht nur den konstant hohen Umsatz über einen Zeitraum von 120 Verweilzeiten bei einer RZA von $41 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, sondern führt auch deutlich die Wichtigkeit des einphasigen Betriebs vor Augen. Nachdem die Verweilzeit auf 30 min verringert wurde, konnte im Mischgefäß die Ausbildung von feinen Substrattropfen beobachtet werden. Dies ist auf die nicht mehr ausreichende Mischzeit zurückzuführen und führte innerhalb kurzer Zeit zu rapider Umsatzabnahme.

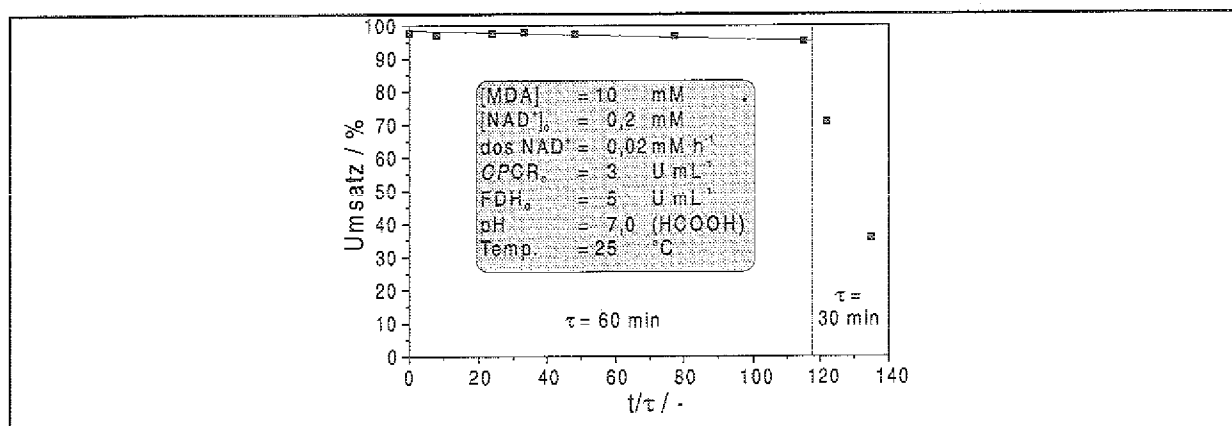


Abb. 4-41: Reduktion von MDA im ZPMR

Die Cofaktorkonzentration wurde mit einem Anfangswert von 0,2 mM vorgelegt. Eine kontinuierliche Nachdosierung ersetzte 10 % des Cofaktors pro Verweilzeit. Der Cofaktorverbrauch konnte also um den Faktor 10 verringert werden. Der gleichmäßige Verbrauch der Ameisensäure zeigte einen gleichbleibenden Umsatz an. Aus dem Verbrauch könnte zwar prinzipiell im Gleichgewicht der Umsatz errechnet werden, jedoch ist dieses Verfahren mit großem Fehler behaftet und es wurde daher auf eine gaschromatographische Umsatzbestimmung von Proben am Reaktorauslauf zurückgegriffen. Das für die Reaktion notwendige Volumen der wässrigen Phase wurde am Anfang der Reaktion vorgelegt und danach nur noch um einen geringen Beitrag durch die Dosierung der NAD⁺-Lösung vergrößert. Dies entspricht über die Gesamtreaktionszeit einer Reduktion des Volumens um den Faktor 25. Abb. 4-42 veranschaulicht dies graphisch.

Eine weitere Reduzierung des Cofaktorgebrauches lässt sich, wie bereits KRUSE¹⁷⁴ ausführte, durch die Vergrößerung des Reaktionsraums und damit Verschiebung des Verhältnisses zwischen Reaktorvolumen und Gesamtvolumen der wässrigen Phase erreichen.

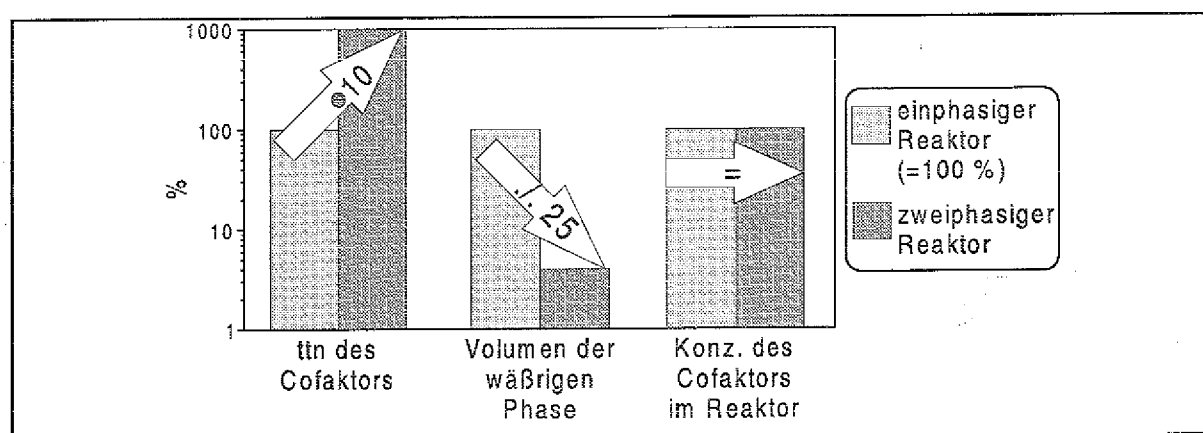


Abb. 4-42: Parameter des ZPMR

¹⁷⁴ Kruse (1995): Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Im Verdampferkolben des Rotationsverdampfers sammelte sich ein Gemisch aus Produkt und nicht umgesetztem Substrat. Diese Mischung konnte aufgrund der ähnlichen Siedepunkte von Keton und Alkohol nicht destillativ getrennt werden, so daß eine Abtrennung des verbleibenden Ketons säulenchromatographisch an Kieselgel erfolgte. Es wurde die Produktlösung verschiedener Versuche gemeinsam aufgearbeitet und so 24,8 g reines MDI mit einem Enantiomerenüberschuß von > 99 % (HPLC) und einer Reinheit von > 99 % gewonnen.

4.5.3 Reduktion von Acetophenon

4.5.3.1 Substratauswahl

Als dritter Vertreter der Klasse schlechtlöslicher Ketone wurde Acetophenon (AcPhe) ausgewählt, welches zu enantiomerenreinem (S)-1-Phenylethanol (PheEt) reduziert wird. Dieses Substrat dient zum Vergleich der enzymatischen Synthese im Zweiphasenmembranreaktor mit einer chemischen Synthese. In diesem Abschnitt sollen nun kurz die Experimente zur enzymatischen Synthese dargestellt werden, bevor in § 4.6 der Vergleich beschrieben wird.

4.5.3.2 Kinetische Beschreibung des Systems

Die kinetische Beschreibung des Acetophenon-Systems erfolgt analog zur Vorgehensweise bei MDA. Die Techniken und Gleichungen wurden bereits dort beschrieben (§ 4.5.2.2), so daß an dieser Stelle nur noch die Ergebnisse dargelegt werden:

Parameter	Wert	Standardabweichung
$V_{\max}^{\text{RED}}$	5,4 U mg ⁻¹	± 4,3 %
$V_{\max}^{\text{OX}}$	11,2 U mg ⁻¹	± 7,7 %
K_M^{AcPhe}	0,04 mM	± 25,0 %
K_M^{PheEt}	0,12 mM	± 24,5 %
K_M^{NADH}	8,7 µM	± 24,5 %
K_M^{NAD}	0,81 mM	± 27,9 %

Tabelle 4-8: Parameter der Kinetik der *CPCR* (0,13 mg mL⁻¹) mit Acetophenon als Substrat

Im Gegensatz zu einer recht guten Anpassung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sind bei den MICHAELIS-MENTEN-Konstanten der Komponenten größere Standardabweichungen zu beobachten. Da allerdings das Modell die Meßwerte mit einer Korrelation von 98,3 % bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt, ist von einer ausreichend genauen Erfassung der Kinetik auszugehen.

In Abb. 4-43 ist basierend auf den kinetischen Berechnungen die Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Umsatz und die NADH-Konzentration aufgetragen. Hierbei wurde die Gesamtkonzentration an Cofaktor konstant gehalten. Hohe NADH-Konzentrationen sind somit Ausdruck für eine effektive Cofaktorregenerierung bei erhöhten FDH-Konzentrationen. Es ist klar ersichtlich, daß bereits bei einer NADH-Konzentration von 0,1 mM (also $[\text{NADH}]:[\text{NAD}^+] = 1:1$) ein Gleichgewichtsumsatz von über 98 % erreicht werden kann. Dies ist mit dem Erreichen der schattierten Bodenfläche angedeutet.

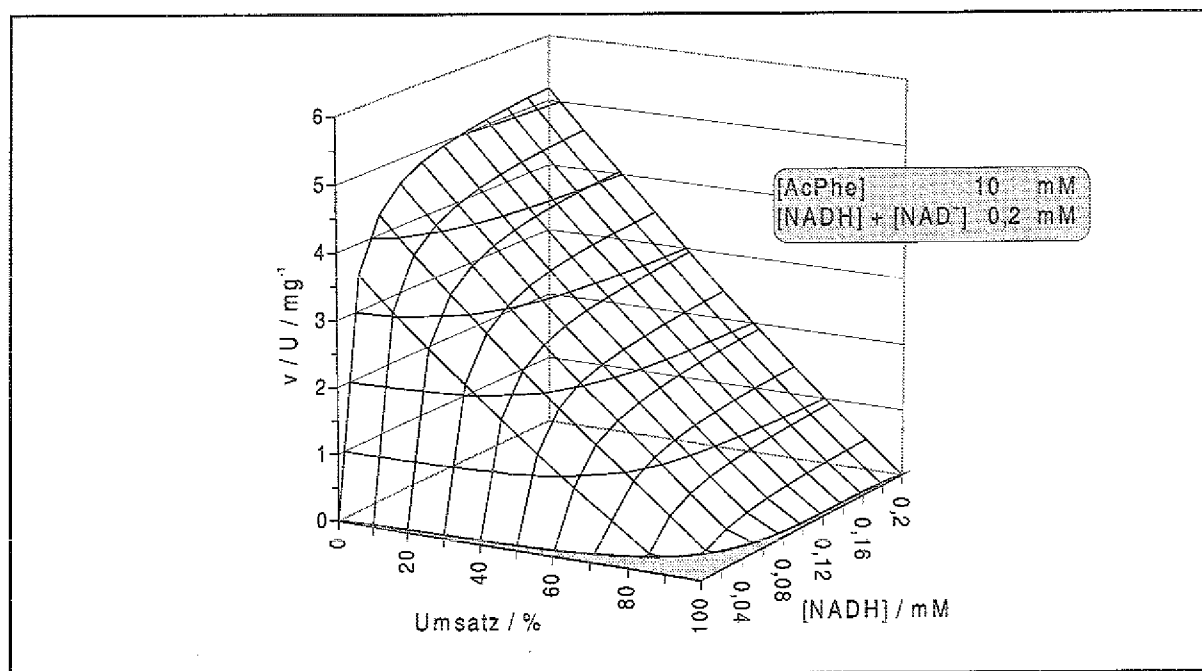


Abb. 4-43: Simulation der Reaktionsgeschwindigkeit über Umsatz und [NADH]

Zur Überprüfung der Kinetik wurden Versuche im Satzreaktor angepaßt. Abb. 4-44 zeigt ein Beispiel. Trotz des einfachen Modells und der recht großen Standardabweichung bei einigen Parametern ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment. Das Listing des Simulationsmodells ist in Anhang A enthalten.

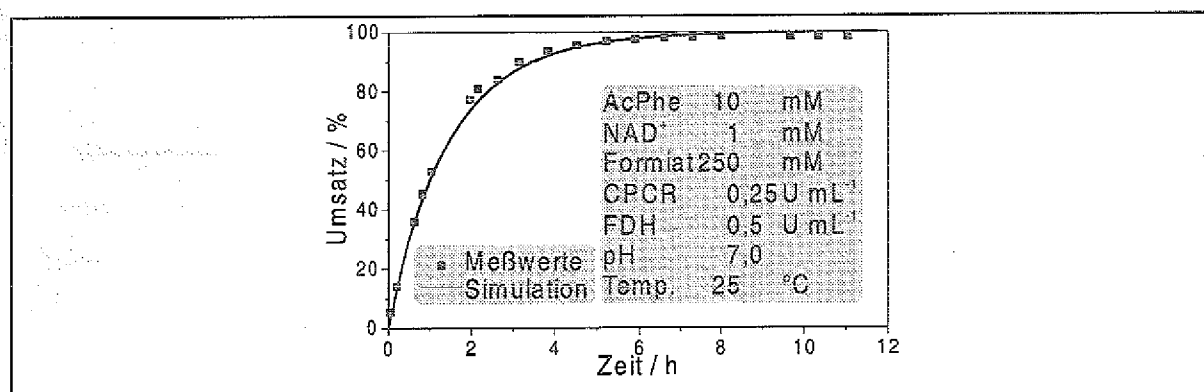


Abb. 4-44: Reduktion von Acetophenon im Satzreaktor mit Simulationskurve

4.5.3.3 Synthese in ZPMR

Auch die Synthese von enantiomerenreinem (S)-1-Phenylethanol wurde im in 4.5.2.4 beschriebenen ZPMR durchgeführt. Erfolgreich konnte bei einer Substratkonzentration von 10 mM und einer Verweilzeit von 1 h ein konstant hoher Umsatz von etwa 95 % ohne Enzymdosierung aufrechterhalten werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) lag bei $27,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Cofaktordosierung wurde so eingestellt, daß pro Verweilzeit 0,02 mM Cofaktor ersetzt wurden. Dies führte zu einer ttn des Cofaktors von 475. Dieser Wert, wie auch die RZA, konnte durch Erhöhung der Substratkonzentration bei Beibehaltung der Cofaktordosierung und aller weiteren Parameter gesteigert werden. Die Verdopplung auf 20 mM führte zu einem Umsatzabfall auf 85 %, bei einer Erhöhung der RZA auf 52,1 und der ttn des Cofaktors auf 850. Auch hier blieb der Umsatz stabil. Eine weitere Verdopplung der Substratkonzentration auf 40 mM führte, wie bereits beim MDA, zur Bildung einer zweiten Phase im Mischgefäß, da bei 4°C die maximale Löslichkeit von Acetophenon in Wasser überschritten war. Dies führte zu einer raschen Umsatzabnahme. Im Anfang konnte jedoch noch eine RZA von $87,8 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und eine ttn des Cofaktors von 1430 erreicht werden. Abb. 4-45 zeigt den Umsatzgraphen des beschriebenen Experiments.

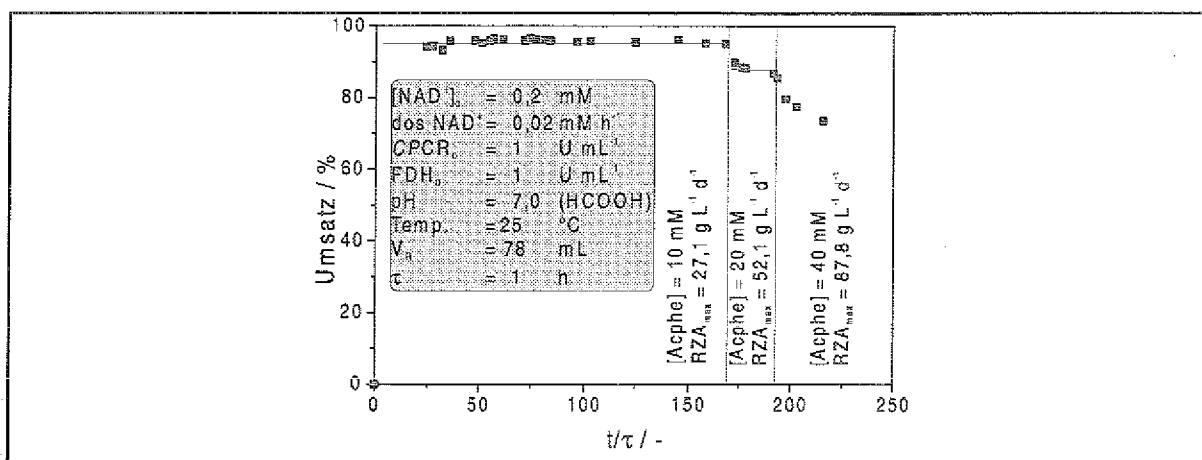


Abb. 4-45: Reduktion von Acetophenon im ZPMR

Aus dem Sumpf der Destillation konnten 10,2 g (S)-1-Phenylethanol aufgereinigt werden. Die Abtrennung von Substratresten erfolgte durch Bildung des 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Derivats der Carbonylverbindung, die quantitativ als rotoranger Feststoff abgesaugt werden konnte. Die anschließende Destillation ergab das reine ($> 99\%$, GC) Produkt mit $> 99\%$ (GC) Enantiomerenüberschuß.

Weitere Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt, in dem dieses Verfahren mit einer chemischen Reduktionsmethode verglichen wird.

4.6 Reduktion von Acetophenon: Ein Verfahrensvergleich¹⁷⁵

In diesem Kapitel werden zwei Reduktionsverfahren für Acetophenon in Hinblick auf Raum-Zeit-Ausbeute, Zyklenzahl des Katalysators und einer Anzahl weiterer Parameter miteinander verglichen.

Acetophenon wurde als Modellsubstrat gewählt, da für dieses Substrat eine Reihe von enantioselektiven Reduktionsmethoden beschrieben sind, die heterogene oder homogene Chemokatalysatoren oder Biokatalysatoren verwenden¹⁷⁶. Eine weit verbreitete chemische Route, die 1,3,2-Oxazaborolidine (OAB) als chiralen Homogenkatalysator nutzt, wurde von ITSUNO und Mitarbeitern¹⁷⁷ entwickelt und nachfolgend von COREY, BAKSHI und SHIBATA¹⁷⁸ verbessert (CBS-Reduktion). Zum Vergleich dient das in §4.5 beschriebene enzymatische Verfahren, das die Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR)¹⁷⁹ nutzt. Da das Substrat in beiden Verfahren mit guter Aktivität und Selektivität umgesetzt wird, ist ein direkter Vergleich der Methoden möglich. Der organische Katalysator wurde an lösliches Polystyrol geknüpft, so daß beide Katalysatoren an Ultra- oder Nanofiltrationsmembranen zurückgehalten werden können.

4.6.1 Die Reaktionssysteme

Die Synthese und Eigenschaften des polymervergrößerten Oxazaborolidinkatalysators wurde von GIFFELS¹⁸⁰ beschrieben, die Carbonylreduktase wurde bereits in §4.2 vorgestellt. Im Falle des chemischen Katalysators wird die aktive Spezies *in situ* aus der Katalysatorvorstufe und Boran als Wasserstoffdonor gebildet. Neben der enantiospezifischen katalysierten Reduktion wird das Substrat auch ohne Katalysator durch Boran reduziert, wobei das racemische Produkt entsteht (Abb. 4-46a).

Das Enzym hingegen bezieht den Wasserstoff über den Cofaktor NADH. Dieser wird durch die Formiatdehydrogenase regeneriert, so daß im Endeffekt Formiat der Wasserstoffdonor

¹⁷⁵ Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind veröffentlicht in: Rissom et al. (1998): Tetrahedron: Asymm., eingereicht.

¹⁷⁶ Noyori (1994): *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York.

¹⁷⁷ Hirao et al. (1981): J. Chem. Soc., Chem. Commun., 315.

Itsuno et al. (1983): J. Chem. Soc., Chem. Commun., 469.

Itsuno et al. (1984): J. Org. Chem., 49, 555.

¹⁷⁸ Corey et al. (1987): J. Am. Chem. Soc., 109, 5551.

¹⁷⁹ Peters et al. (1993): Enzyme Microb. Technol., 15, 950.

Peters et al. (1993): Biocatalysis, 8, 31.

¹⁸⁰ Giffels (1997): Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

Giffels et al. (1998): Tetrahedron: Asymm., 9, 691.

ist (Abb. 4-46b). Auf die Vorteile dieser Verfahrensweise wurde bereits hingewiesen (§ 3.1.3).

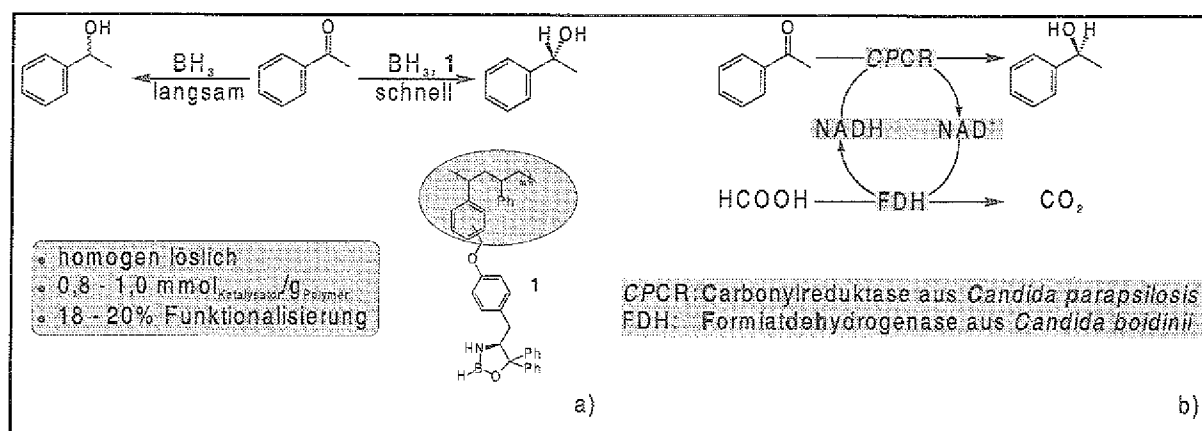


Abb. 4-46: Reaktionsschemata

4.6.2 Kinetisches Verhalten

Bei beiden Systemen wurde die Reaktionskinetik durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ermittelt. Für den Oxazaborolidinkatalysator wird eine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit einem K_M von 2,8 mM für Acetophenon beobachtet (Abb. 4-47a). Für die unkatalysierte Reaktion wird bei konstanter Borankonzentration eine Reaktion erster Ordnung beobachtet.

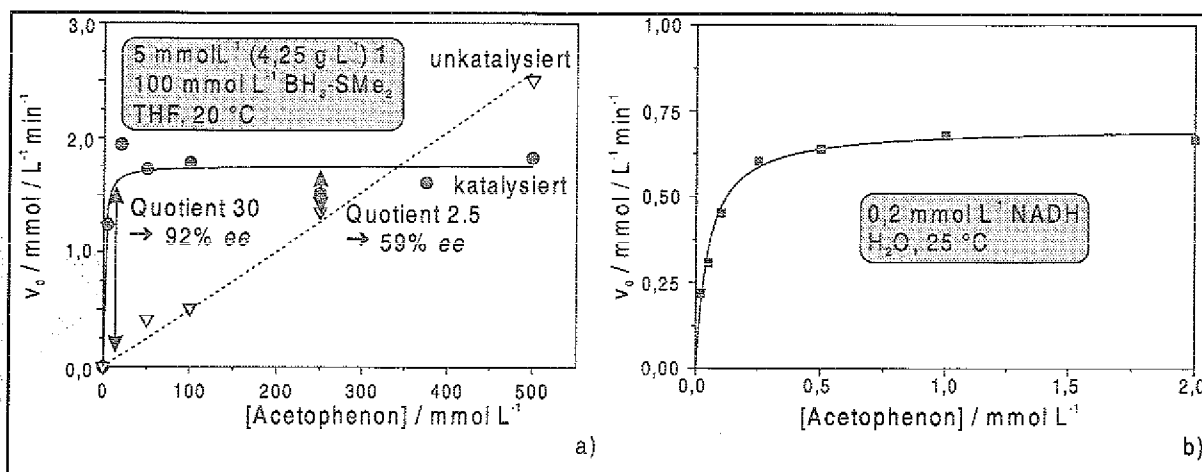


Abb. 4-47: Kinetiken der Reduktion

Es wird deutlich, daß bei geringer Ketonkonzentration das beste Verhältnis zwischen unkatalysierter und katalysierter Reaktion erreicht werden kann und somit die höchsten ee-Werte erzielt werden können. Diese Bedingungen können bei Verwendung eines kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors (CSTR) erreicht werden. In ihm liegt bei hohem Umsatz

kontinuierlich nur eine geringe Substratkonzentration vor. Die Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion zeigt ebenfalls eine MICHAELIS-MENTEN-Kinetik, jedoch liegt der K_M -Wert für Acetophenon mit 0,04 mM erheblich niedriger. Eine unkatalysierte Nebenreaktion tritt nicht auf, da weder Formiat noch der Cofaktor ohne Mitwirkung des Enzyms mit dem Substrat reagieren. Der ee-Wert der enzymatischen Reaktion ist > 99 % unter allen untersuchten Bedingungen.

4.6.3 Verwendete Reaktoren

Beide Reaktionen wurden in kontinuierlich betriebenen Membranreaktoren durchgeführt. Im Falle des chemischen Katalysators muß das System unter strengem Wasserausschluß gehandhabt werden, da der Katalysator in Gegenwart von Wasser desaktiviert. THF wird als Lösungsmittel genutzt und Methanol zum Quenchen von überschüssigem Boran am Reaktorauslaß zudosiert. Die enzymatische Reaktion wird im in § 4.5.2.4 genauer beschriebenen Zweiphasenmembranreaktor durchgeführt. Abb. 4-48 stellt beide Reaktorsysteme schematisch gegenüber.

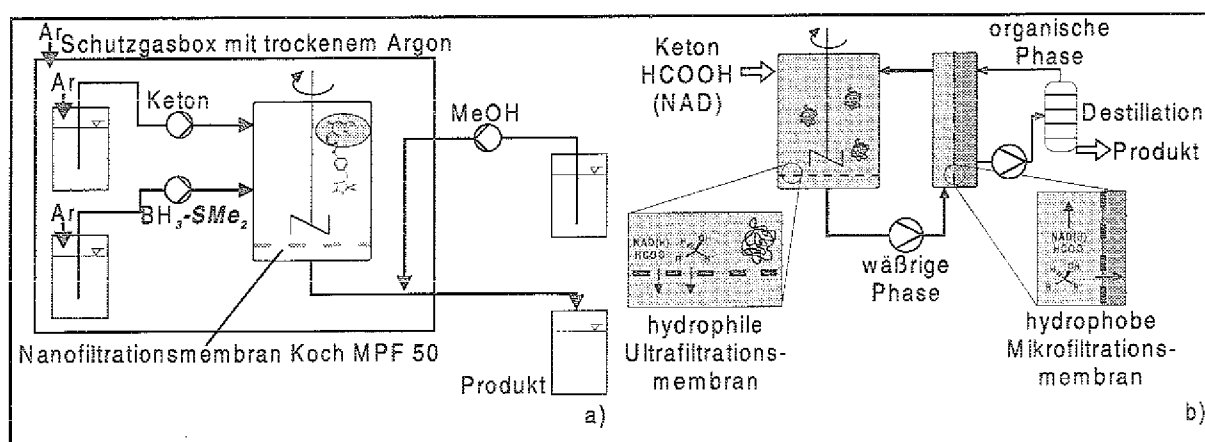


Abb. 4-48: Genutzte Reaktoren

4.6.4 Diskussion und Vergleich signifikanter Parameter

Beide Reaktionen wurden über eine Reihe von Verweilzeiten in kontinuierlich betriebenen Membranreaktoren durchgeführt und sind somit direkt vergleichbar. Abb. 4-49 zeigt die Umsatz-Zeit-Kurven für zwei typische Experimente.

Einige wichtige Parameter sind in Tabelle 4-9 zusammengefaßt. Im Falle der enzymkatalysierten Reaktion wurden nur die Daten der *CPCR* als Produktionsenzym berücksichtigt und jeweils auf das aktive Protein bezogen.

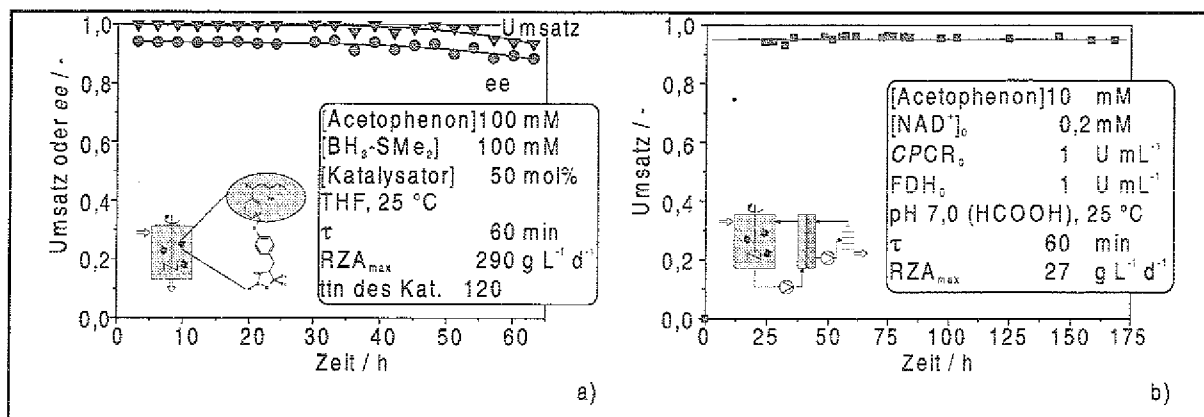


Abb. 4-49: Umsatzgraphen von kontinuierlichen Synthesen

Parameter	Einheit	Oxazaborolidin- reduktion	enzymatische Reduktion
[Acetophenon]	mmol L ⁻¹	250	40
[Cofaktor]	mmol L ⁻¹	kein Cofaktor nötig	0,2
[Katalysator]	mmol L ⁻¹	35	$6,8 \cdot 10^{-6}$
Zyklenzahl des Kat. (ttn)	-	560	$2,4 \cdot 10^8$
Wechselzahl (tof)	min ⁻¹	0,3	$2,3 \cdot 10^4$
Molekulargewicht des Kat.	g mol ⁻¹	14000	78000
Aktive Zentren pro Molekül Kat.	-	~ 16	1
Masse pro aktives Zentrum	g	850	78000
Halbwertszeit des Kat.	d	1,2	27,8
Raum-Zeit-Ausbeute (RZA)	g L ⁻¹ d ⁻¹	1400	88
ee-Wert	%	94	> 99

Tabelle 4-9: Signifikante Parameter beider Reaktionen

(Es sind die besten erzielten Ergebnisse aufgeführt, die nicht unbedingt aus den gezeigten Umsatzkurven stammen)

Hier soll eine Auswahl dieser Parameter diskutiert und bewertet werden:

Substratkonzentration: Die Substratkonzentration des chemischen Prozesses wurde auf ein Maximum von 250 mM eingestellt, aber höhere Konzentrationen sollten möglich sein, da Acetophenon und Phenylethanol unbegrenzt mit THF mischbar sind. Die Substratkonzentration des enzymatischen Prozesses ist durch die begrenzte Löslichkeit des Substrates in Wasser begrenzt und wurde auf maximal 40 mM eingestellt, was nahe der maximalen Löslichkeit ist. Die Cofaktorkonzentration wurde auf 0,2 mM eingestellt, wobei 0,02 mM pro Verweilzeit nachdosiert werden. Dies entspricht einer maximalen Zyklenzahl des Cofaktors von 1600 bei vollständigem Umsatz.

Eingesetzte Katalysatormenge, maximale Zyklenzahl des Katalysators: Der Oxazaborolidinkatalysator wurde in einer Konzentration von 35 mM zugegeben, was einer maximalen Zyklenzahl (ttn) des Katalysators von 560 über die Reaktionszeit gerechnet entspricht. Die *CPCR* hingegen ist wesentlich aktiver. Sie kann 1,9 mmol Substrat pro Minute und mg aktives Protein umsetzen. Daraus errechnet sich bei einem Molekulargewicht von $78.000 \text{ g mol}^{-1}$ eine Konzentration des Katalysators von nur 6,8 nM, was einer ttn von $2,4 \cdot 10^8$ entspricht! Ein ähnliches Verhältnis wird gefunden, wenn man die Wechselzahlen (tof)¹⁸¹ der Katalysatoren betrachtet.

Stabilität des Katalysators: Für den chemischen Katalysator wurde eine Desaktivierungsrate von 1,8 % pro Stunde unter Reaktionsbedingungen gemessen. Dies entspricht einer Halbwertszeit von 1,2 Tagen. Für die Stabilität des Enzymsystems wurde eine Halbwertszeit von 27,8 Tagen gemessen¹⁸² (Desaktivierungsrate = 1,7 % pro Tag), was den stabilen Betrieb eines solchen Reaktors über einen Zeitraum von mehreren Wochen erlaubt.

Raum-Zeit-Ausbeute: Die chemische Reduktion erreicht eine extrem hohe Raum-Zeit-Ausbeute von bis zu $1,4 \text{ kg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, während im enzymatischen Prozeß nur bis zu $88 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht werden. Dies ist vor allem durch die geringere Substratkonzentration des enzymatischen Prozesses bedingt.

ee-Wert der Reaktion: Die enzymatische Reaktion zeigt einen ee von über 99 % über die gesamte Reaktionszeit, da das Enzym sehr stereoselektiv arbeitet und keine unkatalysierte Nebenreaktion auftritt. Bei der chemischen Reduktion hingegen sinkt der ee-Wert der Reaktion während der Reaktionszeit durch Katalysatordesaktivierung ab. Daher ist der ee-Wert mit diesem Katalysator auf 90 – 94 % begrenzt. Um ein enantiomerenreines Produkt ohne weitere Aufreinigungsschritte zu erhalten ist also nur die enzymatische Reaktion geeignet.

