Universität Rostock

Traditio et Innovatio

Anwendung von thermischen Trennverfahren zur integrierten Aufarbeitung bei biokatalytischen Reaktionen

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Lars-Erik Meyer

geboren am 31.10.1990 in Nordenham

Hanse- und Universitätsstadt Rostock, Februar 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002744

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Technische Chemie der Universität Rostock von Dezember 2016 bis Februar 2020 unter der Betreuung von Dr. Jan von Langermann angefertigt.

1. Gutachter: **Dr. Jan von Langermann**
Universität Rostock
Institut für Chemie
Biocatalytic synthesis group
Albert-Einstein-Straße 3a
18059 Rostock

2. Gutachterin: **Prof. Dr. Kathrin Castiglione**
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik
Paul-Gordan-Str. 3
91052 Erlangen

Eingereicht am: 14.02.2020
Promotionskolloquium: 23.06.2020

« *T*here are four lights!»

Jean-Luc Picard

Für Johanna,
meine Eltern
und Großeltern.

Danksagung

Dies ist die erste vollständige Textseite, die in dieser Arbeit zu finden ist! Und sie ist sicherlich die wichtigste von allen folgenden Textseiten. Diese Arbeit wäre nicht ohne die Menschen zustande gekommen, denen ich im Folgenden meinen Dank aussprechen möchte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan von Langermann und Erlencamp. Ohne die tolle Betreuung, die vielen Ratschläge, die reichlichen Anregungen und Kommentare in zahlreichen Gesprächen, E-Mails, Telefonaten, Whats-App Unterhaltungen und Dropbox-Texteditordatei-Unterhaltungsdateien wäre diese Arbeit wahrscheinlich nicht in dieser Form entstanden. Danke Jan, dass du dir mit mir so viel Zeit und Geduld genommen hast.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Udo Kragl. Das in mich gesetzte Vertrauen, die zahlreichen wissenschaftlichen Fragestellungen frei und selbstbestimmt lösen zu können haben mich stets herausgefordert, mich aber letztendlich in meiner Arbeit ge- und bestärkt.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Technischen Chemie bedanken. Wir sind eine gute Truppe! Das gemeinsame, meist „inspirierende“ morgendliche Kaffeetrinken und das gemeinsame Mittagessen in der Mensa und das daran anschließende nachmittägliche Kaffeetrinken werden mir stets in allerbester Erinnerung bleiben. Frau Sandra Diederich gilt mein besonderer Dank für all die kleinen und großen Hilfen im Laboralltag.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hubert Bahl gilt außerdem mein großer Dank. Die Zurverfügungstellung der Mikrobiologielabore mit dem entsprechenden Equipment haben mir die Herstellung der Zellen erst ermöglicht. Insbesondere Herrn Dr. Fischer, Frau Timm, Frau Boldt und Frau Goschke danke ich für die geduldige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen zu Beginn meiner praktischen „Mikrobiologiekariere“. Euch – Maria und Julia – danke ich für die schnelle Aufnahme im Labor und die prompte „Animation“ zum Kuchenbacken.

Meine Verlobte (bald Ehefrau) Johanna Claus (bald Meyer) ist seit dem Beginn des Studiums das Wichtigste in meinem Leben geworden. Gemeinsam haben wir das Studium gemeistert, so wie auch die Promotionszeit. Du warst und bist für mich unerlässlich!

Meine Eltern und Großeltern haben stets an mich geglaubt, mich stets unterstützt und gefördert wo es ihnen nur möglich war. Dafür kann ich mich gar nicht genug bedanken.

Schlussendlich bedanke ich mich bei meinen Freunden, die bis jetzt noch nicht namentlich erwähnt werden konnten. Danke für die schöne Studienzeit, die unzähligen Partys (und die Morgen danach), das gemeinsame Lernen und die gemeinsamen Urlaube.

Danke Euch Allen!

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Biokatalyse 1

1.2 Klassifikation der Enzyme 4

1.3 Vom Plasmid zum Prozess: Aspekte der weißen Biotechnologie 5

2 Zielstellung 9

3 Janusgesicht Wasser: Integration von thermischen Trennverfahren in biokatalytische Prozesse 11

3.1 Biokatalyse: Herausfordernde, aber vielversprechende Zukunft 11

3.2 Thermische Trennverfahren in der Biokatalyse 12

4 Fallstudie I: Adsorptionsharz-basierte Aufarbeitung 17

4.1 Decarboxylase-katalysierte Reaktionen 17

4.2 Imin Reduktase (IRED)-katalysierte Reaktionen 25

5 Fallstudie II: IL-basiertes thermomorphe Lösungsmittelsystem 31

5.1 Lipasen-katalysierte Reaktionen 31

6 Zusammenfassung und Ausblick 37

7 Literaturverzeichnis 39

Anhang: Originalpublikationen 51

A.1 Publikation I 53

A.2 Publikation II 55

A.3 Publikation III 57

A.4 Publikation IV 59

A.5 Publikation V 61

Abkürzungsverzeichnis

1-PS	Einphasensystem (monophasisches System)
2,3-DHBD_*Ao*	2,3-Dihydroxybenzoesäuredecarboxylase aus *Aspergillus oryzae*
2-PS	Zweiphasensystem (biphasisches System)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin (synonym: Rinderserumalbumin)
DHMBA	2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure
DSP	«downstream processing», „Aufarbeitungsverfahren“
E. coli	*Eschericha coli*
EC	Enzyme Commission
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GC	Gas Chromatographie
HPLC	«high performance liquid chromatography»
ISPA	«*in situ* product adsorption»
ISPR	«*in situ* product removal/recovery»
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OLM	Organisches Lösungsmittel
PLP	Pyridoxalphosphat
PS-DVB	Polystyrol/*p*-Divinylbenzol
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
TOF	«turnover frequency»
TPP	Thiaminpyrophosphat
L-Arg	L-Arginin, Aminosäure
L-Asp	L-Asparaginsäure, Aminosäure
L-Glu	L-Glutaminsäure, Aminosäure
L-Lys	L-Lysin, Aminosäure

Vom SI-System abweichende Einheiten, Typographie

Die in dieser Arbeit verwendeten Maßeinheiten entsprechen den Einheiten im Internationalen Einheitensystem (SI). Aufgeführt sind im Folgenden alle abweichenden Einheiten und deren Umrechnungen. Die Trennung von Dezimalzahlen erfolgt nach der englischen Schreibweise durch einen Punkt. Auf eine Zifferngruppierung bei großen Zahlen durch ein Komma wird in dieser Arbeit verzichtet. Literaturgebräuchliche Bezeichnungen werden nicht in die deutsche Sprache übersetzt, um keine Wortneuschöpfungen zu schaffen. Es erfolgt aber eine entsprechende «Kennzeichnung».

℃	Grad Celsius, $\{\vartheta\}_{℃} = \{T\}_{K} - 273.15\ \vartheta$
A	Spezifische Aktivität, 1 U = 1 µmol·min^{-1}
a	Jahre, 1 a
Å	Ångström, 1 Å = 1·10^{-10} m
h	Stunden, 1 h = 60 min = 3600 s
k_{cat}	s^{-1}
K_m	mol·L^{-1}
L	Liter, 1 L = 1·10^{-3} m^3
min	Minuten, 1 min = 60 s
rpm	Rotationen pro Minute
w%	Massenanteil, $w_i = m_i / (m_i + m_j)$

Wichtige Gleichungen und Definitionen

Ausbeute

$$\eta = \chi \cdot \sigma = \frac{n_\mathrm{P} - n_{\mathrm{P},0}}{n_{\mathrm{S},0}} \cdot \frac{|\nu_\mathrm{S}|}{|\nu_\mathrm{P}|} \tag{1.1}$$

Arrhenius-Gleichung

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_\mathrm{A}}{R \cdot T}} \tag{1.2}$$

Enantiomerenüberschuss

$$ee = \frac{|m_1 - m_2|}{m_1 + m_2} \cdot 100\,\%; \quad ee_\mathrm{S} = \frac{n_{(S)-\mathrm{S}} - n_{(R)-\mathrm{S}}}{n_{(S)-\mathrm{S}} + n_{(R)-\mathrm{S}}}; \quad ee_\mathrm{P} = \frac{n_{(R)-\mathrm{P}} - n_{(S)-\mathrm{P}}}{n_{(R)-\mathrm{P}} + n_{(S)-\mathrm{P}}} \tag{1.3}$$

Enantioselektivität

$$E = \frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln[1 - \chi \cdot (1 + ee_\mathrm{P})]}{\ln[1 - \chi \cdot (1 - ee_\mathrm{P})]} = \frac{\ln[(1 - \chi) \cdot (1 - ee_\mathrm{S})]}{\ln[(1 - \chi) \cdot (1 + ee_\mathrm{S})]} \tag{1.4}$$

n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

$$\log P = \log K_\mathrm{OW} = \log\left(\frac{[\mathrm{s}^i]_\mathrm{Octanol}}{[\mathrm{s}^i]_\mathrm{Wasser}}\right) \tag{1.5}$$

Selektivität

$$\sigma = \frac{n_\mathrm{P} - n_{\mathrm{P},0}}{n_{\mathrm{S},0} - n_\mathrm{S}} \cdot \frac{|\nu_\mathrm{S}|}{|\nu_\mathrm{P}|} \tag{1.6}$$

Umsatz

$$\chi = \frac{n_{\mathrm{S},0} - n_\mathrm{S}}{n_{\mathrm{S},0}} = \frac{ee_\mathrm{P}}{ee_\mathrm{S} + ee_\mathrm{P}} \tag{1.7}$$

Wasseraktivität

$$a_{\mathrm{H_2O}} = \frac{f_{\mathrm{H_2O}}}{f^*_{\mathrm{H_2O}}}; \quad a_{\mathrm{H_2O}} = \frac{p_{\mathrm{H_2O}}}{p^*_{\mathrm{H_2O}}} \tag{1.8}$$

ee_P Enantiomerenüberschuss bezüglich des Produktes

ee_S Enantiomerenüberschuss bezüglich des Substrates

f/f^* Fugazität von Wasser in Mischung / Fugazität von Wasser reinem Wasser

k_1 Reaktionsgeschwindigkeit des abreagierenden (*R*)-Enantiomers (*R*)-S (mol·s⁻¹)
(*R*)-S $\xrightarrow{k_1}$ (*R*)-P

k_2 Reaktionsgeschwindigkeit des abreagierenden (*S*)-Enantiomers (*S*)-S (mol·s⁻¹)
(*S*)-S $\xrightarrow{k_2}$ (*S*)-P

$m_{1/2}$ Masse des Enantiomers 1 bzw. des Enantiomers 2

n_P Stoffmenge des Produktes P zum Zeitpunkt $t > t_0$

$n_{\mathrm{P},0}$ Anfangsstoffmenge des Produktes P am Anfang der Reaktion zum Zeitpunkt t_0

n_S Stoffmenge des Substrates S zum Zeitpunkt $t > t_0$

$n_{\mathrm{S},0}$ Anfangsstoffmenge des Substrates S am Anfang der Reaktion zum Zeitpunkt t_0

p/p^* Partialdruck von Wasser über der Mischung / Partialdruck von Wasser reinem Wasser

s^i Konzentration einer Substanz *i*

Abbildungs-, Schemata- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Enzymkatalyse 1
Abbildung 1.2. Temperatur-Reaktionsoptimum bei biokatalytischen Reaktionen 2
Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der kinetischen Racematspaltung 3
Abbildung 1.4. Einteilung der Enzymklassen mit Beispielen 4
Abbildung 1.5. Prinzipien der Enzym-Immobilisierung 5
Abbildung 1.6. Weg vom Plasmid zum nutzbaren Biokatalysator. 6
Abbildung 1.7. Verfahrenstechnische Gesichtspunkte für die Entwicklung eines Prozesses 8
Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Zielstellung dieser Dissertation 9
Abbildung 3.1. Darstellung des binären Phasenverhaltens 15
Abbildung 3.2. Darstellung eines hypothetischen Phasenverhaltens 16
Abbildung 4.1. Substrattoleranz der metallabhängigen *o*-BDCs und LigWs 21
Abbildung 4.2. Benötigte Katalysatorbeladungen der enzymatischen Carboxylierung 23
Abbildung 4.3. Zeitverlauf der enzymatischen Carboxylierung 23
Abbildung 4.4. Schematische Darstellung der Aufarbeitung der enzymatischen Synthese 25
Abbildung 4.5. Optimierungsstudien der IRED-katalysierten Synthese 28
Abbildung 4.6. Adsorption nach 30 min des Iminsubstrates 2-MP und des Amin-Produktes 29
Abbildung 4.7. Speziesverteilung in Bezug zum pH-Wert 30
Abbildung 5.1. Konzept des entwickelten TMS-IL-basierten Reaktionssystems 33
Abbildung 5.2. Kinetische Racematspaltung 34
Abbildung 5.3. (i) SDS-Gel des Enzyms CalB bei verschiedenen Konzentrationen 35

Schema 1.1. Kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat mittels der Lipase CalB 3
Schema 1.2. Dynamische Racematspaltung von racemischer Mandelsäure 3
Schema 3.1. Allgemeine Darstellung der Struktur von Ionenaustauscherharzen 14
Schema 4.1. Der CALVIN-BENSON-BASSHAM-Zyklus 17
Schema 4.2. Industrielle Prozesse, die CO_2 als C_1-Quelle nutzen 18
Schema 4.3. KOLBE-SCHMITT-Prozess am Beispiel der Synthese von Salicylsäure 18
Schema 4.4. Enzymatische Carboxylierung von Phenol- und *para*-Hydroxystyrol-Derivaten 19
Schema 4.5. Generelle Darstellung der Carboxylierung einer C–H-Bindung 20
Schema 4.6. Übersicht von zwei der insgesamt drei relevanten Aren-(De)Carboxylasen 20
Schema 4.7. Allgemeiner Mechanismus für die *ortho*-(De)Carboxylierung 21
Schema 4.8. Enzymatische Carboxylierung von 3,5-Dihydroxytoluol (Orcinol) 22
Schema 4.9. Auswahl chiraler Aminbausteine (rot) in Arzneimitteln 26
Schema 4.10. Enzymklassen, die die enantioselektive Synthese zu Aminen katalysieren 26
Schema 4.11. Übersicht über IRED-katalysierte Reaktionen 27
Schema 4.12. Ausgeführte IRED-katalysierte Testreaktion 28
Schema 5.1. (i) Mechanismus und (ii) Substrat/Produkt Überblick der katalytischen Triade 32
Schema 5.2. Untersuchte ILs mit hoher Biokompatibilität 33

Tabelle 1.1. Vor- und Nachteile von isolierten Enzymen versus ganze Zellen 7
Tabelle 3.1. E-Faktoren in der chemischen Industrie 11
Tabelle 3.2. Biokatalytische Reaktion unter typischen Reaktionsbedingungen 12
Tabelle 3.3. Zusammenfassung der Eigenschaften einiger ausgewählter Adsorptionsharze 14
Tabelle 4.1. Reaktionsumsätze verschiedener Orcinolkonzentrationen 22
Tabelle 4.2. Adsorption des Produktes und des Substrates an zehn verschiedene Adsorber 24
Tabelle 5.1. Charakterisierung verschiedener IL/NaP_i/Wasser-Systeme 35

Kurzfassung

Enzym-katalysierte Reaktionen finden zu jedem Zeitpunkt in jedem lebendigen Organismus überall auf der Welt statt. Die Biotechnologie versucht, diese natürlichen Prozesse in die chemische Synthese zu überführen und deren Vorteile zu nutzten. Da im Allgemeinen nur milde Reaktionsbedingungen bei enzymatischen Reaktionen benötigt werden, besteht seit einigen Jahrzehnten großes Interesse in der akademischen und industriellen Forschung, konventionelle chemische Übergangsmetallkatalysatoren und die damit verbundenen Prozesse durch biotechnologische Verfahren zu substituieren.