Die oben diskutierten Parameter zeigen klar die Vor- und Nachteile beider Verfahren auf. Das enzymatische Verfahren ist bezüglich ttn und Aktivität des Katalysators überlegen. Speziell wenn extrem hohe ee-Werte gefordert sind wird es die Methode der Wahl sein. Das chemische System hingegen besticht durch seine hohe Raum-Zeit-Ausbeute.

In Hinblick auf den Katalysator wird sicher ein organisch-präparativ arbeitender Chemiker den chemischen Katalysator bevorzugen, da er mit üblichem Laborgerät herstellbar ist und recht leicht verändert werden kann. Die entgegengesetzte Enantioselektivität kann durch

¹⁸¹ tof von engl. turnover frequency [®] Glossar

¹⁸² gemessen mit MDA als Substrat [®] 4.5.1.3

Synthese des entgegengesetzten Enantiomers des Katalysators ausgehend von D-Tyrosin erhalten werden. Enzyme, auf der anderen Seite, werden in verstärktem Maße kommerziell verfügbar und die Optimierung dieser Biokatalysatoren durch gerichtete Evolution ist ein aktuelles Thema der Forschung¹⁸³. Die Umkehr der Enantioselektivität unter Verwendung des selben Katalysators bleibt schwierig, jedoch lassen sich im weiten Fundus der Natur Organismen finden, die Enzyme der entgegengesetzten Enantioselektivität zur Verfügung stellen, wie zum Beispiel die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*¹⁸⁴, die die Synthese von (R)-Phenylethanol erlaubt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich beide Ansätze ergänzen. Während der chemische Prozeß durch leichte Katalysatorverfügbarkeit und hohe Raum-Zeit-Ausbeute besticht, ist das enzymatische Verfahren bei Katalysatorverbrauch, Zyklenzahl des Katalysators und vor allem ee-Wert überlegen.

4.7 Zwischenbilanz

In diesem Kapitel wurde die enzymatische Ketonreduktion sowohl leicht als auch schwerlöslicher Substrate mit der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) beschrieben und Membranverfahren zur Durchführung dieser Synthesen vorgestellt. Diese Verfahren wurden mit alternativen Syntheseverfahren verglichen. Wichtige Ergebnisse sind:

- Reduktion von 2,5-Hexandion gelingt in hoher Enantiomeren- und Diastereomerenreinheit im Satzreaktor und im EMR.
- Die Kinetik der Reaktion wurde in einem Modell erfaßt, das zur Simulation von Versuchen genutzt werden konnte.
- Die Darstellung von (2S,5S)-Hexandiol gelingt im 10 g-Maßstab (Reinheit, ee, de: alle > 99 %).
- Entwicklung eines Verfahrens zur Reduktion von 2,5-Hexandion mit Bäckerhefe im 200 L-Maßstab als *fed batch* sowie dessen Vergleich zum enzymatischen Verfahren.
- Synthese und Aufreinigung von 1,7 kg (2S,5S)-Hexandiol nach diesem Verfahren (Reinheit, ee, de: alle > 99 %).
- Entwicklung und Betrieb eines extraktiven Zweiphasenmembranreaktors (ZPMR) zur Umsetzung hydrophober Substrate unter Erhöhung der ttn des Cofaktors und drastischer Reduzierung des Volumens der wäßrigen Phase.

¹⁸³ Arnold et al. (1997): Biochem. Eng., 58, 1.

¹⁸⁴ Hummel (1990): Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 15.

Hummel (1990): J. Biotechnol. Lett., 12, 403.

➤ Synthese hydrophober Hydroxyester und Alkohole im EMR und im ZPMR:

- (S)-5-Hydroxyhexansäureethylester im EMR.
- (S)-3,4-Methylenedioxyphenyl-2-propanol in EMR und ZPMR.
- (S)-1-Phenylethanol im ZPMR.

mit:

- Ermittlung kinetischer Parameter und deren Nutzung zur Simulation und Reaktionsplanung.
 - Demonstration der Betriebsstabilität.
 - Entwicklung von Protokollen zur Produktaufarbeitung.
- Vergleich der Synthese von Phenylethanol mit einem chemischen Verfahren ergibt Vorteile für:
- Chemisches Verfahren: Raum-Zeit-Ausbeute, Katalysatormodifikationen.
 - Enzymatisches Verfahren: Katalysatoraktivität und -selektivität, ttn und tof des Katalysators, Preis der H₂-Quelle, ee des Produktes

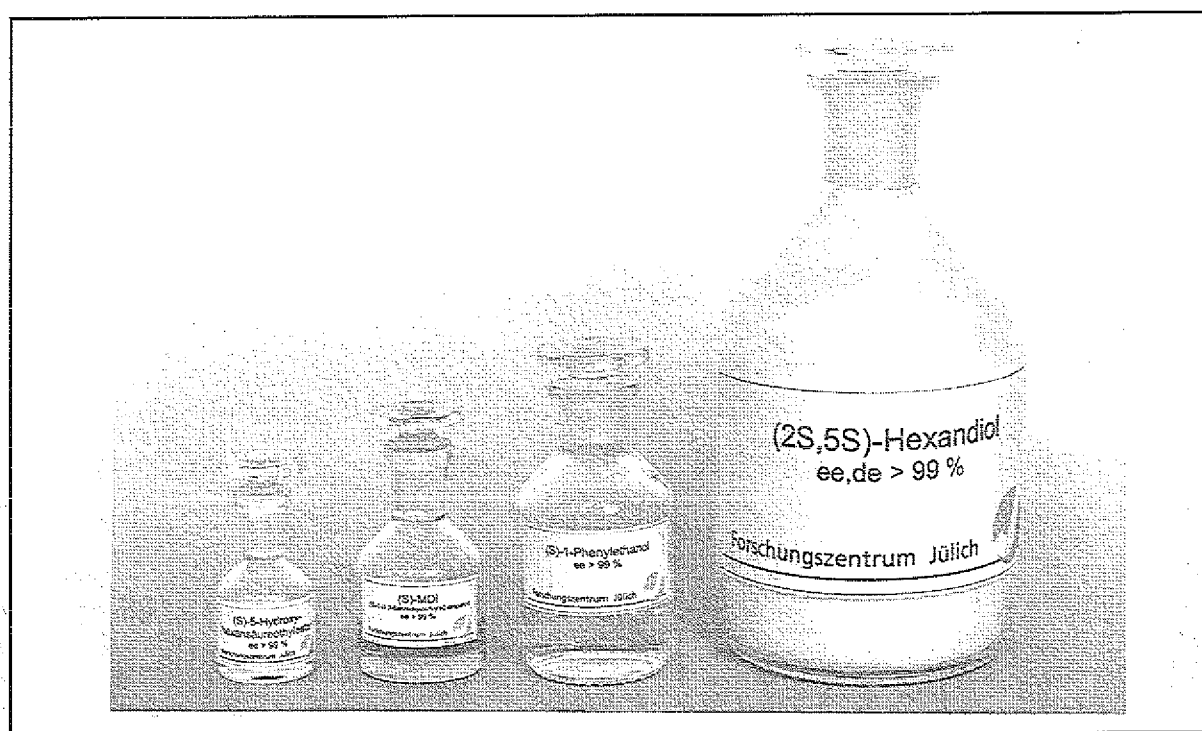


Abb. 4-50: Durch biokatalytische Reduktion dargestellte Produkte

5 Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse der einzelnen Abschnitte wurden bereits im Anschluß an deren Darstellung ausführlich diskutiert und Hinweise auf eine zukünftige Entwicklung gegeben. Hier soll daher ausschließlich eine übergreifende Beurteilung und Bewertung der entwickelten Verfahren erfolgen und ein wünschenswertes Szenario für die Weiterentwicklung der Enzymkatalyse mit cofaktorabhängigen Oxidoreduktasen entwickelt werden.

5.1 Übergreifende Diskussion der Verfahren

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und genutzten Verfahren setzen Membranen sowohl zur Filtration als auch zum Phasenkontakt ein. Die weite Anwendbarkeit dieser Techniken konnten deutlich demonstriert werden. Im Falle des Zweiphasenmembranreaktors konnte die Integration beider Methoden demonstriert werden. Eingesetzt wurde hier eine hydrophile Ultrafiltrationsmembran zur Enzymrückhaltung kombiniert mit einer hydrophoben Mikrofiltrationsmembran zur Extraktion des hydrophoben Produktes. Beide Membranen bestanden aus synthetischen Polymeren. Vergleichbar ist dieses Verfahren mit dem in § 3.6 beschriebenen Versuch, eine kontinuierliche Synthese mit der Cyclohexanon-Monooxygenase durchzuführen. Hier wurde erneut eine hydrophile Ultrafiltrationsmembran zur Enzymrückhaltung genutzt, allerdings erfolgte durch die zweite Membran nicht eine Produktextraktion, sondern eine Substratversorgung, in diesem Fall durch gasförmigen Sauerstoff. Das Prinzip ist hingegen gleich geblieben: Ein schlecht löslicher Stoff limitiert den Fortgang der Reaktion. Er wird kontinuierlich nachdosiert, im Fall der Monooxygenase Sauerstoff durch die Silikonmembran, im Fall des ZPMR Substrat durch Titration in das Mischgefäß. Nach Abschluß der Reaktion ist, im optimalen Fall, das Substrat umgesetzt, jedoch sammelt sich ein Produkt, das im ZPMR extrahiert werden muß, um die homogene Phase im Reaktionsraum zu gewährleisten.

Es kommt nun die Frage auf, warum die Ultrafiltrationsmembran zur Enzymrückhaltung überhaupt eingesetzt wird. Im Falle der Monooxygenase wurde sie in den erfolgreichen Versuchen nicht verwendet. Damit reduziert sich der Reaktor auf den in § 3.5.1 genutzten Satzreaktor mit Sauerstoffversorgung im Umlauf. Ein solches Verfahren scheint prinzipiell auch für die Ketonreduktion anwendbar. Auf einige Probleme, die einer Realisierung entgegenstünden, sei aber an dieser Stelle hingewiesen: Das Reaktorvolumen, also das Volumen, in dem die Enzyme verteilt sind, erhöht sich auf die Summe aus den beiden wäßrigen Kreis-

laufen abzüglich eines geringen Einsparpotentials. Es ist also davon auszugehen, daß ein Mindestvolumen von etwa 300 mL genutzt werden müßte, das für einen Laborreaktor recht viel ist. Zudem tritt im Extraktionsmodul ein direkter Phasenkontakt mit einer organischen Phase auf. Es konnte allerdings in Versuchen im Zweiphasensystem ohne Membran gezeigt werden, daß beim Vorliegen einer Phasengrenzfläche die Aktivität der verwendeten Enzyme schlagartig auf nahe null abnimmt.

Größere Hoffnungen können in die Verwendung des reinen Substrates als organische Phase gesetzt werden. Dies würde das konstante Arbeiten an der Löslichkeitsgrenze erlauben. Dem entgegen steht allerdings die fehlende Stabilität der in Frage kommenden kommerziellen Membranen gegenüber reinem Keton.

Eine komplette Integration beider Techniken wäre, unabhängig von zu lösenden technischen Problemen, prinzipiell denkbar. Hierbei würde in den bestehenden Zweiphasenmembranreaktor eine Begasungsmembran in den EMR-Kreislauf integriert. Zum Einsatz kommen könnte zum Beispiel der gleiche Modultyp, wie er zur Extraktion eingesetzt wird. Da dieser ursprünglich für den Gastransfer in oder aus wäßrigen Lösungen entwickelt wurde, sollte einer Anwendung nichts entgegen stehen. Der Adsorption von Proteinen an der hydrophoben Membran kann durch den hohen Fremdproteingehalt in der *CPCR*-Präparation oder durch die Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) entgegengewirkt werden. Auch tritt hier kein direkter Phasenkontakt mit einem organischen Lösungsmittel auf. Ein analoger Ansatz kann zur Entfernung von CO_2 aus der Ketonreduktion gewählt werden, wenn auf der Mantelseite des Extraktors Vakuum angelegt wird. Abb. 5-1 zeigt das Schema eines solchen Aufbaus.

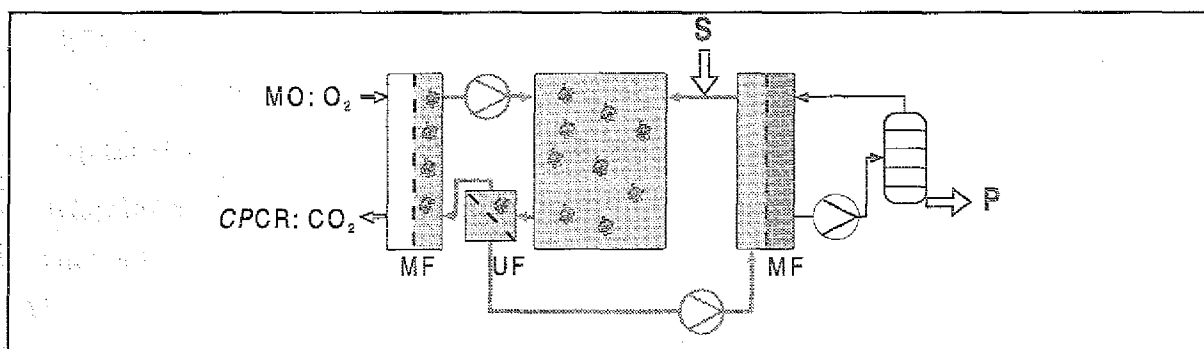


Abb. 5-1: Dreiphasenmembranreaktor

5.2 Enzymverfügbarkeit

Die Verfügbarkeit der zu nutzenden Enzyme ist ein äußerst wichtiger Faktor, wenn die Synthesen auch in einen wirtschaftlich sinnvollen Maßstab vergrößert werden sollen.

Unumgänglich ist es meist, mit Hilfe der Gentechnik ein rekombinantes Protein zur Verfügung zu stellen. Dies bietet den Vorteil, daß bei gelungener Überexpression die Enzymaktivität, selbst wenn das Enzym nicht vom Wirtorganismus benötigt wird, in großen Konzentrationen zur Verfügung hergestellt werden kann.

Im Falle der Monooxygenase ist eine solche Expression in Bäckerhefe bereits gelungen. Die somit geschaffene „Designer Hefe“ wurde kürzlich von STEWART et al. beschrieben und als Ganzzellkatalysator eingesetzt¹⁸⁵. Da die Bäckerhefe selbst keine Monooxygenase besitzt, genauso wenig wie die Produkte abbauende Enzyme, kann in diesem Fall auch in ganzen Zellen eine effektive Biokatalyse durchgeführt werden. Ein Problem ist allerdings die konkurrierende Reduktion des Substrates zum entsprechenden Alkohol. Eine Isolierung des Enzyms aus der Hefe sollte hingegen keine Probleme bereiten. Durch die einfache Fermentation kann somit das rekombinante Protein in großen Mengen isoliert und eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil wäre dabei der Übergang aus der Sicherheitsstufe S2 gemäß Gentechnikgesetz in S1, da mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit der Ursprung der fakultativen Pathogenität von *Acinetobacter* nicht im Protein der Monooxygenase zu sehen ist.

Analog ist die Klonierung und Überexpression der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* weit fortgeschritten. Es konnten in *E. coli* bereits recht gute Expressionen erreicht werden¹⁸⁶, die aber, zusammen mit der Stabilität der Expression noch weiterer Optimierung bedürfen.

5.3 Erweiterung der Substratspektren: Chemische Herausforderungen

Sowohl enantiomerenreine Lactone als auch enantiomerenreine Alkohole sind wichtige Synthons in der organisch-chemischen Synthese. In § 3.6 wurden bereits ausgewählte Beispiele für die Folgechemie der enzymatischen BAEYER-VILLIGER Oxidation aufgeführt. Hier soll nun die Anwendung der CPCR in der Synthese von (S)-8-O-Methymellein gezeigt werden¹⁸⁷. Die Zielverbindung gehört zur Klasse der Dihydroisocumarine, die vor allem aus Pilzen isoliert wurden. Die entscheidende Einführung der Chiralität gelang, wie Abb. 5-2 zeigt, durch enzymatische Reduktion von 2-Aceonyl-6-methoxybenzonnitril mit CPCR in

¹⁸⁵ Stewart et al. (1996): J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 755.

Stewart et al. (1996): J. Org. Chem., 61, 7652.

Stewart et al. (1998): J. Am. Chem. Soc., 120, 3541.

¹⁸⁶ M. Bönitz, Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf, unveröffentlichte Ergebnisse

¹⁸⁷ Schubert (1998): Diplomarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.

hoher Enantiomerenreinheit. Der Enantiomerenüberschuß blieb auch bei der anschließenden Lactonisierung komplett erhalten.

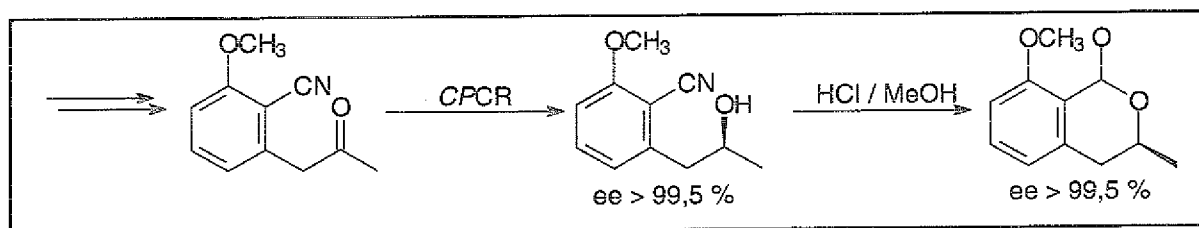


Abb. 5-2: Chemoenzymatische Synthese von (S)-8-O-Methylmellein

Eine Herausforderung an die chemische Synthese ist die selektive Reduktion einer Keton-
gruppe in Gegenwart anderer funktioneller Gruppen¹⁸⁸. Während die Diskriminierung zwi-
schen der Hydrierung von Doppelbindung und Keton, wie zum Beispiel in Benzyliden-
acetone, chemisch wie enzymatisch problemlos ist, ist die Diskriminierung zwischen zwei
Carbonylgruppen häufig schwieriger. Enzymatisch sollte es gelingen Strukturen, wie sie in
Abb. 5-3 schematisch dargestellt sind, selektiv an der endständigen Ketonfunktion zu redu-
zieren. Im Idealfall würde gleichzeitig eine Racemattrennung in Bezug auf den Rest R
durchgeführt. Anhaltspunkte hierfür bieten das Substratspektrum der CPCR.

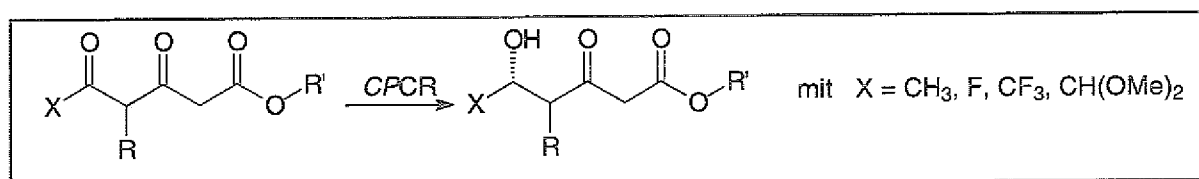


Abb. 5-3: Selektive Reduktion von Carbonylfunktionen

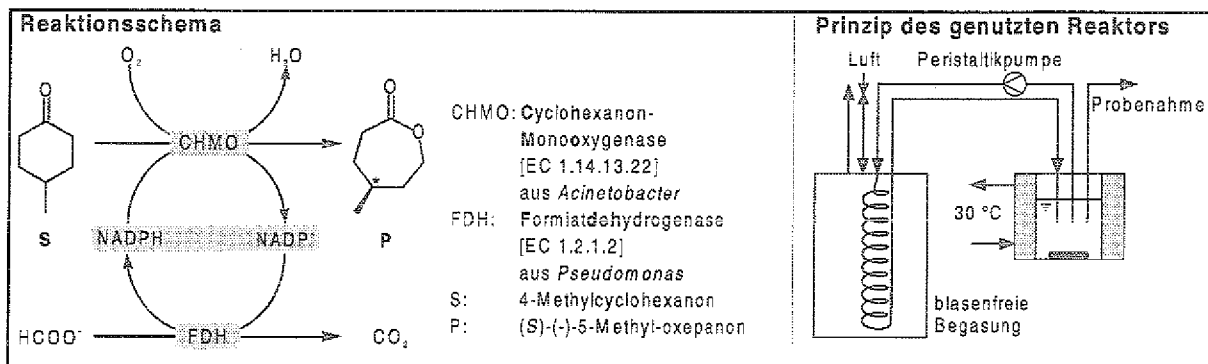
Anhand dieser Beispiele ist ersichtlich, daß weder die Reaktionstechnik noch die Substrat-
breite der enzymatischen Redoxreaktionen mit cofaktorabhängigen Enzymen bis heute aus-
geschöpft sind, sondern vielmehr enorme Entwicklungsmöglichkeiten auch für die Zukunft
gesehen werden können.

¹⁸⁸ Wolberg et al. (1998): Deutscher Patentantrag 198 57 323.2

6 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung und Nutzung von Membranverfahren, die die Nutzung cofaktorabhängiger Oxidoreduktasen in präparativem Maßstab effektiv erlauben. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Enzymatische BAEYER-VILLIGER Oxidation



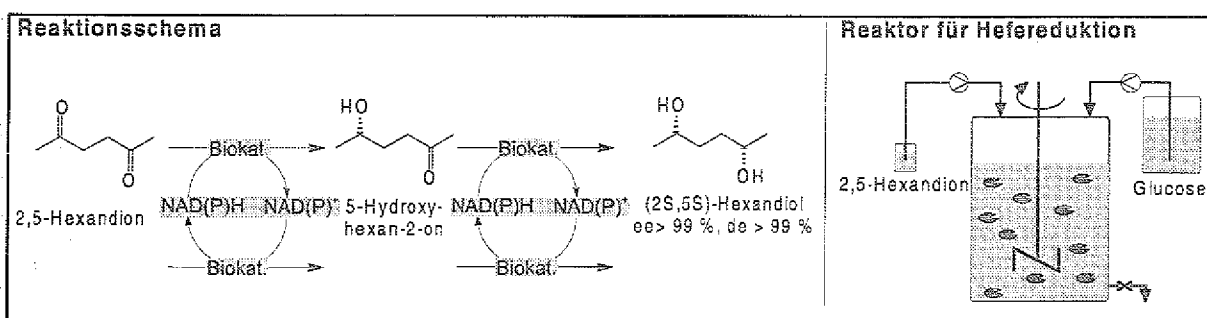
- Erfolgreiche Anwendung der **Cyclohexanon-Monooxygenase** zur Synthese enantiomerenreiner Lactone.
- Effektive Regenerierung des Cofaktors NADPH durch eine NADP⁺-abhängige **Formiatdehydrogenase** und Formiat als Wasserstoffquelle.
- **Blasenfreie Begasung** durch eine Silikonmembran.
- Durchführung der präparativen Synthese im *Repetitive Batch*.
- Isolierung des Produktes in hoher chemischer Reinheit mit einem ee von > 99 %.

2. Enzymatische Ketonreduktion

a) Fermentation und Isolierung der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis*

- Fermentation im 300 L-Maßstab führt zu ca. **70.000 U** in der Zellmasse.
- Vereinfachung der Aufarbeitung führt zu präparativ anwendbarem Enzym.

b) Reduktion von gut löslichem **2,5-Hexandion**



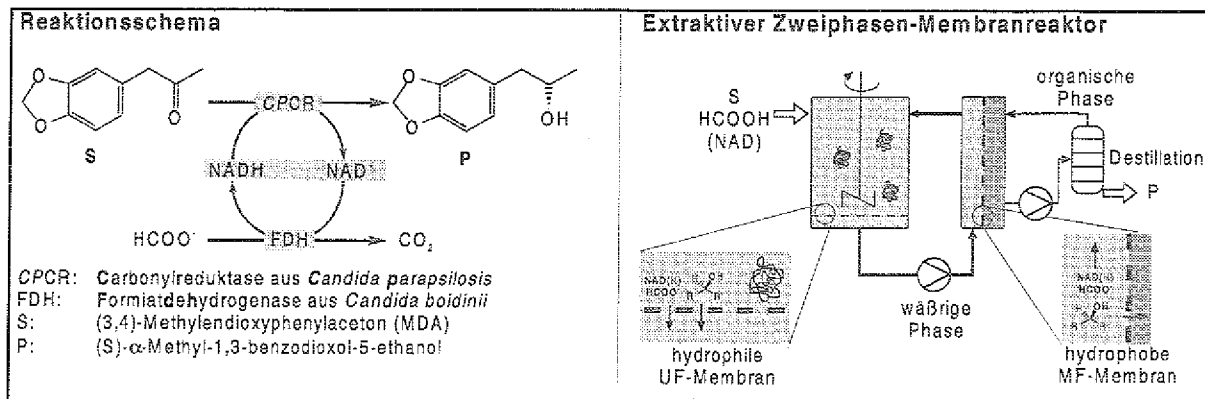
- Kinetische Beschreibung des Gesamtreaktionssystems als Folgereaktion.

- Synthese im Satzreaktor und EMR.
- Vergleich mit Ganzzellbiotransformation mit Bäckerhefe.
- Damit Produktion und Isolierung von **1,7 kg (2S,5S)-Hexandiol** mit Reinheit, ee und de > 99 %.

c) Reduktion von schlecht löslichen Substraten

- Kinetische Charakterisierung der Reaktionssysteme und kontinuierliche Reduktion im EMR über bis zu **20 Tagen** mit geringem Umsatzrückgang.
- Aufbau eines kontinuierlich betriebenen **Zweiphasenmembranreaktors (ZPMR)** mit folgenden Eigenschaften:
 - Kreislaufführung der wäßrigen Phase. Dadurch Erhöhung der Zyklenzahl des Cofaktors um Faktor 10 und Reduktion des Volumens der wäßrige Phase um Faktor 25.
 - Integration einer **membrangestützten Extraktion** erlaubt kontinuierliche Entfernung des Produktes.
- Erfolgreiche Reduktion von **3,4-Methylenedioxyphenylaceton** und **Acetophenon** im ZPMR.
- Folgende Parameter der Synthesen wurden erzielt:

Substrat	ABEE	MDA	AcPhe
Parameter			
Reaktor	EMR	EMR	ZPMR
[S]	30 mM	10 mM	10 mM
[NAD ⁺]	0,2 mM	0,25 mM	0,2 mM
[CPCR]	2 U mL ⁻¹	2 U mL ⁻¹	3 U mL ⁻¹
RZA	102 g L ⁻¹ d ⁻¹	225 g L ⁻¹ d ⁻¹	41 g L ⁻¹ d ⁻¹
t _{in}	135	35	475
t _{1/2}	9,3 d	27,8 d	
Betriebszeit	170 h	450 h	140 h
V _{H₂O} (rel.)	100 %	100 %	4 %
m(P)	8 g	24,8 g	10,2 g
ee	> 99 %	> 99 %	> 99 %



- **Vergleich** der enzymatischen Acetophenon-Reduktion mit Oxazaborolidin-Reduktion (OAB) ergibt höhere Raum-Zeit-Ausbeute für OAB, jedoch erheblich höhere Katalysatoraktivität, Zyklenzahl des Katalysators und ee für enzymatisches Verfahren.
- **Isolierung der Produkte** in hoher Enantiomerenreinheit:
 - 8 g (S)-5-Hydroxyhexansäureethylester (Reinheit, ee > 99 %).
 - 24,8 g (S)-3,4-Methylenedioxyphenyl-2-propanol (Reinheit, ee > 99 %).
 - 10,2 g (S)-1-Phenylethanol (Reinheit, ee > 99 %).

7 Material und Methoden

7.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

7.1.1 Chemikalien

Aldrich Chemie, Steinheim

Acetbuttersäureethylester

Acetophenon

Biomol Feinchemikalien, Hamburg

NAD⁺

NADH

NADP⁺

NADPH

Boehringer Mannheim, Mannheim

Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Fluka, Steinheim

2,5 Hexandion

4-Methylcyclohexanon

Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Merck, Darmstadt

Albumin Fraktion V aus Rinderserum

DTT

2,5-Hexandion

Pharmacia LKB, Freiburg

Q-Sepharose Fast Flow

UBE, Düsseldorf

3,4-Methylenedioxyphenylaceton

Andere Chemikalien wurden von Sigma/Aldrich/Fluka (Steinheim), Riedel de Haen (Seelze) oder Merck (Darmstadt) als p.A.-Ware bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

7.1.2 Geräte

Amafilter, Langenhagen

RO-Membran ROM 375

Amicon, Witten

UF-Membranen YM-10, YM-30, YM-3

- BEST, Bornheim
Swadgelok Verschraubungen
Whitey Ventile
- BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Silikonschlauch zur blasenfreien Begasung
- Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen
FTIR-Spektrometer
Polarimeter 241 MC
- Bohlender, Lauda Königshofen
Teflonanschlußstücke
- Brooks, Veenendaal, NL
Druckregler mit Steuerelektronik
- Bruker Analytische Meßtechnik, Rheinstetten
Kernresonanzspektrometer AM 400 und AC 200
- Büchi Laboratoriumstechnik, Göppingen
Rotavapor RE 111
Vacobox R-160
Wasserbad 461
- Celanese, Wiesbaden
UF-Membranen UF-PA 20H und UF-PA-5
Extraktionsmodul LIQUICEL 2,5x8
- Chemap, Volkertswil, CH
Fermentationsanlagen
- Chrompack, Frankfurt
Gas-Chromatograph 428 A mit
Autosampler Modell 311
- CS Chromatographie-Service, Langerwehe
GC Kapillarsäule Cyclodex β /P 50 m x 0,32 mm i.d.
GC Kapillarsäule FS CW 20M-CB-0,5 25 m * 0,32 mm i.d.
- DuPont de Nemours, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Sorval RC-5B mit GS3-Rotor
- Eppendorf, Hamburg
Laborzentrifuge
- Haake, Karlsruhe
div. Kryostaten
- Hellma, Müllheim
div. Quarzglasküvetten
- Hewlett-Packard, Waldbronn
GC-System 6890
GC/MS-System 6890 mit MSD 5973
ChemStation Datenauswertung

- IKA Labortechnik, Stauffen
Magnetrührer Ikamag RET-G
Membranpumpstand
- Latek, Heidelberg
Teflonschläuche und Anschlüsse
- Leybold, Köln
Membranpumpe Divac
Ölschieberpumpe Trivac D 4B
Thermovac TM 210
- Mallinckrodt-Baker, Griesheim
Daicel Chiracel OD-H HPLC-Säule
- Macherey-Nagel, Düren
Kapillarsäule FS Lipodex E
- Metrohm, Herisau, CH
pH-Meter 691
Impulsomat 614
Dosimat 665
Wechseleinheit 552
pH-Elektroden
- MGW Lauda, Lauda-Königshofen
div. Thermostaten
- Netsch Feinmahltechnik, Seib
Kugelmühle LME 0,5
- Pharmacia LKB, Freiburg
Fraktionssammler FRAC-100 und REDI-FRAC
Schreiber LKB 2210 und 2065
UV-Durchflußphotometer UVicordS
Wechselkolbenpumpe P500
- Reichert Chemie Technik, Heidelberg
Präzisionsdosierpumpe M160
- Sartorius, Göttingen
Cellulosenitrat und -acetat Sterilfilter
Filtrationsgerät SM 16254
Glas-Vakuumfiltrationsgerät
Vorfilter S-200
- Shimadzu Europa, Duisburg
Gas-Chromatograph GC 14A mit
Autosampler AOC 14
Integrator CR-6A
Spektrophotometer UV 160
- Siemens, München
SMP-Interface
- Stoe, Darmstadt
Transmissionsdiffraktometer mit ortsauflösendem Detektor
Stoe Index Software

Sykam, Gilching:

HPLC-Controller S 2000

Solvent Delivery System S 1100

Low Pressure Gradient Mixer S 8110

Verder, Düsseldorf

div. Schlauchpumpen und Pumpenschläuche

Werkstätten bzw. Eigenentwicklungen der Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich

Blasenfalle, Acrylglas

div. Glasbauteile

div. elektrische Anschlüsse und Adapter

Enzymmembranreaktor, 10 ml, Edelstahl

Meßdatenerfassungsprogramm MEDUSA

7.2 Analysenbedingungen

7.2.1 Umsatzbestimmung

Umsatzbestimmungen wurden durch Vergleich der Flächenprozent von Substrat und Produkt in einer achiralen gaschromatographischen Analyse durchgeführt.

7.2.1.1 Synthese von 5-Methylcaprolacton

Säule: FS CW 20M-CB-0,5
25 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 2 bar He
Säulentemperatur: 140 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 0,9 min 4-Methylcyclohexanon
6,3 min 5-Methylcaprolacton

7.2.1.2 Synthese von 2,5-Hexandiol

Säule: FS CW 20M-CB-0,5
25 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 2 bar He
Säulentemperatur: 140 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 1,4 min 2,5-Hexandion
2,2 min 5-Hydroxyhexan-2-on
4,7 min 2,5-Hexandiol

7.2.1.3 Synthese von HHEE

Säule: FS CW 20M-CB-0,5
25 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 2 bar He
Säulentemperatur: 140 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 3,0 min ABEE
5,2 min HHEE

7.2.1.4 Synthese von MDI

Säule: FS CW 20M-CB-0,5
25 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 2 bar He
Säulentemperatur: 200 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 4,4 min MDA
5,3 min MDI

7.2.1.5 Synthese von Phenylethanol

Säule: FS CW 20M-CB-0,5
25 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 2 bar He
Säulentemperatur: 140 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 2,3 min Acetophenon
4,1 min Phenylethanol

7.2.2 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

Die Bestimmung des Enantiomeren- und Diastereomerenüberschusses wurde durch Gaschromatographie bzw. HPLC (MDI) an chiraler stationärer Phase durchgeführt.

7.2.2.1 Synthese von 5-Methylcaprolacton

Säule: FS Cyclodex β /P
50 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 1,8 bar H₂
Säulentemperatur: 130 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 16,7 min (5R)-Methylcaprolacton
17,3 min (5S)-Methylcaprolacton

7.2.2.2 Synthese von 2,5-Hexandiol

Säule: FS Cyclodex β /P
50 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 1,3 bar H₂
Säulentemperatur: 110 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 21,6 min (2S,5S)-Hexandiol (Diacetat)
24,2 min meso-2,5-Hexandiol (Diacetat)
26,1 min (2R,5R)-Hexandiol (Diacetat)

7.2.2.3 Synthese von HHEE

Säule: FS Lipodex E
50 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 1,1 bar H₂
Säulentemperatur: 130 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 21,7 min (R)-HHEE (TFA)
23,3 min (S)-HHEE (TFA)

7.2.2.4 Synthese von MDI

Säule: Daicel Chiracel OD-H
25 cm * 0,46 cm i.d. + 5 cm Vorsäule
Eluent: n-Heptan / 2-Propanol = 98 / 2
Fluß: 1 mL h⁻¹
Detektor: UV bei 290 nm
Retentionszeiten: 22,7 min (S)-MDI
25,2 min (R)-MDI

7.2.2.5 Synthese von Phenylethanol

Säule: FS Lipodex E
50 m * 0,32 mm i.d.
Trärgas: 1,1 bar H₂
Säulentemperatur: 100 °C
Injektor: 250 °C s/sl
Detektor: 250 °C FID
Retentionszeiten: 19,7 min (S)-Phenylethanol
20,4 min (R)-Phenylethanol

7.2.3 Kernresonanzspektren

Die Kernresonanzspektren wurden in der Abteilung Zentralanalytik der chemischen Institute der Universität Bonn auf Bruker AC 200 und AM 400-Spektrometern aufgenommen und mit Hilfe des Programms NUTS[®] ausgewertet.

Die in den Spektren angegebene chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben und auf den Standard Tetramethylsilan bezogen. Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die Spektren in CDCl_3 als Lösungsmittel aufgenommen.

Die Kopplungskonstanten werden in Hz angegeben, nach absteigender Größe geordnet und mit folgenden Buchstaben oder Kombinationen daraus bezeichnet:

s	= Singulett
d	= Dublett
t	= Triplett
q	= Quartett
m	= Multiplett

7.2.4 Massenspektren

Die Massenspektren wurden in der zentralen analytischen Abteilung der chemischen Institute der Universität Bonn auf einem Kratos AEI MS50 Massenspektrometer aufgenommen.

7.2.5 Infrarotspektren

Infrarotspektren wurden auf einem Perkin Elmer FTIR-Spektrometer aufgenommen¹⁸⁹

7.2.6 Drehwertmessungen

Die Messung der molekularen Drehung der Produkte erfolgte auf einem Perkin Elmer 241 MC. Die verwendete 10 cm Küvette wurde vor der Messung auf 25 °C temperiert. Es wird bei der Wellenlänge der Na D-Linie mit Hilfe einer Natriumdampflampe gemessen. Die Konzentrationen sind konventionsgemäß in g pro 100 mL Lösung angegeben.

7.2.7 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgenfeinstrukturanalyse wurde durch die Abteilung ZCH des Forschungszentrums Jülich auf einem Stoe Diffraktometer durchgeführt. Die Ermittlung des Gittertyps und der Gitterkonstanten wurden mittels der Stoe Index Software bestimmt.

7.2.8 Photometrische Messungen

Der Gehalt bzw. die Konzentrationsänderung von NADH und NADPH werden spektrophotometrisch an einem Shimadzu 160 Photometer vermessen. Soweit nichts anderes angegeben, erfolgt die Messung bei 340 nm in einer 1 cm Küvette gegen einen entsprechenden Nullwert. Die Konzentrationsänderung von NAD^+ bzw. NADP^+ wird über das gebildete

¹⁸⁹ Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Prof. Wamhoff, Uni Bonn, sei für die bereitwillige Zurverfügungstellung des Spektrometers wie für Rat und Tat gedankt.

NADH bzw. NADPH bestimmt. Die Umrechnung der Absorptionen auf die Konzentration erfolgt mit Hilfe des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes¹⁹⁰.

7.3 Versuchsvorschriften

7.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.3.1.1 Derivatisierung mit Acetylchlorid

10 µL einer Analysenprobe werden in 500 µL Methylenchlorid gelöst. Es werden 100 µL Pyridin und vorsichtig 100 µL Acetylchlorid zugegeben. Dabei erwärmt sich die Lösung und ein weißer bis gelber Niederschlag fällt aus. Nach 30 min wird 1 mL Methanol zugegeben, wobei sich der Niederschlag wieder löst. Das Lösungsmittel und überschüssiges Reagens werden abgeblasen und erneut in 1 mL Methanol aufgenommen.

7.3.1.2 Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFA)

10 µL einer Analysenprobe werden in 500 µL Methylenchlorid gelöst. Es werden 100 µL Pyridin und vorsichtig 100 µL TFA zugegeben. Es wird 2 h auf 60 °C erwärmt und anschließend 1 mL Methanol zugegeben. Das Lösungsmittel und überschüssiges Reagens werden abgeblasen und erneut in 1 mL Methanol aufgenommen.

7.3.1.3 Proteinquantifizierung nach BRADFORD

Proteinproben werden nach der Methode von BRADFORD¹⁹¹ mit Hilfe einer Fertiglösung (Merck) quantifiziert. Die Berechnung erfolgt gegen eine Eichung mit BSA.

Assay: 800 µl Wasser

+ 50 µl Probenlösung

+ 200 µl Bradford-Lösung

Nullwert: 850 µl Wasser

+ 200 µl Bradford-Lösung

Verfahren: 10 min inkubieren

Endpunktmessung bei 595 nm und Raumtemperatur gegen Nullprobe

7.3.2 BAEYER-VILLIGER Oxidation

7.3.2.1 Kinetik der MO

Die Kinetik wird photometrisch vermessen. Entsprechende Konzentrationen werden variiert.

¹⁹⁰ Becker et al. (1990): *Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

¹⁹¹ Bradford (1976): *Anal. Biochem.*, **72**, 248.

Ansätze: [4-Methylcyclohexanon] = 1 mM
[NADPH] = 0,2 mM
pH (Tris /HCl, 50 mM) = 8,0
Temperatur: = 30 °C

7.3.2.2 Kinetik der FDH

Die Kinetik wird photometrisch vermessen. Entsprechende Konzentrationen werden variiert.

Ansätze: [Formiat] = 300 mM
[NADP⁺] = 1,5 mM
pH (Tris /HCl, 50 mM) = 8,0
Temperatur: = 30 °C

7.3.2.3 Repetitive Batch mit blasenfreier Begasung

21,6 mL einer Lösung aus 135 mg (143 µL, 1,2 mmol, 40 mM) 4-Methylcyclohexanon, 6,3 mg (7,5 µmol, 0,25 mM) NADP⁺ und 408 mg (6 mmol, 200 mM) Natriumformiat und 300 µL (4,7 U, 0,16 U mL⁻¹) CHMO-Lösung in Tris-Puffer werden 10 min im Mantelkolben bei 30 °C inkubiert. Zum Starten der Reaktion werden 8,4 mL (9,4 U, 0,32 U mL⁻¹) FDH zugegeben. Die Lösung wird leicht gerührt und mit einem Volumenstrom von 450 mL h⁻¹ mit Hilfe einer Schlauchpumpe durch einen dünnwandigen Silikonschlauch gepumpt, dessen Umgebung mit ca. 60 L h⁻¹ Luft (Überdruck < 20 mbar) umströmt wird. Der Verlauf der Umsetzung wird durch regelmäßige gaschromatographische Analyse von Reaktorproben verfolgt. Nach ca. 10 h ist der Umsatz vollständig und die Lösung wird in einer 50 mL-Rührzelle ausgestattet mit einer YM 30-Ultrafiltrationsmembran (Amicon, Witten) bei 4 °C eingengt und mehrmals mit Puffer nachgewaschen. Das Enzymkonzentrat wird mit frischer Substratlösung versetzt und die Reaktion erneut gestartet. Das Filtrat wird 4 mal mit je 20 mL Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.V. entfernt.

Ausbeute des ersten Laufes: 108 mg (70%)

7.3.2.4 Repetitive Batch mit Nanofiltration

Bei Versuchen mit einer Nanofiltrationsmembran wird mit Hilfe eines 3 mL Plexiglas EMRs filtriert und eine Reversosmosemembran ROM 375 verwendet. Es wird kein NADP⁺ nachdosiert. Die Enzymkonzentrationen wurden auf 0,21 U mL⁻¹ und 0,72 U mL⁻¹ FDH erhöht. Die übrigen Bedingungen gleichen denen in 7.3.2.3.

7.3.2.5 EMR mit blasenfreier Begasung

Ein Standard-EMR-Aufbau mit einem 3 mL Plexiglas EMR wird mit einer YM 10 Ultrafiltrationsmembran ausgestattet. In einem Umlauf wird ein Begasungsgefäß mit Silikon-schlauch angebracht. Am EMR Auslauf und am Luftauslaß des Begasungsgefäßes werden Druckregler angebracht, die für gleichen Druck auf beiden Seiten der Begasungsmembran sorgen sollen.

Eine Lösung aus 20 mM 4-Methylcyclohexanon, 100 mM Natriumformiat und 0,25 mM NADP^+ in 50 mM Tris / HCl-Puffer pH 8,0 wird mit 10 mL h^{-1} durch den Reaktoraufbau gepumpt. Durch die Blasenfalle werden 665 μL CHMO (10 U) und 7,14 mL FDH (20 U) zugegeben.

Nach wenigen Verweilzeiten steigt der Druck im EMR stark an, so daß es trotz Druckregelung zunächst zu einem Durchtritt von Reaktionslösung durch die Begasungsmembran und später zu einem Bruch der Membran kommt. Ein konstanter Umsatz konnte nicht über längere Zeit erreicht werden.

7.3.3 Fermentation und Aufreinigung der CPCR

7.3.3.1 Fermentationsbedingungen

Die Hefe *Candida parapsilosis* wurde von der DSMZ in Braunschweig als Schrägagar bezogen. Die Vermehrung verläuft zunächst im Schüttelkolben. Proben dieser Kulturen werden mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Sie werden als Animpfkultur für weitere Versuche genutzt.

Nachfolgend sei eine Fermentation im Fermenter beschrieben. Die Mengen sind pro L Fermentationsvolumen angegeben.

Ein Nährmedium bestehend aus 20 g L^{-1} Glycerin (2 %), 10 g L^{-1} Hefeextrakt (1 %), $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Ammoniumsulfat (0,12 %), 1 g L^{-1} Di-Natriumhydrogenphosphat (0,1 %), 1 g L^{-1} Kalium-di-hydrogenphosphat (0,1%) und $0,01 \text{ mL L}^{-1}$ Antischaum (Dehysan Z2111 0,01 %) werden bei 121°C für 30 min sterilisiert und anschließend auf 30°C abgekühlt. Es wird mit H_3PO_4 auf pH 4,5 titriert. Angeimpft wird mit 5 % Vorkultur. Bei einer Rührerdrehzahl von 500 U min^{-1} wird bei 30°C und 60 % Sauerstoffsättigung fermentiert. Eine Wachstumskontrolle findet durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm statt. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wird die Kultur auf 4°C abgekühlt und im Kammerseparator separiert. Die Zellen werden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.3.3.2 Enzymaufreinigung

7.3.3.2.1 Chemikalien und Lösungen

Aufschlußpuffer

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Bidest. H ₂ O			5 L
Triethanolamin	100 mM	14,92 g	74,6 g
DTT	1 mM	154 mg	770 mg
Pefabloc SC		40 mg	200 mg
Konz. HCl	auf pH 7,0		

PEG- Lösung

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Aufschlußpuffer			1 L
PEG 4000	50 % (v/w)		1 kg

Lyo-Puffer

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Bidest. H ₂ O			1 L
NaHCO ₃	100 mM	8,40 g	8,40 g
Konz. HCl	auf pH 7,0		

Säulenpuffer

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Bidest. H ₂ O			19 L
Isopropanol	5 % (v/v)	50 mL	1 L
Triethanolamin	100 mM	14,92 g	298,38 g
DTT	1 mM	0,154 g	3,09 g
Konz. HCl	auf pH 7,0		

40 mM NaCl

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Säulenpuffer			1 L
NaCl	40 mM	2,34 g	2,34 g

120 mM NaCl

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Säulenpuffer			2 L
NaCl	120 mM	7,01 g	14,03 g

2 M NaCl

Substanz	Konzentration	Menge pro L	Menge auf Ansatz
Säulenpuffer			2 L
NaCl	2000 mM	116,88 g	233,76 g

7.3.3.2.2 Zellaufschluß

1 kg feuchte Zellen werden grob zerkleinert und in 3 L Aufschlußpuffer unter Rühren aufgetaut (30-60 min). Die Suspension wird auf Eis gestellt. Der Aufschluß erfolgt durch Naß-

vermahlen mit Glasperlen ($d = 0,5 \text{ mm}$; 3 Passagen in Netsch LME 0,5 bei 2500 min^{-1}) unter Kühlung.

7.3.3.2.3 PEG-Fällung

Die gesamte Fällung wird unter Kühlung auf dem Eisbad bzw. in der auf $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Zentrifuge durchgeführt.

Das Zellhomogenat wird unter ständigem langsamen Rühren bis zu einer Endkonzentration von 2,5 % PEG (w/v) versetzt (*50 mL PEG-Lösung pro 1 kg Homogenat*). Die Suspension wird noch 30 min lang leicht gerührt und dann bei 7000 G 30 min lang zentrifugiert. (8000 U min^{-1} in GS3-Rotor der DuPont-Zentrifuge). Die vereinigten Überstände werden gewogen und unter leichtem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 17,5 % PEG (w/v) versetzt. (= zu den bereits vorhandenen 2,5 % im Überstand werden weitere *460 mL PEG-Lösung / 1 kg Überstand* gegeben). Die Lösung wird für 30 min leicht gerührt und danach 3 min bei 2500 G zentrifugiert. (3000 U min^{-1} in GS3-Rotor). Der Überstand wird abgesehen und nach negativem Enzymtest verworfen. Die Pellets werden aus den Zentrifugenbechern entfernt und in Lyo-Puffer gelöst ($0,5 - 1 \text{ L / kg Zellen}$). Die Lösung wird 30 min leicht gerührt und nach Enzymtest in Kristallisationsschalen gefüllt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

7.3.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Mengen dieser Vorschrift sind auf die Verwendung einer Säule von 5 cm Innendurchmesser und 35 cm Gelbett ausgerichtet.

12 g Lyophilisat der PEG-Fällung werden langsam in 600 mL Säulenpuffer eingerührt. Man rührt noch 30 min nach.

Die Lösung wird mit einer Pumprate von $1,5 \text{ L h}^{-1}$ auf die Säule aufgepumpt. Reste in der Vorlage werden 2 mal mit wenig Säulenpuffer nachgewaschen.

Mit 40 mM NaCl-Lösung wird solange gespült, bis der Durchlaufpeak beendet ist und die danach folgende Schulter beginnt abzufallen. Hier beginnt die Fraktionierung mit einer Fraktionsgröße von 0,75 min. Danach wird 120 mM NaCl-Lösung eingespült. Mit dem ersten deutlichen Peak wird die Aktivität eluiert, die photometrisch bei 340 nm quantifiziert wird. Das Umstellen auf 2 M NaCl-Lösung erfolgt, sobald die Aktivität vollständig eluiert wurde. Hierzu wird die Säule in umgekehrter Flußrichtung betrieben. Am UV-Detektor beobachtet man nun einen starken Ausschlag, dessen Rückgang abgewartet wird. Nach dessen deutlichen Rückgang wird die Flußrichtung der Säule erneut gewechselt und mit Säulenpuffer ohne Salz solange gespült, bis am Leitfähigkeitsdetektor die ursprüngliche Leitfähigkeit

wiederhergestellt ist. Nach ca. 30 min Nachspülen kann die Säule für den nächsten Lauf verwendet werden. Nach ca. 10 Läufen wird die Säule gemäß Anleitung mit Natronlauge gewaschen und anschließend wieder äquilibriert.

Die Aktivität enthaltenen Fraktionen werden vereinigt, wobei die Randaktivität getrennt gesammelt werden, lyophilisiert und erneut gesäult werden. Ist eine längere Lagerung oder die Entfernung von Isopropanol notwendig, wird der Pool mittels Ultrafiltration durch eine YM10-Membran aufkonzentriert, das Retentat bis zu einer Endkonzentration von ca. 50 % mit Glycerin versetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

7.3.4 Enzymatische Reduktion von Hexandion

In diesem System wurden ein Vielzahl kinetischer Messungen durchgeführt und Satzreaktorversuche durchgeführt. Die Beschreibung jedes einzelnen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher seien hier nur die allgemeinen Vorschriften und einige ausgewählte wichtige Experimente genannt.

7.3.4.1 Kinetische Messungen

Die Reaktionskinetik wurde mit Hilfe von Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen photometrisch durchgeführt. Die Ansätze enthielten die zu untersuchenden Substrate in unterschiedlicher Menge (s. Anhang A) in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0 mit 1 mM DTT. Die Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Die Integralkinetiken wurden gaschromatographisch verfolgt:

Ansatz zur Reduktionskinetik:

[2,5-Hexandion]	= 10 mM
[NADH]	= 20 mM
CPCR	= 2 U mL ⁻¹

Ansatz zur Oxidationskinetik:

[(2S,5S)-Hexandiol]	= 10 mM
[NAD ⁺]	= 20 mM
CPCR	= 2 U mL ⁻¹

7.3.4.2 Satzreaktorversuche

Es folgt die Beschreibung eines typischen Satzreaktorversuches:

Eine Lösung aus 50 mM 2,5-Hexandiol, 0,2 mM NAD⁺, 125 mM Natriumformiat und 1 mM DTT in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0 werden auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert. Es werden 2 U mL⁻¹ CPCR und 2 U mL⁻¹ FDH zugegeben und leicht gerührt. Der Umsatz wird gaschromatographisch bestimmt. Nach vollendeter Umsetzung werden die Enzyme durch Ultrafiltration entfernt und das Filtrat mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.V. entfernt. Das Rohprodukt kann destillativ oder säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (Eluent Essigsäureethylester) weiter gereinigt werden.

7.3.4.3 pH-statisierter Satzreaktorversuch

Eine Lösung aus 100 mM 2,5-Hexandiol, 0,5 mM NAD^+ , 250 mM Natriumformiat und 1 mM DTT in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0 werden auf 25 °C temperiert. Es werden $2,5 \text{ U mL}^{-1}$ CPCR und 5 U mL^{-1} FDH zugegeben und leicht gerührt. Der pH-Wert der Lösung wird kontinuierlich gemessen und mit Hilfe eines pH-Reglers (Metrohm, Herisau) durch Titration mit verd. HCl konstant gehalten. Umsatzkontrolle und Aufreinigung erfolgt wie in 7.3.4.3.

7.3.4.4 EMR-Versuche

Die Reaktion wird in einem Aufbau bestehend aus Doppelkolbenpumpe, Blasenfalle, Sterilfilter mit $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ Celluloseacetatfilter und Vorfilter, temperiertem 10 mL Edelstahl EMR mit YM10 Ultrafiltrationsmembran und Fraktionssammler durchgeführt. Die Substratlösung enthält 50 mM 2,5-Hexandion, 0,25 mM NAD^+ , 100 mM Natriumformiat und 1 mM DTT in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0. Das Reaktorsystem wird je ca. 12 h mit destilliertem Wasser, mit 0,1 % (v/v) Peressigsäure zur Sterilisation und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Es wird Substratlösung mit einem Volumenstrom von 10 mL h^{-1} ($\tau=1\text{h}$) aufgepumpt. Nach 2 h werden 4 U mL^{-1} CPCR und 8 U mL^{-1} FDH eingepumpt, woraufhin die Umsetzung einsetzt. Zur Bestimmung verschiedener Betriebsparameter wird durch Variation des Volumenstroms die Verweilzeit sowie die Temperatur verändert. Die Aufarbeitung des Eluats erfolgt wie oben unter Verzicht auf die Ultrafiltration, die ja bereits im EMR erfolgte.

7.3.5 Hefereduktion von 2,5-Hexandion

7.3.5.1 Fed batch mit Bäckerhefe

Zu einer wäßrigen Glucoselösung wird Bäckerhefe gegeben. Nach kurzer Zeit wird eine Glucose- und Substratdosierung gestartet. Der Umsatz wird gaschromatographisch verfolgt. Die Substratdosierung wird nach Erreichen der gewünschten Menge gestoppt. Die Glucose-dosierung wird bis zum Ende der Umsetzung aufrechterhalten. Nach Beendigung der Um

setzung wird noch gerührt, um die letzte Glucose zu verstoffwechseln. Die Zellen werden abgetrennt und das Wasser sowie der entstandene Alkohol i.V. weitgehend entfernt. Die Aufreinigung des Sumpfes erfolgt destillativ. Die Produktreinheit wird durch Umkristallisieren verbessert.

7.3.6 Reduktion von ABEE

7.3.6.1 Darstellung der racemischen Referenzverbindung

Racemisches HHEE wird durch eine NaBH_4 -Reduktion des Oxoesters in Ethanol erhalten. In eine Suspension von 0,38 g NaBH_4 (10 mmol) in 50 mL abs. Ethanol unter Schutzgas wird portionsweise unter Eiskühlung 4,75 g ABEE (30 mmol = 4,8 mL) eingetropft. Die Reaktionsmischung läßt man unter leichtem Rühren über Nacht auf 20 °C erwärmen, wobei sich der Umsatz vervollständigt. Mit 4-6 N HCl wird auf pH 4,0 titriert und zweimal mit je 40 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über NaSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel i.V. entfernt und das Produkt nach obiger Vorschrift an Kieselgel chromatographiert. Es werden 3,3 g (70% Ausbeute) einer schwach gelben Flüssigkeit erhalten. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

7.3.6.2 Kontinuierliche Synthese im EMR

Eine EMR-Anlage bestehend aus gekühlter Substratvorlage, Wechselkolbenpumpe, Blasenfalle, Sterilfilter mit 0,2 μm Cellulosenitratfilter mit Vorfilter und Fraktionssammler am Auslauf wird mit einem gerührten und auf 25 °C temperierten 10 mL Edelstahl-EMR mit eingelegter Ultrafiltrationsmembran UF-PA 20 (*cut-off* = 20000 g mol^{-1}) ausgestattet und mit 0,1 % (v/v) Peressigsäure über einen Zeitraum von 24 h mit einem Fluß von 20 mL h^{-1} sterilisiert. Nach gründlichem Auswaschen der Säure zunächst mit Wasser und anschließend mit Substratlösung bestehend aus 30 mM ABEE (4,75 g L^{-1}), 0,2 mM NAD^+ (143 mg L^{-1}), 100 mM Kaliumformiat (8,4 g L^{-1}) und 1 mM DTT (154 mg L^{-1}) in 100 mM TEA/HCl-Puffer (14,9 g L^{-1}) wird die Membran durch Zugabe von 20 mg BSA vorbelegt, um Proteinadsorption zu vermeiden. Es werden 20 U FDH (= 2 U mL^{-1}) und 10 U CPCR (= 1 U mL^{-1}) eingespült und der Fluß auf 10 mL h^{-1} (τ = 1h) eingestellt. Es werden je 10 mL Fraktionen gesammelt. Die Veränderung der Verweilzeit erfolgt durch Veränderung der Pumprate.

7.3.6.3 Aufarbeitung der Produktlösungen

Die vereinigten Produktlösungen werden 6 mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. V. entfernt. Das Gemisch aus Substrat und Produkt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (70 g pro g Substanz) mit einem Eluenten aus Essigsäureethylester/n-Hexan = 1/1 und einem Fluß von ca. 15 mL h^{-1} gereinigt. Es werden 20 mL Fraktionen separiert. Zunächst wird das nicht umgesetzte Substrat eluiert (Frc. 25-44), danach das Produkt (Frc. 57-75).

7.3.7 Reduktion von MDA

7.3.7.1 Darstellung von racemischem MDI durch NaBH_4 -Reduktion

In einem 250 mL Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rückflußkühler mit Trockenrohr und Argonzuleitung wird eine Suspension von 0,76 g (20 mmol) Natriumborhydrid in 100 mL absolutem Ethanol unter Argon auf dem Eisbad gekühlt. Über einen Zeitraum von 20 min werden 8,9 g (50 mmol) Methylendioxyphenylacetone eingetropft. Nach Beendigung des Zutropfens rührt man ca. 2 Stunden bis zur Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle) und läßt anschließend die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen. Mit wäßriger Salzsäure wird auf pH 4 titriert, wobei sich eine homogene Lösung bildet. Diese wird dreimal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Bei nicht ausreichender Reinheit wird das Produkt säulenchromatographisch gereinigt.

7.3.7.2 Kinetische Messungen

Die Reaktionskinetik wurde mit Hilfe von Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen photometrisch durchgeführt. Die Ansätze enthielten die zu untersuchenden Substrate in unterschiedlicher Menge (s. Anhang A) in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0 mit 1 mM DTT. Die Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

7.3.7.3 Synthese im EMR

In einer bereits in § 7.3.6.2 beschriebenen Anlage wird folgende Substratlösung verwendet: 10 mM MDA ($1,78 \text{ g L}^{-1}$), 0,25 mM NAD^+ (179 mg L^{-1}), 50 mM Natriumformiat ($3,4 \text{ g L}^{-1}$) und 1 mM DTT (154 mg L^{-1}) in 100 mM TEA/HCl-Puffer ($14,9 \text{ g L}^{-1}$). Es werden 20 U FDH ($= 2 \text{ U mL}^{-1}$) und 7 U CPCR ($= 0,7 \text{ U mL}^{-1}$) eingespült und der Fluß auf 10 mL h^{-1}

($\tau = 1\text{h}$) eingestellt. Es werden je 10 mL Fraktionen gesammelt. Nach 175 h werden 10 U FDH ($= 1\text{ U mL}^{-1}$) und 5 U CPCR ($= 0,5\text{ U mL}^{-1}$) nachdosiert.

7.3.7.4 Simulationsmodell der Membranextraktion

```
// Zielgröße (DepVars):
// ciwb_out Konzentration des Stoffes i am Auslaß Wasserseite / mM

// Rechengrößen:
// dln    logarithmischer mittlerer Durchmesser einer Faser / cm
// de     Hydraulischer Durchmesser der Mantelseite / cm
// vs     Lineargeschwindigkeit auf der Mantelseite / cm/s
// vt     Lineargeschwindigkeit auf der Faserseite / cm/s
// phi    Packungsanteil der Fasern / -

// Res    Reynoldszahl auf der Mantelseite / -
// Ret     Reynoldszahl auf der Faserseite / -
// Scs     Schmidtzahl auf der Mantelseite / -
// Sct     Schmidtzahl auf der Faserseite / -
// Shis    Sherwoodzahl der Komponente i auf der Mantelseite / -
// Shit    Sherwoodzahl der Komponente i auf der Faserseite / -

// kimo    Lokaler Massentransferkoeffizient des Stoffes i in der Membran / cm/s
// kiwt    Lokaler Massentransferkoeffizient des Stoffes i in der Wasserphase Faserseite / cm/s
// kios    Lokaler Massentransferkoeffizient des Stoffes i in der org. Phase Mantelseite / cm/s

// Kw      Gesamtmassentransferkoeffizient basierend auf Wasserphase / cm/s

// LTU     Länge der theoretischen Trenneinheit / cm
// ciww_outlst die Zielgröße (s.o.)
// ciob_out Konzentration des Stoffes i am Auslaß organische Seite / mM
// NTU     Anzahl der theoretischen Trenneinheiten / -
// Test     NTU * LTU muß die Länge des Moduls L ergeben

// Parameter:
// !!!Jeder der Parameter kann als IndVars variiert werden wenn alle anderen unter Params aufgeführt sind!!!

// ciwb_in Konzentration des Stoffes i am Einlaß Wasserseite / mM
// ciob_in Konzentration des Stoffes i am Einlaß organische Seite / mM
// dHFU     Durchmesser des HF- Gehäuses / cm
// Dis      Diffusionskoeffizient des Stoffes i in der Mantelseite / cm^2/s
// Dit      Diffusionskoeffizient des Stoffes i in der Faser / cm^2/s
// dti      Innendurchmesser der Fasern / cm
// dto      Außendurchmesser der Fasern / cm
// lm       Wandstärke der Fasern / cm
// mi       Verteilungskoeffizient für den Stoff i / -
// N        Anzahl der Fasern / -
// Qw       Fluß auf der Wasserseite / mL/s
// Qo       Fluß auf der Organischen Seite / mL/s
// rp       Porenradius der Membran / cm
// epsm     Membranporosität / -
// nys      Kinematische Viskosität der Mantelseite / cm^2/s
// nyt      Kinematische Viskosität der Faserseite / cm^2/s
// taum     Labyrinthfaktor der Membran / -
// L        Länge des Membranmoduls / cm
```



```

//Variablen- und Parameterdefinitionen
IndVars: L
DepVars: ciwb_out
Params: ciwb_in, ciob_in, dHFU, Dis, Dit, dti, dto, lm, mi, N, Qo, Qw, rp, epsm, nys, nyt, taum

//Rechengleichungen

dtln = (dto-dti)/(ln(dto/dti))
de = 4*(((pi/4)*dHFU^2)-(N*(pi/4)*dto^2))/((pi*dHFU)+(N*pi*dto))
vs = Qo/(((pi/4)*dHFU^2)-(N*(pi/4)*dto^2))
vt = Qw/(N*(pi/4)*dti^2)
phi = (N*(pi/4)*dto^2)/((pi/4)*dHFU^2)

Res = de*vs/nys
Ret = dti*vt/nyt
Scs = nys/Dis
Sct = nyt/Dit

Shis = 5.85*(1-phi)*(de/L)*(Res^(2/3))*(Scs^(1/3))
Shit = 1.5*((dti/L)*Ret*Sct)^(1/3)

kimo = Dit*epsm/(taum*lm)
kios = Shis*Dis/de
kiwt = Shit*Dit/dti

Kw = (1/((1/(mi*dto*kios)))+(1/(mi*dtln*kimo)))+(1/(dti*kiwt)))/dti

LTU = Qw/(Kw*N*pi*dti)
zaehler = ciwb_in*(1-(Qw/(Qo*mi)))-((ciob_in/mi)*(1-exp((L*(1-(Qw/(mi*Qo))))/LTU)))
nenner = exp((L*(1-(Qw/(mi*Qo))))/LTU)-(Qw/(Qo*mi))
ciwb_out = zaehler/nenner
ciob_out = ((Qw/Qo)*(ciwb_in-ciwb_out))+ciob_in
NTU = (1/(1-(Qw/(mi*Qo))))*ln((ciwb_in-(ciob_out/mi))/(ciwb_out-(ciob_in/mi)))
Test = NTU * LTU
***

```

7.3.7.5 Synthese im ZPMR

Die Reaktorvorbereitung geschieht wie in § 7.3.6.2 beschrieben. Der verwendete Reaktor ist in § 4.5.2.4 beschrieben und hat ein Volumen von 39 mL. Die Substratlösung besteht aus: 10 mM MDA ($1,78 \text{ g L}^{-1}$), 0,2 mM NAD^+ (143 mg L^{-1}), 50 mM Natriumformiat ($3,4 \text{ g L}^{-1}$) und 1 mM DTT (154 mg L^{-1}) in 100 mM TEA/HCl-Puffer ($14,9 \text{ g L}^{-1}$). Es werden 195 U FDH ($= 5 \text{ U mL}^{-1}$) und 117 U CPCR ($= 3 \text{ U mL}^{-1}$) eingespült und der Fluß auf 39 mL h^{-1} ($\tau = 1 \text{ h}$) eingestellt. Nach 12 h wird der wäßrige Kreislauf geschlossen und eine Dosierung von 60 µL h^{-1} reinem MDA ($= 10 \text{ mM h}^{-1}$) und 300 µL h^{-1} einer $2,6 \text{ mM NAD}^+$ -Lösung ($= 0,02 \text{ mM h}^{-1}$) gestartet. Der pH-Wert wird durch Titration mit 50 % HCOOH auf 7,0 geregelt. Nach 117 h wird die Verweilzeit durch Erhöhung des Flusses auf 78 mL h^{-1} und der MDA-Dosierung auf 120 µL h^{-1} auf 30 min verkürzt, wobei die NAD^+ -Dosierung konstant bleibt.

7.3.8 Reduktion von Acetophenon

7.3.8.1 Kinetische Messungen

Die Reaktionskinetik wurde mit Hilfe von Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen photometrisch durchgeführt. Die Ansätze enthielten die zu untersuchenden Substrate in unterschiedlicher Menge (s. Anhang A) in 100 mM TEA / HCl-Puffer pH 7,0 mit 1 mM DTT. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

7.3.8.2 Synthese im ZPMR

Der Reaktor wird analog zu 7.3.7.5 betrieben, hat jedoch ein Volumen von 78 mL. Die Substratlösung besteht aus: 10 mM AcPhe ($1,2 \text{ g L}^{-1}$), 0,2 mM NAD^+ (143 mg L^{-1}), 50 mM Natriumformiat ($3,4 \text{ g L}^{-1}$) und 1 mM DTT (154 mg L^{-1}) in 100 mM TEA/HCl-Puffer ($14,9 \text{ g L}^{-1}$). Es werden 78 U FDH ($= 1 \text{ U mL}^{-1}$) und 78 U *CPCR* ($= 1 \text{ U mL}^{-1}$) eingespült und der Fluß auf 78 mL h^{-1} ($\tau = 1 \text{ h}$) eingestellt. Nach 12 h wird der wäßrige Kreislauf geschlossen und eine Dosierung von $90 \mu\text{L h}^{-1}$ reinem AcPhe ($= 10 \text{ mM h}^{-1}$) und $300 \mu\text{L h}^{-1}$ einer 5,2 mM NAD^+ -Lösung ($= 0,02 \text{ mM h}^{-1}$) gestartet. Der pH-Wert wird durch Titration mit 50 % HCOOH auf 7,0 geregelt. Nach 176 h wird die Substratkonzentration durch Erhöhung der Substratdosierung auf $180 \mu\text{L h}^{-1}$ und zusätzliche Zugabe von 10 mM AcPhe in das Mischgefäß verdoppelt. Nach 191 h wird eine Konzentration von 40 mM AcPhe durch Erhöhung der Dosierung auf $360 \mu\text{L h}^{-1}$ und Zugabe von 20 mM AcPhe ins Mischgefäß eingestellt. Es liegt ab hier keine homogene Lösung mehr vor, was zum raschen Abfall des Umsatzes führt.