Nichtsdestotrotz gibt es bei enzymatischen Reaktionen auch einige Limitierungen, die überwunden werden müssen, um zum Erfolg der Biotechnologie beizutragen. Vor allem unwirtschaftliche Reaktionsumsätze, Produkttiter und Aufarbeitungen bzw. Aufreinigungen der hergestellten Produkte stellen noch zum Teil große Hürden in dem Themenkomplex der Biokatalyse dar.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, Strategien der Aufarbeitung in enzymatisch-katalysierten Reaktionen zu integrieren und an verschiedenen konkreten Enzymsystemen (Decarboxylasen, Imin Reduktasen und Lipasen) zu evaluieren. Hier stehen vor allem ein Adsorptionsharz-basiertes Downstream-Processing und ein auf Ionischen Flüssigkeiten basiertes thermomorphes Extraktionssystem im Fokus dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Integration kommerziell erhältlicher Adsorber-, Anion- oder Kationenaustauscherharze die Aufarbeitungsschritte signifikant verringern lassen. Dadurch können die entsprechenden Produkte selektiv aus der Reaktionslösung entfernt und mit hohen Reinheiten ohne weitere Reinigungsschritte erhalten werden. Des Weiteren zeigt diese Arbeit die Möglichkeiten eines temperatur-schaltbaren Extraktionssystems auf, welches eine Flüssigimmobilisierung einer Lipase zusammen mit der Extraktion der entstehenden Produkte beinhaltet.

Abstract

Enzyme-catalyzed reactions take place in any living organism anywhere in the world at any time. Biotechnology focuses on transferring these natural processes into chemical synthesis and on exploiting their advantages. In general, only mild reaction conditions are required for enzymatic reactions. Substituting conventional chemical transition metal catalysts and the associated processes by biotechnological methods has been of interest for scientists in research and industry for several decades.

Nevertheless, enzymatic reactions also face several problems that need to be overcome in order to contribute to the success of biotechnology. Above all, uneconomical conversions, product titres and the downstream processing and purification of products remain major obstacles in the field of biocatalysis.

The aim of this work is to develop strategies for the integrated downstream processing and the purification of enzymatic-catalyzed reactions and to evaluate them based on different tangible enzyme systems (decarboxylases, imine reductases and lipases). Here, the focus of this work is mainly on adsorptive resin-based downstream processing and ionic liquid-based thermomorphic extraction systems. The integration of commercially available adsorber, anion or cation exchange resins can significantly reduce the downstream processing steps. Thus, the corresponding products can be selectively removed from the reaction solution to obtain highly pure products without further purification steps. In addition, this work shows the possibilities of a thermomorphic extraction system, which includes a liquid immobilization of a lipase and the extraction of the resulting products.

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse

Enzyme sind Stoffe, die aus Makromolekülen bestehen und chemische Reaktionen beschleunigen können. Sie wirken also als Katalysatoren. Die grundlegenden Verständnisse der Biokatalyse beruhen auf denselben Prinzipien wie auf der Chemokatalyse (Organo- und Metallkatalysatoren): Durch die Bildung eines (Bio)Katalysator-Substrat-Komplexes wird die Aktivierungsenergie einer betrachteten Reaktion herabgesetzt und die eigentliche Reaktionsrate der ARRHENIUS-Gleichung (1.2) folgend signifikant erhöht. So beschleunigt sich z. B. die Reaktionsgeschwindigkeit (die Einstellung des Gleichgewichtszustandes) bei einer Abnahme von $\Delta\Delta G$ = 30 kJ·mol^{-1} auf 20 kJ·mol^{-1} um das 56-Fache, bei einer Verringerung auf z. B. 10 kJ·mol^{-1} um das 3000-Fache. Der Katalysator selbst wird während der Reaktion nicht verbraucht und steht einem neuen Substrat nach dem Durchschreiten eines Katalysezyklus wieder unverändert zur Verfügung. Die Lage des thermodynamischen, chemischen Gleichgewichtes einer betrachteten Reaktion wird durch einen (Bio)Katalysator nicht verändert (Abbildung 1.1).[1–3]

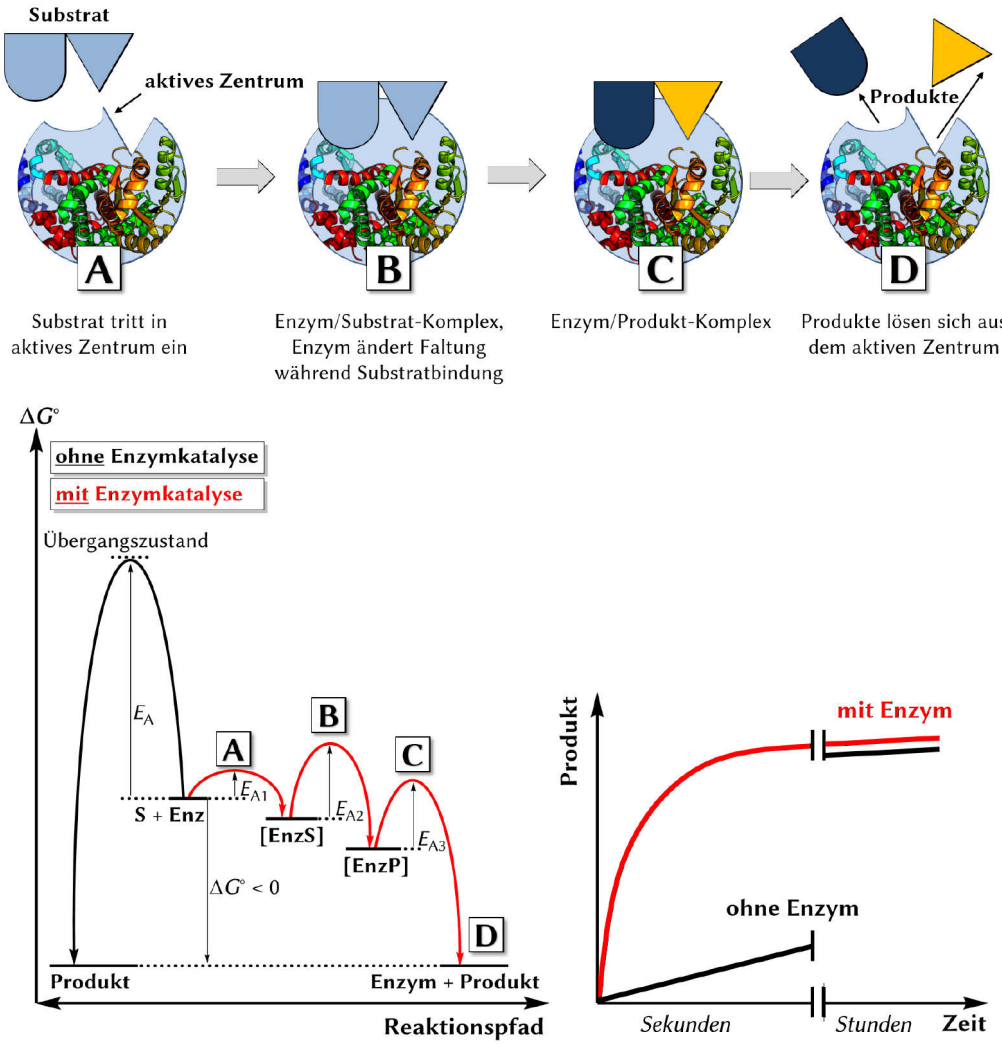


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Enzymkatalyse nach dem Modell der „Induzierten Passform“ («induced fit»), bei dem sich die Quartärstruktur des Enzyms während der Substratbindung anpasst (oben). Durch die Erniedrigung der Aktivierungsenergie E_A wird die Einstellung des Gleichgewichtzustandes signifikant beschleunigt (unten).[1,3]

Biokatalysatoren neigen aufgrund ihrer Beschaffenheit bei höheren Temperaturen zur Desaktivierung infolge der strukturellen Veränderung der Proteinstrukturen (Denaturierung). Das optimale Temperatur-Reaktionsoptimum einer biokatalysierten Reaktion ist daher von besonderem Interesse (vgl. Abbildung 1.2). Bei vielen Enzymen kann aufgrund ihrer natürlichen Herkunft aus prokaryotischen und eukaryotischen Zellen von einem optimalen Temperaturbereich von 30 °C bis 37 °C ausgegangen werden. Es gibt jedoch in der Literatur auch zahlreiche herausragende Beispiele für enzymkatalysierte Reaktionen bei erhöhten oder erniedrigten Temperaturen.[4] Auch weitere Reaktionsbedingungen haben einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität und sind stets für jedes Enzym-Reaktionssystem zu evaluieren, im einfachsten Fall durch photometrische Bestimmungen (Aktivitätsassays)[5] und der jeweiligen Variierung einzelner Parameter. Hierzu zählen u.a. der pH-Wert, dass daraus resultierende Puffersystem, die Ionenkonzentration (Salzstärke des Mediums), die Anfangssubstratkonzentration und etwaige Toxizitätsniveaus der Produkte und/oder der Substrate.

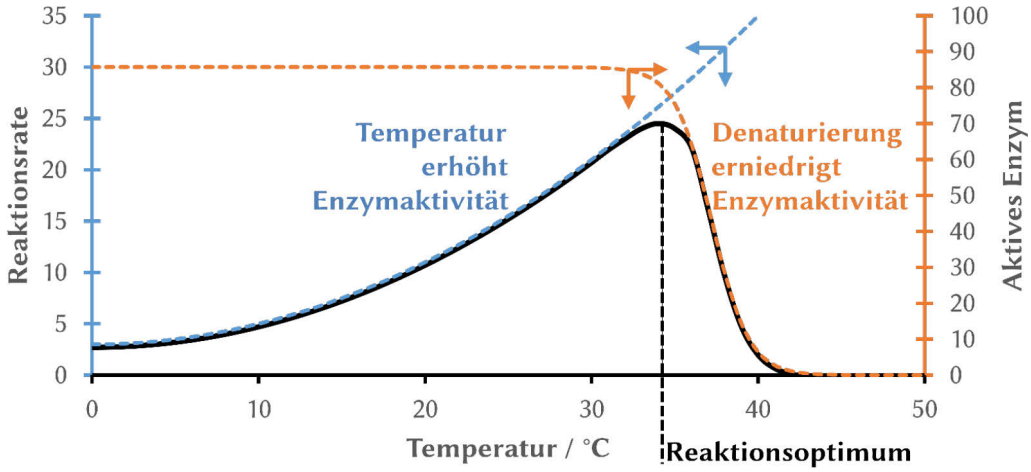


Abbildung 1.2. Temperatur-Reaktionsoptimum bei biokatalytischen Reaktionen. Durch eine Temperaturerhöhung wird der ARRHENIUS-Gleichung (1.2) folgend die Enzymaktivität erhöht (blaue Linie). Bei weiterer Erhöhung kommt es jedoch zu irreversiblen Denaturierungseffekten (orange Linie) respektive zum Aktivitätsverlust. Das Temperatur-Reaktionsoptimum wird dabei durch das Maximum der resultierenden Aktivitätskurve repräsentiert (schwarze Linie). Die Einheiten der Ordinaten sind willkürliche gewählt.

Eine der beeindruckendsten Eigenschaften von enzymkatalysierten Reaktionen ist die ausgeprägte Substratspezifität der Biokatalysatoren. So werden in der Literatur – und auch in dieser Arbeit – zahlreiche Beispiele von enantio-, stereo- und regioselektiven Reaktionen beschrieben, da sich nur bestimmte Substrate in das katalytische aktive Zentrum eines spezifischen Enzyms anlagern können („Schlüssel-Schloss-Prinzip“).[6] Durch die Bildung eines spezifischen Enzym-Substrat-Komplexes wird die Aktivierungsenergie deutlich herabgesetzt und respektive diese spezifische Reaktionsrate signifikant erhöht.