8 Literatur

- Adlercreutz, P. (1996). "Cofactor Regeneration in Biocatalysis in Organic Media" *Biocatal. Biotransform.* **14**, 1-30.
- Alphand, V., Furstoss, R. (1995). "Baeyer-Villiger Oxidations" in: Drauz, K., Waldmann, H. (Hrsg.): "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" 2 VCH, Weinheim, 745-773.
- Anderson, B.A., Hansen, M.H., Harkness, A.R., Henry, C.L., Vicenzi, J.T., Zmijewski, M.J. (1996). "A Novel Enantioselective Synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164: Utility of a Practical Biocatalytic Reduction" Abstracts of the Papers of the American Chemical Society **211**, 11.
- Anderson, B.A., Hansen, M.M., Harkness, A.R., Henry, C.L., Vicenzi, J.T., Zmijewski, M.J. (1995). "Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5H-2,3-Benzodiazepine LY300164" *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12358-12359.
- Arnold, F.H., Moore, J.C. (1997). "Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution" *Biochem. Eng.* **58**, 1-14.
- Bach, J., Berenguer, R., Garcia, J., López, M., Manzanal, J., Vilarrasa, J. (1998). "Oxazaborolidine-Catalysed Reduction of Alk-2-ene-1,4-diones. A Convenient Access to Chiral 1,4-Diols" *Tetrahedron* **54**, 14947-14962.
- Baeyer, A., Villiger, V. (1899). "Einwirkung des Caro'schen Reagens auf Ketone" *Ber. Dt. Chem. Ges.* **32**, 3625-3633.
- Battino, R. (1981). "IUPAC Solubility Data Series" 7 (Oxygen and Ozone) Pergamon Press, Oxford.
- Becker, H.G.O., Domschke, G., Fanghärter, E., Fischer, M., Gewald, K., Meyer, R., Pavel, D., Schmidt, H., Schwetlick, K. (1990). "Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum" Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- Bergmeyer, H.U. (1974). "Bestimmung der Aktivität von Enzymen" in: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): "Methoden der enzymatischen Analyse" 1 VCH, Weinheim, 129-165.
- Bertschy, H., Chenault, H.K., Whitesides, G.M. (1995). "Reduction of Aldehydes and Ketones" in: Drauz, K., Waldmann, H. (Hrsg.): "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" 2 VCH, Weinheim, 595-628.
- Biselli, M., Kragl, U., Wandrey, C. (1995). "Reaction Engineering for Enzyme-Catalyzed Biotransformations" in: Drauz, K., Waldmann, H. (Hrsg.): "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" 1 VCH, Weinheim, 89-155.
- Biselli, M.F. (1991). "Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D,L-Alanin zu L-Alanin" Dissertation Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Bolm, C., Schligoff, G., Bienewald, F. (1997). "Copper- and Vanadium-Catalyzed Asymmetric Oxidations" *J. Mol. Catal. A: Chem.* **117**, 347-350.
- Bolm, C., Schlingloff, G., Weickhardt, K. (1994). "Optically-Active Lactones from a Baeyer-Villiger-Type Metal-Catalyzed Oxidation with Molecular-Oxygen" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1848-1849.

- Bommarius, A.S., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., Drauz, K. (1995). "Synthesis and Use of Enantiomerically Pure *tert*-Leucine" *Tetrahedron: Asymm.* 6, 2851-2888.
- Bongs, J. (1997). "Reaktionstechnische Optimierung Transketolase-katalysierter Synthesen" Dissertation Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bückmann, A.F., Kula, M.-R., Wichmann, R., Wandrey, C. (1981). "An Efficient Synthesis of High-Molecular-Weight NAD(H) Derivatives Suitable for Continuous Operation With Coenzyme-Dependant Enzyme Systems" *J. Appl. Biochem.* 3, 301-315.
- Burk, M.J. (1992). "Chiral Phospholanes via Chiral 1,4-Diol Cyclic Sulfates".
- Burk, M.J., Feaster, J.E., Harlow, R.L. (1990). "New Electron-Rich Chiral Phosphines for Asymmetric Catalysis" *Organometallics* 9, 2653-2655.
- Burk, M.J., Feaster, J.E., Harlow, R.L. (1991). "New Chiral Phospholanes; Synthesis, Characterisation, and Use in Asymmetric Hydrogenation Reactions" *Tetrahedron: Asymm.* 2, 569-592.
- Burk, M.J., Feaster, J.E., Nugent, W.A., Harlow, R.L. (1993). "Preparation and Use of C₂-Symmetric Bis(phospholanes): Production of α -Amino Acid Derivatives via Highly Enantioselective Hydrogenation Reactions" *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10125-10138.
- Burk, M.J., Gross, M.F., Harper, T.G.P., Kalberg, C.S., Lee, J.R., Martinez, J.P. (1996). "Asymmetric Catalytic Routes to Chiral Building Blocks of Medicinal Interest" *Pure Appl. Chem.* 68, 37-44.
- Burk, M.J., Harper, G.P., Kalberg, C.S. (1995). "Highly Enantioselective Hydrogenation of β -Keto Esters Under Mild Conditions" *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4423-4424.
- Carrea, G., Ottolina, G., Pasta, P., Riva, S. (1995). "Synthetic Applications of NAD(P)(H) Dependant Enzymes" *Enzyme Engineering* 13, San Diego, CA, USA.
- Chen, L.-Y., Ghosez, L. (1990). "Study of Chiral Auxiliars for the Intramolecular [2+2] Cycloaddition of a Ketiminium Salt to an Olefinic Double Bond. A New Asymmetric Synthesis of Cyclobutanones" *Tetrahedron Lett.* 31, 4467-4470.
- Chen, L.-Y., Ghosez, L. (1991). "Intramolecular Cycloaddition of Ketiminium Salts: A Practical Asymmetric Synthesis of Prostaglandins" *Tetrahedron: Asymm.* 2, 1181-1184.
- Chen, Y.-C.J., Peoples, O.P., Walsh, C.T. (1988). "Acinetobacter Cyclohexanone Monooxygenase: Gene Cloning and Sequence Determination" *J. Bacteriol.* 170, 781-789.
- Chenault, H.K., Simon, E.S., Whitesides, G.M. (1988). "Cofactor Regeneration for Enzyme-Catalyzed Synthesis" *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 6, 221-270.
- Chenault, H.K., Whitesides, G.M. (1987). "Regeneration of Nicotinamide Cofactors for Use in Organic Synthesis" *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14, 147-197.
- Cleland, W.W. (1963). "The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions With Two or More Substrates or Products" *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137.
- Cordes, A., Kula, M.-R. (1994). "Large-Scale Purification of Formate Dehydrogenase" *Methods Enzymol.* 228, 600-608.

- Corey, E.J., Bakshi, K.R., Shibata, S. (1987). "Highly Enantioselective Borane Reduction of Ketones Catalyzed by Chiral Oxazaborolidines. Mechanism and Synthetic Implications" *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5551-5553.
- Corey, E.J., Link, J.O. (1992). "A New Process for the Enantioselective Synthesis of α -Aryloxy and α -Hydroxy Acids" *Tetrahedron Lett.* **33**, 3431-3434.
- Cornish-Bowden, A. (1995). "Fundamentals of Enzyme Kinetics" Portland Press, London.
- Crespo, J.G., Bölddeker, K.W. (1996). "Membrane Processes in Separation and Purification" NATO ASI Ser., Ser. E 272, 505.
- Daiminger, U., Plucinski, P., Nitsch, W. (1995). "Leistungspotential von Hohlfasermodule für die nichtdispersive chemische Extraktion" *Chem.-Ing.-Tech.* **67**, 217-221.
- DECHEMA (1994). "Lehrprofil Technische Chemie".
- D'Elia, N.A., Dahuron, L., Cussler, E.L. (1986). "Liquid-Liquid Extractions With Microporous Hollow Fibers" *J. Membrane Sci.* **29**, 309-319.
- Deslongchamps, P., Chenevert, R., Taillefer, R.J., Moreau, C., Saunders, J.K. (1975). "The Hydrolysis of Cyclic Orthoesters. Spectroelectronic Control in the Cleavage of Hemioorthoesters Tetrahedral Intermediates" *Canad. J. Chem.* **53**, 1601-1615.
- Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., Comtat, M. (1997). "Potential Applications of NAD(P)-Dependent Oxidoreductases in Synthesis: a Survey" *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 248-258.
- Dierkes, P., Ramdeehul, S., Barloy, L., De Cian, A., Fischer, J., Kamer, P.C.J., van Leeuwen, P.W.N.M., Osborn, J.A. (1998). "Vielseitige Liganden für die Pd-katalysierte asymmetrische allylische Alkylierung" *Angew. Chem.* **110**, 3299-3301.
- Donoghue, N.A., Norris, D.B., Trudgill, P.W. (1975). "The Metabolism of Cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB 9871" *Eur. J. Biochem.* **60**, 1-7.
- Donoghue, N.A., Norris, D.B., Trudgill, P.W. (1976). "The Purification and Properties of Cyclohexanone Oxygenase from *Norcadia globerula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871" *Eur. J. Biochem.* **63**, 175-192.
- Drauz, K., Waldmann, H. (Hrsg.) (1995). "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis", VCH, Weinheim.
- Drioli, E., Giorno, L. (1996). "Catalytic Membrane Reactors" *Chemistry & Industry*, 19-22.
- Egorov, A.M., Avilova, T.V., Dikov, M.M., Popov, V.O., Rodionov, Y.V., Berezin, I.V. (1979). "NAD-Dependent Formate Dehydrogenase from Methylophilic Bacterium, Strain 1: Purification and Characterization" *Eur. J. Biochem.* **99**, 569-576.
- Faber, K. (1995). "Biotransformations in Organic Chemistry" Springer Verlag, Berlin.
- Faber, K. (1997). "Biotransformations of Nonnatural Compounds - State-of-the-Art and Future-Development" *Pure Appl. Chem.* **69**, 1613-1632.
- Fan, Q.-H., Yeung, C.-H., Chan, A.S.C. (1997). "An improved synthesis of Chiral Diols via the Asymmetric catalytic hydrogenation of prochiral diones" *Tetrahedron: Asymm.* **8**, 4041-4045.
- Fang, J.-M., Lin, C.-H., Bradshaw, C.-W., Wong, C.-H. (1995). "Enzymes in Organic Synthesis: Oxidoreductions" *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 967-978.

- Fantin, G., Fogagnolo, M., Giovannono, P.P., Medici, A., Pedrini, P., Gardini, F., Lanciotti, R. (1996). "Anti-Prelog Microbial Reduction of Prochiral Carbonyl Compounds" *Tetrahedron* **52**, 3547-3552.
- Fonds der Chemischen Industrie (1996). "Folienserie Biotechnologie / Gentechnik" FCI, Frankfurt.
- Fry, A.J., Sobolov, S.B., Leonida, M.D., Voivodov, K.I. (1994). "Electroenzymatic Synthesis (Regeneration of NADH Coenzyme): Use of Nafion Ion Exchange Films or Immobilization of Enzyme and Redox Mediator" *Tetrahedron Lett.* **35**, 5607-5610.
- Fujii, T., Miyawaki, O., Yano, T. (1991). "Modelling of Hollow-Fiber Capillary Reactor for the Production of L-Alanine With Coenzyme Regeneration" *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1166-1172.
- Geist, A., Plucinski, P., Nitsch, W. (1997). "Modellierung der Multikationenkoextraktion in Hohlfasermodule auf der Basis von kinetischen Messungen und Gleichgewichtsdaten" *Chem.-Ing.-Tech.* **69**, 946-951.
- Giffels, G. (1997). "Enantioselektive Homogenkatalyse mit polymergebundenen Katalysatoren im Membranreaktor" Dissertation Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Giffels, G., Beliczey, J., Felder, M., Kragl, U. (1998). "Polymer Enlarged Oxazaborolidines in a Membrane Reactor: Enhancing Effectivity by Retention of the Homogeneous Catalyst" *Tetrahedron: Asymm.* **9**, 691-696.
- Godfrey, T., West, S. (1996). "Industrial Enzymology- Application of Enzymes in Industry" Macmillan, London, 271-283.
- Guerin, M., Camougrand, N., Caubet, R., Zniber, S., Velours, G., Manon, S., Guelin, E., Cheyrou, A. (1989). "The second respiratory chain of *Candida parapsilosis* : A comprehensive study" *Biochimie.* **71**, 887-902.
- Gusso, A., Baccin, C., Pinna, F., Strukul, G. (1994). "Platinum-Catalyzed Oxidations with Hydrogen-Peroxide - Enantiospecific Baeyer-Villiger Oxidation of Cyclic Ketones" *Organometallics* **13**, 3442-3451.
- Hambach, B., Biselli, M., Runstadler, P.W., Wandrey, C. (1992). "Development of a Reactor-Integrated Aeration System for Cultivation of Animal Cells in Fluidized Beds" in: Spier, R.E., Griffith, J.B., MacDonald, C. (Hrsg.): "Animal Cell Technology, Developments, Processes and Products" Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 381-385.
- Hilthorst, R., Laane, C., Veeger, C. (1982). "Photosensitized Production of Hydrogen by Hydrogenase in Reversed Micells" *Proc. Natl. Acad. Sci* **79**, 3927-3930.
- Hirao, A., Itsuno, S., Nakahama, S., Yamazaki, N. (1981). "Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones with Chiral Alkoxy-Amine-Borane Complexes" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 315-317.
- Ho, W.S.W., Sirkar, K.K. (Hrsg.) (1992). "Membrane Handbook", Chapman & Hall, New York.
- Hoffmann, N. (1996). "Bäckerhefe - Ein lebendes Reagens für die Organisch-chemische Synthese" *Chem. unserer Zeit* **30**, 201-213.
- Holt, K.E., Berens, U., McCague, R., Taylor, S.J.C. (1997). "Preparation of Enantiomerically Pure C₂-Symmetric Diols" *Biotrans '97*, La Grande Motte, Frankreich, C-20.

- Hummel, W. (1990). "Enzyme-Catalyzed Synthesis of Optically Pure R(+)-Phenylethanol" *J. Biotechnol. Lett.* **12**, 403-408.
- Hummel, W. (1990). "Reduction of Acetophenone to R(+)-Phenylethanol by a New Alcohol Dehydrogenase From *Lactobacillus kefir*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 15-19.
- Hummel, W. (1997). "New Alcohol Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds" *Adv. Biochem. Eng.* **58**, 145-184.
- Ikeda, H., Sato, E., Sugai, T., Ohta, H. (1996). "Yeast-Mediated Synthesis of Optically Active Diols with C₂-Symmetry and (R)-4-Pentanolide" *Tetrahedron* **52**, 8113-8122.
- Ishida, T., Wada, K. (1977). "Total Synthesis of (±)-Diplodialide A" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 337-337.
- Ishida, T., Wada, K. (1978). "Total Synthesis of (±)-Diplodialide A" *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 323-327.
- Itsuno, S., Iro, K., Hirao, A., Nakahama, S., Yamazaki, N. (1983). "Asymmetric Reduction of Aromatic Ketones with the Reagent Prepared from (S)-(-)-2-Amino-3-methyl-1,1-diphenylbutan-1-ol and Borane" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 469.
- Itsuno, S., Ito, K. (1984). "Asymmetric Reduction of Aliphatic Ketones with the Reagent Prepared from (S)-(-)-2-Amino-3-methyl-1,1-diphenylbutan-1-ol and Borane" *J. Org. Chem.* **49**, 555-557.
- Jacobsen, S.E., Tang, R., Mares, F. (1978). "Oxidation of Cyclic Ketones by Hydrogen Peroxide Catalysed by Group 6 Metal Peroxo Complexes" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 888-889.
- Kim, M.J., Lee, I.S. (1993). "Combined Chemical and Enzymic Synthesis of (S,S)-2,5-Dimethylpyrrolidine" *Synlett*, 767-768.
- Kim, M.J., Lee, I.S., Jeong, N., Choi, Y.K. (1993). "Lipase-Catalyzed Transesterification as a Route to Each Stereoisomer of 2,5-Hexanediol and 3-Hexyne-2,5-diol. Synthesis of (2R,5R)-2,5-Dimethyltetrahydrofuran" *J. Org. Chem.* **58**, 6483-6485.
- Knowles, J.R. (1991). "Enzyme Catalysis: Not Better, Just Different" *Nature* **350**, 121-124.
- Kometani, T., Yoshii, H., Matsuko, R. (1996). "Large-Scale Production of Chiral Alcohols With Bakers' Yeast" *J. Mol. Cat. B Enzymatic* **1**, 45-52.
- Kragl, U. (1996). "Enzyme Membrane Reactors" in: Godfrey, T., West, S. (Hrsg.): "Industrial Enzymology- Application of Enzymes in Industry" Macmillan, London, 271-283.
- Kragl, U. (1997). "Reaktionstechnik der asymmetrischen Synthese mit Homogen- und Biokatalysatoren" Habilitationsschrift Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Kragl, U., Gödde, A., Wandrey, C., Kinzy, W., Cappon, J.J., Lugtenburg, J. (1993). "Repetitive Batch as an Efficient Method for Preparative Scale Enzymatic Synthesis of 5-Azido-Neuraminic Acid and ¹⁵N-L-Glutamic Acid" *Tetrahedron: Asymm.* **4**, 1193-1202.
- Kragl, U., Rissom, S., Kula, M.-R., Wandrey, C. (1997). "Verbesserung der Produktivität enzymkatalysierter Reaktionen am Beispiel der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis*" Dechema Jahrestagung der Biotechnologen, Münster.
- Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C. (1992). "Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen" *Chem.-Ing.-Tech.* **64**, 499-509.
- Kruse, W. (1995). "Enantioselektive enzymkatalysierte Reduktion von Ketonen im Enzym-Membran-Reaktor mit membrangestützter extraktiver Produktabtrennung- Verfahren zur

- Produktion chiraler hydrophober Alkohole* Dissertation Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Kruse, W., Hummel, W., Kragl, U. (1996). "Alcohol-Dehydrogenase-Catalyzed Production of Chiral Hydrophobic Alcohols. A New Approach Leading to a Nearly Waste-Free Process" *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **115**, 239-243.
- Kula, M.-R., Peters, J. (1993). "Ketoester Reductase, for Conversion of Keto Acid Esters to Optically Active Hydroxy Acid" US-Patent 5,523,223.
- Kuwahara, Y., Matsumoto, K., Wada, Y., Suzuki, T. (1991). "Chemical Ecology on Astigmatid Mites. XXIX. Aggregation Pheromone and Kairomone Activity of Synthetic Lardolure (1R,3R,5R,7R)-1,3,5,7-Tetramethyldecyl Formate and Its Optical Isomers to *Lardoglyphus kono*i and *Carpoglyphus lactis* (Acari: Astigmata)" *Appl Ent. Zool.* **26**, 85-89.
- Laane, C., Verhaert, R. (1987/88). "Photochemical, electrochemical and hydrogen-driven enzymatic reductions in reversed micells" *Israel J. Chem.* **28**, 17-22.
- Lamzin, V.S., Aleshin, A.E., Strokopytov, B.V., Yukchenevich, M.G., Popov, V.O., Harutyunyan, E.H., Wilson, K.S. (1992). "Crystal Structure of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase" *Eur. J. Biochem.* **206**, 441-452.
- Larsson, P.O., Mosbach, K. (1974). "Preparation and Characterization of a Water-Soluble Coenzymically Active Dextran-NAD⁺" *FEBS Lett.* **46**, 119-122.
- Latham, J.A., Walsh, C. (1987). "Mechanism-Based Inactivation of the Flavoenzyme Cyclohexanone Monooxygenase during Oxygenation of Cyclic Thiol Ester Substrates" *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3421-3427.
- Liese, A., Zelinski, T., Kragl, U., van der Tweel, W., Kula, M.-R., Wandrey, C. (1996). "Enantioselective Reduktion schwerlöslicher Ketone - Reaktorkonzept für Arbeiten an der Löslichkeitsgrenze" Dechema Jahrestagung, Wiesbaden.
- Liese, A., Zelinski, T., Kula, M.-R., Kierkels, H., Karutz, M., Kragl, U., Wandrey, C. (1998). "A Novel Reactor Concept for the Enzymatic Reduction of Poorly Soluble Ketones" *J. Mol. Cat. B Enzymatic* **4**, 91-99.
- Lieser, J.K. (1983). "A Simple Synthesis of (S,S)-2,5-Hexanediol" *Synth. Commun.* **13**, 765-767.
- Lin, S.-S., Harada, T., Hata, C., Miyawaki, O., Nakamura, K. (1997). "Nanofiltration Membrane Bioreactor for Continuous Asymmetric Reduction of 2-Ketoglutaraldehyde to Produce L-Glutamate with NADH Regeneration" *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 54-58.
- Ling, I., Hámori, T., Botka, P., Sólyom, S., Simay, A., Moravcsik, I. (1995). "Optically Active 1-(4-Nitrophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-3,4-dihydro-5H-2,3-benzodiazepine and Process for Preparing the Same" *Internationales Patent* WO 95/01357.
- Ling, I., Podányi, B., Hámori, T., Sólyom, S. (1995). "Asymmetric Reduction of a Carbon-Nitrogen Double Bond: Enantioselective Synthesis of 4,5-Dihydro-3H-2,3-benzodiazepines" *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 1423-1427.
- Masamune, S. (1985). "Preparation and Application of Chiral 2,5-Dimethylborolanes" US-Patent 85-807096.
- McKinstry, L., Livinghouse, T. (1995). "An Efficient Procedure for the Synthesis of C-Chiral Bisphosphines" *Tetrahedron* **51**, 7655-7666.
- Michaelis, L., Menten, M.L. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung" *Biochem. Zeitschr.* **49**, 333-369.

- Michelin, R.A., Ros, R., Strukul, G. (1979). "Synthesis and Reactivity of Hydroperoxo Complexes of Platinum(II)" *Inorg. Chim. Acta* 37, L491-L492.
- Mori, K., Kuwahara, S. (1986). "Synthesis of Both Enantiomers of Lardolure, the Aggregation Pheromone of the Acarid Mite, *Lardoglyphus Kono*" *Tetrahedron* 42, 5539-5544.
- Morita, Y., Furui, H., Yoshii, H., Matsuno, R., Kometani, T. (1994). "NADP(H) Regeneration Using Ethanol as an Energy Source in Baker's Yeast-Mediated Bioreduction" *J. Ferment. Bioeng.* 77, 13-16.
- Mulder, M. (1996). "Basic Principles of Membrane Technology" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Murahashi, S.-I., Oda, Y., Naota, T. (1992). "Fe₂O₃-Catalyzed Baeyer-Villiger Oxidation of Ketones with Molecular Oxygen in the Presence of Aldehydes" *Tetrahedron Lett.* 33, 7557-7560.
- Mutschler, E. (1996). "Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie" Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart.
- Nagai, H., Morimoto, T., Achiwa, K. (1994). "Facile Enzymic Synthesis of Optically Active 2,5-Hexanediol Derivatives and its Application to the Preparation of Optically Pure Cyclic Sulfate for Chiral Ligands" *Synlett*, 289-290.
- Nakamura, K., Aizawa, M., Miyawaki, O. (1988). "Electroenzymology Coenzyme Regeneration" Springer Verlag, Berlin.
- Nakamura, K., Kitano, K., Matsuda, T., Ohno, A. (1996). "Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of *Geotrichum candidum*" *Tetrahedron Lett.* 37, 1629-1632.
- Neuberg, C. (1949). "Biochemical Reductions at the Expense of Sugars" *Adv. Carbohydr. Chem.* 4, 75-117.
- Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K.D. (1996). "Continuous Enzymatic Production of Xylitol with Simultaneous Coenzyme Regeneration in a Charged Membrane Reactor" *Biotechnol. Bioeng.* 52, 389-396.
- Noble, R.D., Stern, S.A. (Hrsg.) (1995). "Membrane Separations Technology. Principles and Applications", Elsevier, Amsterdam.
- Notari, B. (1989). "Synthesis and Catalytic Properties of Titanium Containing Zeolites" in: Grobet, P.J., Mortier, W.J., Vansant, E.F., Schulz-Ekloff, G. (Hrsg.): "Innovation in Zeolite Material Science" 37 Elsevier, Amsterdam, 413-425.
- Noyori, R. (1994). "Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, New York.
- Obon, J.M., Almagro, M.J., Manjón, A., Iborra, J.L. (1996). "Continuous Retention of Native NADP(H) in an Enzyme Membrane Reactor for Gluconate and Glutamate Production" *J. Biotechnol.* 50, 27-36.
- Otten, S., Fröhlich, R., Haufe, G. (1998). "Synthesis and Structural Characterisation of Enantiopure (2R,5R)-(+)-2,5-Dimethylthiolane" *Tetrahedron: Asymm.* 9, 189-191.
- Peters, J. (1993). "Isolierung und Charakterisierung von Enzymsystemen zur stereoselektiven Reduktion von Ketocarbonsäuren / estern" Dissertation Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

- Peters, J. (1998). "Dehydrogenases - Characteristics, Design of Reaction Conditions, and Applications" in: Kelly, D.R. (Hrsg.): "Biotechnology" 8a (Biotransformations I) Wiley-VCH, Weinheim, 391-474.
- Peters, J., Brockamp, H.-P., Minuth, T., Grothus, M., Steigel, A., Kula, M.-R., Elling, L. (1993). "Combined Chemoenzymatic Synthesis of 2O-6-Deoxy- α -L-Sorbofuranosyl-D-Glucose" Tetrahedron: Asymm. 4, 1173-1182.
- Peters, J., Minuth, T., Kula, M.-R. (1993). "Kinetic and Mechanistic Studies of a Novel Carbonyl Reductase Isolated from *Candida parapsilosis*" Biocatalysis 8, 31-46.
- Peters, J., Minuth, T., Kula, M.R. (1993). "A Novel NADH-Dependent Carbonyl Reductase with an Extremely Broad Substrate Range from *Candida parapsilosis*: Purification and Characterization" Enzyme Microb. Technol. 15, 950-958.
- Peters, J., Zelinski, T., Kula, M.R. (1992). "Studies on the Distribution and Regulation of Microbial Keto Ester Reductases" Appl. Biochem. Biotechnol. 38, 334-340.
- Peters, J., Zelinski, T., Minuth, T., Kula, M.-R. (1993). "Synthetic Applications of the Carbonyl Reductases Isolated from *Candida parapsilosis* and *Rhodococcus erythropolis*" Tetrahedron: Asymm. 4, 1683-1692.
- Pichon, M., Figadère, B. (1996). "Synthesis of 2,5-Disubstituted Pyrrolidines" Tetrahedron: Asymm. 7, 927-964.
- Poppe, L., Novak, L. (1992). "Selective Biocatalysis" VCH, Weinheim.
- Prasad, R., Kiani, A., Bhave, R.R., Sirkar, K.K. (1986). "Further Studies on Solvent Extraction with Immobilized Interfaces in a Microporous Hydrophobic Membrane" J. Membrane Sci. 26, 79-97.
- Prasad, R., Sirkar, K.K. (1988). "Dispersion-Free Solvent Extraction with Microporous Hollow-Fiber Modules" AIChE J. 34, 177-188.
- Prasad, R., Sirkar, K.K. (1990). "Hollow Fiber Solvent Extraction: Performances and Design" J. Membrane Sci. 50, 153-175.
- Reed, B.W., Semmens, M.J., Cussler, E.L. (1995). "Membrane Contactors" in: Noble, R.D., Stern, S.A. (Hrsg.): "Membrane Separations Technology" 2 Elsevier, Amsterdam, 467-498.
- Rilling, P., Pommersheim, R., Vogt, W., Rissom, S., Liese, A., Wandrey, C. (1996). "Immobilization of Enzymes and Living Cells by Multilayer Microcapsules" International Workshop Bioencapsulation V, Potsdam.
- Rissom, S., Beliczey, J., Giffels, G., Kragl, U., Wandrey, C. (1998). "Asymmetric Reduction of Acetophenone in Membrane Reactors: Comparison of Oxazaborolidine and Alcohol Dehydrogenase Catalysed Processes" Tetrahedron: Asymm. in Druck.
- Rissom, S., Kragl, U. (1999). "Approaches to the Recycle of Cofactors in Enzyme Reactions" J. Mol. Cat. B Enzymatic eingereicht.
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V.I., Kragl, U. (1997). "Synthesis of Chiral ϵ -Lactones in a Two-Enzyme System of Cyclohexanone Mono-oxygenase and Formate Dehydrogenase with Integrated Bubble-Free Aeration" Tetrahedron: Asymm. 8, 2523-2526.
- Roberts, S.M. (1998). "Preparative Biotransformations: The Employment of Enzymes and Whole-Cells in Synthetic Organic Chemistry" J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 157-169.

- Roberts, S.M., Wan, P.W.H. (1998). "Enzyme-Catalysed Baeyer-Villiger Oxidations" J. Mol. Cat. B Enzymatic 4, 111-136.
- Röthig, T.R., Kulbe, K.D., Bückmann, F., Carrea, G. (1990). "Continuous Coenzyme Dependant Stereoselective Synthesis of Sulcatol by Alcohol Dehydrogenase" Biotechnol. Lett. 12, 353-356.
- Ruppert, R., Herrmann, S., Steckhan, E. (1988). "Very Efficient Reduction of NAD(P)⁺ with Formate Catalysed by Cationic Rhodium Complexes" J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1150-1151.
- Saravanan, P., Raina, S., Sambamurthy, T., Singh, V.K. (1997). "Practical Synthesis of (2R,5R)-2,5-Hexanediol" J. Org. Chem. 62, 2669-2670.
- Schils, D., Ghosez, L. (1998). "Synthesis of Chiral 2,5-Disubstituted Pyrrolidines" The Impact of Organic Synthesis on Drug Discovery, Heidelberg, 91.
- Schmidt, S. (1997). "Grenzschichttransport bei membranbegasten Wirbelschichten: Verifizierung eines mechanistischen Modells" Diplomarbeit RWTH, Aachen.
- Schneider, M., Reymond, F., Marison, I.W., von Stockar, U. (1995). "Bubble-Free Oxygenation by Means of Hydrophobic Porous Membranes" Enzyme Microb. Technol. 17, 839-847.
- Schubert, T. (1998). "Chemoenzymatische Dihydroisocumarinsynthese" Diplomarbeit Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahm, H., Kula, M.-R. (1976). "Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*" Eur. J. Biochem. 62, 151-160.
- Schütte, H., Hummel, W., Kula, M.-R. (1982). "Purification and Characterisation of a Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Candida boidinii*" Biochim. Biophys. Acta 716, 298-307.
- Schwarz-Linek, U. (1995). "Untersuchungen zur enzymatischen Baeyer-Villiger-Oxidation mit Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter NCIMB 9871*" Diplomarbeit Universität Leipzig, Leipzig.
- Schwarz-Linek, U. (1998). "Untersuchungen zur enzymatischen Baeyer-Villiger-Oxidation mit Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter NCIMB 9871* Anwendung eines neuen Systems zur Coenzymregenerierung" Dissertation Universität Leipzig, Leipzig.
- Seelbach, K. (1994). "Verwendung von Umkehrosmosemembranen zur Cofaktorrückhaltung in Enzym-Membranreaktoren am Beispiel neuer NADP(H)-abhängiger Enzyme" Diplomarbeit Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn.
- Seelbach, K., Kragl, U. (1997). "Nanofiltration Membranes for Cofactor Retention in Continuous Enzymatic Synthesis" Enzyme Microb. Technol. 20, 389-392.
- Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M.R., Tishkov, V.I., Egorov, A.M., Wandrey, C., Kragl, U. (1996). "A Novel, Efficient Regenerating Method of NADPH Using a New Formate Dehydrogenase" Tetrahedron Lett. 37, 1377-1380.
- Segel, I.H. (1975). "Enzyme Kinetics" John Wiley & Sons Inc., New York.
- Servi, S. (1990). "Baker's Yeast as a Reagent in Organic Synthesis" Synthesis, 1-25.
- Shi, X., Leal, W.S., Schrader, E., Meinwald, J. (1995). "A New Synthesis of Alkylated 2H-Pyran-2-ones and Its Application to the Determination of the Relative and Absolute

- Configuration of Supellapyrone, Sex Pheromone of the Brownbanded Cockroach, Supella longipalpa*" Tetrahedron Lett. **36**, 71-74.
- Short, R.P., Kennedy, R.M., Masamune, S. (1989). "An Improved Synthesis of (-)-(2R,5R)-2,5-Dimethylpyrrolidine" J. Org. Chem. **54**, 1755-1756.
- Sieber, H. (1980). "Mathematische Formeln" Klett, Stuttgart.
- Sih, C.J., Chen, C.-S. (1984). "Mikrobielle asymmetrische Katalyse - Enantioselektive Reduktion von Ketonen" Angew. Chem. **96**, 570-578.
- Stauder, E. (1992). "Membranen und Membrantrennprozesse" VCH, Weinheim.
- Steckhan, E., Herrmann, S., Ruppert, R., Thömmes, J., Wandrey, C. (1990). "Kontinuierliche Erzeugung von NADH aus NAD⁺ und Formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten Homogenkatalysator in einem Membranreaktor" Angew. Chem. **102**, 445-447.
- Stewart, J.D., Reed, K.W., Kayser, M.M. (1996). "Designer Yeast: A New Reagent for Enantioselective Baeyer-Villiger Oxidations" J. Chem. Soc. Perkin Trans.1, 755-757.
- Stewart, J.D., Reed, K.W., Martinez, C.A., Zhu, J., Chen, G., Kayser, M.M. (1998). "Recombinant Baker's Yeast as a Whole-Cell Catalyst for Asymmetric Baeyer-Villiger Oxidations" J. Am. Chem. Soc. **120**, 3541-3548.
- Stewart, J.D., Reed, K.W., Zhu, J., Chen, G., Kayser, M.M. (1996). "A 'Designer Yeast' That Catalyzes the Kinetic Resolutions of 2-Alkyl-Substituted Cyclohexanones by Enantioselective Baeyer-Villiger Oxidations" J. Org. Chem. **61**, 7652-7653.
- Stinson, S.C. (1995). "Chiral Drugs" Chemical & Engineering News **9.10.**, 44-72.
- Stinson, S.C. (1998). "Counting on Chiral Drugs" Chem. Eng. News **21.9.**, 83-104.
- Strukul, G. (1998). "Übergangsmetallkatalyse bei der Baeyer-Villiger-Oxidation von Ketonen" Angew. Chem. **110**, 1252-1267.
- Taranava, I., Berzsenyi, P., András, F., Botka, P., Hátori, T., Ling, I., Körösi, J. (1993). "Structure-Activity Relationship of 2,3-Benzodiazepine Compounds with Glutamate Antagonistic Action" Bioorg. Med. Chem. Lett. **3**, 99-104.
- Taschner, M.J., Black, D.J. (1988). "The Enzymatic Baeyer-Villiger Oxidation: Enantioselective Synthesis of Lactones from Mesomeric Cyclohexanes" J. Am. Chem. Soc. **110**, 6892-6893.
- Thomas, K.C., Woodley, J.M. (1998). "Rational Selection of Cofactor Regeneration Processes" 2nd European Symposium on Biochemical Engineering Science, Porto, 201.
- Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Marchenko, G.N., Tsygankov, Y.D., Egorov, A.M. (1993). "Formate Dehydrogenase from Methylotrophic Bacterium Pseudomonas sp. 101 - Gene Cloning and Expression in Escherichia coli" Biotechnol. Appl. Biochem. **18**, 201-207.
- Tishkov, V.I., Matorin, A.D., Rojkova, A.M., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Dementieva, L.A., Lamzin, V.S., Mezentzev, A.V., Popov, V.O. (1996). "Site-Directed Mutagenesis of the Formate Dehydrogenase Active-Center: Role of the His³³²-Gln³¹³ Pair in Enzyme Catalysis" FEBS Lett. **390**, 104-108.
- Tishkov, V.I.G., A. G.; Kulakova, L. B.; Egorov, A. M. (1993). "Protein Engineering of Bacterial Formate Dehydrogenase" Enzyme Engineering XII, Deauville, France.
- Trudgill, P.W. (1990). "Cyclohexanone 1,2-Monooxygenase from Acinetobacter NCIMB 9871" Methods Enzymol. **188**, 70-77.