Eine daraus resultierende Anwendung liegt in der Trennung von Enantiomeren (Abbildung 1.3). Bei der kinetischen Racematspaltung wird in einem racemischen Gemisch nur ein Enantiomer ausreichend schnell umgesetzt (vgl. Schema 1.1).[7] Die größtmögliche theoretische Ausbeute ist hier auf maximal 50 % begrenzt, da in der Substratmischung auch nur 50 % des verfügbaren Enantiomers vorhanden ist.[8]

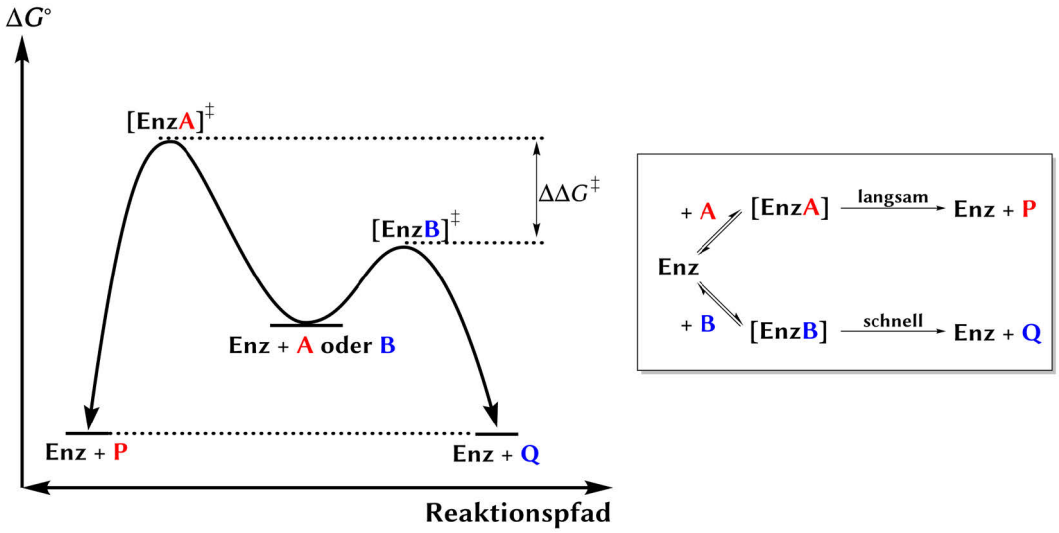
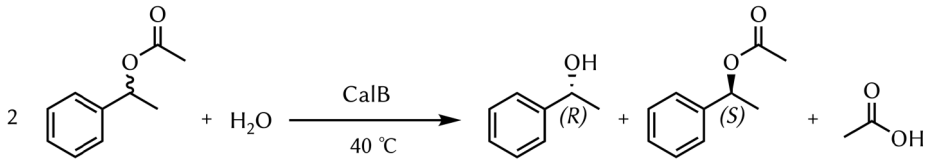
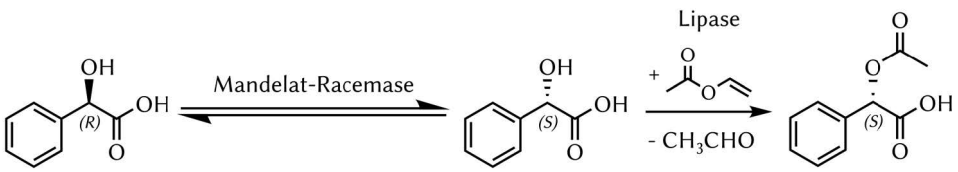


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der kinetischen Racematspaltung. Durch eine geringere Aktivierungsbarriere wird die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes [EnzB] bevorzugt, wodurch diese Gleichgewichtsreaktion signifikant schneller verläuft als die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes [EnzA]. Das Produkt Q wird aus diesem Grund in einem zeitlich endlichen Betrachtungsraum übermäßig gebildet. Modifiziert nach Faber.[1]



Schema 1.1. Kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat mittels der Lipase CalB. Durch die deutlich größere Reaktionsrate wird das entsprechende (*R*)-Substrat zum (*R*)-Produkt im signifikanten Überschuss umgesetzt, die Lipase wird als „(*R*)-selektiv" bezeichnet.

Bei der dynamisch-kinetischen Racematspaltung kann durch einen vorgelagerten *in situ* Racemisierungsschritt ein Enantiomer in ein anderes überführt werden, um dieses dann in einer anschließenden enantioselektiven Reaktion zum Zielprodukt umsetzen zu können. Die dynamisch-kinetische Racematspaltung ermöglicht daher Umsätze von theoretisch bis zu 100 % (in der Praxis bis zu >99 %, vgl. Schema 1.2).[9] Neben der Kombination von verschiedenen Enzymen zu einer Racemase-Lipase-Kaskade für die dynamisch-kinetische Racematspaltung sind auch Verknüpfungen von Chemo- und Biokatalyse in der Literatur beschrieben.[10]



Schema 1.2. Dynamische Racematspaltung von racemischer Mandelsäure zu (*S*)-Acetylmandelsäure. Durch eine *in situ* Racemisierung von (*R*)-Mandelsäure zu (*S*)-Mandelsäure kann durch die verknüpfte *O*-Acetylierung mit Vinylacetat durch eine (*S*)-selektive Lipase ein theoretischer Umsatz von >99% erreicht werden. Zeitgleich wird das Gleichgewicht der Racemasen-katalysierten Reaktion in Richtung des (*S*)-Produktes verschoben.[9] Siehe auch Jeromin *et al.*[11] und Strauss *et al.*[12]

1.2 Klassifikation der Enzyme

Zur Identifizierung und Klassifizierung der Enzyme ist eine logische Unterteilung der Biokatalysatoren notwendig. Jedes Enzym kann durch eine vierstellige EC-Klassifizierungsnummer, die von links nach rechts fortschreitend immer spezifischer wird, kategorisiert werden. Es werden sieben Hauptklassen unterschieden (Abbildung 1.4). Dabei bilden die Enzymklassen [EC 1] bis [EC 4] (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Lyasen) die weitaus größten Vertreter von synthetisch nutzbaren Enzymen. Translokasen [EC 7] bilden seit der zweiten Hälfte 2018 eine eigenständige Enzymklasse.[13] Nach bestem Wissen gibt es derzeit aber noch keine chemisch-synthetisch bekannten Anwendungsbeispiele in der allgemeinen Literatur. Aktuell sind etwa 6500 Enzyme von der «International Union of Biochemistry and Molecular Biology» (IUBMB) klassifiziert. Es wird angenommen, dass bis zu 25000 Enzyme in der Natur existieren.[1]

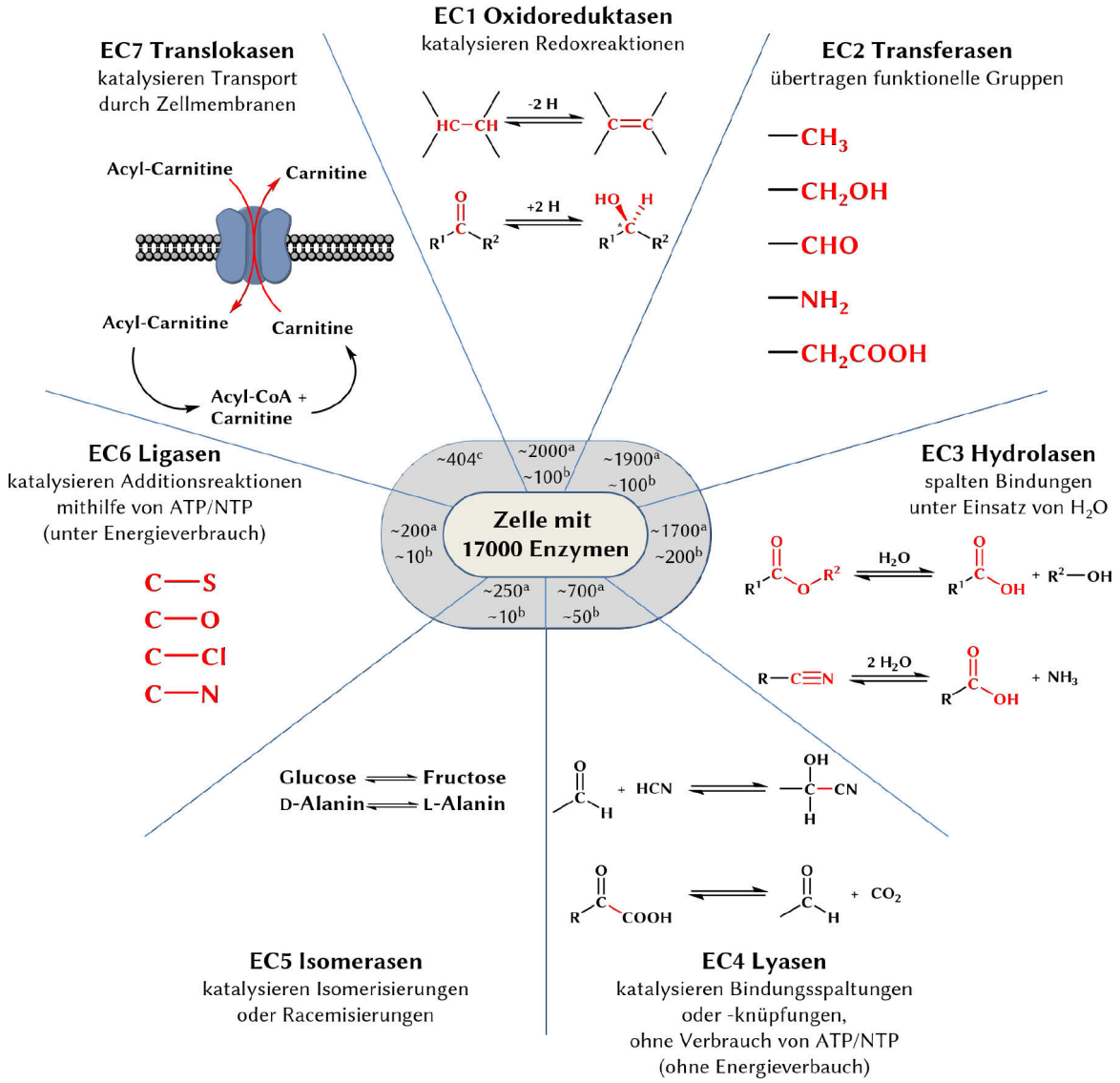


Abbildung 1.4. Einteilung der Enzymklassen mit Beispielen. [a]Anzahl der klassifizierten Enzyme und [b]Anzahl der verfügbaren Enzyme basierend auf Faber 2018,[1] [c]Anzahl der bekannten Organsimen laut Brenda 2019 (https://www.brenda-enzymes.org, Stand Juli 2019).

1.3 Vom Plasmid zum Prozess: Aspekte der weißen Biotechnologie

Das Gebiet der Biotechnologie hat sich durch die fortschreitende Akademisierung und durch den Bedarf nach alternativen Synthesewegen in der chemischen Industrie in den letzten Jahrzehnten zu einem eigenständigen und wichtigen Industriezweig entwickelt.[14,15] Wichtig hierbei war auch die Entwicklung gentechnischer Methoden für den Zugang zu einer breiteren Palette an Biokatalysatoren.[16] So können heutzutage z. B. gezielte Transformationen von extrachromosomalen Desoxyribonukleinsäuren (Plasmiden) in Bakterien dazu genutzt werden, nicht wirtseigene Proteine direkt im Bakterium selbst zu produzieren. Die so hergestellten artifiziellen Proteine werden als „rekombinante Proteine" bezeichnet. 1977 wurde durch diese Genmanipulationsmethode erstmalig das menschliche Hormon Somatostatin in *E. coli* von der Firma Genentech kommerziell biotechnologisch produziert.[17] Wenig später folgte die großtechnische Herstellung von Insulin und weiteren Wachstumshormonen.[18] Heutzutage besteht die Möglichkeit, durch die gezielte Transformation von Plasmiden eine Vielzahl von rekombinanten Enzymen in Wirtsorganismen zu produzieren. Diese Wirtsorganismen, die den Biokatalysator enthalten, können dann entweder frisch für eine enzymatische Reaktion verwendet oder für eine längere Haltbarkeit gefriergetrocknet oder eingefroren werden. Daneben können die überproduzierten Enzyme durch spezielle Aufreinigungsverfahren als reine Biokatalysatoren gewonnen werden (Abbildung 1.6, vgl. auch Tabelle 1.1). Diese können dann entweder direkt, als homogene oder durch eine etwaige Immobilisierung als heterogene Biokatalysatoren zum Einsatz kommen (Abbildung 1.5).

Die Immobilisierung eines Enzyms kann deutliche Vorteile in einem biotechnologischen Prozess mit sich bringen. Aus diesem Grund hat dieses Themenfeld in der Forschungsgemeinschaft in den vergangenen Jahren eine große Aufmerksamkeit erhalten und beträchtliche Fortschritte gemacht.[19] Abhängig von der Immobilisierungstechnik variieren die Enzymeigenschaften wie Stabilität, Selektivität, k_{cat}- und K_m-Wert, pH-Wert, etc. und das Temperaturverhalten erheblich (manchmal mit positivem, manchmal mit negativem Ausgang). Die Auswirkungen einer Immobilisierung auf die katalytische Leistung von Proteinen sind sehr schwer vorauszusagen.[1] Wichtige Einflussgrößen sind u.a. etwaige Stofftransportlimitierungen und/oder die Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms, sowie die Lage und Beschaffenheit des aktiven Zentrums.[2]

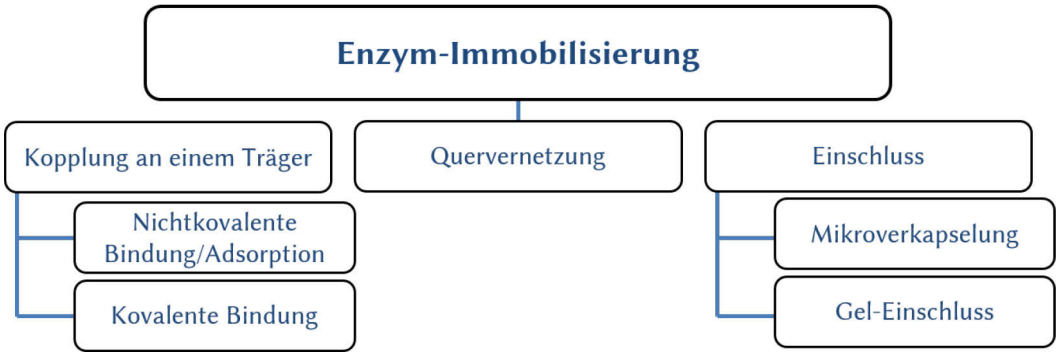


Abbildung 1.5. Prinzipien der Enzym-Immobilisierung.[13] Insgesamt können drei Arten der Enzym-Immobilisierung unterschieden werden: (i) Kopplung des Enzyms an einem Träger, (ii) eine Quervernetzung der Enzyme und (iii) Einschluss der Biokatalysatoren in eine Matrix.

Zu dem wohl bedeutendsten kommerziell gehandelten immobilisierten Biokatalysator zählt „Novozym 435" der Firma Novozymes S/A (Dänemark). Das Immobilisat bindet hierbei adsorptiv die Hydrolase „Lipase B" (EC 3.1.1.3) aus *Candida antarctica* und die poröse Matrix besteht aus Polymethylmethacrylat, welches als „Lewatit VP OC 1600"von der Firma Lanxess vertrieben wird.

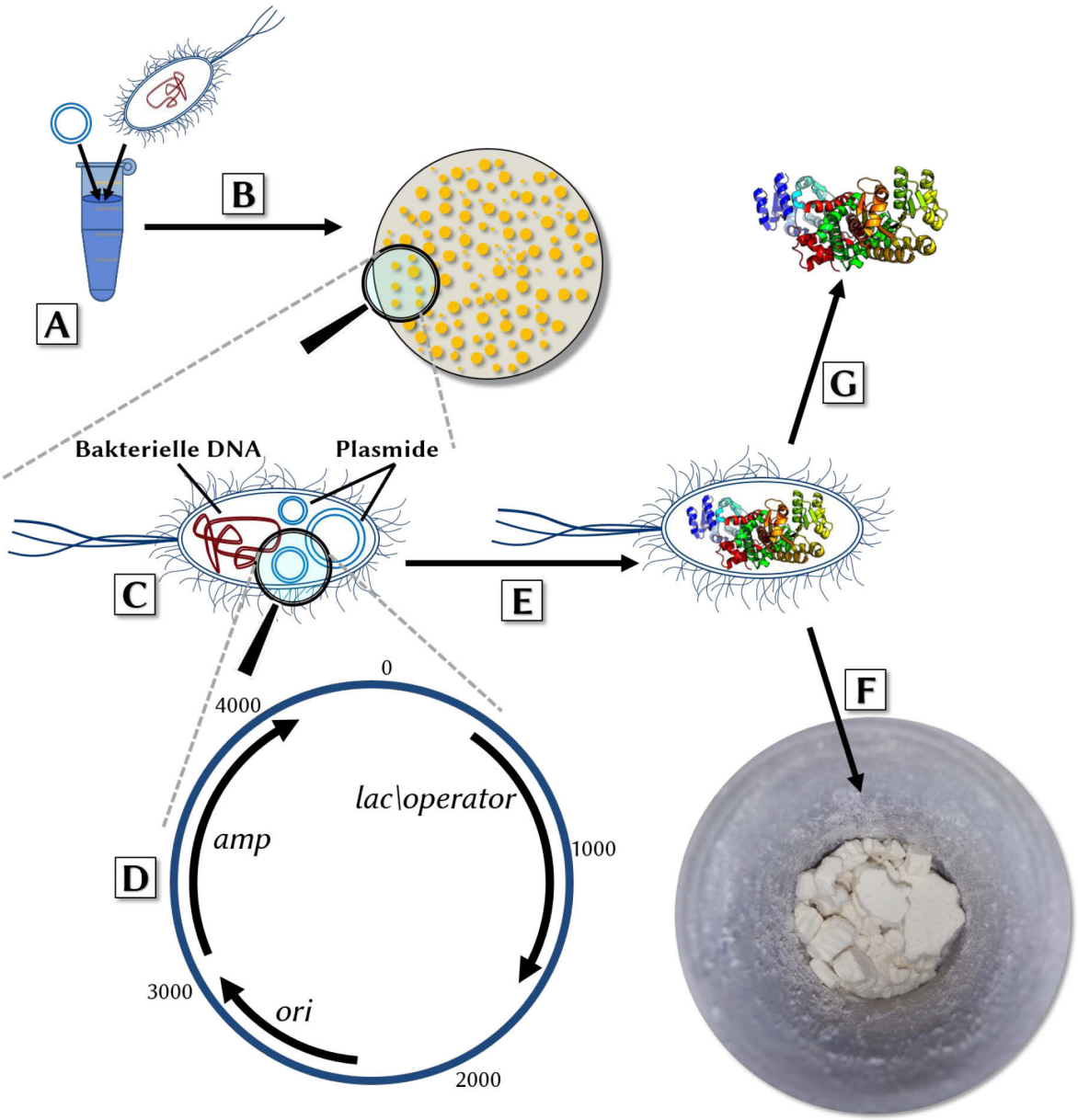


Abbildung 1.6. Weg vom Plasmid zum nutzbaren Biokatalysator. Kompetente Zellen können Fremd-DNA in Form von Plasmiden aufnehmen (Transformation, **A**), die den Zellen auch gewünschte Funktionalitäten wie z. B. eine Antibiotikaresistenz geben können. Eine Selektierung von gentransferierten (**C**) und „leeren" Zellen erfolgt durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Nährböden (**B**). Ein typisches Plasmid (auch: Vektor) mit Ampicillin-Resistenz zeigt **D**. Nach Induktion mit z. B. Galactose-Thioglycosid Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird das gewünschte Zielprotein in der Zelle überproduziert (**E**). Nach einer Gefriertrocknung (**F**) können diese Zellen entweder direkt als Biokatalysator eingesetzt werden (vgl. Tabelle 1.1 „Biokatalysator: Ganze Zellen") oder es kann das reine Zielprotein durch verschiedene Aufreinigungsschritte erhalten werden (**G**) (vgl. Tabelle 1.1 „Biokatalysator: Isolierte Enzyme").

Für einen möglichen Prozess kann der physikalische Zustand des Biokatalysators von entscheidender Bedeutung sein. Die Verwendung eines komplett aufgereinigten Enzyms, eines Rohextrakts oder von ganzen Mikroorganismen hängt von vielen Faktoren ab. Überlegungen wie (i) die Art der Reaktion, (ii) eine mögliche Kofaktor-Regenerierung und (iii) der Größenmaßstab der Biotransformation spielen hier eine entscheidende Rolle.[20] Die allgemeinen Vorteile und Nachteile der Verwendung isolierter Enzyme im Vergleich zu ganzen (mikrobiellen) Zellen können Tabelle 1.1 entnommen werden.

Tabelle 1.1. Vor- und Nachteile von isolierten Enzymen versus ganze Zellen. Tabelle modifiziert nach Faber.[1]

Biokatalysator: Isolierte Enzyme		
Form	**Vorteile**	**Nachteile**
Allgemein	Einfache technische Vorrichtung, einfache Aufarbeitung, höhere Produktivität aufgrund höherer Konzentrationstoleranz	Kofaktor-Regenerierung nötig, eingeschränkte Enzymstabilität
In Wasser gelöst	Hohe enzymatische Aktivität	Nebenreaktionen möglich, lipophile Substrate unlöslich, Aufarbeitung aufwendig
In organischen Lösungsmitteln suspendiert	Leicht durchzuführen, vereinfachte Aufarbeitung, lipophile Substrate löslich, einfache Enzymwiederverwendung	Verminderte Enzymaktivitäten, Redoxreaktionen stark gehindert
Immobilisiert	Einfache Enzymwiederverwendung	Eventuell Aktivitätsverlust
Biokatalysator: Ganze Zellen		
Form	**Vorteile**	**Nachteile**
Allgemein	Keine Kofaktor-Regenerierung nötig, keine Enzymaufreinigung nötig	Teures Equipment, mühsame Aufarbeitung in Bezug auf große Volumina, geringe Produktivität in Bezug auf eine geringere Konzentrationstoleranz, geringe Toleranz bezüglich organischer Lösungsmittel, mögliche Nebenreaktionen infolge von unkontrolliertem Metabolismus
Kultur in Wachstumsphase	Höhere Aktivitäten	Hohe Mengen von Biomasse, gesteigerter Metabolismus, vermehrte Nebenprodukte, Prozesskontrolle erschwert
Ruhende Zellen	Einfachere Aufarbeitung, geringerer Metabolismus, weniger Nebenprodukte	Geringere Aktivitäten
Immobilisierte Zellen	Wiederverwendung der Zellen	Geringere Aktivitäten

Bei der Verwendung lebensfähiger Ganzzellen bei traditionellen Fermentationsprozessen werden in der Regel sehr hohe Produkttiter gewonnen, da sie aus dem Primärstoffwechsel stammen und daher eine geringe Toxizität aufweisen. Typische Produkte sind organische Säuren (z. B. Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Itaconsäure, Brenztraubensäure), α-Aminosäuren (z. B. L-Glu, L-Lys, L-Arg, L-Asp) und Alkohole (z. B. 1-Butanol, 1,3-Propandiol). Es handelt sich hierbei um *de-novo*-Synthesen, ausgehend von billigen Kohlenstoffquellen wie Melasse oder Stärke. Sekundärmetabolite wie Steroide (z. B. Hydrocortison), Terpenoide (z. B. Taxadien, Artemisinsäure) und Antibiotika (z. B. Penizilline, Cephalosporine, Tetracycline) erfordern einen wesentlich höheren Aufwand des Metabolismusdesigns und werden aufgrund ihrer Toxizität mit reduzierter Produktivität gewonnen.[1,21]

Im Gegensatz dazu finden häufiger Zellen mit rekombinanten Enzymen, die gezielt ein Protein (oder mehrere) überproduzieren, in mikrobiell vermittelten Biotransformationen Anwendung. Hier können auch nicht-natürliche organische Verbindungen in ein gewünschtes Produkt umgewandelt werden, wobei nicht wachsende, „ruhende" Zellen eingesetzt werden. Oftmals treten aufgrund ihres eingeschränkten Stoffwechsels hierbei weniger Nebenreaktionen auf. Solche maßgeschneiderten, gentechnisch veränderten Organismen für Biotransformationen werden im Allgemeinen auch als «designer bugs» bezeichnet.[1]

Neben den beachtlichen Erfolgen in der Entwicklung der Biotechnologie in den letzten Jahrzehnten sind häufig noch Einschränkungen wie (i) unzureichende Stereo- oder Regioselektivitäten bzw. zu geringe Umsetzungsraten, (ii) unzureichende Biokatalysatorstabilitäten unter den gegebenen oder benötigten Reaktions- oder Prozessbedingungen oder (iii) Aktivitätseinbußen durch etwaige Substrat- oder Produkttoxizitäten zu überwinden, die sich nicht immer einfach durch ein Enzymkatalysatordesign («protein/enzyme engineering») lösen lassen. Diese Nachteile schränken die Anwendung von Enzymen – vor allem in der großtechnischen Synthesechemie – erheblich ein, so dass auch technische Gesichtspunkte eine entscheidende Rolle für die Etablierung von industriellen biokatalysierten Prozessen spielen, um die oben genannten Nachteile zu überwinden. Ein ganzheitlicher Ansatz, angefangen von den Prozessentwicklungszielen über die Biokatalysatorcharakterisierung bis zum Downstream-Processing (DSP), ist für die Entwicklung eines geeigneten Prozesses nötig (vgl. Abbildung 1.7).[22] Sind z. B. die Katalysatoreigenschaften und Reaktionscharakteristika bestimmt, ist die Wahl des passenden Enzymreaktors von entscheidender Bedeutung. Genauere Informationen hierzu sind in der gängigen Literatur zu finden.[23]

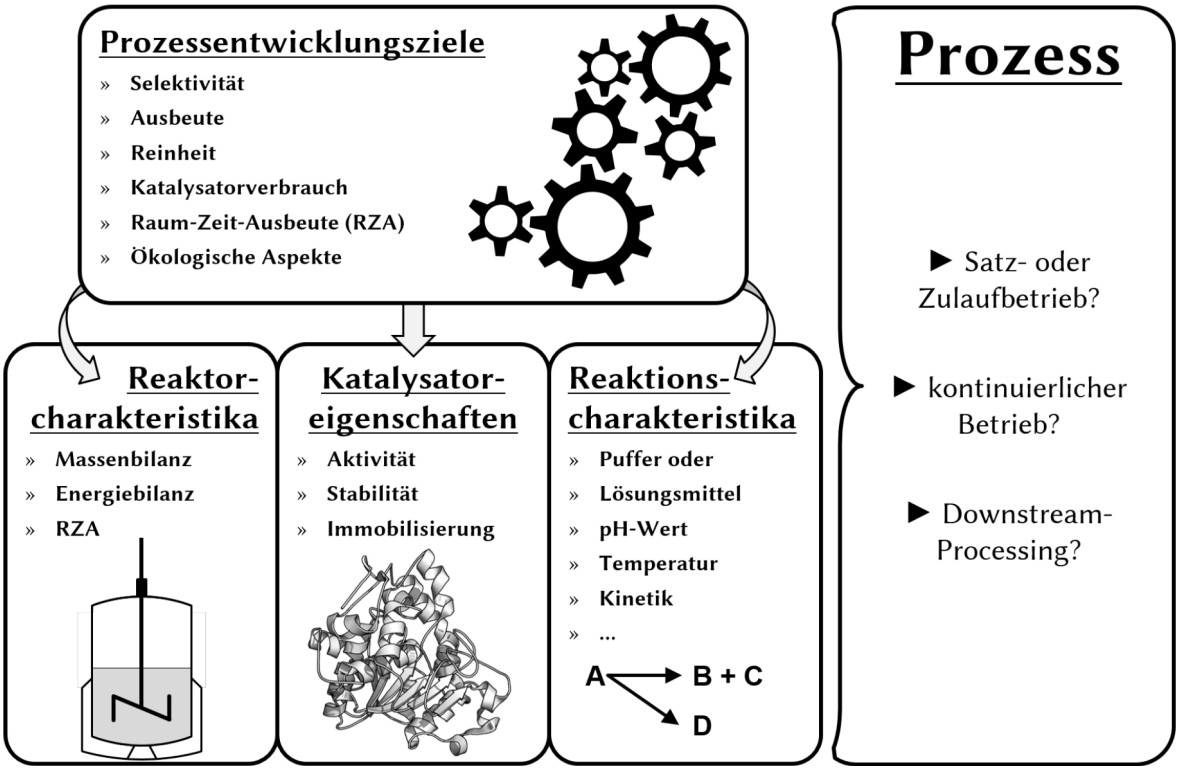


Abbildung 1.7. Verfahrenstechnische Gesichtspunkte für die Entwicklung eines Prozesses. Grafik adaptiert nach Liese *et al.*[24] und Hülsewede/Meyer *et al.*[25]

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Verbesserung von ausgewählten biokatalysierten Reaktionen mit dem Hauptaugenmerk auf die integrierte Aufarbeitung der synthetisierten Produkte mit Hilfe der thermischen Trennverfahren Extraktion und Adsorption. Dabei sollen Biokatalysatoren aus den Enzymklassen der Lyasen (EC 4.1.1.46, (De)carboxylase „2,3-DHBD_*Ao*“), der Hydrolasen (EC 3.1.1.3, Lipase „CalB“) und der Oxidoreduktasen (EC 1.5.1.48, Imin Reduktase „IRED“) verwendet werden (Abbildung 2.1).