- Verachtert, H., DeMot, R. (1990). *"Yeast Biotechnology and Biocatalysis"* Marcel Dekker Inc., New York.
- Vicenzi, J.T., Zmijewski, M.J., Reinhard, M.R., Landen, B.E., Muth, W.L., Marler, P.G. (1997). *"Large-Scale Stereoselective Enzymatic Ketone Reduction With in-Situ Product Removal via Polymeric Adsorbent Resins"* Enzyme Microb. Technol. **20**, 494-499.
- Walsh, C.T., Chen, Y.-C.J. (1988). *"Enzymatische Baeyer-Villiger-Oxidationen durch flavinabhängige Monooxygenasen"* Angew. Chem. **100**, 342-352.
- Wandrey, C., Bossov, B. (1986). *"Continuous Cofactor Regeneration - Utilization of Polymer Bound NAD(H) for the Production of Optically Active Acids"* Biotechnol. Bioind. **3**, 8-13.
- Wendhausen Jr., R., Moran, P.J.S., Joekes, I., Rodrigues, J.A.R. (1998). *"Continuous Process for Large-Scale Preparation of Chiral Alcohols with Baker's Yeast Immobilized on Chrysotile Fibers"* J. Mol. Cat. B Enzymatic **5**, 69-73.
- Westerhausen, D., Herrmann, S., Hummel, W., Steckhan, E. (1992). *"Formiatgetriebene, nicht enzymatische NAD(P)H-Regeneration bei der durch Alkohol-Dehydrogenasen katalysierten stereoselektiven Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon"* Angew. Chem. **104**, 1496-1498.
- Weuster-Botz, D., Paschold, H., Striegel, B., Gieren, H., Kula, M.-R., Wandrey, C. (1994). *"Continuous Computer Controlled Production of Formate Dehydrogenase and Isolation on a Pilot Scale"* Chem. Eng. Technol. **17**, 131-137.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A.F., Kula, M.-R. (1981). *"Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NAD(H) Regeneration"* Biotechnol. Bioeng. **23**, 2789-2802.
- Wolberg, M., Müller, M., Hummel, W. (1998). *"Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von 3,5-Dioxocarbonsäuren sowie deren Ester"* Deutscher Patentantrag 198 57 323.2
- Wong, C.-H., Whitesiedes, G.M. (1994). *"Enzymes in Synthetic Organic Chemistry"* in: Baldwin, J.E., Magnus, P.D.: *"Tetrahedron Organic Chemistry Series"* **12** Elsevier Science, Oxford.
- Yamada, T., Takahashi, K., Kato, K., Takai, T., Inoki, S., Mukaiyama, T. (1991). *"The Baeyer-Villiger Oxidation of Ketones Catalyzed by Nickel(II) Complexes with Combined Use of Molecular Oxygen and an Aldehyde"* Chem. Lett., 641-644.
- Zachariou, M., Scopes, R.K. (1986). *"Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated From Zymomonas mobilis That is Responsible for the Sorbitol Production"* J. Bacteriol. **167**, 863-869.
- Zelinski, T., Kula, M.R. (1997). *"Asymmetric Enzymatic Reduction of Lipophilic Ketones in Aqueous-Solution Containing Cyclodextrins"* Biocatal. Biotransform. **15**, 57-74.
- Zelinski, T., Peters, J., Kula, M.R. (1994). *"Purification and Characterization of a Novel Carbonyl Reductase Isolated from Rhodococcus erythropolis"* New. J. Chem. **33**, 283-292.
- Zmijewski, M.J., Vicenzi, J., Landen, B.E., Muth, W., Marler, P., Anderson, B. (1997). *"Enantioselective Reduction of 3,4-Methylene-dioxyphenylacetone Using Candida famata and Zygosaccharomyces rouxii"* Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**, 162-166.

Anhang A: Daten der Kinetikmessungen und Simulationen

In diesem Anhang werden die Daten und Graphen der Messungen zur Bestimmung der Reaktionskinetiken zusammengefaßt. Zu näheren Angaben zu den experimentellen Details sei auf den Methodenteil dieser Arbeit verwiesen. Zusätzlich sind Listings der Simulationsmodelle angegeben.

A.1 System 4-Methylcyclohexanon / Monooxygenase / FDH

Meßbedingungen (soweit nicht anders angegeben bzw. variiert):

MO:

[4-Methylcyclohexanon] = 1 mM

[NADPH] = 0,2 mM

pH (Tris/HCl, 50 mM) = 8,0

Temperatur = 30 °C

FDH:

[Formiat] = 300 mM

[NADP⁺] = 1,5 mM

pH (Tris/HCl, 50 mM) = 8,0

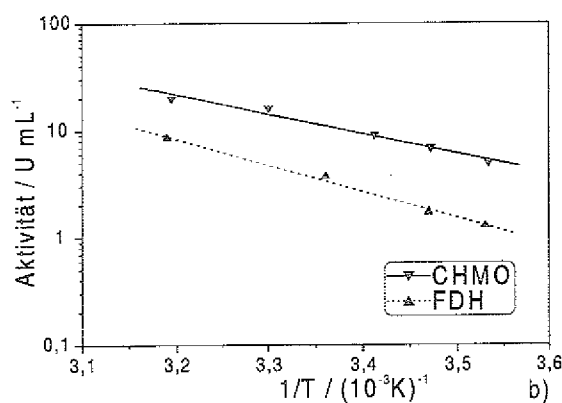
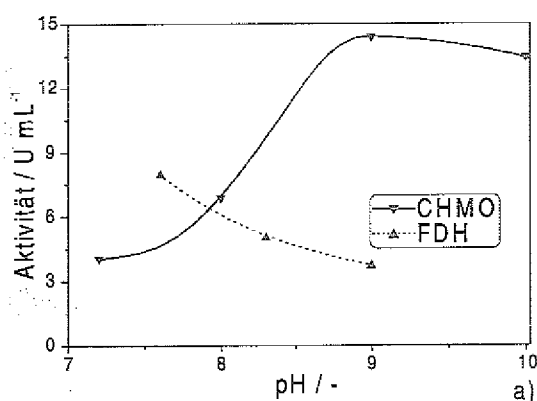
Temperatur = 30 °C

a) pH-Abhängigkeit:

pH /-	Akt(MO) / U mL ⁻¹	Akt(FDH) / U mL ⁻¹
7,2		4,06
7,6	7,93	
8		6,87
8,3	5,01	
9	3,71	14,38
10		13,44

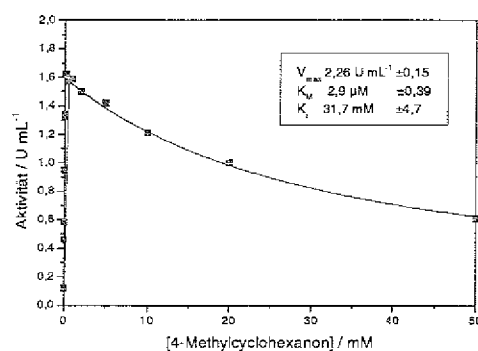
b) Temperaturabhängigkeit

Temperatur / °C	Akt(MO) / U mL ⁻¹	Akt(FDH) / U mL ⁻¹
10	1,27	5
15	1,71	6,87
20		9,06
24	3,71	
30		16,25
40	8,48	20



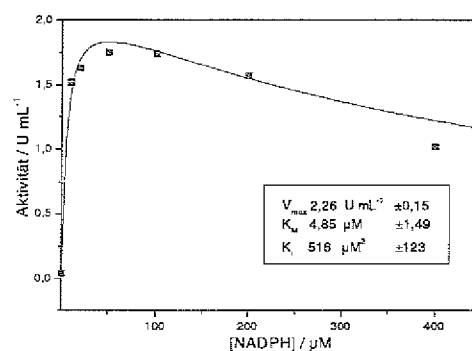
Kinetikmessungen der CHMO aus *Acinetobacter*

[4-MeChOn] / mM	[NADPH] / μ M	V / U mL ⁻¹
50	200	0,61
20	200	1,00
10	200	1,21
5	200	1,42
2	200	1,50
1	200	1,59
0,5	200	1,57
0,2	200	1,62
0,1	200	1,62
0,05	200	1,62
0,02	200	1,33
0,01	200	1,34
0,005	200	0,95
0,002	200	0,58
0,001	200	0,46
0	200	0,12

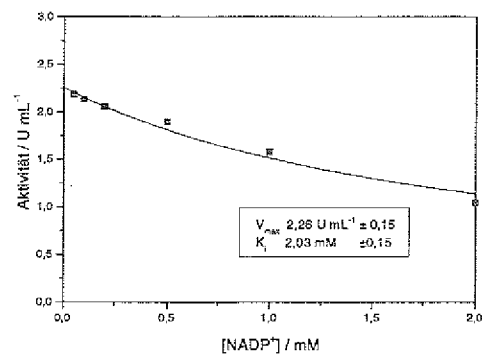


Abhängigkeit NADPH:

[4-MeChOn] / mM	[NADPH] / μ M	V / U mL ⁻¹
1	400	1,02
1	200	1,57
1	100	1,74
1	50	1,75
1	20	1,63
1	10	1,52
1	0	0,04

Inhibierung NADP⁺:

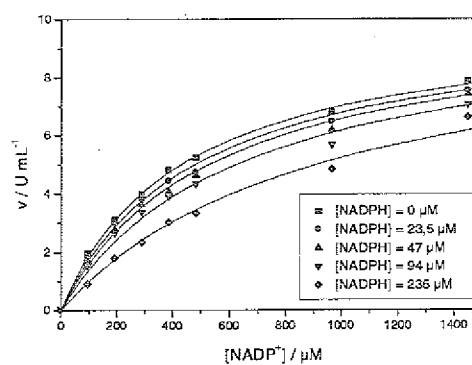
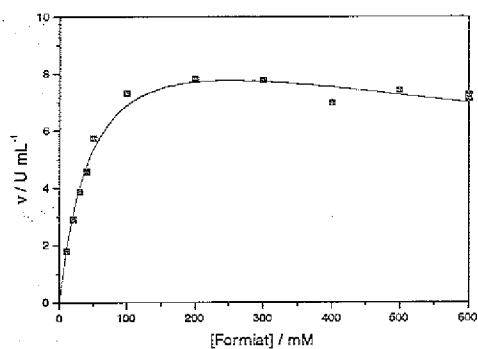
[NADP ⁺] / mM	V / U mL ⁻¹
2	1,05
1	1,58
0,5	1,90
0,2	2,06
0,1	2,13
0,05	2,19
0	1,94



Kinetikmessungen der FDH aus *Pseudomonas*

[NADP ⁺] / μM	[Formiat] / mM	[NADPH] / μM	V / U mL^{-1}
1449	0	0	-0,03
1449	10	0	1,80
1449	20	0	2,91
1449	30	0	3,88
1449	40	0	4,58
1449	50	0	5,74
1449	100	0	7,32
1449	200	0	7,81
1449	300	0	7,79
1449	400	0	6,98
1449	500	0	7,43
1449	600	0	7,27
1449	600	0	7,12
0	300	0	-0,02
96,6	300	0	1,95
193,2	300	0	3,09
289,8	300	0	3,99
386,4	300	0	4,83
483	300	0	5,25
966	300	0	6,82
1449	300	0	7,87
0	300	23,5	0,00
96,6	300	23,5	1,70
193,2	300	23,5	3,02
289,8	300	23,5	3,80
386,4	300	23,5	4,43
483	300	23,5	4,74
966	300	23,5	6,48
1449	300	23,5	7,54

[NADP ⁺] / μM	[Formiat] / mM	[NADPH] / μM	V / U mL^{-1}
0	300	47	0,00
96,6	300	47	1,70
193,2	300	47	2,77
289,8	300	47	3,64
386,4	300	47	4,08
483	300	47	4,63
966	300	47	6,20
1449	300	47	7,42
0	300	94	0,05
96,6	300	94	1,54
193,2	300	94	2,65
289,8	300	94	3,37
386,4	300	94	3,91
483	300	94	4,36
966	300	94	5,68
1449	300	94	7,06
0	300	235	-0,05
96,6	300	235	0,91
193,2	300	235	1,80
289,8	300	235	2,35
386,4	300	235	3,03
483	300	235	3,34
966	300	235	4,85
1449	300	235	6,63



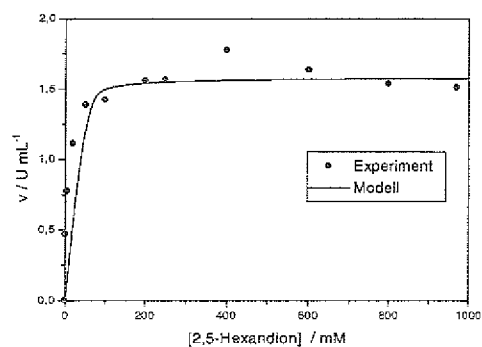
A.2 System Hexandion / CPCR / Formiat

Zur Erklärung von Abkürzungen und Reaktionsbezeichnungen sei auf den Ergebnisteil dieser Arbeit verwiesen.

Reaktion 1:

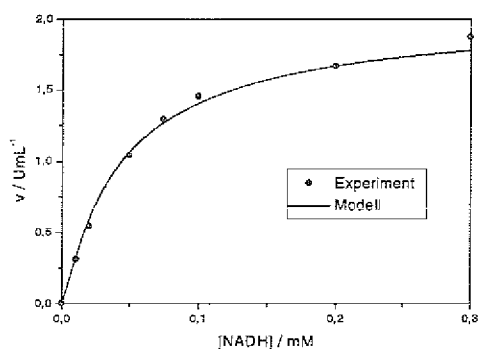
Abhängigkeit HD

[HD] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0
1	0,469
5	0,775
20	1,113
50	1,388
100	1,421
200	1,56
250	1,567
400	1,774
600	1,633
800	1,537
970	1,511



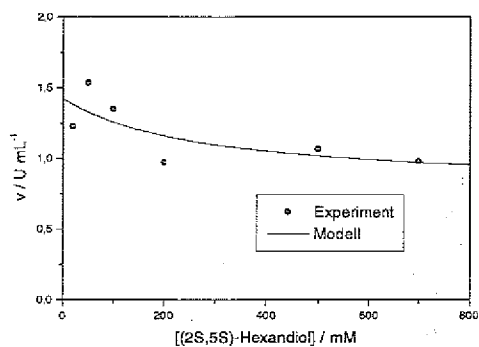
Abhängigkeit NADH

[NADH] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0
0,01	0,305
0,02	0,54
0,05	1,038
0,075	1,29
0,1	1,454
0,2	1,668
0,3	1,875



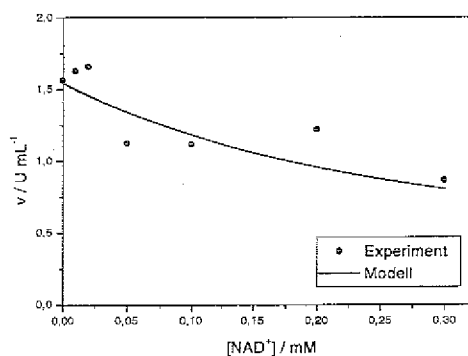
Inhibierung Hexandiol:

[HDL] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
20	1,221
50	1,532
100	1,346
200	0,97
500	1,066
700	0,98



Inhibierung durch NAD^+ :

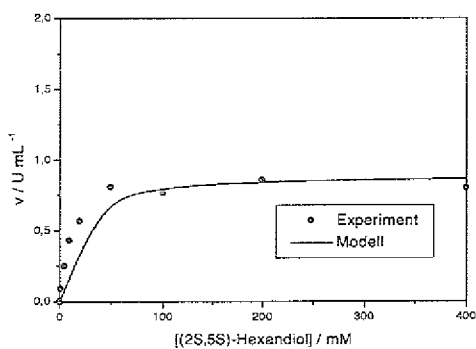
$[\text{NAD}^+] / \text{mM}$	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	1,56
0,01	1,625
0,02	1,657
0,05	1,122
0,1	1,113
0,2	1,217
0,3	0,864



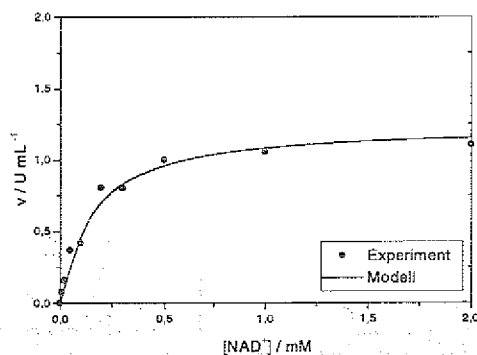
Reaktion 4:

Abhängigkeit HDL:

$[\text{HDL}] / \text{mM}$	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0
1	0,09
5	0,247
10	0,43
20	0,564
50	0,804
100	0,763
400	0,797
600	0,519
800	0,502

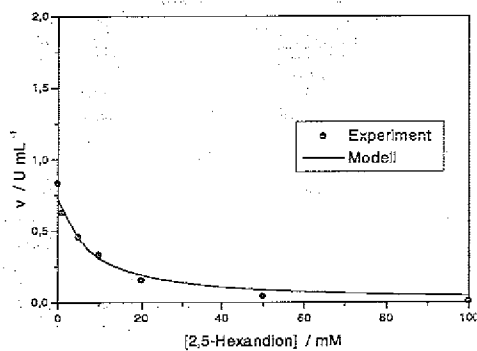
Abhängigkeit NAD^+ :

$[\text{NAD}^+] / \text{mM}$	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0
0,01	0,075
0,02	0,16
0,05	0,367
0,1	0,419
0,2	0,805
0,3	0,799
0,5	1
1	1,054
2	1,102



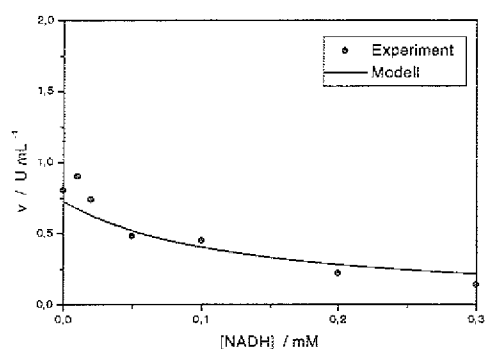
Inhibierung Hexandion:

$[\text{HD}] / \text{mM}$	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,833
1	0,627
5	0,454
10	0,332
20	0,154
50	0,042
100	0,006



Inhibierung NADH:

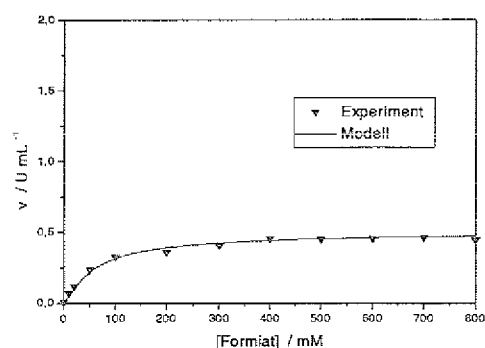
[NADH] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,805
0,01	0,899
0,02	0,734
0,05	0,478
0,1	0,447
0,2	0,217
0,3	0,135



Reaktion 5:

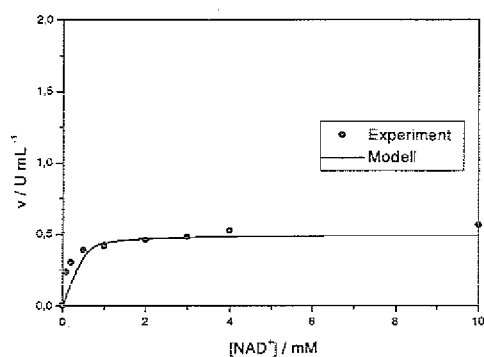
Abhängigkeit Formiat:

[FOR] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,01
10	0,07
20	0,119
50	0,235
100	0,325
200	0,357
300	0,405
400	0,454
500	0,449
600	0,456
700	0,46
800	0,447



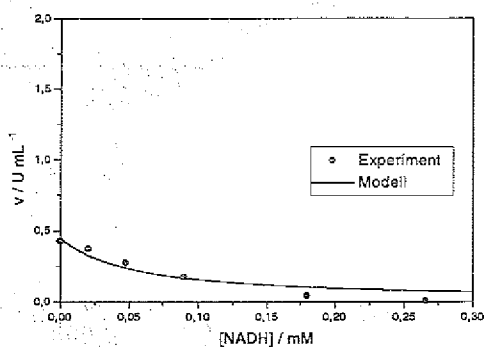
Abhängigkeit NAD⁺:

[NAD⁺] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0
0,1	0,233
0,2	0,303
0,5	0,387
1	0,42
2	0,459
3	0,481
4	0,523
10	0,562



Inhibierung NADH:

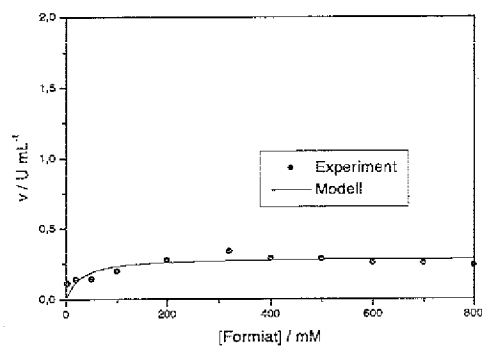
[NADH] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,428
0,0206	0,374
0,0477	0,271
0,0905	0,17
0,18	0,043
0,266	0,006



Reaktion 7:

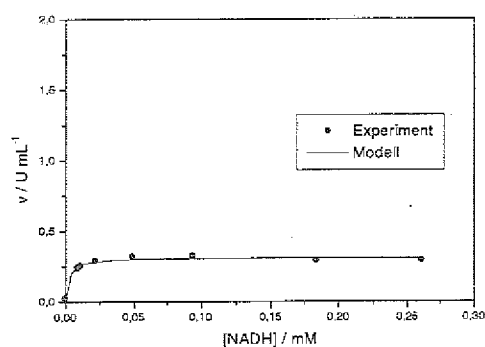
Abhängigkeit Formiat:

[FOR] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
4	0,109
20	0,136
50	0,143
100	0,197
200	0,276
320	0,337
400	0,29
500	0,284
600	0,258
700	0,256
800	0,24



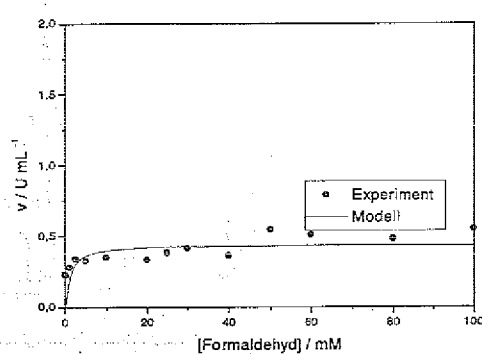
Abhängigkeit NADH:

[NADH] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,024
0,009	0,242
0,0109	0,256
0,0217	0,292
0,0489	0,322
0,094	0,324
0,184	0,29
0,261	0,295

**Reaktion 8:**

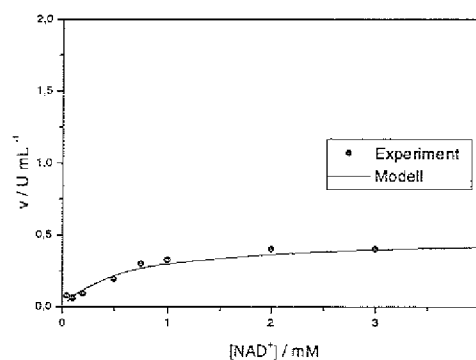
Abhängigkeit Formaldehyd:

[FALD] / mM	$v / \text{U mL}^{-1}$
0	0,223
1	0,28
2,5	0,34
5	0,324
10	0,349
20	0,329
25	0,381
30	0,41
40	0,359
50	0,544
60	0,508
80	0,481
100	0,547



Abhängigkeit NAD^+ :

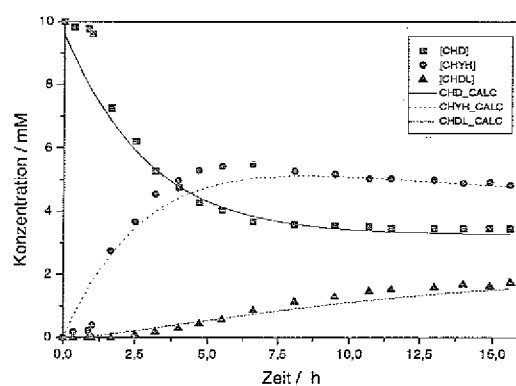
$[\text{NAD}] / \text{mM}$	$v / \text{U mL}^{-1}$
0,05	0,075
0,1	0,058
0,2	0,087
0,5	0,191
0,75	0,299
1	0,324
2	0,399
3	0,4
4	0,389



Datensatz zur Erstellung der Integralkinetiken zur Bestimmung des Einflusses von Hydroxyhexanon:

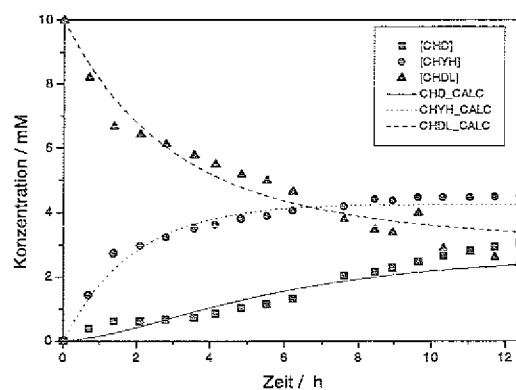
Reduktionsreaktion:

Zeit / h	$[\text{HD}] / \text{mM}$	$[\text{HYH}] / \text{mM}$	$[\text{HDL}] / \text{mM}$
0	10	0	0
0,35	9,82	0,18	0
0,87	9,78	0,22	0
1	9,62	0,38	0
1,65	7,26	2,74	0
2,5	6,22	3,66	0,11
3,2	5,28	4,53	0,19
4	4,75	4,95	0,3
4,7	4,28	5,28	0,43
5,5	4,03	5,41	0,56
6,6	3,67	5,47	0,86
8,1	3,59	5,27	1,14
9,5	3,54	5,17	1,29
10,7	3,53	5,01	1,46
11,5	3,46	5,01	1,53
13	3,45	4,98	1,58
14	3,44	4,89	1,68
14,9	3,47	4,9	1,63
15,6	3,44	4,82	1,74



Oxidationsreaktion:

Zeit / h	[HD] / mM	[HYH] / mM	[HDL] / mM
0	0	0	10
0,02	0	0,02	9,98
0,72	0,39	1,41	8,2
1,4	0,61	2,71	6,68
2,1	0,62	2,95	6,43
2,8	0,66	3,21	6,12
3,57	0,74	3,49	5,77
4,15	0,86	3,63	5,51
4,85	1,03	3,79	5,18
5,53	1,15	3,87	4,98
6,22	1,32	4,04	4,65
7,6	2,04	4,18	3,79
8,45	2,15	4,39	3,46
8,95	2,28	4,36	3,36
9,65	2,47	4,45	3,97
10,32	2,65	4,46	2,89
11,05	2,8	4,47	2,77
11,72	2,93	4,47	2,6
12,4	3,06	4,51	2,43



Exemplarisches Programmlisting aus Scientist® des Modells, das zur Simulation des in

4.3.4.1 beschriebenen pH-statisierten Batches verwendet wurde¹:

```
// Modell HDL-Batch
IndVars: T
DepVars: CHD,CHYH,CHDL,CFOR,CNH,CN,CFALD
Params: KMHD,KMHYH,KMHDL,KMNH,KMN,KMFOR,KMFALD
Params: V1,V2,V3,V4,V5,V7,V8
Params: V6,KM6FOR,K6N,K6NH
// Kinetische Gleichungen
A=1/((1+CHD/KMHD+CHYH/KMHYH+CHDL/KMHDL)*(1+CN/KMN+CNH/KMNH))
B=1/((1+CFOR/KMFOR)*(1+CN/KMN+CNH/KMNH))
R1=A*CFOR*(V1*CHD/KMHD*CNH/KMNH)
R2=A*CFOR*(V2*CHYH/KMHYH*CN/KMN)
R3=A*CFOR*(V3*CHYH/KMHYH*CNH/KMNH)
R4=A*CFOR*(V4*CHDL/KMHDL*CN/KMN)
R5=B*V5*CFOR/KMFOR*CN/KMN
R6=V6*CFOR/(KM6FOR+CFOR)*CN/(K6N*(1+CNH/K6NH)+CN)
R7=B*V7*CFOR/KMFOR*CNH/KMNH1
R8=V8*CFALD/(KMFALD+CFALD)*CN/(KNH+CN)
// Massenbilanzen
CHD'=-R1+R2
CHYH'=R1-R2-R3+R4
CHDL'=R3-R4
CFOR'=-R5-R6-R7+R8
CFALD'=R7-R8
CNH'=-R1+R2-R3+R4+R5+R6-R7+R8
CN'=R1-R2+R3-R4-R5-R6+R7-R8
// Anfangsbedingungen
T=0
CHD=100
CHYH=0
CHDL=0
CNH=0.5
CN=0
CFOR=250
CFALD=0
// Parameter
KMHD=12.4407883
KMHYH=18.5790356
KMHDL=13.0933250
KMN=0.101542631
KMNH=0.06177714
KMFOR=59.6511334
KMFALD=0.923
V1=1.22349597
V2=1.79847740
V3=0.147960795
V4=0.781345836
V5=0.0674557550
V7=0.0711291117
V8=0.056
// Parameter FDH
KM6FOR=11.2379316
K6N=0.0344235033
K6NH=0.0120146905
V6=4.31971292
***
```

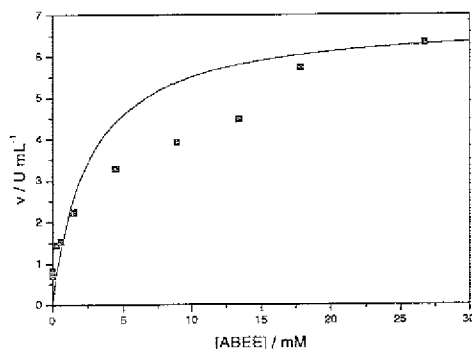
¹ In die Geschwindigkeitskonstanten sind die Enzymkonzentrationen bereits eingerechnet

A.3 System *CPCR* / ABEE

A.3.1 Kinetik der *CPCR* mit ABEE als Substrat

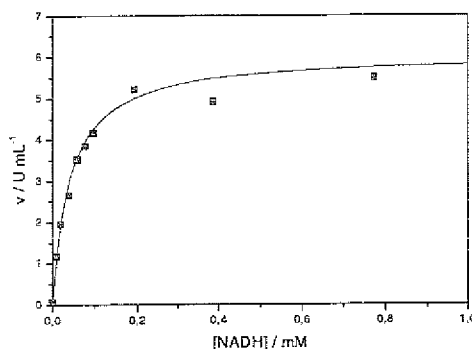
Abhängigkeit ABEE:

[ABEE] / mM	$v / U \text{ mL}^{-1}$
0	0,82
0,29	1,44
0,59	1,53
1,49	2,24
4,46	3,28
8,91	3,92
13,37	4,48
17,82	5,73
26,73	6,33



Abhängigkeit NADH:

[NADH] / mM	$v / U \text{ mL}^{-1}$
0	0,07
0,01	1,18
0,02	1,96
0,04	2,66
0,06	3,53
0,08	3,85
0,1	4,17
0,19	5,22
0,39	4,92
0,77	5,49



Modell (Scientist®) zur Parameteranpassung:

// Michaelis-Menten-Doppelsubstratkinetik

IndVars: ABEE,NADH

DepVars:V

Params:VMAX,KMABEE,KMNADH

$V = V_{\text{MAX}} * (ABEE / (KMABEE + ABEE)) * (NADH / (KMNADH + NADH))$

A.3.2 Synthese im EMR

Modell (Scientist®) der Simulation bei Anfangsbedingungen (mit Kommentaren):

// Simulation EMR, ABEE als Substrat, vereinfacht

IndVars: T

DepVars:STD,U

Params:KMS,KMNADH,TAU,E,K

$V = \text{CNADH} * \text{CS} / ((\text{KMS} + \text{CS}) * (\text{KMNADH} + \text{CNADH}))$

$\text{CS}' = -E * V + ((\text{CS}_0 - \text{CS}) / \text{TAU})$

$E' = -E * K$

$\text{STD} = T / 60$

$U = 100 * (\text{CS}_0 - \text{CS}) / \text{CS}_0$

// Anfangsbedingungen

T=0

CS = 30

CS0 = 30

CNADH = 0.2

Reaktionsgeschwindigkeitsgleichung
Massenbilanz für ABEE
Enzymdesaktivierung
Umrechnung der Zeit auf h
Umsatzberechnung

[min]

[mM]

[mM]

[mM]

E = 1

k = 5.2E-5

TAU = 60

// Parameter

KMS = 2.5

KMNADH = 0.041

Zur Variation der Verweilzeiten wurde ersetzt:

TAU = 30, 20, 15, 45, 60

unter Einfügen der jeweils aktuellen Anfangskonzentration des Enzyms E und der aus dem letzten Umsatzwert des vorhergehenden Verweilzeitabschnittes berechneten Substratkonzentration CS0.