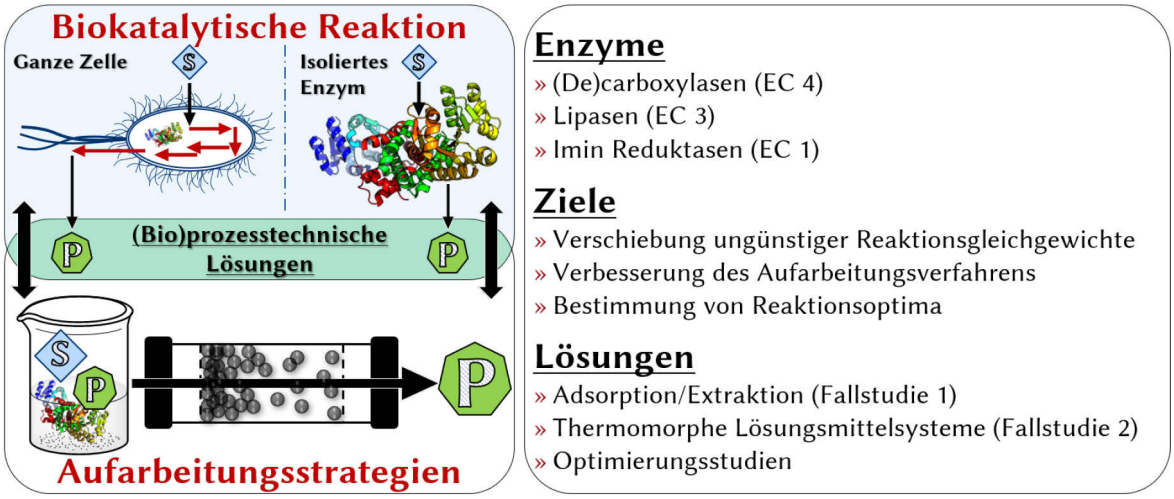


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Zielstellung dieser Dissertation. Die Produktivität biokatalytischer Reaktionen, die entweder mit isolierten, aufgereinigten Enzymen oder mit ruhenden, ganzen Zellen durchgeführt werden, wird meist durch die nachgeschaltete aufwendige Aufarbeitung verringert. Durch die direkte Integration einfach durchzuführender Aufarbeitungsstrategien wie Extraktion oder Adsorption können diese bioprozesstechnischen Lösungen diese Nachteile überwinden.

Alle Enzyme, die in dieser Arbeit Verwendung finden sollen, sind bereits literaturbekannt. Jedoch werden diese meistens nur grundlegend beschrieben. Vor allem werden die optimalen Reaktionsbedingungen und die mögliche Substratbreite besprochen, ohne dabei leider auf die Einflussfaktoren einzugehen, die für synthetische Anwendungen dieser Reaktionen nötig sind. So erreicht der Großteil der beschriebenen Substrat-Screenings nur eine Spanne von wenigen mmol·L^{-1} und die entsprechenden Produkte werden nur selten isoliert hergestellt. Wenn doch eine Isolierung beschrieben werden kann, handelt es sich meist um relativ aufwendige Verfahren, die die Atomeffizienz des enzymatischen Systems erheblich verschlechtern. Aus diesen Gründen besitzen diese Enzymsysteme (noch) keine große Relevanz für großtechnische, synthetische Anwendungen.

In einem ersten großen Themenkomplex soll die Verwendung von Ionenaustauscher- und Adsoberharzen evaluiert und bewertet werden. Diese Materialien zeigen zum einen ein hohes Potential, Produkte und Substrate selektiv aus der Reaktionslösung abzutrennen und zum anderen sind sie für die Anwendung zur Produktaufarbeitung bei biokatalytischen Prozessen in der Literatur noch unzureichend beschrieben. Genauer sollen anhand einer (De)carboxylase-katalysierten Testreaktion – nach deren Optimierung – die Produkte und Substrate aus der Reaktionslösung abgetrennt werden, ohne das im 60-fachen Überschuss vorhandene Bicarbonat vernichten zu müssen. Dazu sollen unterschiedliche Adsorber- und Anionenaustauscherharze gescreent und das Verfahren im größeren Maßstab durchgeführt werden.

Anhand einer Imin Reduktase-katalysierten Testreaktion soll in einer zweiten Studie das Verfahren erweitert und gezeigt werden, dass der Einsatz von Adsorber- und Kationaustauscherharzen auch hier zu einem verbesserten Downstream-Processing des Gesamtprozesses führen kann.

Durch den Einsatz von Ionischen Flüssigkeiten soll in einer zweiten Fallstudie geprüft werden, ob sich ein homogener Biokatalysator in einem thermomorphen Lösungsmittelsystem immobilisieren lässt (Flüssigimmobilisierung) und dieser dennoch eine Aktivität für die kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat zeigt. Ziel ist es dabei, in einem ersten Schritt wässrige Zweiphasensysteme durch eine geschickte Kombination von Ionischen Flüssigkeiten, Puffersalzen und Wasser zu entwickelt, die durch eine Temperaturerhöhung ein monophasisches Verhalten zeigen und wiederum durch eine Temperaturerniedrigung einen reversiblen Zerfall in zwei Phasen aufweisen. Des Weiteren ist die Frage zu klären, ob sich durch den induzierten Phasenzerfall die Produkte und der Biokatalysator voneinander trennen lassen. Bei dieser Fallstudie handelt es sich um eine Untersuchung im viel beachteten Themenfeld der Biokatalyse in unkonventionellen Lösungsmitteln.

3 Janusgesicht Wasser: Integration von thermischen Trennverfahren in biokatalytische Prozesse

3.1 Biokatalyse: Herausfordernde, aber vielversprechende Zukunft

Biokatalytische Reaktionen, durchgeführt mit aufgereinigten Enzymen, deren Immobilisaten oder mit ruhenden ganzen Zellen, gelten allgemein als „grün" und die Ökologie wenig belastend. Nicht selten werden Argumente wie „milde Reaktionsbedingungen", „nachwachsende Rohstoffe" als Quelle der Biokatalysatoren oder auch die Verwendung des ubiquitären Lösungsmittels Wasser bei der Diskussion um die Vorteile von biokatalytischen Reaktionen aufgeführt.[15,26]

Die von Anastas und Warner eingeführten «12 Principles of Green Chemistry» stellen einen Leitrahmen für die Entwicklung neuer chemischer Produkte und Prozesse dar. Es werden u.a. Aspekte wie die Atomeffizienz, die verwendeten Rohstoffe, die Effizienz und Sicherheit der Umwandlung bis hin zur Toxizität und biologischen Abbaubarkeit der verwendeten Produkte und Reagenzien betrachtet.[27] Als erstes der 12 Prinzipien wird der Aspekt des Abfalls eines chemischen Prozesses betrachtet. Eine wichtige Betrachtungsgröße hier ist der von Sheldon 1992 eingeführte E-Faktor («enviromental factor»). Dieser ist definiert als das Massenverhältnis von Abfall zu gewünschtem Produkt (E-Faktor = kg Abfall/kg Produkt).[28] Ein höherer E-Faktor bedeutet mehr Abfall und damit größere negative Auswirkungen auf die Umwelt. Der ideale, theoretische E-Faktor ist Null. Ein großes Defizit des E-Faktors ist, dass (i) Wasser generell aus der Berechnung des E-Faktors ausgeschlossen wird und (ii) dieser nicht die Toxizität des Abfalls einbezieht (vgl. z. B. 1 kg NaCl vs. 1 kg Hg). Wird beispielsweise ein wässriger Abfallstrom betrachtet, werden nur die im Wasser enthaltenen anorganischen Salze und organischen Verbindungen gezählt, das Wasser selbst wird ausgeschlossen. Wie groß das Abfallproblem in der Chemieproduktion ist, zeigt die Betrachtung typischer E-Faktoren in verschiedenen Bereichen der Chemieindustrie (Tabelle 3.1).[29]

Tabelle 3.1. E-Faktoren in der chemischen Industrie. Adaptiert nach Sheldon 2007.[29]

Industriezweig	Produktmenge/t	E-Faktor/ $kg_{Abfall} \cdot (kg_{Produkt})^{-1}$
Ölverarbeitung	10^6–10^8	<0.1
Bulkchemikalien	10^4–10^6	<1–5
Feinchemikalien	10^2–10^4	5–50
Pharmazeutika	10–10^3	25–100

Auch die Atomökonomie ist ein wichtiges Konzept in der „Grünen Chemie" und beschreibt den Umwandlungswirkungsgrad eines chemischen Prozesses in Bezug auf alle beteiligten Atome und der gewünschten erzeugten Produkte (Atomökonomie = Molekulargewicht des gewünschten Produktes/Molekulargewicht aller beteiligten Reaktanden x 100 %). Er wurde 1991 von Trost definiert.[30]

Bei einer im wässrigen Milieu ablaufenden biokatalytischen Reaktion ist das Lösungsmittel Wasser im Verhältnis zum Produkt im massiven Überschuss präsent. Eine effiziente Aufarbeitungsstrategie ist daher nötig, um einen Prozess möglichst effizient (geringer E-Faktor und hohe Atomeffizienz) zu gestallten. Aus der Betrachtung des E-Faktors geht auch hervor, dass eine möglichst

hohe Produktmenge einen Gesamtprozess effizienter gestalten kann (weniger Abfall, größere Atomeffizienz, weniger Gesamtkosten). Hier darf allerdings nicht die Grenze der Leistungsfähigkeit der enzymatischen Katalysatoren vernachlässigt werden, die vor allem durch eine maximale Substratkonzentration (Substratinhibierungen) und der Robustheit des Katalysators (Produktinhibierungen, Stabilität) definiert ist. Die Biokatalyse erfüllt zehn der zwölf Prinzipien der „Grünen Chemie“: (i) Abfallvermeidung, (ii) hohe Atomeffizienz durch ihre hohe Selektivität, (iii) weniger gefährliche Synthesen, (iv) sicherere Lösungsmittel (meistens Wasser), (v) geringer Energiebedarf aufgrund der milden Prozessbedingungen, (vi) Herkunft der Biokatalysatoren aus nachwachsenden Rohstoffen, (vii) Vermeidung von Derivatisierungen, (viii) Biokatalysatoren selbst sind Katalysatoren (nicht stöchiometrische Reagenzien), (ix) die Fähigkeit zur Anwendung von Echtzeit-Prozessanalytik zur Abfallvermeidung und vor allem (x) die inhärente Sicherheit.[31,32]

Wasser besitzt viele umweltfreundliche Eigenschaften: Es ist ungefährlich, nicht entflammbar und besitzt keine Explosionsgefahr im Gegensatz zu vielen organischen Lösungsmitteln. Es ist das natürliche Medium von Mikroorganismen und daher auch das präferierte Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen. Dennoch gibt es beim Einsatz von Wasser zwei große Nachteile: (i) Durch seine hohe Polarität sind hydrophobe Substanzen nur schwer löslich und erniedrigen somit die Reaktandenkonzentration (vergleiche Tabelle 3.2) und (ii) die in der Industrie häufig angewandten Grundoperationen wie Destillation und Trocknung benötigen sehr viel thermische Energie (z. B. Vergleich der Verdampfungswärme von H_2O = 2257 kJ·kg^{-1}, Aceton = 538.9 kJ·kg^{-1} und Diethylether = 353.1 kJ·kg^{-1}).

Tabelle 3.2. Biokatalytische Reaktion unter typischen Reaktionsbedingungen bei der Verwendung schwer wasserlöslicher Reagenzien. Die Reaktionslösung enthält ein Vielfaches an Substanzen verglichen zum Produkt. [a]M($NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$) = 156 g·mol^{-1}, [b]M = 40 kDa, [c]∅M = 200 g·mol^{-1}. Tabelle modifiziert nach De María/Hollmann.[33]

Komponente	Typische Konzentration/mol·L^{-1}	Massenanteil (Komponente zu Produkt)/kg·kg^{-1}
Wasser	55.6	500
Puffer[a]	0.1	8
Enzym[b]	$1 \cdot 10^{-6}$	0.02
Produkt[c]	0.010	1

3.2 Thermische Trennverfahren in der Biokatalyse

Sollen Synthesen vom Labormaßstab in einen größeren industriellen Maßstab überführt werden, ist eine Fülle von Prozessschritten zu beachten. Um diese beschreiben zu können, werden sie in Grundoperationen («unit operations») mit nur einem physikalischen Vorgang (Mischen, Verdampfen, etc.) zerteilt, wobei hier wiederum eine Einteilung in mechanische und thermische Grundoperationen vorgenommen werden kann. Folgeschritte, die häufig nach einer Reaktion notwendig sind, können als thermische Trennverfahren zusammengefasst werden, weil sie häufig unter Einsatz thermischer Energie arbeiten. Nach Sattler können u.a. folgende Thermische Trennverfahren unterschieden werden: (i) Rektifikation (Destillation), (ii) Extraktion, (iii) Absorption, (iv) Adsorption, (v) Kristallisation, (vi) Sublimation und (vii) Trocknung.[34] Je nach Definition können auch (viii) Membranverfahren zu den thermischen Trennverfahren gezählt werden.