[U mL⁻¹][min⁻¹]

[min]

[mM]

[mM]

A.4 System CPCR / MDA

A.4.1 Kinetik der CPCR mit MDA als Substrat

Reduktion:

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
0,38	0	0	0,47	0,37
0,76	0	0	0,47	0,78
1,14	0	0	0,47	1,24
1,51	0	0	0,47	1,49
1,89	0	0	0,47	1,72
4,73	0	0	0,47	2,40
9,46	0	0	0,47	2,63
14,19	0	0	0,47	3,24
0,38	0	0	0,28	0,76
0,76	0	0	0,28	1,27
1,14	0	0	0,28	1,43
1,51	0	0	0,28	1,60
1,89	0	0	0,28	1,86
4,73	0	0	0,28	2,36
9,46	0	0	0,28	3,03
14,19	0	0	0,28	3,18
14,19	0	0	0	0,05
14,19	0	0	0,03	0,18
14,19	0	0	0,06	0,78
14,19	0	0	0,08	1,30
14,19	0	0	0,11	1,53
14,19	0	0	0,14	1,95
14,19	0	0	0,28	2,65
14,19	0	0	0,47	3,43
9,46	0	0	0	0
9,46	0	0	0,03	0,32
9,46	0	0	0,06	0,74
9,46	0	0	0,08	1,26
9,46	0	0	0,11	1,71
9,46	0	0	0,14	2,00
9,46	0	0	0,28	3,06

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
9,46	0	0	0,47	3,67
0,39	0,28	0	0,47	1,04
0,77	0,28	0	0,47	1,77
1,14	0,28	0	0,47	2,05
1,52	0,28	0	0,47	2,39
1,90	0,28	0	0,47	2,41
4,74	0,28	0	0,47	3,11
9,47	0,28	0	0,47	3,63
14,20	0,28	0	0,47	4,27
0,40	0,55	0	0,47	1,36
0,77	0,55	0	0,47	1,75
1,15	0,55	0	0,47	2,33
1,53	0,55	0	0,47	2,35
1,91	0,55	0	0,47	2,63
4,75	0,55	0	0,47	3,21
9,48	0,55	0	0,47	3,60
14,21	0,55	0	0,47	3,91
0,41	0,92	0	0,47	1,37
0,79	0,92	0	0,47	1,87
1,16	0,92	0	0,47	2,48
1,54	0,92	0	0,47	2,54
1,92	0,92	0	0,47	2,62
4,76	0,92	0	0,47	3,24
9,49	0,92	0	0,47	3,58
14,22	0,92	0	0,47	3,83
0,44	1,84	0	0,47	1,38
0,81	1,84	0	0,47	1,94
1,19	1,84	0	0,47	1,95
1,57	1,84	0	0,47	2,34
1,95	1,84	0	0,47	2,48
4,79	1,84	0	0,47	3,20

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
9,52	1,84	0	0,47	3,66
14,25	1,84	0	0,47	3,89
0,38	0	0,46	0,47	0,96
0,76	0	0,46	0,47	1,35
1,14	0	0,46	0,47	1,59
1,51	0	0,46	0,47	1,60
1,89	0	0,46	0,47	1,96
4,73	0	0,46	0,47	2,31
9,46	0	0,46	0,47	2,72
14,19	0	0,46	0,47	2,86
0,38	0	0,93	0,47	0,84
0,76	0	0,93	0,47	1,12
1,14	0	0,93	0,47	1,41
1,51	0	0,93	0,47	1,42
1,89	0	0,93	0,47	1,54
4,73	0	0,93	0,47	1,81
9,46	0	0,93	0,47	2,12
14,19	0	0,93	0,47	2,40
0,38	0	1,86	0,47	0,52
0,76	0	1,86	0,47	0,81

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
1,14	0	1,86	0,47	0,92
1,51	0	1,86	0,47	1,02
1,89	0	1,86	0,47	1,03
4,73	0	1,86	0,47	1,24
9,46	0	1,86	0,47	1,65
14,19	0	1,86	0,47	1,80
0,38	0	4,64	0,47	0,39
0,76	0	4,64	0,47	0,61
1,14	0	4,64	0,47	0,62
1,51	0	4,64	0,47	0,67
1,89	0	4,64	0,47	0,69
4,73	0	4,64	0,47	0,77
9,46	0	4,64	0,47	0,94
0,38	0	9,28	0,47	0,30
0,76	0	9,28	0,47	0,27
1,14	0	9,28	0,47	0,27
1,51	0	9,28	0,47	0,26
1,89	0	9,28	0,47	0,27
4,73	0	9,28	0,47	0,32
8,51	0	9,28	0,47	0,34

Oxidation:

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
0	0,38	0,93	0	-0,29
0,01	0,37	0,93	0	-0,29
0,02	0,74	0,93	0	-0,35
0,03	1,11	0,93	0	-0,34
0,05	1,48	0,93	0	-0,46
0,06	1,84	0,93	0	-0,45
0,14	4,61	0,93	0	-0,66
0,29	9,22	0,93	0	-0,76
0,43	13,83	0,93	0	-1,22
0,01	0,37	0,46	0	-0,27
0,02	0,74	0,46	0	-0,26
0,03	1,11	0,46	0	-0,37
0,05	1,48	0,46	0	-0,38
0,06	1,84	0,46	0	-0,41
0,14	4,61	0,46	0	-0,95
0,29	9,22	0,46	0	-0,95
0,43	13,83	0,46	0	-1,43
0,43	13,83	0	0	-0,01
0,43	13,83	0,05	0	-0,21
0,43	13,83	0,09	0	-0,36
0,43	13,83	0,14	0	-0,67
0	14,26	0,46	0	-1,00

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
0,43	13,83	0,46	0	-1,00
0,43	13,83	0,93	0	-1,33
0,43	13,83	1,86	0	-1,43
0,29	9,22	0	0	0
0,29	9,22	0,05	0	-0,26
0,29	9,22	0,09	0	-0,54
0,29	9,22	0,14	0	-0,71
0,29	9,22	0,19	0	-0,90
0,29	9,22	0,46	0	-1,39
0,29	9,22	0,93	0	-1,81
0,29	9,22	1,86	0	-1,89
0,48	0,37	0,93	0	-0,41
0,50	0,74	0,93	0	-0,77
0,51	1,11	0,93	0	-0,84
0,52	1,48	0,93	0	-0,89
0,53	1,84	0,93	0	-0,88
0,62	4,61	0,93	0	-1,23
0,76	9,22	0,93	0	-1,42
0,90	13,83	0,93	0	-1,43
0,96	0,37	0,93	0	-0,44
0,97	0,74	0,93	0	-0,39
0,98	1,11	0,93	0	-0,56

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
0,99	1,48	0,93	0	-0,59
1,00	1,84	0,93	0	-0,51
1,09	4,61	0,93	0	-0,88
1,23	9,22	0,93	0	-1,20
1,37	13,83	0,93	0	-1,30
1,90	0,37	0,93	0	-0,14
1,91	0,74	0,93	0	-0,24
1,93	1,11	0,93	0	-0,25
1,94	1,48	0,93	0	-0,27
1,95	1,84	0,93	0	-0,35
2,03	4,61	0,93	0	-0,56
2,18	9,22	0,93	0	-0,83
2,32	13,83	0,93	0	-0,98
3,80	0,37	0,93	0	-0,10
3,81	0,74	0,93	0	-0,13
3,82	1,11	0,93	0	-0,13
3,83	1,48	0,93	0	-0,15
3,84	1,84	0,93	0	-0,16
3,93	4,61	0,93	0	-0,31
4,07	9,22	0,93	0	-0,50
4,21	13,83	0,93	0	-0,65
0,01	0,37	0,93	0,09	-1,26
0,02	0,74	0,93	0,09	-1,44
0,03	1,11	0,93	0,09	-0,99
0,05	1,48	0,93	0,09	-1,28
0,06	1,84	0,93	0,09	-1,57
0,14	4,61	0,93	0,09	-1,69
0,29	9,22	0,93	0,09	-1,40
0,43	13,83	0,93	0,09	-1,33

[MDA] / mM	[MDI] / mM	[NAD] / mM	[NADH] / mM	V / U mL ⁻¹
0,01	0,37	0,93	0,19	-0,45
0,02	0,74	0,93	0,19	-1,06
0,03	1,11	0,93	0,19	-1,21
0,05	1,48	0,93	0,19	-1,14
0,06	1,84	0,93	0,19	-1,23
0,14	4,61	0,93	0,19	-1,33
0,29	9,22	0,93	0,19	-1,35
0,43	13,83	0,93	0,19	-1,12
0,01	0,37	0,93	0,28	-0,74
0,02	0,74	0,93	0,28	-0,83
0,03	1,11	0,93	0,28	-0,81
0,05	1,48	0,93	0,28	-0,81
0,06	1,84	0,93	0,28	-0,82
0,14	4,61	0,93	0,28	-0,93
0,29	9,22	0,93	0,28	-0,99
0,43	13,83	0,93	0,28	-0,34
0,01	0,37	0,93	0,37	-0,61
0,02	0,74	0,93	0,37	-0,57
0,03	1,11	0,93	0,37	-0,56
0,05	1,48	0,93	0,37	-0,57
0,06	1,84	0,93	0,37	-0,52
0,14	4,61	0,93	0,37	-0,63
0,29	9,22	0,93	0,37	-0,68
0,01	0,37	0,93	0,47	-0,09
0,02	0,74	0,93	0,47	-0,06
0,03	1,11	0,93	0,47	-0,09
0,05	1,48	0,93	0,47	-0,10
0,06	1,84	0,93	0,47	-0,13
0,14	4,61	0,93	0,47	0

Optimierprogramm:

// Doppelsubstratkinetik mit Inhibierungen

IndVars: S,P,NADH,NAD

DepVars: V

Params: VMAXRED,VMAXOX,KMS,KMP,KMNADH,KMNAD

 $A = 1 / ((1 + S/KMS + P/KMP) * (1 + NAD/KMNAD + NADH/KMNADH))$ $V = A * (VMAXRED * S / KMS * NADH / KMNADH + VMAXOX * P / KMP * NAD / KMNAD)$

A.5 System *CPCR* / AcPhe

A.5.1 Kinetik der *CPCR* mit AcPhe als Substrat

Reduktion:

[AcPhe] / mM	[NADH] / mM	[PheEt] / mM	[NAD] / mM	V / U mL ⁻¹
0	0,20	0	0	0
0,02	0,20	0	0	0,22
0,05	0,20	0	0	0,31
0,10	0,20	0	0	0,45
0,25	0,20	0	0	0,60
0,25	0,20	0	0	0,67
0,50	0,20	0	0	0,64
0,50	0,20	0	0	0,68
1,00	0,20	0	0	0,68
2,00	0,20	0	0	0,59
2,00	0,20	0	0	0,67
4,50	0,20	0	0	0,62
4,50	0,20	0	0	0,56
9,90	0,20	0	0	0,63
9,90	0,20	0	0	0,58
20,25	0,20	0	0	0,75
20,25	0,20	0	0	0,68
40,50	0,20	0	0	0,90
40,50	0,20	0	0	0,90

[AcPhe] / mM	[NADH] / mM	[PheEt] / mM	[NAD] / mM	V / U mL ⁻¹
4,50	0	0	0	0
4,50	0,01	0	0	0,20
4,50	0,01	0	0	0,30
4,50	0,02	0	0	0,42
4,50	0,05	0	0	0,56
4,50	0,10	0	0	0,59
4,50	0,20	0	0	0,62
4,50	0,30	0	0	0,51
4,50	0,20	0	0	0,59
4,50	0,20	0	0,01	0,61
4,50	0,20	0	0,02	0,56
4,50	0,20	0	0,05	0,50
4,50	0,20	0	0,10	0,49
4,50	0,20	0	0,20	0,46
4,50	0,20	0	0	0,62
4,50	0,20	2,00	0	0,64
4,50	0,20	5,00	0	0,59
4,50	0,20	10	0	0,52
4,50	0,20	20	0	0,52
4,50	0,20	40	0	0,49

Oxidation:

[AcPhe] / mM	[NADH] / mM	[PheEt] / mM	[NAD] / mM	V / U mL ⁻¹
0	0	0	0,20	0
0	0	0,05	0,20	-0,03
0	0	0,10	0,20	-0,06
0	0	0,20	0,20	-0,11
0	0	0,50	0,20	-0,24
0	0	1,00	0,20	-0,40
0	0	2,00	0,20	-0,60
0	0	5,00	0,20	-0,82
0	0	10	0,20	-0,89
0	0	25,00	0,20	-0,79
0	0	37,50	0,20	-0,69
0	0	50	0,20	-0,61
0	0	10	0	0
0	0	10	0,01	-0,11
0	0	10	0,02	-0,21
0	0	10	0,05	-0,43
0	0	10	0,10	-0,65

[AcPhe] / mM	[NADH] / mM	[PheEt] / mM	[NAD] / mM	V / U mL ⁻¹
0	0	10	0,20	-0,89
0	0	10	0,50	-1,13
0	0	10	0,70	-1,19
0	0	10	1,00	-1,24
0	0	10	0,50	-1,13
0	0,04	10	0,50	-0,87
0	0,07	10	0,50	-0,73
0	0,15	10	0,50	-0,53
0	0,21	10	0,50	-0,43
0	0,28	10	0,50	-0,36
0	0	10	0,50	-1,13
0,10	0	10	0,50	-1,02
0,25	0	10	0,50	-0,89
0,50	0	0,50	0,50	-0,74
0,99	0	10	0,50	-0,55
2,00	0	10	0,50	-0,36
9,90	0	10	0,50	-0,10

Optimierprogramm:

```
// s    = Substrat
// nad  = NAD
// nadh = NADH
// v    = Reaktionsgeschwindigkeit
// vmax = Vmax
// kmx  = Michaelis-Menten-Konstanten für die Komponente x
```

IndVars: s,p,nadh,nad

DepVars: v

Params: vmaxred,vmaxox,kms,kmp,kmnadh,kmnad

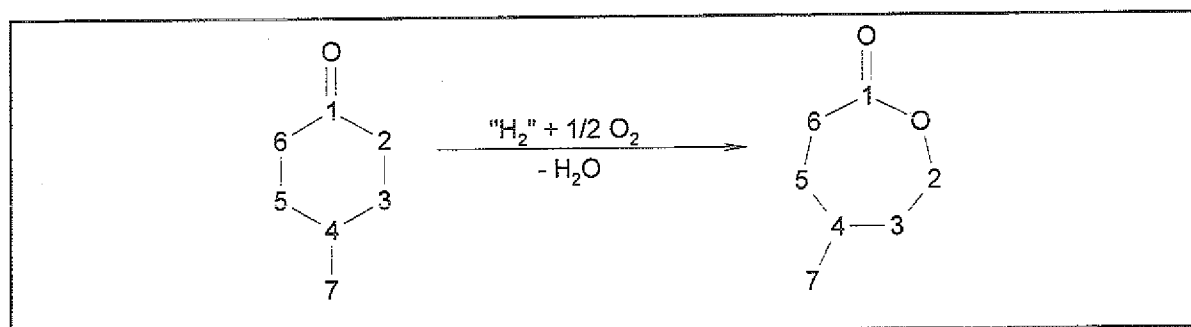
```
vred = vmaxred*(s/(kms*(1+(p/kmp))+s))*(nadh/(kmnadh*(1+(nad/kmnad))+nadh))
vox  = vmaxox*(p/(kmp*(1+(s/kms))+p))*(nad/(kmnad*(1+(nadh/kmnadh))+nad))
v=vox+vred
```

Anhang B: Stoffeigenschaften und Analysendaten

In diesem Anhang werden die Stoffeigenschaften und Analysendaten der untersuchten Produkte zusammengefaßt.

B.1 4-Methylcyclohexanon zu (5S)-Methylcaprolacton

B.1.1 Summierte Reaktionsgleichung



B.1.2 Stoffdaten

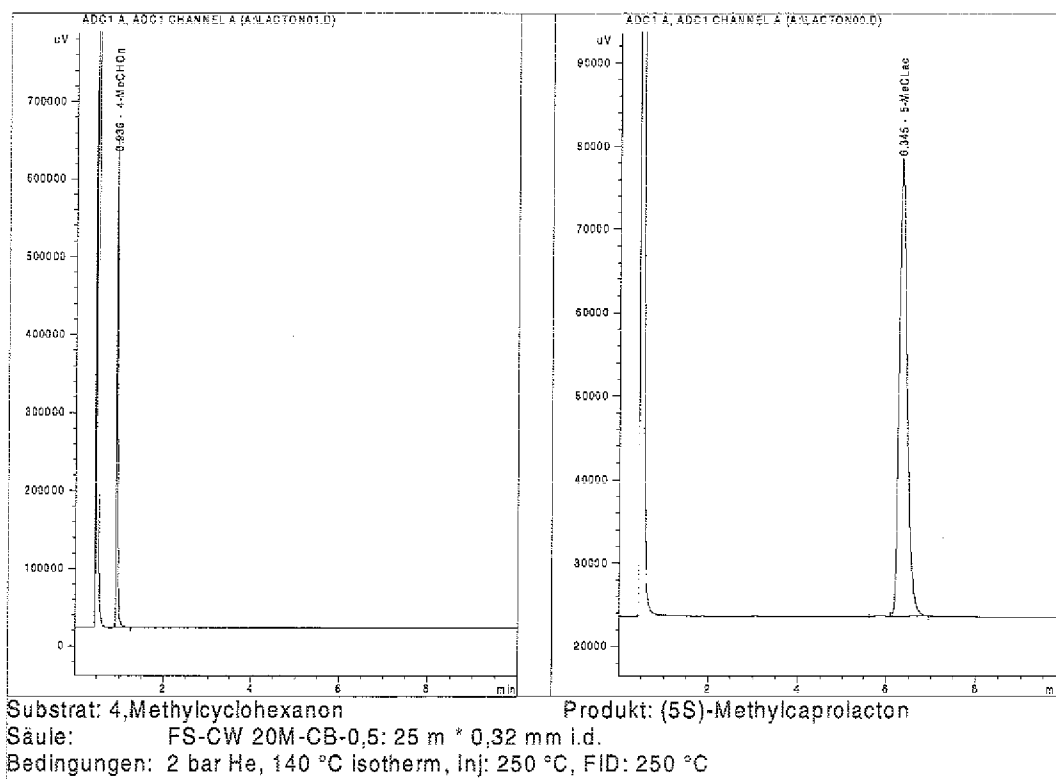
Parameter	Kurzzeichen	4-Methylcyclohexanon	5-Methylcaprolacton
Summenformel		C ₇ H ₁₂ O	C ₇ H ₁₂ O ₂
Molekulargewicht	MW	112,17 g/mol	128,17 g/mol
Siedepunkt	Kp	169-171 °C	
Dichte	D ₂₅ ²⁵	0,917 g/mL	
Brechungsindex	n _D ²⁵	1,4455	
CAS- Nummer		[58-92-4]	
Drehwert	[α] _D ²⁵	-	-44,23 (c 1,56, CHCl ₃)

B.1.3 Drehwert

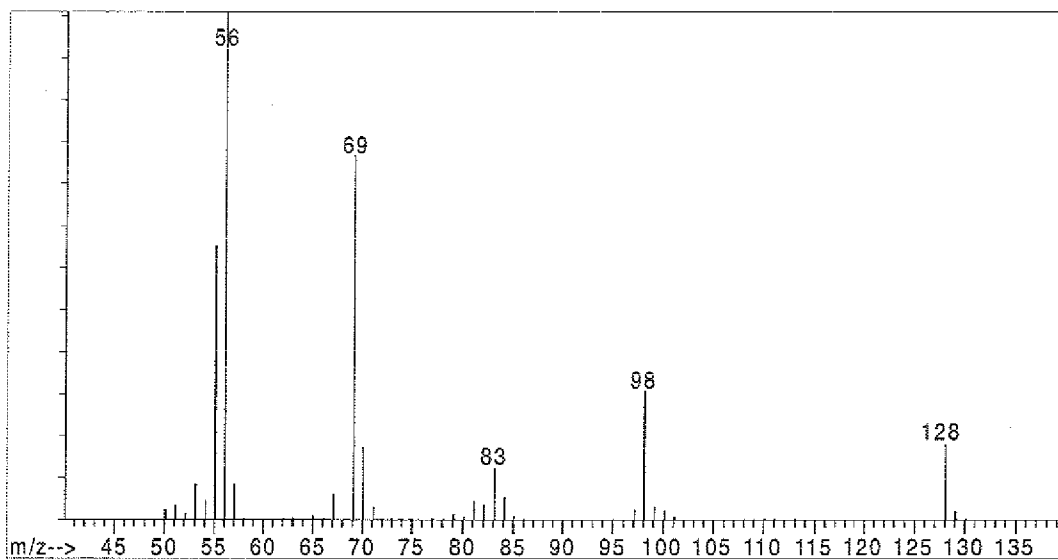
[α]_D²⁵ -44,0 (c= 1, CHCl₃)

B.1.4 Chromatographische Reinheits- und ee-Bestimmung:

B.1.4.1 Umsatz- und Reinheitsbestimmung mit achiraler GC

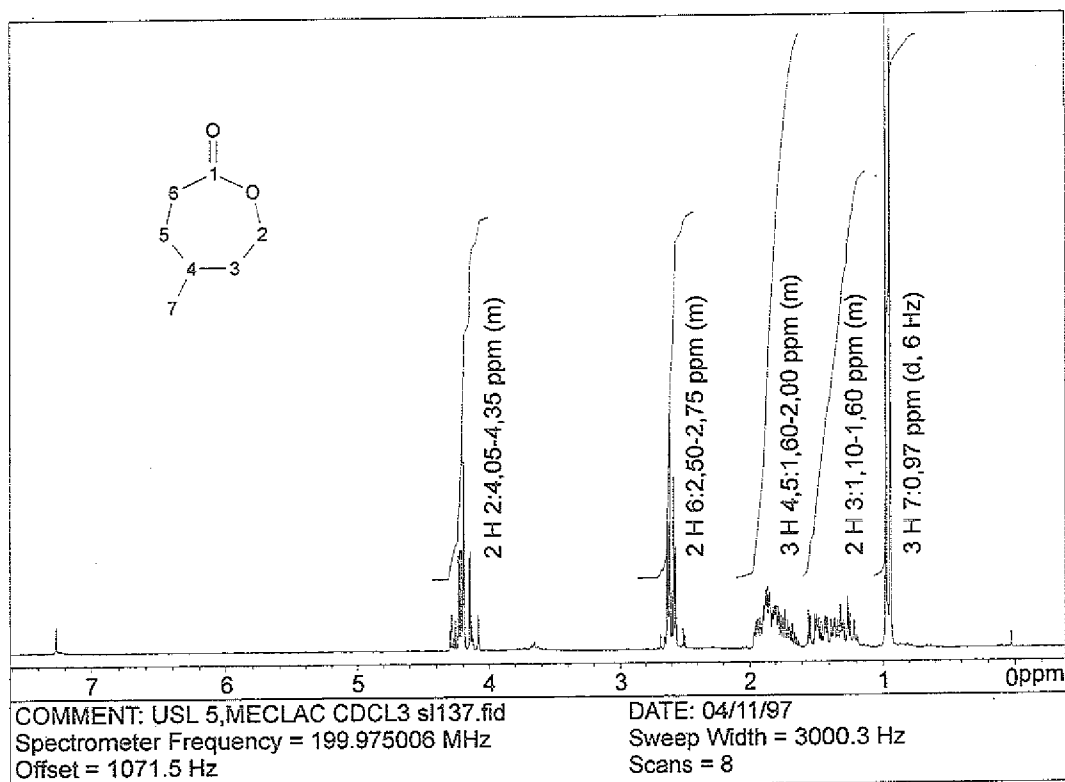
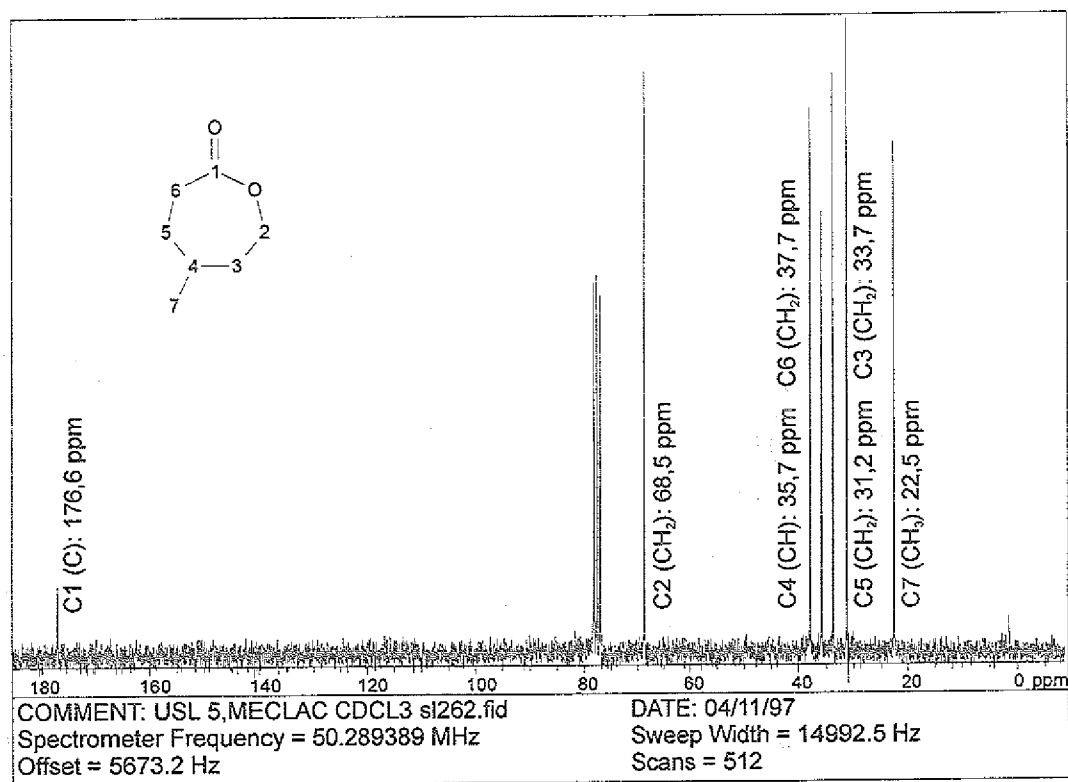


B.1.5 Massenspektrum



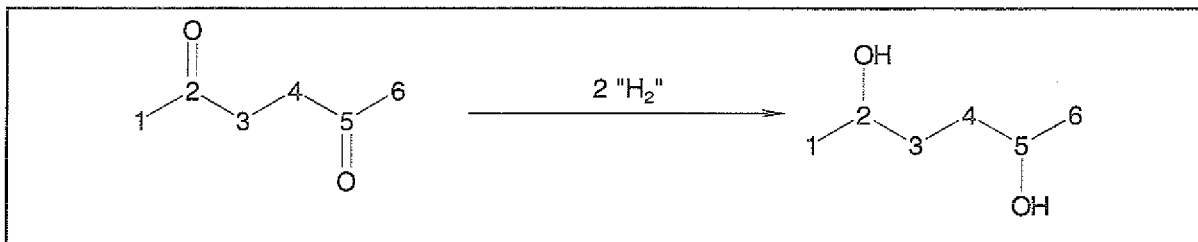
128	(10%)	M ⁺
98	(16%)	128 - HCHO
83	(7%)	
69	(61%)	
56	(100%)	
55	(52%)	

B.1.6 Kernresonanzspekten

B.1.6.1 ^1H -NMRB.1.6.2 ^{13}C -NMR

B.2 2,5-Hexandion zu 2,5-Hexandiol

B.2.1 Summierte Reaktionsgleichung



B.2.2 Stoffdaten

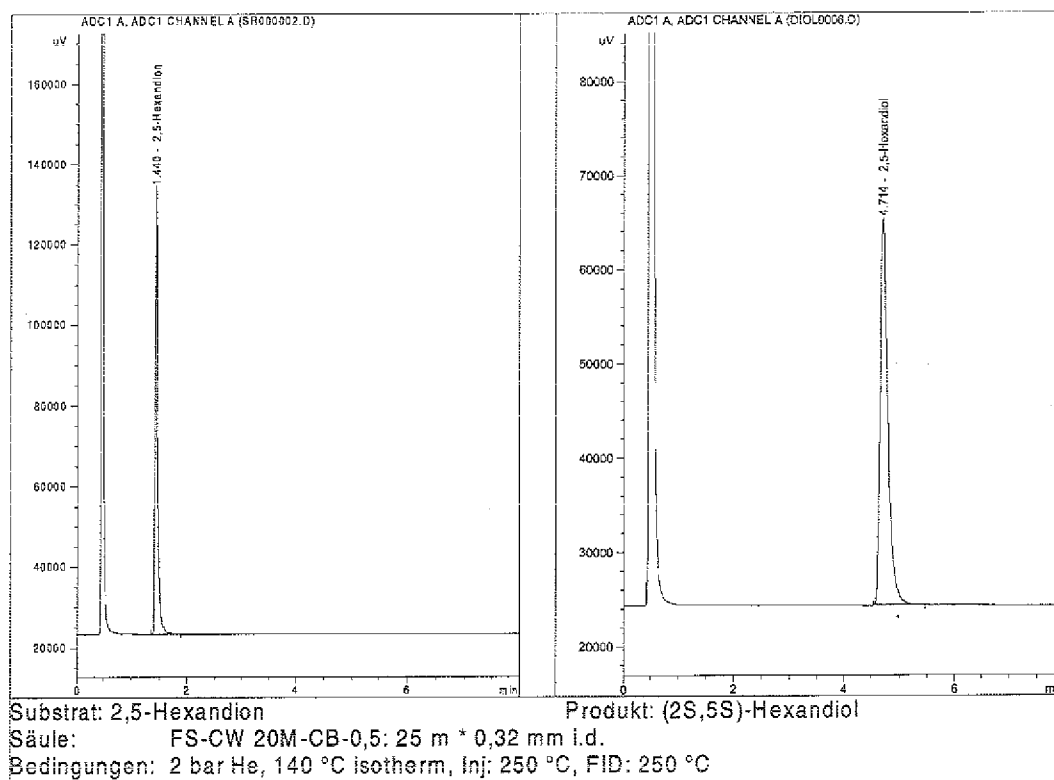
Parameter	Kurzzeichen	2,5-Hexandion	(2S,5S)-Hexandiol
Summenformel		$C_6H_{10}O_2$	$C_6H_{14}O_2$
Molekulargewicht	MW	114,14 g/mol	118,18 g/mol
Schmelzpunkt	Fp	-9 °C	50-53 °C
Siedepunkt	Kp	192 °C	212-215 °C
Dichte	D_{25}^{25}	0,97 g/mL	0,961 g/mL (rac)
Brechungsindex	n_D^{20}	1,4230	1,4470 (rac)
CAS- Nummer		[110-13-4]	[34338-96-0]
Drehwert	$[\alpha]_D^{25}$	-	+34,5° (c=9, $CHCl_3$)