Um biokatalytische Reaktionen zu verbessern, können die oben aufgeführten Grundoperationen verwendet und integriert (zusammengefasst) werden. Wird z. B. die Grundoperation (ii) Extraktion betrachtet, finden sich in der gängigen Literatur u.a. Beispiele für die Verwendung von organischen Lösungsmitteln (OLM) in der Biokatalyse als Substratdepot in einem Zweiphasensystem (wässrige Pufferphase/OLM).[35] Auch Ionische Flüssigkeiten als ein Ersatz für OLM wurden ausgiebig für die Biokatalyse untersucht[36] und 2003 um das Themenfeld der „Deep Eutetic Solvents" (DESs) erweitert.[37] Ionische Flüssigkeiten (ILs) selbst zeichnen sich durch eine Reihe interessanter Eigenschaften aus (u.a. thermische Stabilität, schwere Entflammbarkeit, sehr niedrige und kaum messbare Dampfdrücke, sehr gutes Lösungsvermögen für zahlreiche Substanzen) und sind als Salze mit einem Schmelzpunkt unter 100 °C definiert.[36,38]

In Bezug auf Extraktion und deren Integration in Zweiphasensysteme ist es wichtig, die Lipophilie bzw. die Hydrophilie einer Substanz abschätzen zu können. Ein zentrales Konzept in diesem Themenbereich ist der *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, auch „log *P*-Konzept".[39] Er gibt das Verhältnis der Konzentrationen einer Chemikalie in einem Zweiphasensystem aus *n*-Octanol und Wasser an und ist in der Regel als dekadischer Logarithmus definiert (Gleichung (1.5), vergleiche auch Kapitel 5 und **Publikation III**). Werden enzymatische Reaktionen nicht in gepufferten wässrigen Systemen, sondern (teilweise) in „nicht konventionellen Lösungsmitteln" wie organischen Lösungsmitteln oder ILs durchgeführt, spielt auch die Wasseraktivität (a_w-Wert oder «activity of water») in Bezug auf den Biokatalysator eine entscheidende Rolle.[40] Diese beschreibt die relative Gleichgewichtsfeuchte des zu betrachtenden Systems und ist ein Maß für das verfügbare Wasser, welches das Enzym maximal nutzen kann. Die bloße Angabe des Wassergehalts ist daher nicht zwangsläufig auch an die Enzymaktivität gekoppelt (vgl. Gleichung (1.8)).[41]

Weitere integrierte Verfahren verbinden biokatalytische Reaktionen mit gleichzeitig stattfindender Adsorption oder Kristallisation.[25,42–44] Da diese Grundoperationen unmittelbar am Ort der Reaktion stattfinden, werden diese auch als *in situ* Kristallisationen oder Adsorptionen (ISPC, ISPA) bezeichnet. In der Literatur findet der Begriff «*in situ* product recovery» (ISPR) für diese Verfahren Anwendung (siehe auch **Publikation IV**). Alternativ finden sich in der gängigen Literatur aber auch die Begriffe der „Reaktivadsorption", der „Reaktivdestillation" oder der „Reaktivkristallisation".

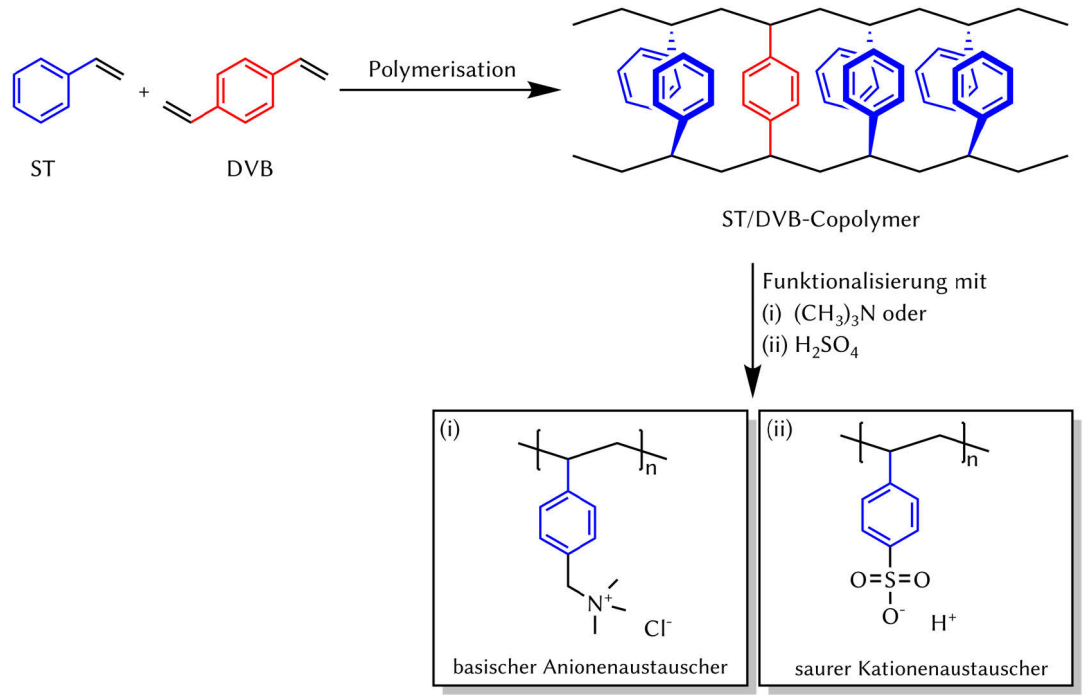
Die in Kapitel 3.1 aufgeführten Punkte machen deutlich, dass noch ein erheblicher Forschungsbedarf für die Entwicklung effizienterer Prozesse nötig ist. Diese Arbeit geht diese Probleme unter der Verwendung der Grundoperationen Adsorption (zusammen mit Ionenaustausch, Fallstudie I in Kapitel 4) und Extraktion (Fallstudie II in Kapitel 5) an und zeigt somit Möglichkeiten der Verbesserung von biokatalytischen Prozessen auf.

Nach Phillips *et al.* sind bei der Anwendung von Festphasenadsorption während Fermentationen zu beachten, (i) welches Harz zu verwenden ist, (ii) wie viel Harz hinzuzufügen ist und (iii) wann es hinzuzufügen ist.[45] Zwar fokussiert sich der genannte Übersichtsartikel auf ISPA von nicht-ionischen Adsorberharzen während Fermentationsprozessen, doch diese Punkte lassen sich genauso auf Aufarbeitungsproblematiken nach Beendigung der eigentlichen biokatalytischen Reaktion ausweiten.[46] Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über kommerziell erhältliche nicht-ionische Adsorberharze. Allgemein wichtige Einflussgrößen sind die Partikelgröße, Oberfläche und Porengröße der Materialien.

Tabelle 3.3. Zusammenfassung der Eigenschaften einiger ausgewählter Adsorptionsharze, die derzeit vermarktet werden, aus nichtionischen Polymeren bestehen und auch für *in situ* Anwendungen geeignet sind. PMMA (Polymethylmethacrylat), PS (Polystyrol), DVB (*p*-Divinylbenzol). [a]Mitsubischi, [b]Dow. Tabelle modifiziert und gekürzt nach Phillips *et al.*[45]

Handelsname	Hersteller	Matrix	Partikelgröße	Oberfläche/$m^2 \cdot g^{-1}$	Porengröße/Å
HP20	Diaion[a]	PS-DVB	300–1180	590	290
HP2MG	Diaion[a]	PMMA	300–1180	570	240
Lewatit VP OC 1064	Lanxess	PS-DVB	440–540	800	50–100
Optipore L493	Dow Chemical	PS-DVB	300–840	≥1100	46
FPX66	Dow Chemical	arom. Polymer	600–750	≥700	n.d.
XAD7 HP	Rohm Haas[b]	aliphat. Acryl	560–710	≥500	450
XAD4	Rohm Haas[b]	PS-DVB	490–690	≥750	100
XAD1180 N	Rohm Haas[b]	PS-DVB	350–600	≥500	400

Mit großer Mehrheit bestehen kommerziell erhältliche ionische- und nicht-ionische Adsorberharze aus einer Polystyrol/*p*-Divinylbenzol Matrix, die je nach Einsatzzweck zu einem basischen Kationenaustaucher oder zu einem sauren Anionenaustauscher funktionalisiert werden kann (Schema 3.1).



Schema 3.1. Allgemeine Darstellung der Struktur von Ionenaustauscherharzen mit einer Polystyrol (blau)/*p*-Divinylbenzol (rot)-Matrix, funktionalisiert mit (i) Trimethylbenzylammoniumgruppen (=basischer Kationenaustauscher) oder (ii) Sulfonsäuregruppen (=saurer Kationenaustauscher).

Ein anderes Konzept, biokatalytische Systeme zu verbessern, liegt in der Anwendung der integrierten Extraktion. Eine Extraktion bezeichnet dabei jedes Trennverfahren, bei dem mit Hilfe eines Extraktionsmittels eine (oder mehrere) Komponente(n) aus einem Stoffgemisch herausgelöst wird (werden). Klassischerweise werden Extraktionen im organisch-synthetischen Betrieb als Flüssig-

Flüssig-Extraktion («liquid-liquid extraction», LLE) ausgeführt, wobei als Lösungsmittel je eine hydrophile Phase (meistens Wasser) und ein hydrophobes organisches Lösungsmittel genutzt werden.

Das Gleichgewicht zwischen zwei flüssigen, schlecht miteinander mischbaren Lösungsmitteln kann physikalisch-chemisch mit Hilfe von Phasendiagrammen beschrieben werden. Dabei teilt die Binodale (Koexistenzkurve) das Phasendiagramm in einen homogenen und einen heterogenen Bereich auf. Im biphasischen Bereich des Phasendiagramms besitzt ein Stoffgemisch keinen stabilen Phasenzustand (Mischungslücke) und das Gemisch zerfällt in zwei konkrete Phasen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Durch die Änderung der Temperatur kann dieses Gleichgewicht verschoben werden und es kommt zu einer veränderten Position der Binodalen im Phasendiagramm. Zu den häufigsten Typen von Mischungslücken zählen dabei Systeme mit oberer kritischer Entmischungstemperatur und Systeme mit unterer kritischer Entmischungstemperatur (Abbildung 3.1).[47] Seltener finden sich aber auch Systeme mit geschlossener Mischungslücke, mit oberer und unterer kritischer Entmischungstemperatur oder ohne kritische Entmischungspunkte.[47]

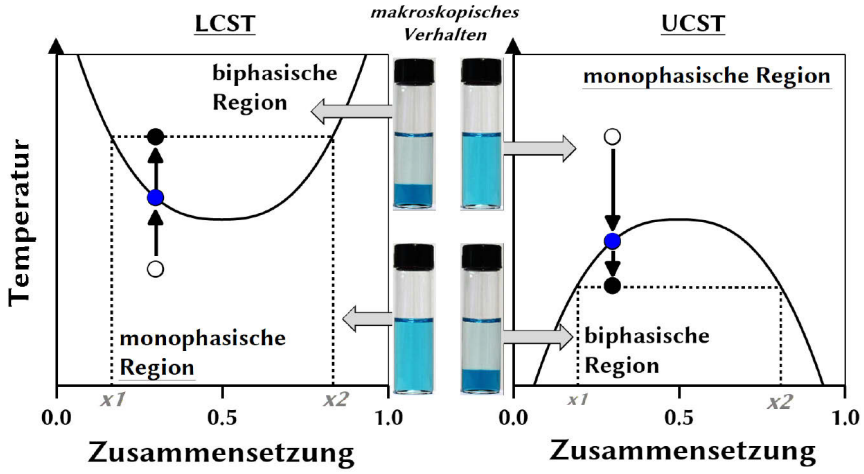


Abbildung 3.1. Darstellung des binären Phasenverhaltens von teilmischbaren Lösungsmitteln mit einer unteren kritischen Lösungstemperatur («lower critical solution temperature» LCST, links) und einer oberen kritischen Lösungstemperatur («upper critical solution temperature» UCST, rechts).

Mit diesem Konzept können klassische Extraktionssysteme beschrieben werden, die aus einer wässrigen und einer organischen Phase bestehen, z. B. Wasser und Diethylether. Darüber hinaus können auch wässrige Zweiphasensysteme («aqueous biphasic systems», ABS; oder analog «aqueous two phase systems», ATPS) beschrieben werden. Diese bestehen aus zwei schlecht miteinander mischbaren wasserreichen Phasen, die auf Polymer-Polymer-, Polymer-Salz- oder Salz-Salz-Kombinationen basieren. Im Jahr 2003 beschrieben Gutowski *et al.* erstmals auch den Einsatz wassermischbarer ILs und anorganischer Salze für die gezielte Induktion von Mischungslücken.[48]

Durch eine gezielte Erhöhung und Erniedrigung der Temperatur kann die Reversibilität solcher Systeme ausgenutzt werden. Diese sogenannten thermomorphen Lösemittel (TMS)-Systeme haben in der wissenschaftlichen Literatur für verschiedene Zwecke erhebliche Aufmerksamkeit erlangt.[49] Im Allgemeinen können TMS-Systeme als vereinfachtes binäres oder ternäres System dargestellt werden, das eine temperaturabhängige Phasenänderung aufweist. Die Temperaturänderung wird genutzt, um einen makroskopischen Phasenübergang von einphasig zu mehrphasig oder

umgekehrt zu bewirken, basierend auf der Position der Binodalen im jeweiligen Phasendiagramm.[50] Für die Arbeiten in **Publikation III** wurden IL-TMS-Systeme mit einem UCST-Verhalten untersucht (Abbildung 3.2).

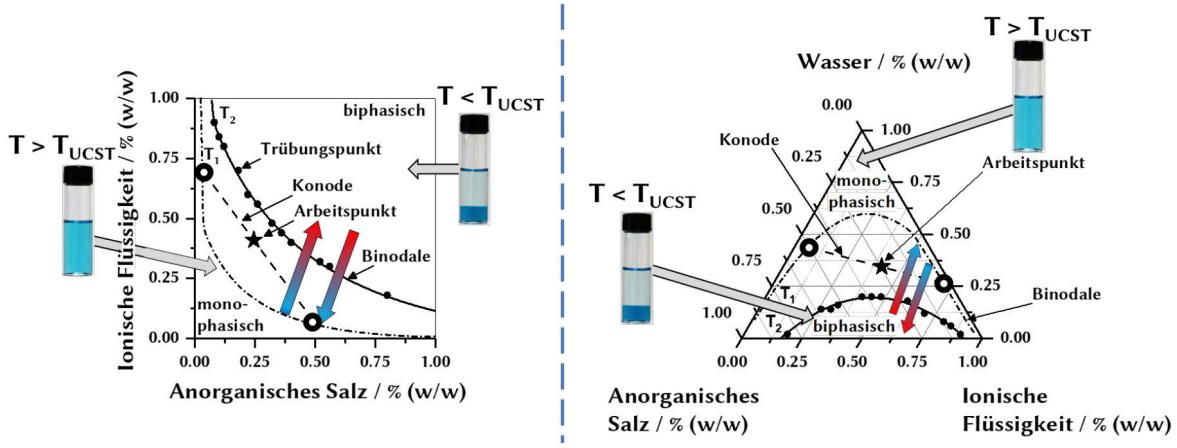


Abbildung 3.2. Darstellung eines hypothetischen Phasenverhaltens im orthogonalen Phasendiagramm (links) und im trigonalen Gibbs-Diagramm (rechts) bestehend aus IL, anorganischem Salz und Wasser bei verschiedenen Temperaturen. Bei T < Tucst tritt eine Phasentrennung auf. Die Diagramme sind gleichwertig und unterscheiden sich nur in der Art ihrer Darstellung.

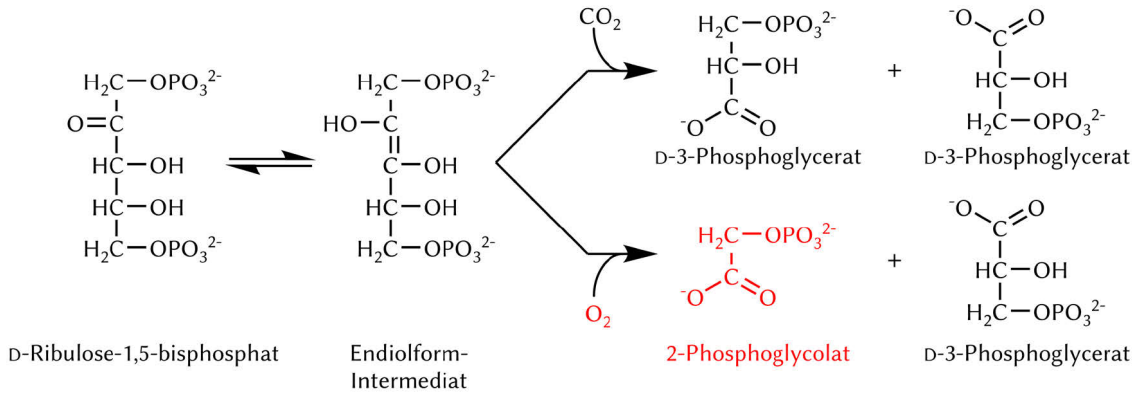
Die folgenden Kapitel vier und fünf legen die theoretischen Hintergründe der Forschungsarbeiten der **Publikationen I** bis **III** dar, fassen diese kurz zusammen und zeigen auch die jeweilige Motivation und den jeweiligen Stand der Technik auf. **Publikation I** und **II** beschäftigen sich dabei mit dem Themengebiet der integrierten Adsorptionsharz-basierten Aufarbeitung am Beispiel einer Decarboxylase (**Publikation I**) und einer Imin Reduktase (**Publikation II**). Der Einsatz von Ionenaustauschern und Adsorbern zur intelligenten Aufarbeitung in biokatalytischen Reaktionen ist in der einschlägigen wissenschaftlichen Literatur unterrepräsentiert und es konnte gezeigt werden, dass damit das DSP von Reaktionen der oben angesprochenen Enzymklassen signifikant verbessert werden konnte. Bei **Publikation IV** handelt es sich um einen Übersichtsartikel, der sich hauptsächlich mit der Anwendung von *in situ* Produktkristallisation (ISPC) in biokatalytischen Prozessen beschäftigt. Es werden aber auch Gemeinsamkeiten zwischen ISPC und *in situ* Produktadsorption (ISPA) besprochen, weshalb dieser Übersichtsartikel in das Wissenschaftsgebiet der Adsorptionsharz-basierten Aufarbeitung eingeordnet werden kann.

Publikation III beschreibt den Themenkomplex der integrierten Anwendung eines auf Ionischen Flüssigkeiten basierenden thermomorphen Lösungsmittelsystems, in welchem eine kinetische Racematspaltung durchgeführt wird. Als Biokatalysator wurde die Lipase CalB gewählt, da diese eine außerordentliche Robustheit gegen hohe Temperaturen und verschiedene organische Lösungsmittel besitzt. Untersucht wurden verschiedene Kombinationen von organischen Salzen, Ionischen Flüssigkeiten und Wasser in Bezug auf das Phasenverhalten. Es konnte gezeigt werden, dass bei höheren Temperaturen die biokatalytische Reaktion im 1-PS abläuft und bei niedrigen Temperaturen eine Separierung von Enzym und Produkt erfolgen kann. **Publikation V** ist ein Übersichtsartikel, der sich mit neuen Entwicklungen in der Biokatalyse in Ionischen Flüssigkeiten beschäftigt und daher in diesen Themenblock eingeordnet werden kann.

4 Fallstudie I: Adsorptionsharz-basierte Aufarbeitung

4.1 Decarboxylase-katalysierte Reaktionen

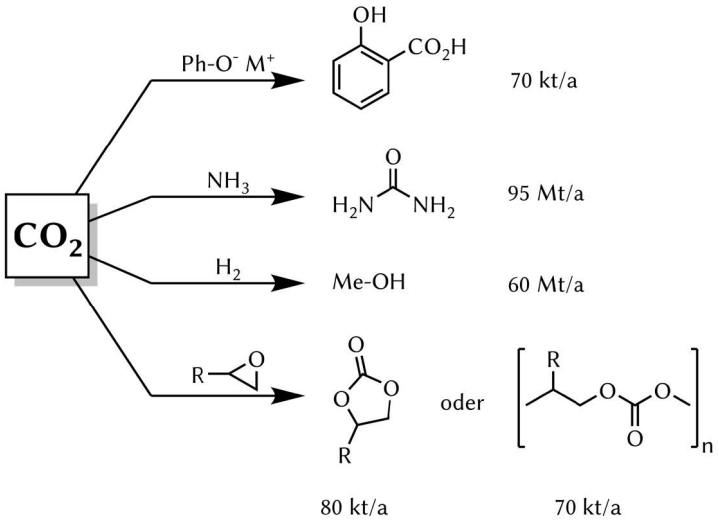
Decarboxylasen gehören zu der Enzymklasse der Lyasen [EC 4] und bilden eine eigene Untereinheit, die unter [EC 4.1.1] (Carboxy Lyasen) kategorisiert werden. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Untergruppe gehören etwa die Pyruvat Decarboxylase [EC 4.1.1.1] (PDC, Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetaldehyd und Kohlendioxid),[51] oder die Benzoylformiatdecarboxylase [EC 4.1.1.7] (BFD, Decarboxylierung von Benzoylformiat zu Benzaldehyd).[52] Als Kofaktoren werden in beiden Fällen Thiaminpyrophosphat und Mg^{2+} benötigt. Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase [EC 4.1.1.39] (RuBisCO, Kofaktor: Mg^{2+}) gilt als das am häufigsten vorkommende Enzym auf der Erde.[53] Das Enzym ist an der Kohlenstoff-Fixierung beteiligt, bei dem das atmosphärische Kohlendioxid von Pflanzen und anderen photosynthetischen Organismen in energiereiche Moleküle wie Glucose umgewandelt wird (Schema 4.1).[3]



Schema 4.1. Der CALVIN-BENSON-BASSHAM-Zyklus beschreibt die Kohlenstoffdioxid-Fixierung in photosynthetisch aktiven Pflanzen und Bakterien. Die dargestellte Carboxylierung ist die erste Phase im Zyklus. D-Ribulose-1,5-bisphosphat wird zu zwei Molekülen D-3-Phosphoglycerat durch Kondensation von CO_2 umgesetzt. In Konkurrenz dazu kann auch O_2 fixiert werden und es fällt stattdessen 2-Phosphoglycolat an.[54]

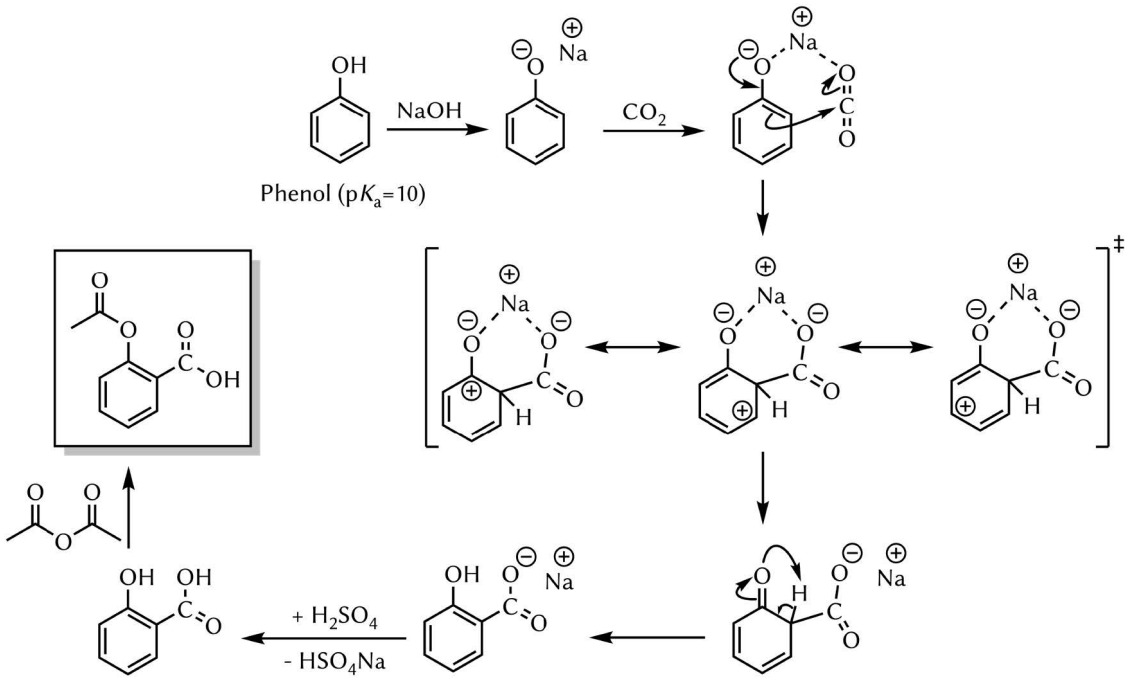
Weltweit werden jährlich schätzungsweise 120 Gigatonnen Kohlenstoff aus CO_2 von Landpflanzen fixiert. Dies entspricht etwa ein Sechstel des gesamten atmosphärischen CO_2 und ca. dem 17- bis 20-fachen der jährlich durch anthropogene Aktivitäten in die Atmosphäre freigesetzten CO_2-Menge.[55] Zwar scheint das Enzym mit einer Wechselzahl (TOF) von 17 s^{-1} (in der lebenden Zelle: 3 s^{-1}) und der verlustreichen Nebenreaktion nicht in seinem Optimum zu arbeiten, jedoch gelang trotz intensiver Forschung keine Ertragssteigerung des Enzyms.[56]

Das Vorbild aus der Natur, CO_2 in Carboxylierungsreaktionen als C_1-Baustein für die Synthese wertschöpfender Substanzen einzusetzen, hat zur Entwicklung – wenn auch in überschaubarer Anzahl – wichtiger industrieller Prozesse geführt (Schema 4.2). Auch wenn das Konzept der Nutzbarmachung wichtiger Großchemikalien durch die Fixierung von CO_2 als ein wichtiger Schritt zur Abmilderung des Klimawandels sinnvoll erscheint, ist dessen Beitrag nur marginal (≤1% bei ca. 200 $Mt \cdot a^{-1}$), verglichen mit der massiven Freisetzung von CO_2 durch Verbrennung zur Erzeugung von Energie (ca. 34 $Gt \cdot a^{-1}$).[57] Dementsprechend ist die CO_2-Fixierung durch Carboxylierungsreaktionen in der Synthese organischer Verbindungen für die Bilanz des Kohlenstoffkreislaufs irrelevant.[58]



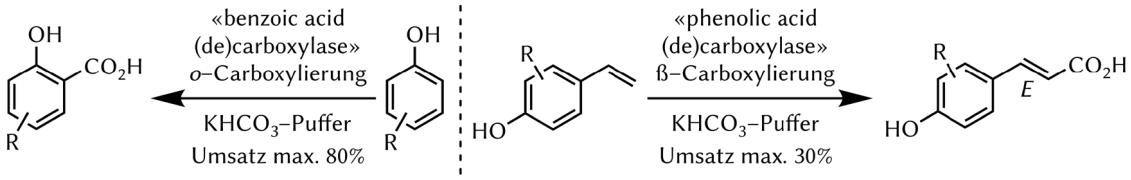
Schema 4.2. Industrielle Prozesse, die CO_2 als C_1-Quelle nutzen. Von oben nach unten: Herstellung von Salicylsäure (ca. 70 kt·a^{-1}), Harnstoff (ca. 95 Mt·a^{-1}), Methanol (ca. 60 Mt·a^{-1}) und organischen (Poly)carbonaten (ca. 150 kt·a^{-1}). Modifiziert nach Gluеck *et al.* 2010.[54]

Hervorzuheben sei die Synthese von Hydroxybenzoesäuren, welche Ende des 19. Jahrhunderts von Kolbe und Schmitt im industriellen Maßstab eingeführt wurde.[59] Der Kolbe-Schmitt-Prozess (Schema 4.3) ermöglicht den Zugang zu wichtigen aromatischen Carbonsäuren wie Pharmazeutika,[60,61,62] Agrochemikalien und weiteren Vorstufen für die organische Synthese.[63] Die Nachteile an dem Verfahren sind eine häufig unbefriedigende Regioselektivität und die benötigten, harschen Reaktionsbedingungen wie hohe Temperaturen und Drücke (120-300 °C, 20-100 atm).



Schema 4.3. Kolbe-Schmitt-Prozess am Beispiel der Synthese von Salicylsäure ausgehend von Phenol. Nach einer Acetylierung mit Acetanhydrid wird Acetylsalicylsäure erhalten und unter dem Handelsnamen Aspirin® von der Bayer AG vermarktet.

Im Jahr 2012 veröffentlichte Prof. Kurt Faber erstmals die systematische Untersuchung der biokatalytischen Carboxylierung von aromatischen, phenolischen Verbindungen.[64] Es wurden «*otho*-benzoic acid (de)carboxylases» (*o*-BDCs) vorgestellt, die selektiv *o*-Hydroxybenzoesäurederivate aus Phenolen bilden und «phenolic acid (de)carboxylases» (PADs), die selektiv am β-Kohlenstoffatom der Styrolgruppe von *para*-Hydroxystyrol-Derivaten wirken und (*E*)-4-Hydroxyzimtsäuren bilden (Schema 4.4).