B.2.3 Drehwert

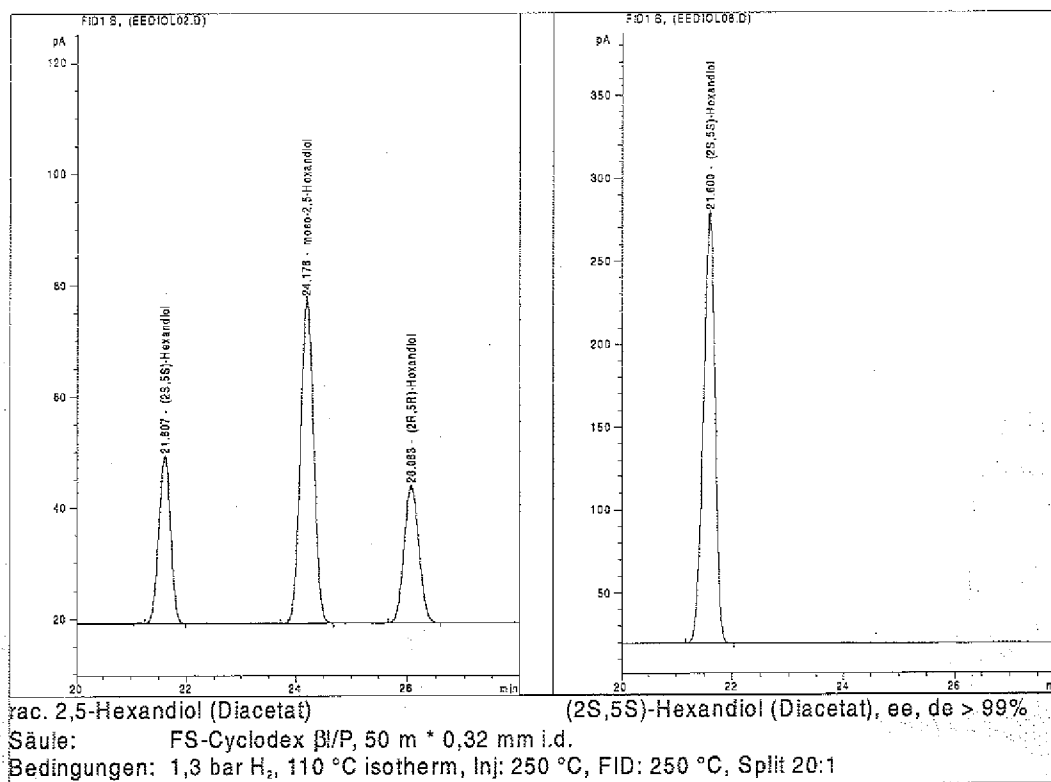
$$[\alpha]_D^{25} = +36,3^\circ (c=1, CHCl_3)$$

B.2.4 Chromatographische Reinheits- und ee-Bestimmung:

B.2.4.1 Umsatz- und Reinheitsbestimmung mit achiraler GC

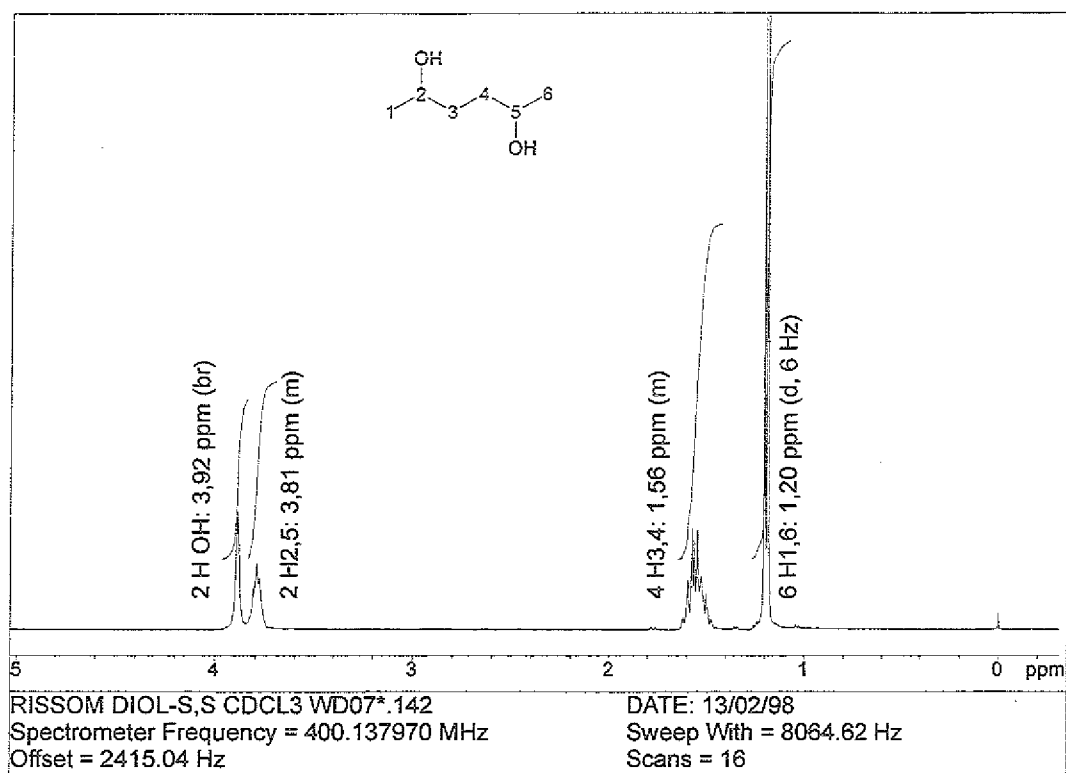


B.2.4.2 ee-Bestimmung mit chiraler GC

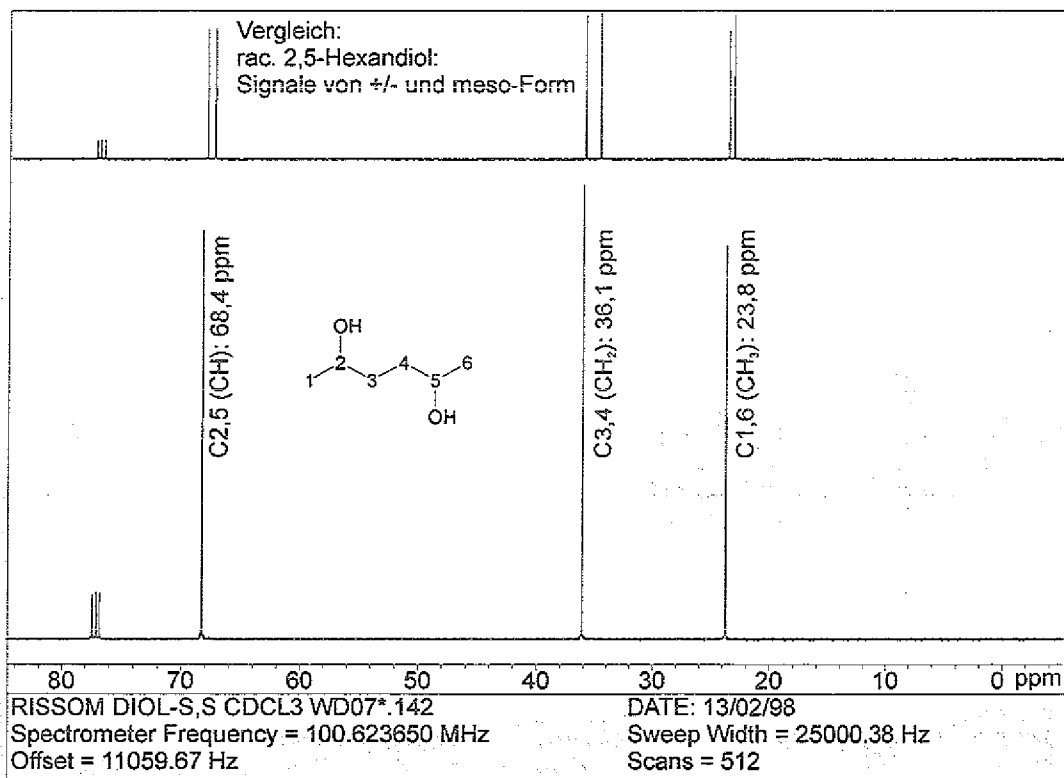


B.2.5 Kernresonanzspekten

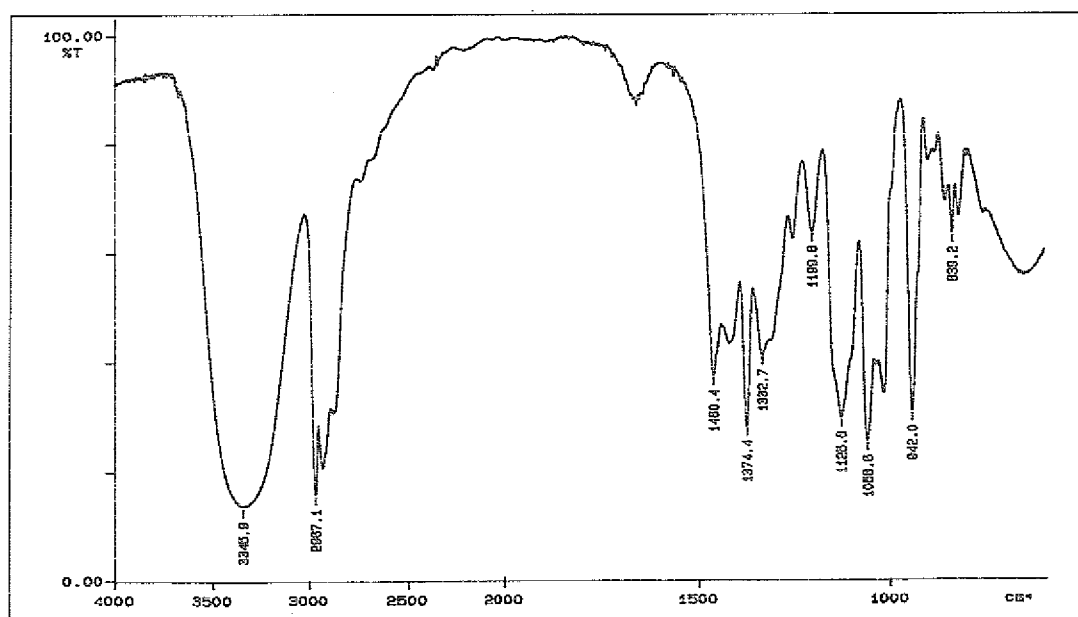
B.2.5.1 ^1H -NMR



B.2.5.2 ^{13}C -NMR

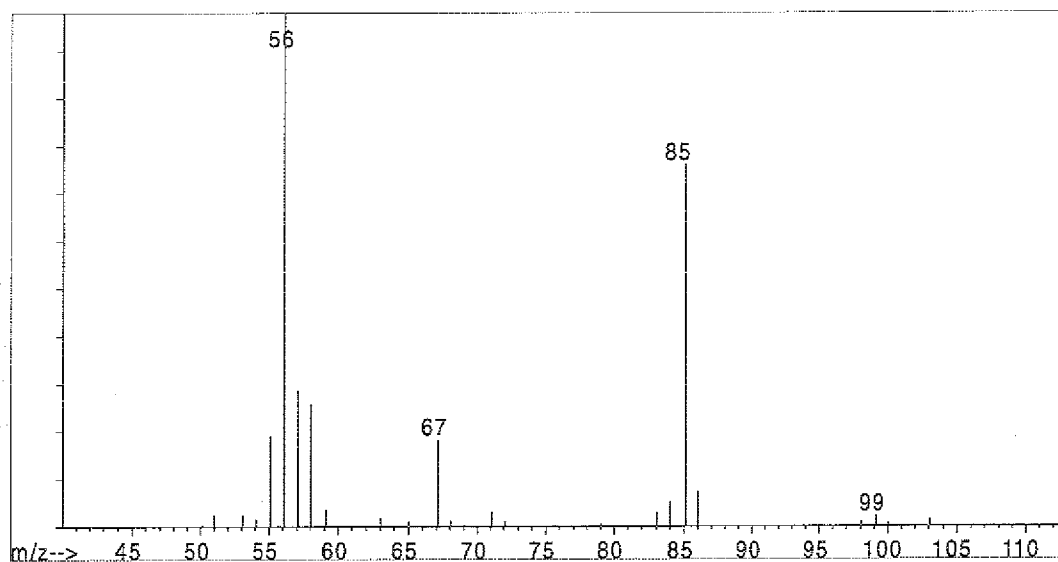


B.2.6 Infrarot-Spektrum



Wellenzahl [cm ⁻¹]	Funktion
3346	O-H-Valenz
2967	C-H-Valenz
1374	OH-Deformation
1059	C-OH-Valenz

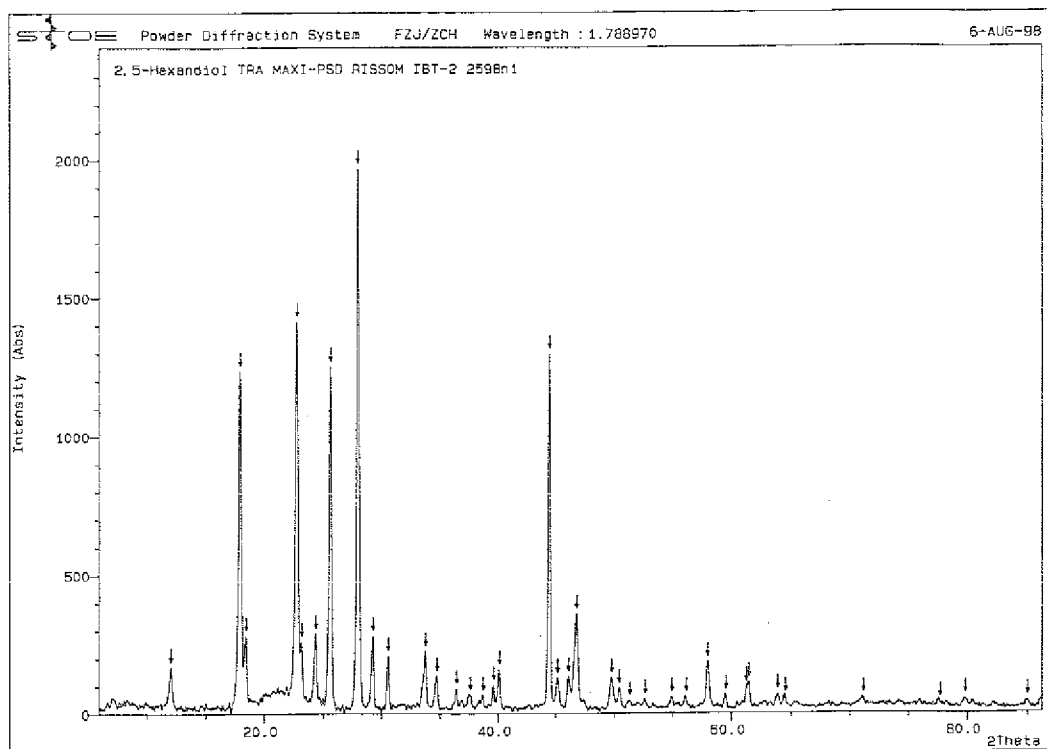
B.2.7 Massenspektrum



99	(3%)	$M^{++} - H_3O$
85	(50%)	$99 - CH_2$
67	(18%)	$85 - H_2O$
56	(100%)	$99 - COCH_3$
45	(62%)	

Hochauflösung des Molekülionenpeaks wegen zu geringer Intensität nicht möglich

B.2.8 Röntgenstrukturanalyse (Pulverdiffraktometrie)²



Monoklin

$a = 5,9925 \text{ \AA}$

$b = 7,3821 \text{ \AA}$

$c = 8,8905 \text{ \AA}$

$\beta = 107,32^\circ$

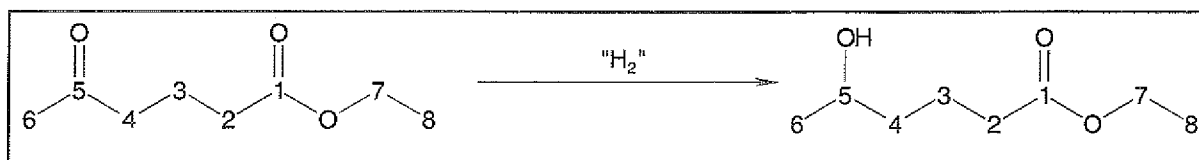
$V = 375,46 \text{ \AA}^3$

² Durchgeführt durch Abteilung ZCH des FZ Jülich Nr. 259/98

2Theta / °	2 Theta _{ber} / °	Intensität / %	h	k	l
12,0436	12,099	7,9	0	0	1
17,9580	17,991	62,8	1	0	0
18,4630	1,466	13,8	-1	0	1
22,8027	22,818	71,1	1	1	0
23,1797	23,198	12,6	-1	1	1
24,3617	24,336	14,1	0	0	2
25,6385	25,645	62,8	-1	0	2
28,0325	28,049	100,0	0	2	0
29,2951	29,293	13,5	-1	1	2
30,6301	30,646	10,2	0	2	1
33,7848	33,792	10,4	-1	2	1
34,7671	34,770	5,9	-2	0	1
36,4229	36,446	3,8	2	0	0
37,5769	37,619	4,6	-2	1	1
38,7051	38,677	4,3	-1	1	3
39,5861	39,583	4,4	0	1	3
40,1124	40,120	7,4	-2	1	1
44,5003	44,479	65,0	0	3	1
45,1985	45,251	5,5	-2	2	1
46,1298	46,142	5,8	-2	1	3
46,8193	46,824	17,6	-1	3	1
49,7390	49,694	7,7	0	3	2
49,9340	49,867	7,7	0	0	4
50,4174	50,415	3,9	-1	3	2
51,3718	51,281	2,9	2	2	1
52,6923	52,700	2,6	-2	0	4
54,9487	54,911	3,5	1	2	3
56,1667	56,171	3,2	-1	2	4
57,9801	57,982	8,5	0	4	0
59,5513	59,518	4,8	-3	1	2
61,2378	61,231	3,7	1	4	0
61,4803	61,401	4,7	2	3	1
63,8718	63,896	4,3	-3	0	4
64,5256	64,426	4,6	-1	4	2
71,1923	71,183	3,5	-3	2	4
77,6795	77,618	3,2	-1	5	1
79,8333	79,850	2,9	-4	0	4
85,0000	84,988	2,9	-2	5	1

B.3 Acetylbuttersäureethylester (ABEE) zu 5-Hydroxyhexansäure-ethylester (HHEE)

B.3.1 Summierte Reaktionsgleichung



B.3.2 Stoffdaten

Parameter	Kurzzeichen	ABEE	HHEE
Summenformel		$C_8H_{14}O_3$	$C_8H_{16}O_3$
Molekulargewicht	MW	158,20 g/mol	160,21 g/mol
Siedepunkt	Kp	221-222 °C 64-66 °C (bei 1 Torr)	94-95 °C (bei 2 Torr)
Dichte	D_{25}^{25}	0,989 g/mL	0,9832 g/mL
Brechungsindex	n_D^{25}	1,4270	1,4315
CAS- Nummer		[13984-57-1]	[20266-62-0]

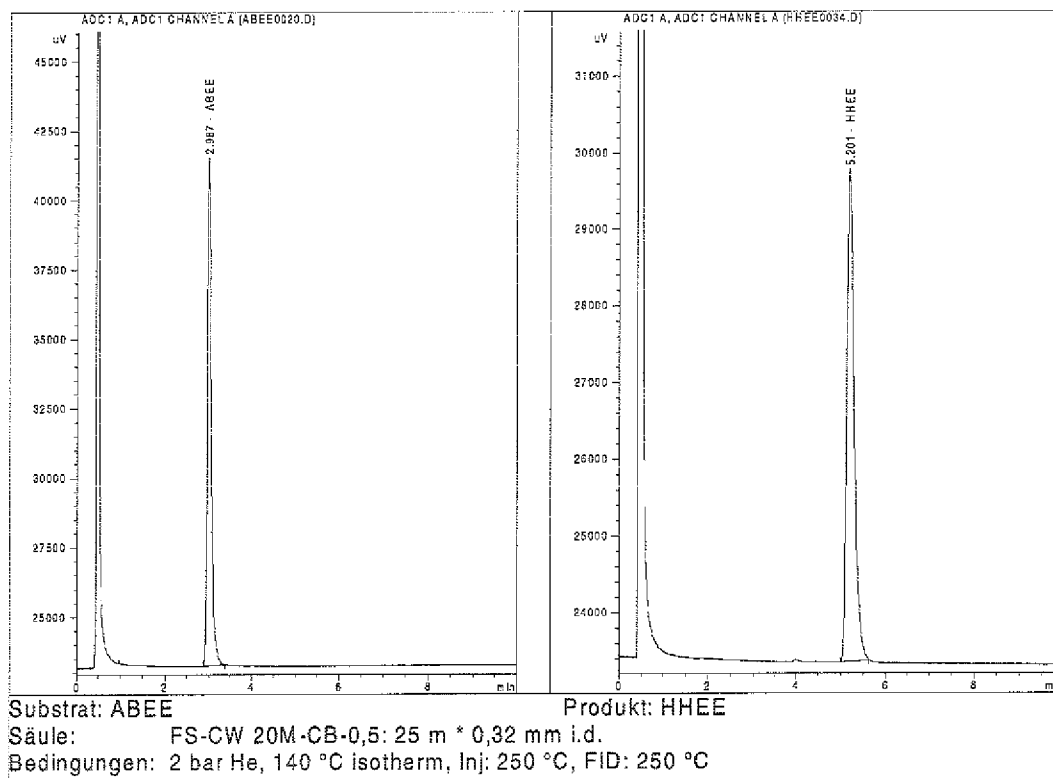
B.3.3 Drehwert

$$[\alpha]_D^{25} = +8,3^\circ \text{ (c=1, CHCl}_3\text{)}$$

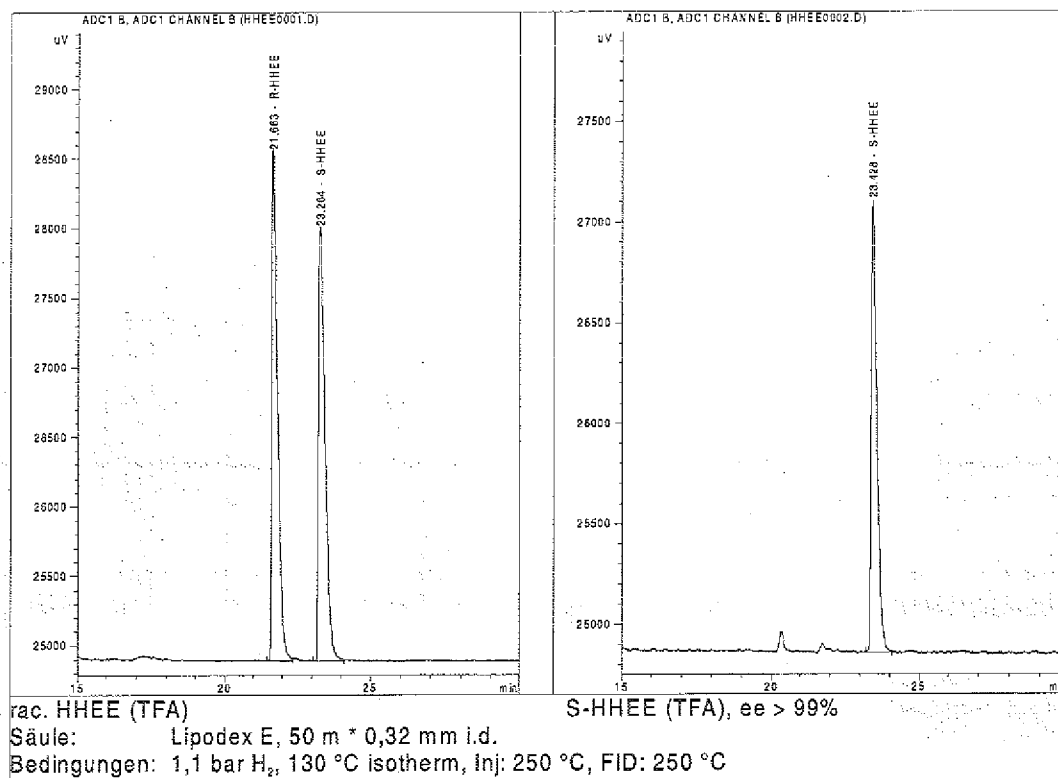
(Dies ist der Drehwert eines äquilibrierten Gemisches aus HHEE und seinem Lacton)

B.3.4 Chromatographische Reinheits- und ee-Bestimmung:

B.3.4.1 Umsatz- und Reinheitsbestimmung mit achiraler GC

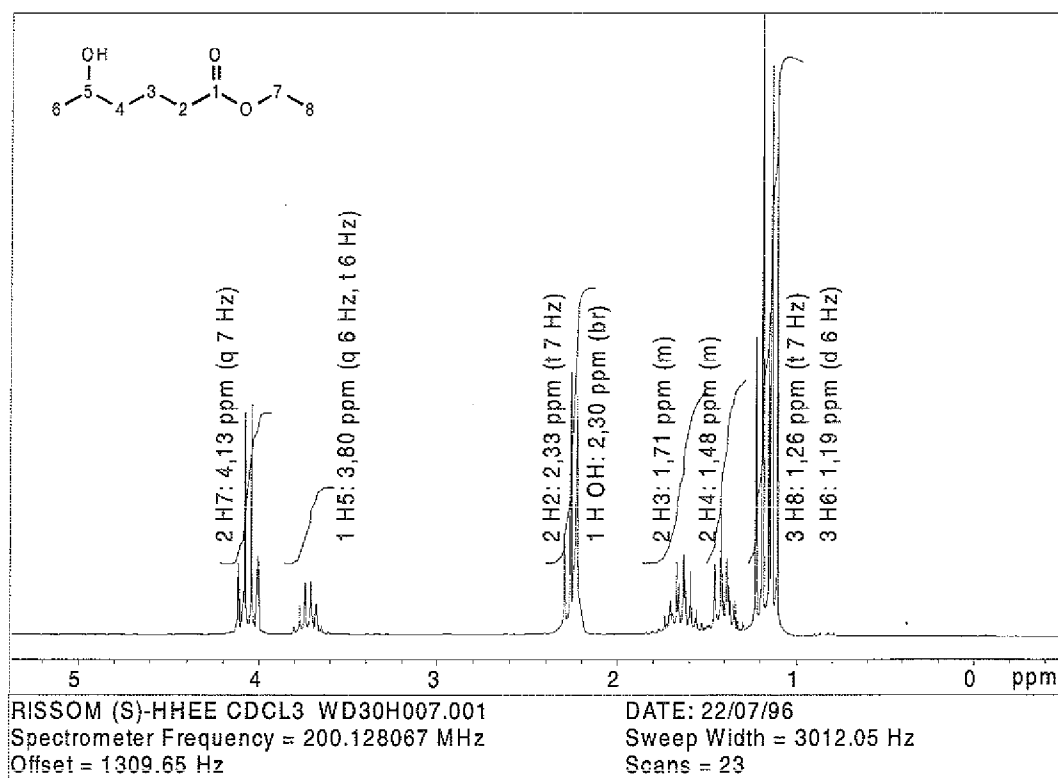


B.3.4.2 ee-Bestimmung mit chiraler GC

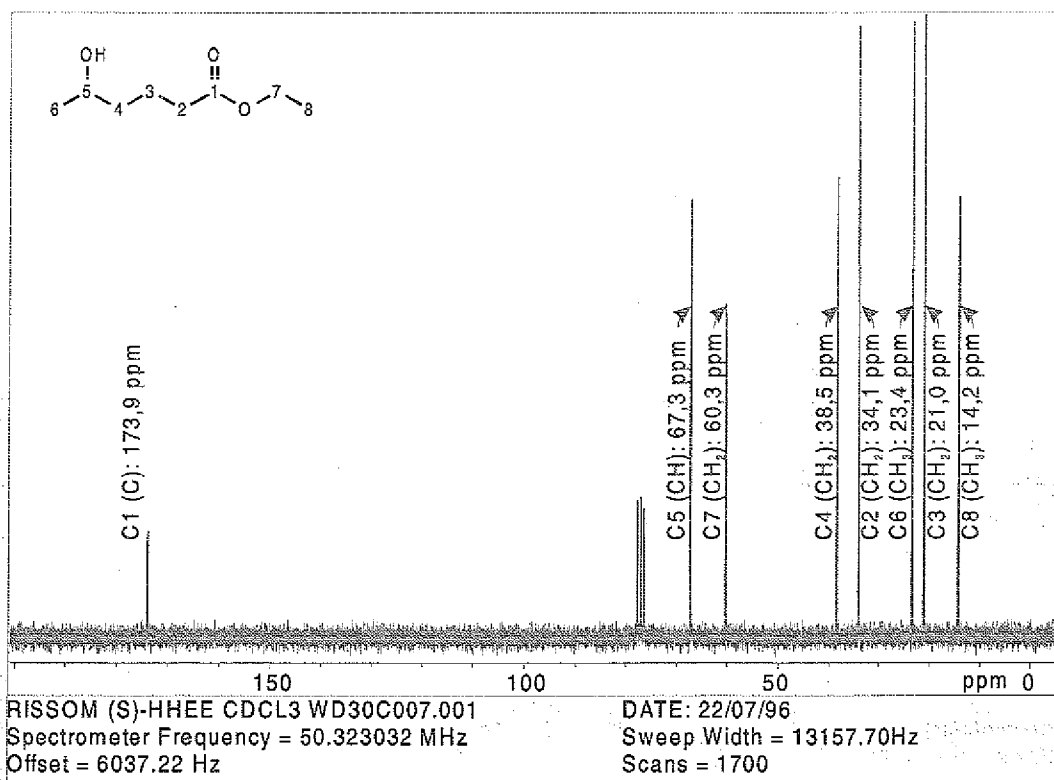


B.3.5 Kernresonanzspekten

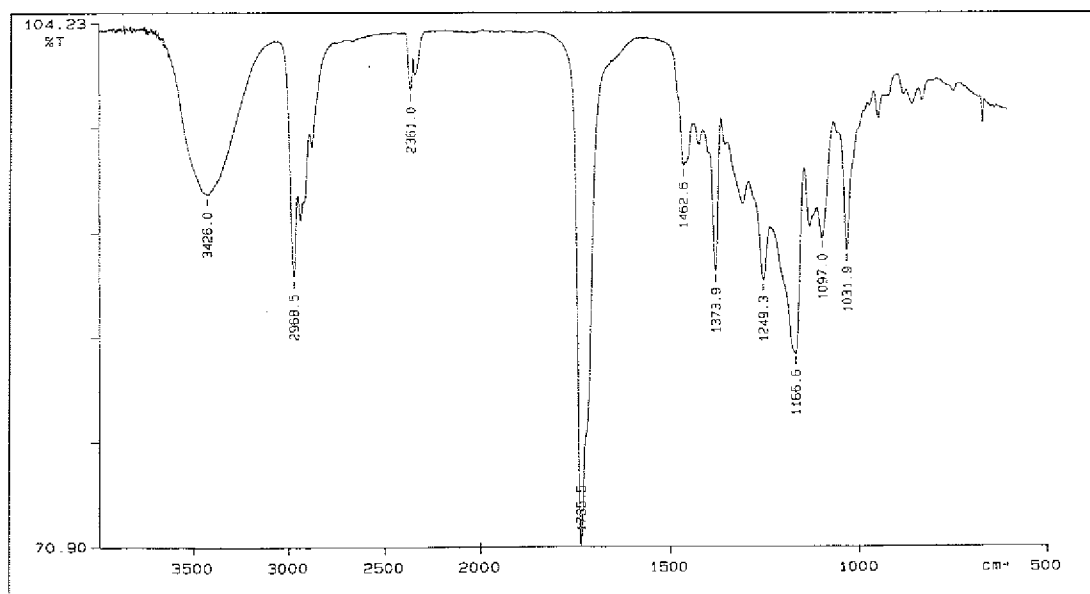
B.3.5.1 ^1H -NMR



B.3.5.2 ^{13}C -NMR

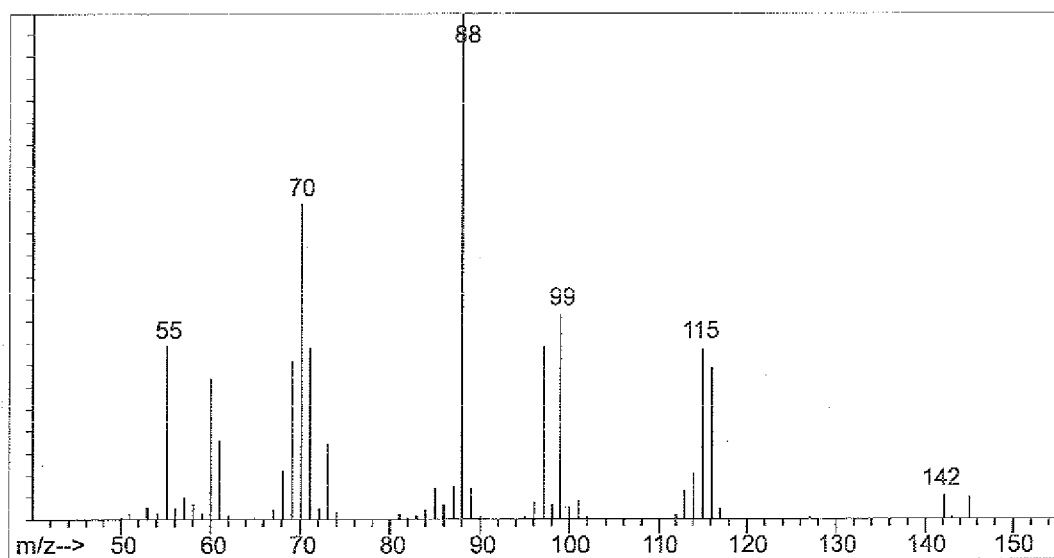


B.3.6 Infrarot-Spektrum



Wellenzahl [cm ⁻¹]	Funktion
2969	C-H-Valenz
1736	C=O-Valenzen
1374	CO-C ₂ H ₅
1166	C-O-Valenz

B.3.7 Massenspektrum

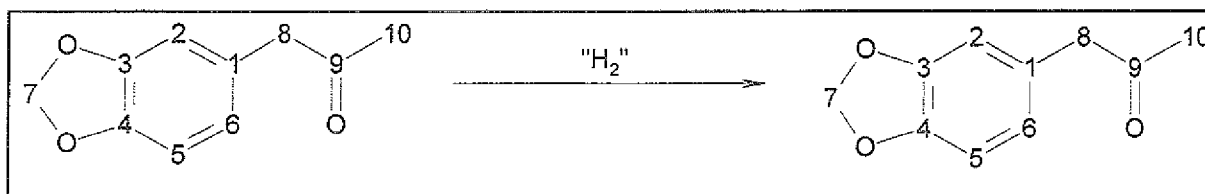


142	(6%)	M ⁺ - OH ₂
115	(36%)	M ⁺ - OC ₂ H ₅
99	(44%)	
88	(100%)	C ₄ H ₈ O ₂ (McLafferty)
70	(66%)	

Hochauflösung des Molekülionenpeaks wegen zu geringer Intensität nicht möglich

B.4 (3,4)-Methylenedioxyphenylacetone (MDA) zu (3,4)-Methylenedioxyphenyl-2-propanol (MDI)

B.4.1 Summierte Reaktionsgleichung



B.4.2 Stoffdaten

Parameter	Kurzzeichen	MDA	MDI
Summenformel		$C_{10}H_{10}O_3$	$C_{10}H_{12}O_3$
Molekulargewicht	MW	178,19 g/mol	180,20 g/mol
Dichte	D_{25}^{25}	1,20 g/mL	
CAS- Nummer		[4676-39-5]	

IUPAC-Namen: MDA = 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-aceton

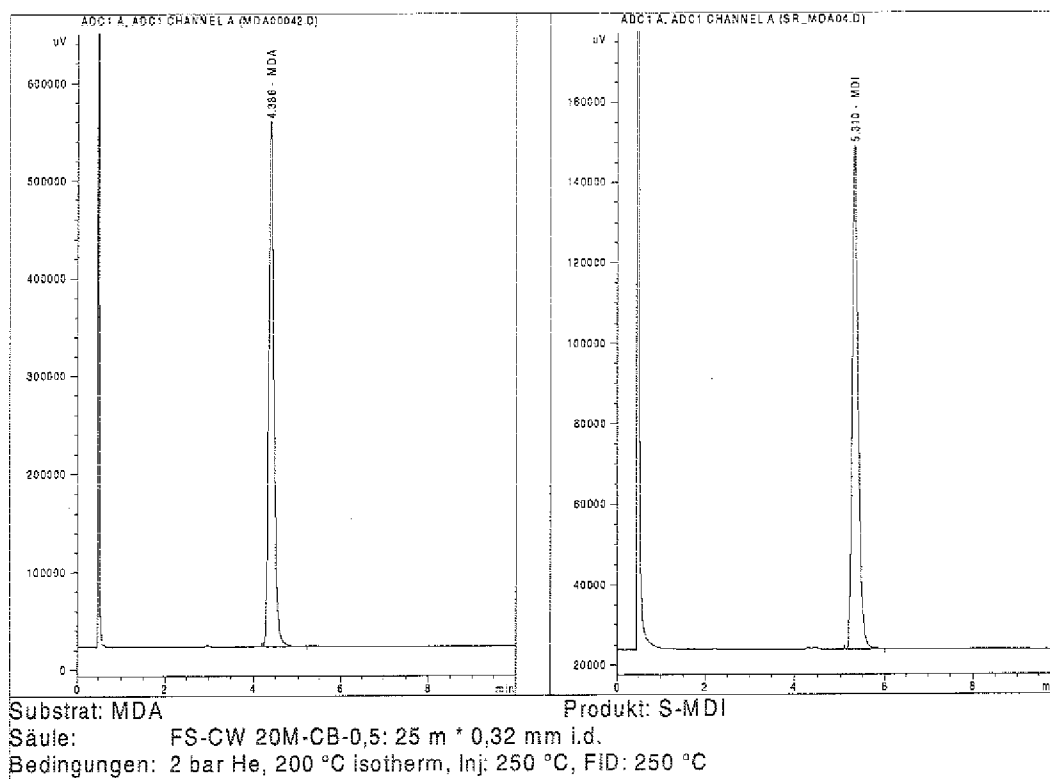
MDI = 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-propanol

B.4.3 Drehwert

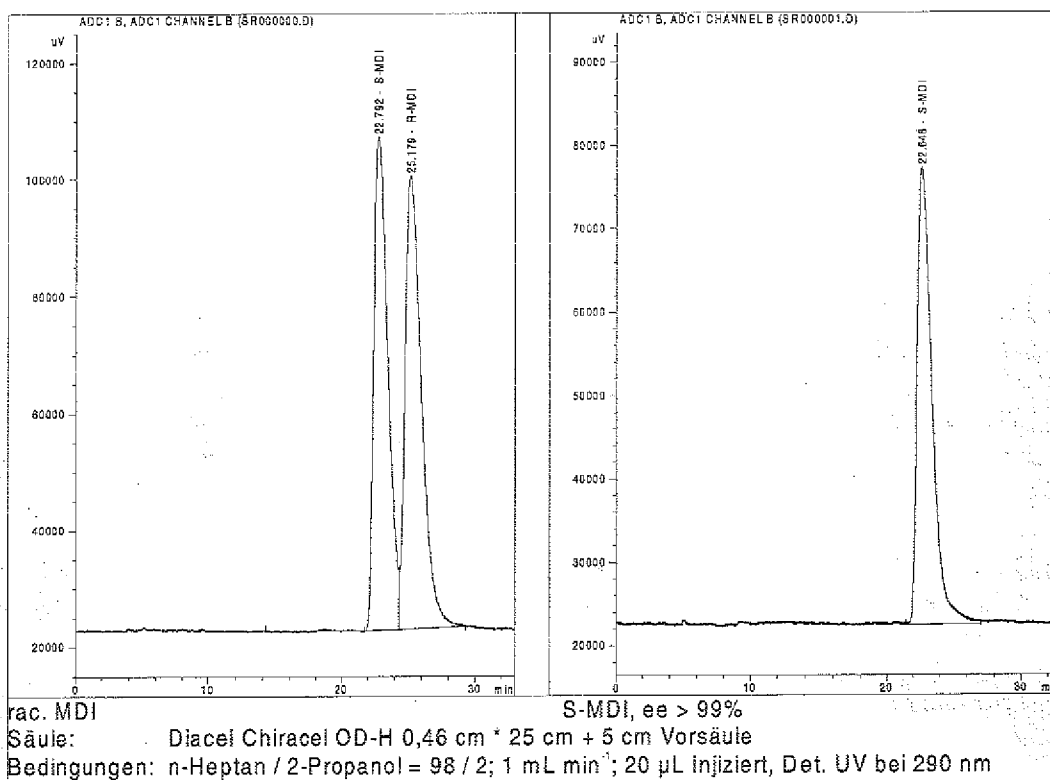
$[\alpha]_D^{25} = +30,3^\circ$ ($c=1,15$, $CHCl_3$)

B.4.4 Chromatographische Reinheits- und ee-Bestimmung:

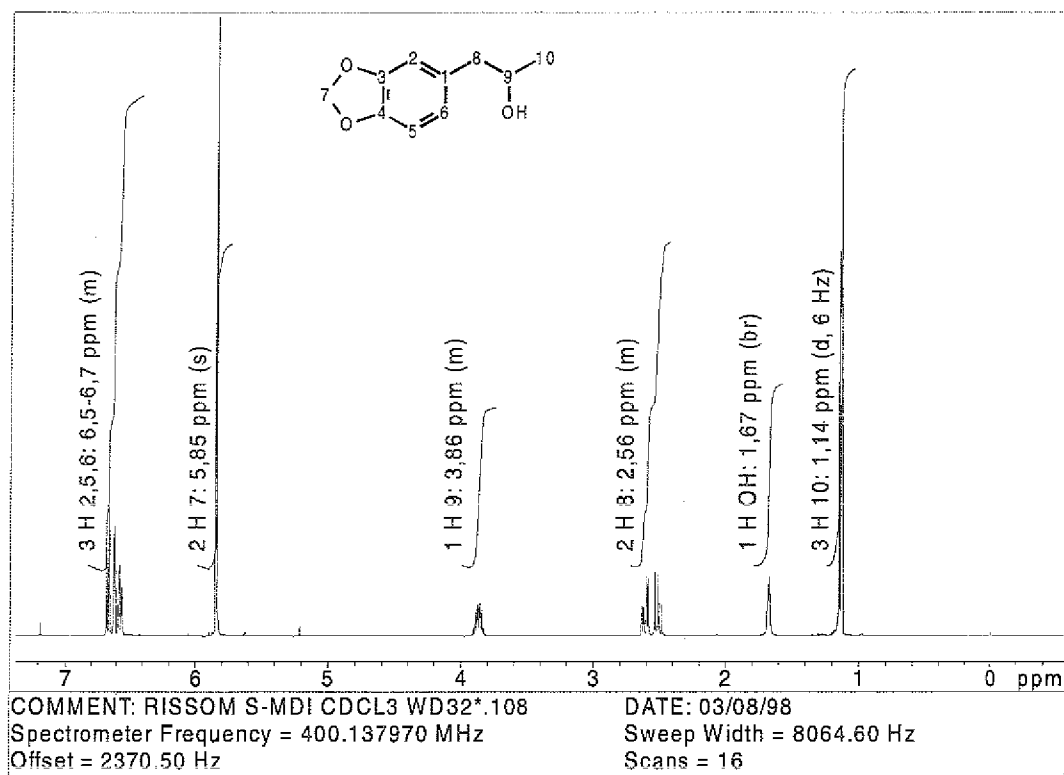
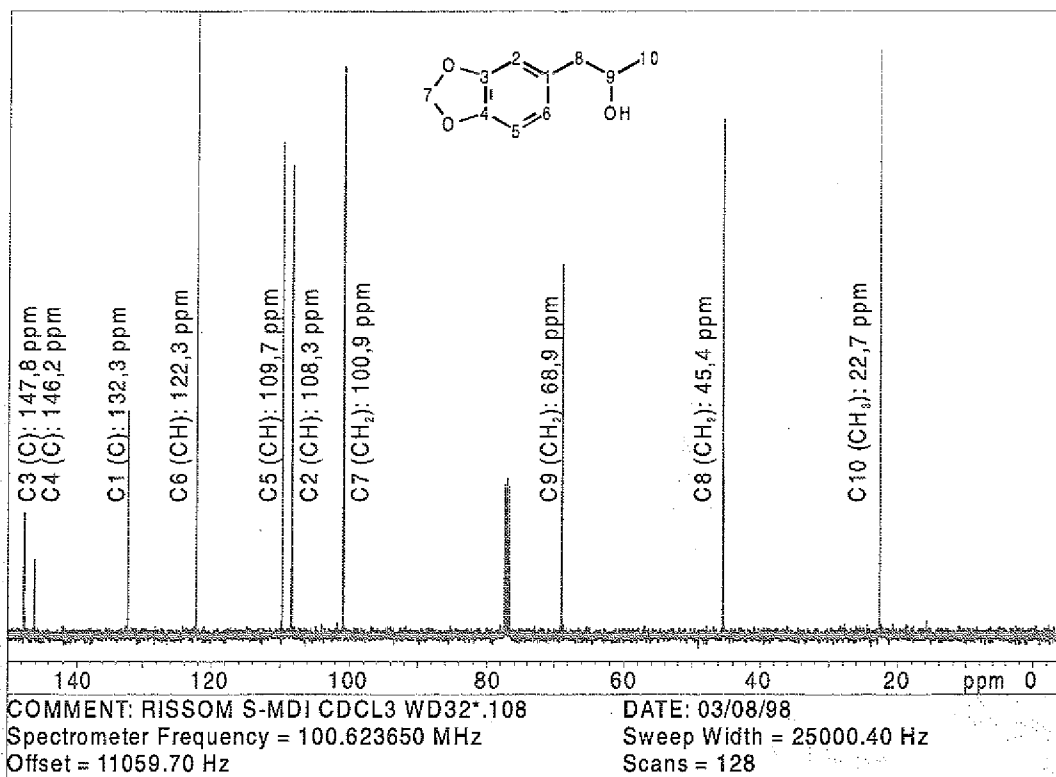
B.4.4.1 Umsatz- und Reinheitsbestimmung mit achiraler GC



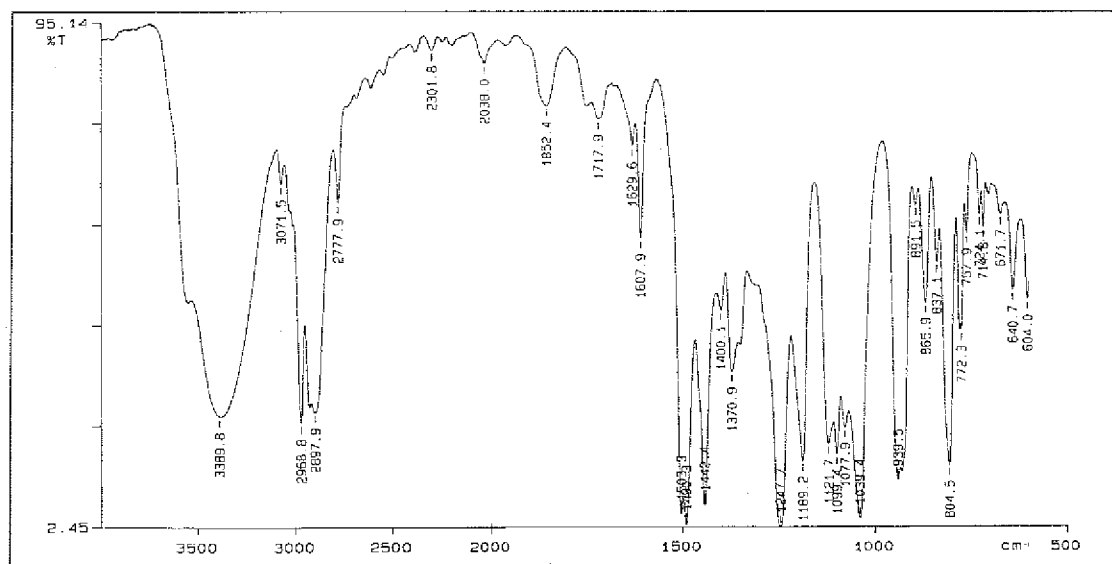
B.4.4.2 ee-Bestimmung mit chiraler HPLC



B.4.5 Kernresonanzspekten

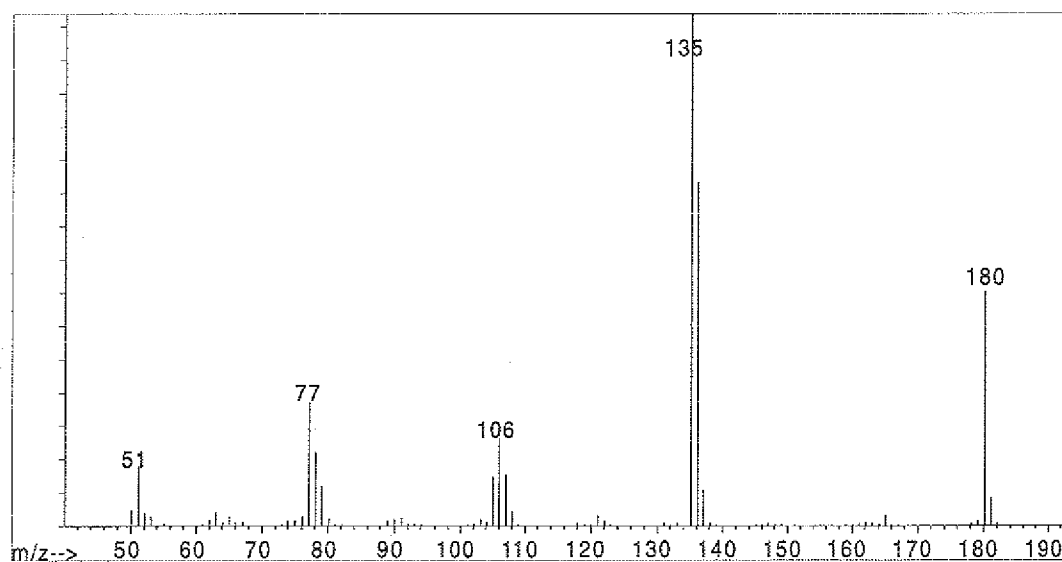
B.4.5.1 ^1H -NMRB.4.5.2 ^{13}C -NMR

B.4.6 Infrarot-Spektrum



Wellenzahl [cm ⁻¹]	Funktion
3391	O-H-Valenz
1503	C=C-Valenz
1490	C=C-Valenz
1247	C-O-Valenz
1039	C-O-Valenz
804	C-H out of plane (1,3,4-trisubst. Ar.)

B.4.7 Massenspektrum

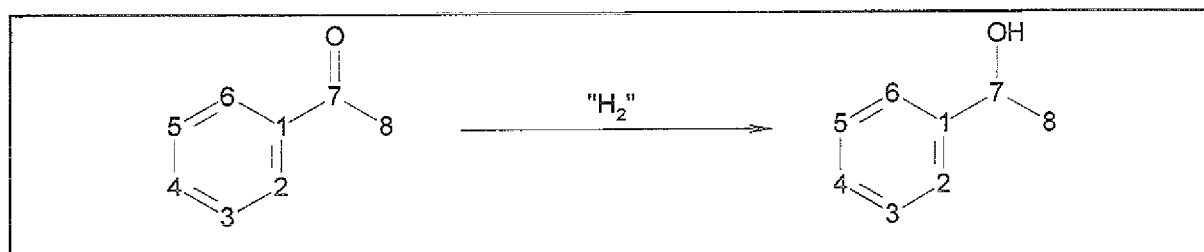


- 180 (38%) M^{+}
 135 (100%) $M^{+} - \text{CHOHCH}_3$
 106 (16%) 135 - OCH
 77 (20%) Phenyl⁺

Hochoflösung des Molekülionen Peaks: 180,0785
 (Berechnet für $^{12}\text{C}_{10}^{1}\text{H}_{12}^{16}\text{O}_3$: 180,786)

B.5 Acetophenon zu 1-Phenylethanol

B.5.1 Summierte Reaktionsgleichung



B.5.2 Stoffdaten

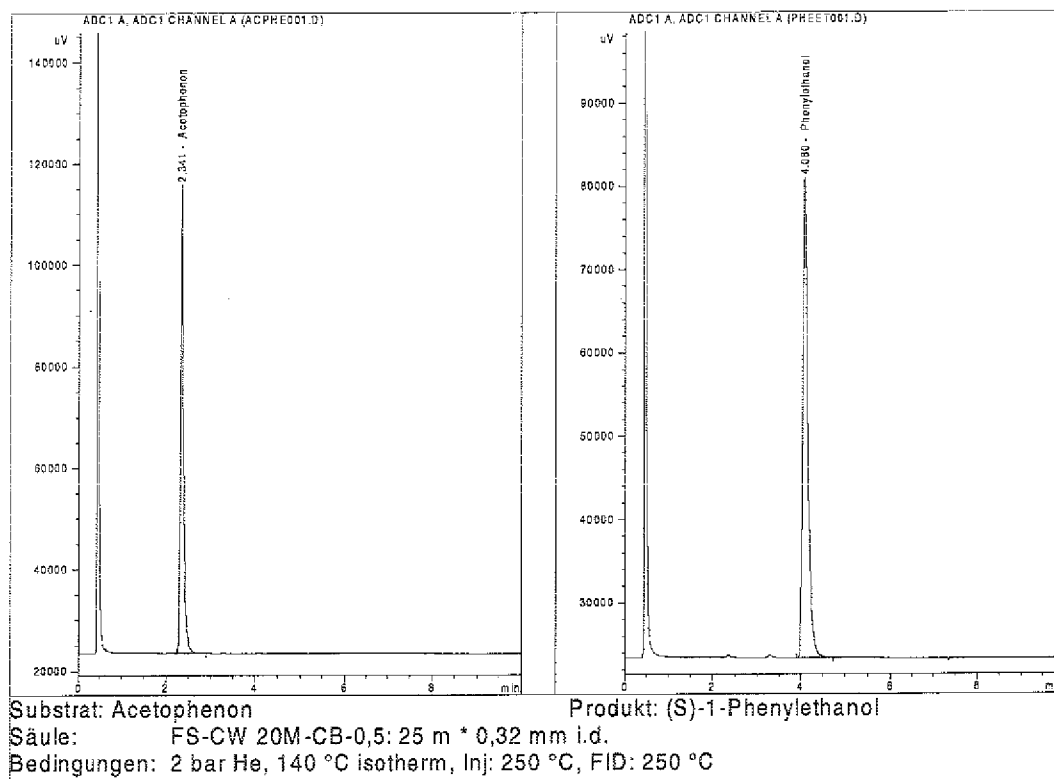
Parameter	Kurzzeichen	Acetophenon	1-Phenylethanol
Summenformel		C_8H_8O	$C_8H_{10}O$
Molekulargewicht	MW	120,15 g/mol	122,17 g/mol
Siedepunkt	Kp	202 °C	200-205 °C
Schmelzpunkt	Fp	19 °C	20 °C
Dichte	D_{25}^{25}	1,03 g/mL	1,01 g/mL
Brechungsindex	n_D^{20}	1,5339	1,5265
CAS- Nummer		[98-86-2]	[13323-81-4]
Drehwert	$[\alpha]_D^{25}$	-	-46 - -48 °

B.5.3 Drehwert

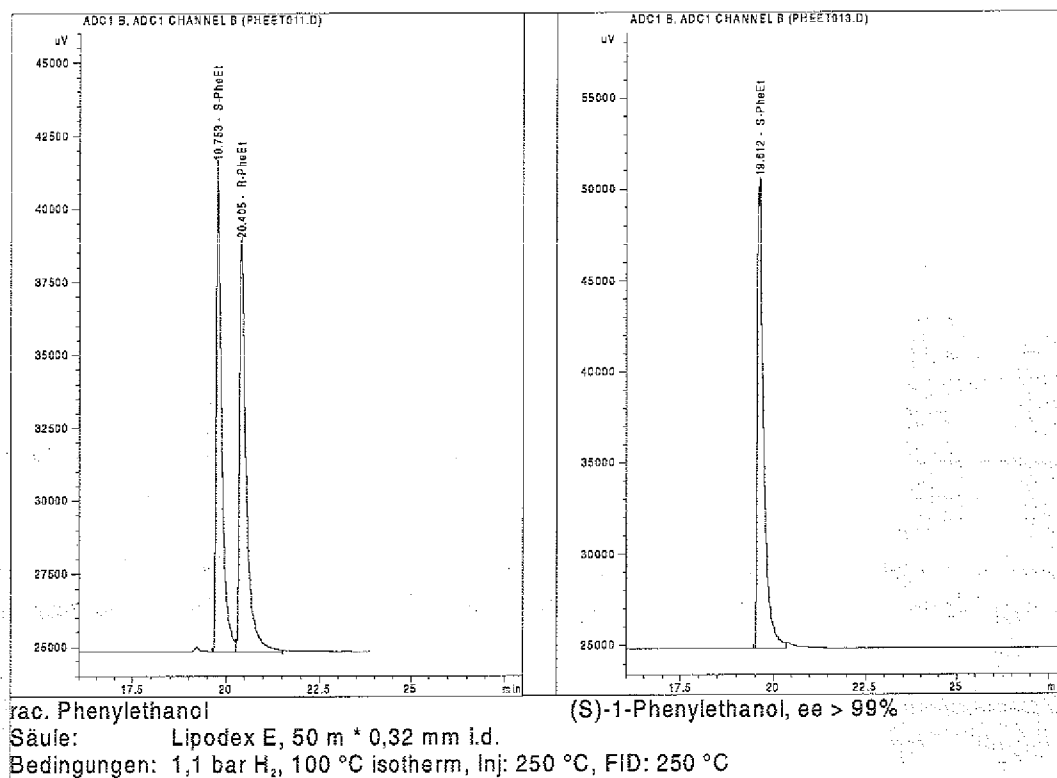
$[\alpha]_D^{25}$ -58,1° (c=0,985, $CHCl_3$)

B.5.4 Chromatographische Reinheits- und ee-Bestimmung:

B.5.4.1 Umsatz- und Reinheitsbestimmung mit achiraler GC

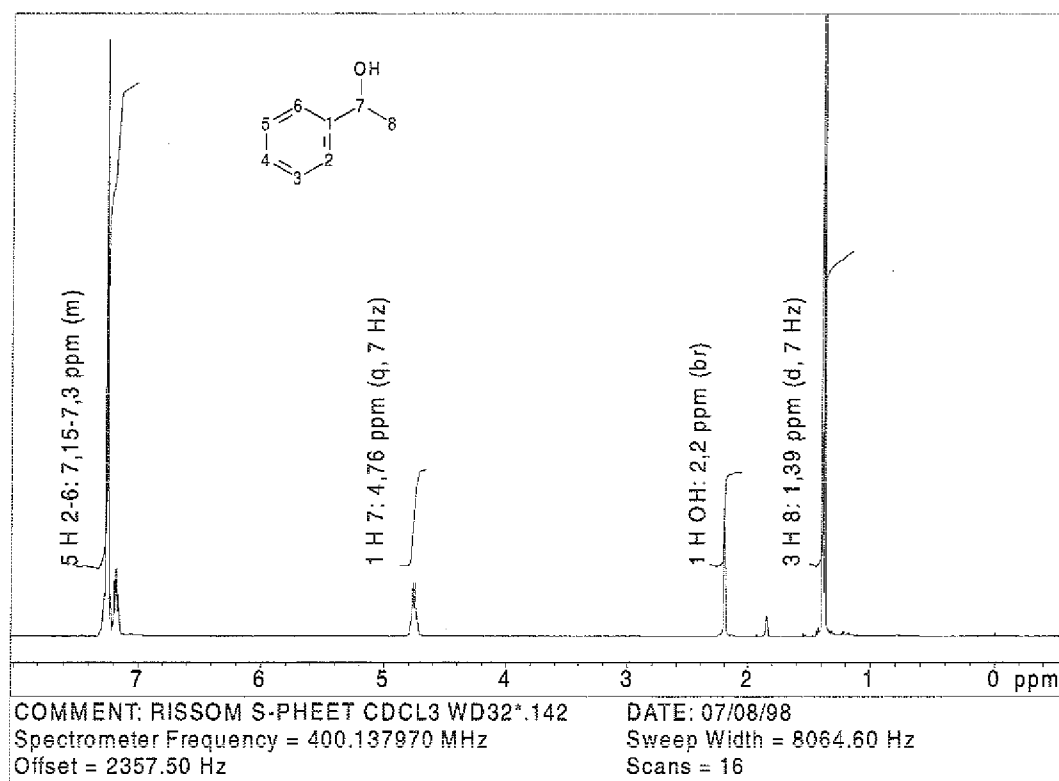


B.5.4.2 ee-Bestimmung mit chiraler GC

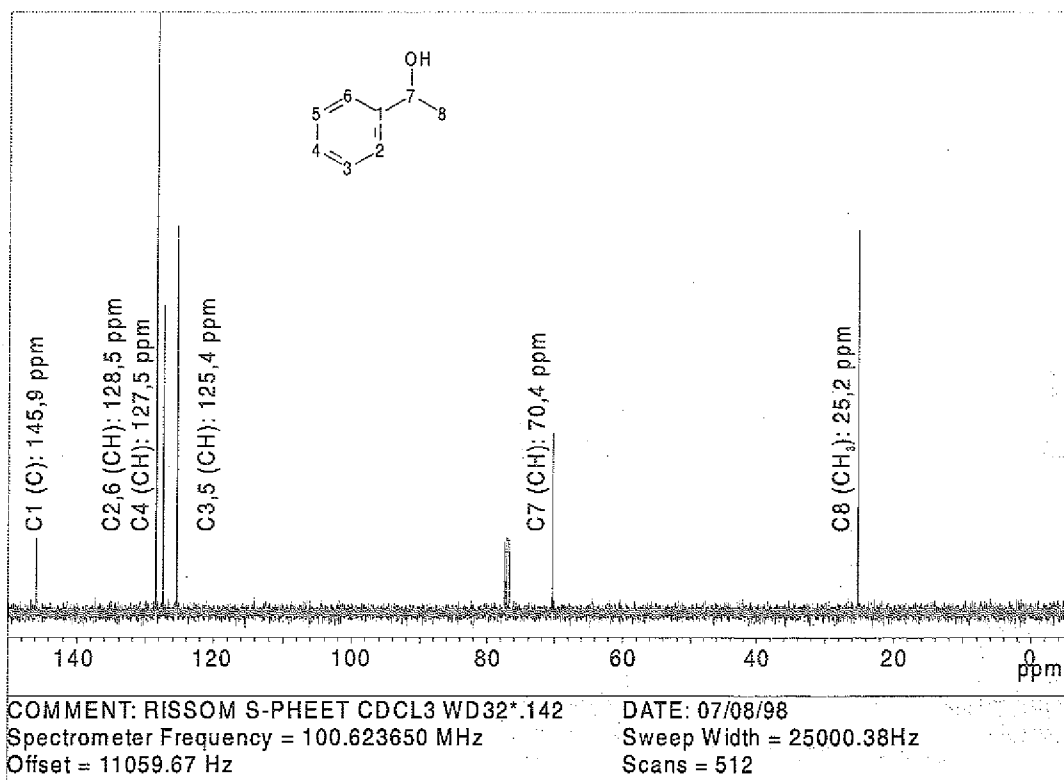


B.5.5 Kernresonanzspekten

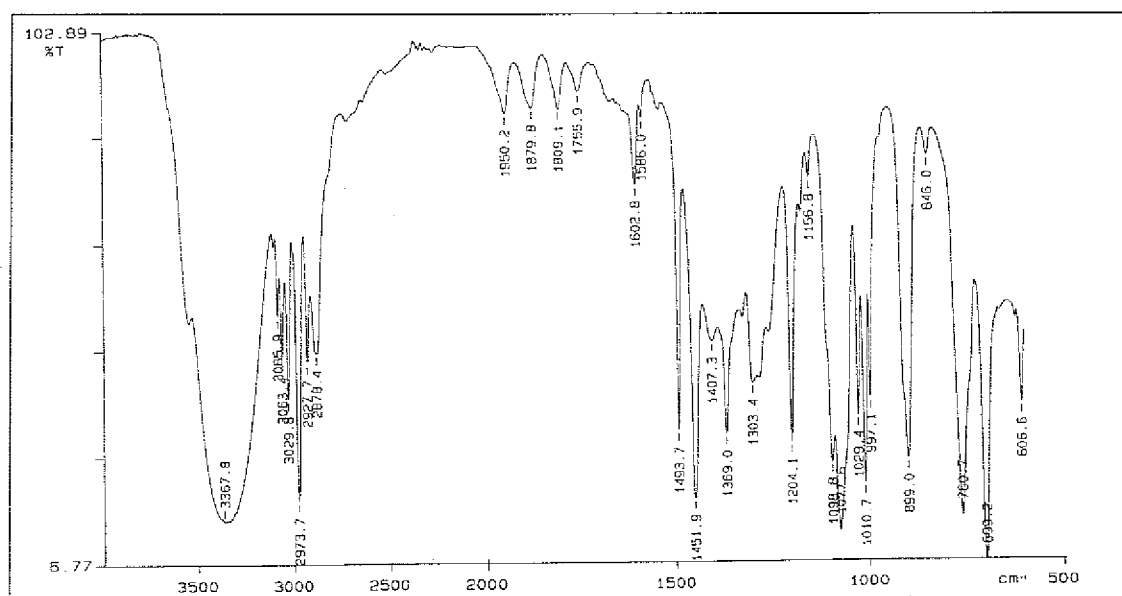
B.5.5.1 ^1H -NMR



B.5.5.2 ^{13}C -NMR

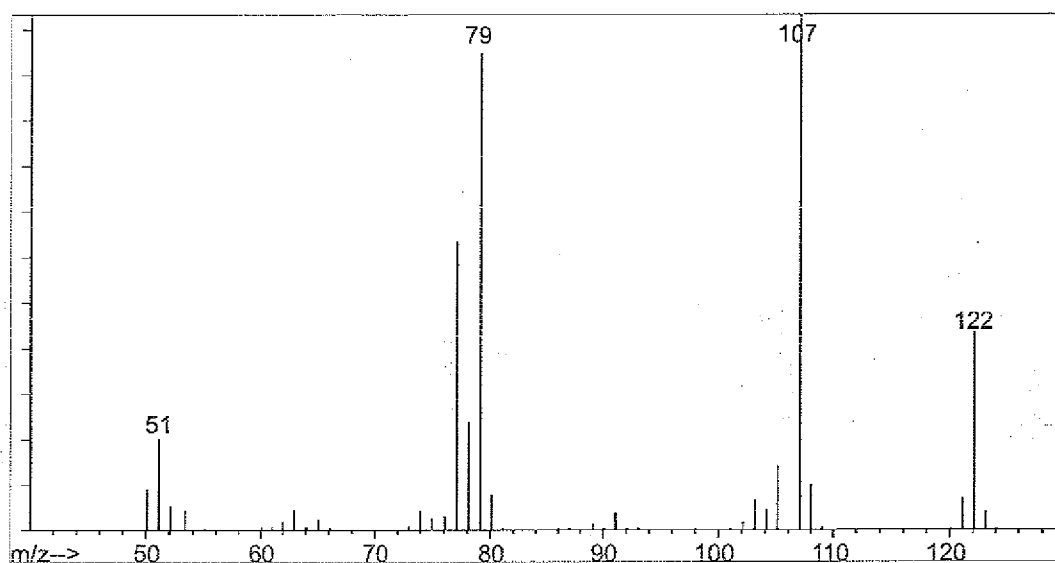


B.5.6 Infrarot-Spektrum



Wellenzahl [cm ⁻¹]	Funktion
3368	O-H-Valenz
2974	C-H-Valenz
1452	C-H-Deformation
1078	C-O-Valenz
761	C-H out of plane (monosubst. Ar.)
699	C-H out of plane (monosubst. Ar.)

B.5.7 Massenspektrum



122 (43%)	M ⁺
105 (96%)	M ⁺ - CH ₃
79 (96%)	M ⁺ - COCH ₃
77 (57%)	Phenyl ⁺

Hochauflösung des Molekülionen Peaks: 122,0731
(Berechnet für ¹²C₈¹H₁₀¹⁶O₁: 122,0732)

JUL-3682
August 1999
ISSN 0944-2952



Forschungszentrum Jülich