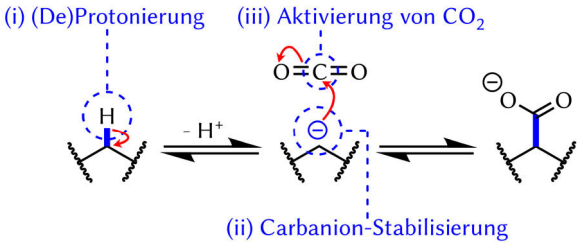


Schema 4.4. Enzymatische Carboxylierung von Phenol- und *para*-Hydroxystyrol-Derivaten. Modifiziert nach Wuensch *et al.* 2012.[64]

2014 wurde das Konzept der regioselektiven *ortho*-Carboxylierung von Phenolen von derselben Arbeitsgruppe erweitert und als biokatalytisches Äquivalent zur Kolbe-Schmitt-Reaktion vorgestellt. Demnach werden enzymatische Carboxylierungen von elektronenreichen (Hetero)aromaten in vier große Kategorien eingeteilt:[65]

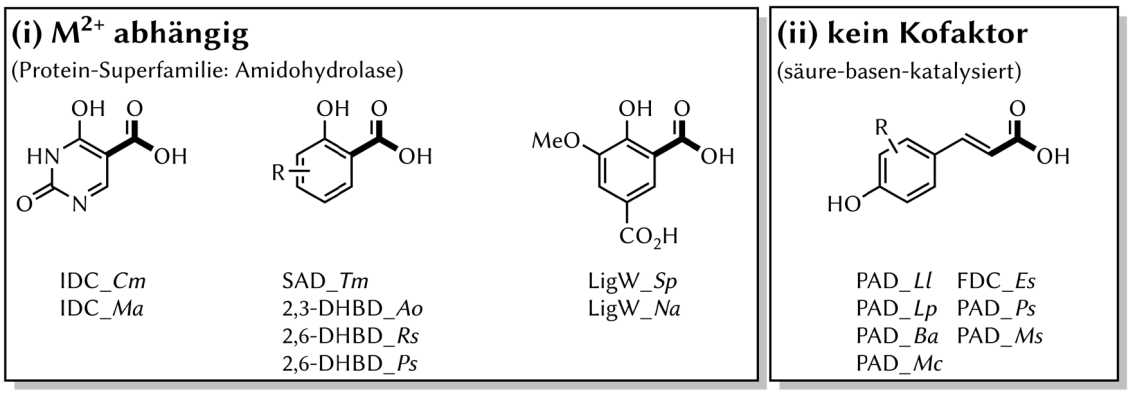
1. Decarboxylasen, darunter «salicylic acid decarboxylase» (SAD),[60] «2,3-[66] und 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase» (2,3/2,6-DHBD, auch als «γ-resorcylate decarboxylase» bezeichnet),[67–69] die die regioselektive *ortho*-Carboxylierung von Phenolen zur richtungsweisenden Phenolgruppe katalysieren;
2. Carboxylasen, darunter «4-hydroxybenzoate decarboxylase»[70] und «3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase»,[71] die die regioselektive *para*-Carboxylierung von Phenolen zur richtungsweisenden Phenolgruppe katalysieren. Die «phenyl phosphate carboxylases» gehören ebenfalls zu dieser Kategorie, diese benötigen jedoch eine ATP-verbrauchende Aktivierung des Phenols durch Phosphorylierung vor der Carboxylierung;[72]
3. Enzyme, die die Carboxylierung von *para*-Hydroxystyrolen am β-Kohlenstoff der Styrol-Seitenkette katalysieren und (*E*)-4-Hydroxyzimtsäuren darstellen;[64]
4. Enzyme, die die Carboxylierung von elektronenreichen Heteroaromaten, wie Pyrrol und Indol katalysieren. Pyrrol wird dabei in α-Position von der «pyrrole-2-carboxylate carboxylase»,[73] Indol in β-Position von der «indole-3-carboxylate carboxylase»[74] carboxyliert.

Alle oben genannten Enzyme benötigen keine Coenzyme, keine Aktivierung der Substrate durch Phosphorylierung (außer «phenylphosphate carboxylase» aus fakultativen Anaerobiern) und verwenden HCO_3^- als CO_2-Quelle.[75] Die Reaktionen selber können als Ganzzell-Biotransformationen oder mit isolierten Enzymen durchgeführt werden. Die Reaktionen benötigen – im Gegensatz zur oben erwähnten Kolbe-Schmitt-Reaktion – nur milde Bedingungen und laufen bei 30 °C und unter Atmosphärendruck durch die Verwendung von Bicarbonat als CO_2-Quelle im wässrigen gepufferten System ab. Die allgemeine Frage, ob CO_2 oder Bicarbonat (HCO_3^-) als Co-Substrat bei der enzymatischen Carboxylierung dient, wird noch diskutiert und kann hier nicht abschließend beantwortet werden.[76] Es sind im Allgemeinen drei Schritte nötig, um die Carboxylierung einer C-H-Bindung zu ermöglichen (Schema 4.5).



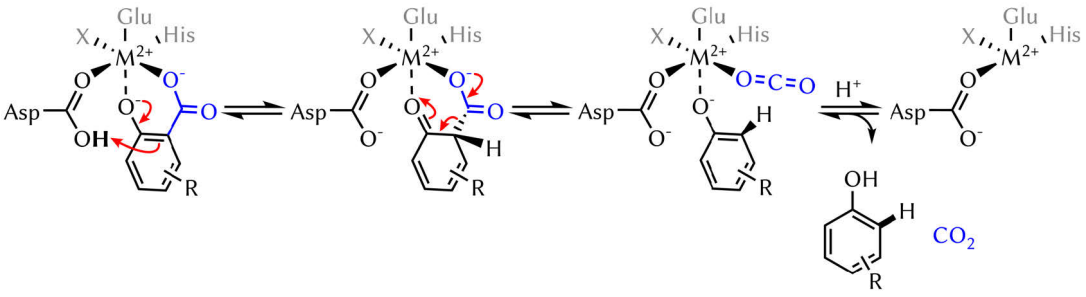
Schema 4.5. Generelle Darstellung der Carboxylierung einer C–H-Bindung. (i) Die Abstraktion eines Protons (üblicherweise mit einem pK_a-Wert von 15-18) erzeugt ein intermediäres Carbanion, (ii) die Stabilisierung der negativen Ladung erfolgt durch Delokalisierung innerhalb der Substratstruktur (meist als metallion-chelatiertes Enolat) oder durch ein Kofaktor-Konjugat und (iii) Aktivierung von CO_2 und nukleophiler Angriff des Carbanions. Adaptiert nach Payer *et al.* 2019.[58,77]

Basierend auf dem jeweiligen Mechanismus können drei große Gruppen von (De)Carboxylasen für die biokatalytische (De)Carboxylierung von (Hetero)Aromaten und α,β-ungesättigten (Acrly)Säuren definiert werden: (i) Zweiwertige metallabhängige (De)Carboxylasen der Amidohydrolase Protein-Superfamilie, (ii) kofaktor- und metallunabhängige Phenolsäuren Decarboxylasen und (iii) prenylierte FMN-abhängige (prFMN) Decarboxylasen aus der UbiD Protein-Superfamilie (Schema 4.6).



Schema 4.6. Übersicht von zwei der insgesamt drei relevanten Aren-(De)Carboxylasen. Gruppe drei (prFMN abhängige Decarboxylasen aus der UbiD Protein-Superfamilie) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgelassen und ist anderweitig zu finden.[58]

Für den Mechanismus von enzymatischen *ortho*-(de)Carboxylierungsreaktionen wird eine umgekehrt ablaufende elektrophile aromatische Substitution der Phenolderivate vorgeschlagen. Dies weist eine starke Ähnlichkeit zur Kolbe-Schmitt-Reaktion auf. Durch das Metallion (vorwiegend Mangan oder Zink) erfolgt eine Chelatisierung und damit Stabilisierung der Carboxylat- und Phenolatgruppe des Arensubstrates, einhergehend mit einer Stabilisierung der negativen Ladung. Durch diese Koordination kann nun das nukleophile Phenolat an dessen Carboxylat-*ipso*-Kohlenstoff durch eine nahegelegene Aminosäure (z. B. Asp = Asparaginsäure) protoniert werden. Eine Entaromatisierung des Arens ist die Folge, die aber durch die Abspaltung von Kohlendioxid wiederhergestellt werden kann und zusammen mit dem decarboxylierten Phenol aus dem Metallzentrum dissoziiert (Schema 4.7).[78]



Schema 4.7. Allgemeiner Mechanismus für die *ortho*-(De)Carboxylierung metallabhängiger (De)Carboxylasen aus der Amidohydrolase Protein-Superfamilie. X = Aminosäure, M^{2+} = Metall = Zn^{2+}, Mn^{2+}. Adaptiert nach Payer *et al.* 2019.[58]

In der Zeit seit 2012 konnte eine breite Substrattoleranz der *o*-BDCs bei der regioselektiven *ortho*- und *para*-Carboxylierung vor allem von 2,3-DHBD aus *Aspergillus* und *Fusarium*, SAD aus *Trichosporon moniliiforme* und 2,6-DHBD/«γ-resorcylate decarboxylase» aus *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pandoraea*, *Rhodococcus* und *Polaromonas* gefunden werden (vgl. Abbildung 4.1).[60,61,67,69,79,80]

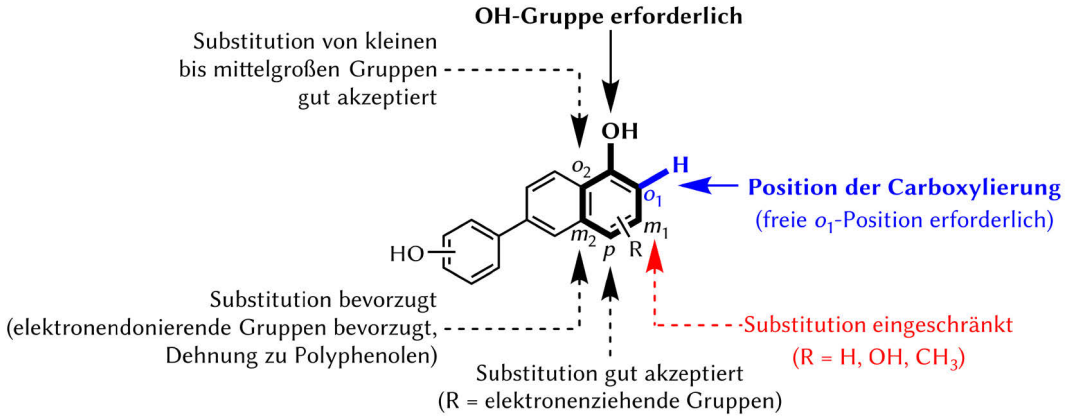
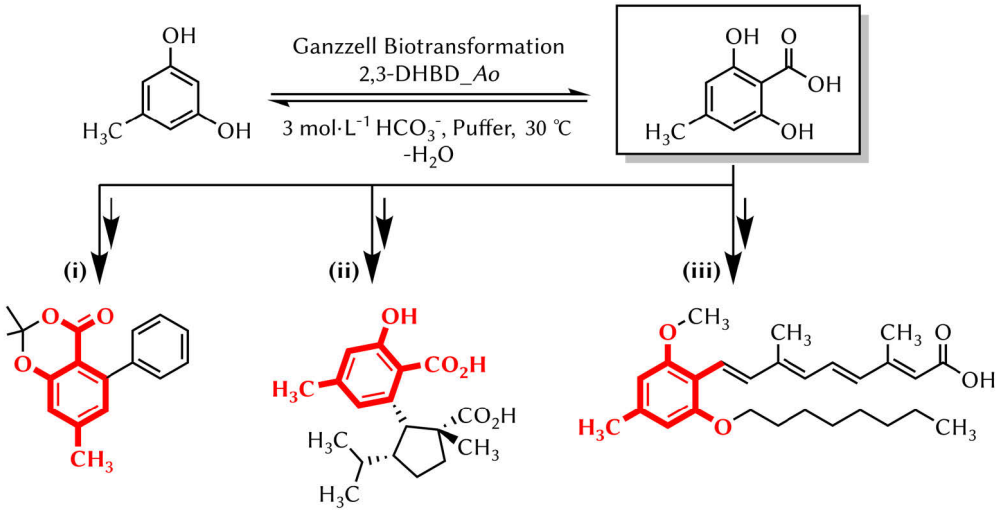


Abbildung 4.1. Substrattoleranz der metallabhängigen *o*-BDCs und LigWs für die reversible (De)Carboxylierung von phenolischen Derivaten. Adaptiert nach Payer *et al.* 2019.[58]

Das Reaktionsgleichgewicht der biokatalytischen (De)Carboxylierung ist stark auf die Seite der Phenolverbindungen verschoben.[81] Strategien, das Gleichgewicht nach dem Prinzip vom kleinsten Zwang (Prinzip von Le Chatelier) auf die Seite der Carboxylierungsprodukte zu verschieben, umfassen u.a. einen Überschuss von Bicarbonat/CO_2 und/oder die Entwicklung einer *in situ* Produktkristallisation.[82] Neuere Studien berichten über eine durch Amine vermittelte Umwandlung von CO_2 in Bicarbonat, einhergehend mit einer Verdoppelung des Umsatzes und einer Verfünffachung der Reaktionsrate der Carboxylierung von Katechol.[83]

Trotz der beeindruckenden Untersuchungen der letzten Jahre und der daraus resultierenden wichtigen Erkenntnisse über *o*-BDCs sind nur wenige Beispiele von synthetischen, hochskalierten Reaktionen beschrieben worden (max. 100-mg-Maßstab). Den wenigen Beispielen ist jedoch gemein, dass eine vollständige Vernichtung des überschüssigen Bicarbonats durch Säureaddition und eine anschließende Säulenchromatographie erforderlich ist.[80] Die Lücke eines geeigneten, exemplarischen Aufarbeitungsverfahrens von (De)Carboxylase-katalysierten Reaktionen konnte 2018 mit **Publikation I** geschlossen werden. Hier wurden verschiedene Ionenaustauscher- und Adsorberharze auf eine selektive Produktisolation aus dem Reaktionsgemisch untersucht, ohne dabei

den Überschuss an Bicarbonat zu vernichten. Als Testreaktionssystem für diese Methode wurde die enzymatische Carboxylierung von 3,5-Dihydroxytoluol (Orcinol) zu 2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure (DHMBA) gewählt (Schema 4.8).



Schema 4.8. Enzymatische Carboxylierung von 3,5-Dihydroxytoluol (Orcinol) zu 2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure (DHMBA) als gewähltes Testreaktionssystem. DHMBA ist ein wertvoller Präkursor für die Synthese von (i) Herbizid-Präkursoren,[84] (ii) Debromohamigeran E[85] und (iii) weiteren Antirheumatika und Immunsuppressiva.[86]

Erste Schritte bei der Entwicklung eines Ionenaustauscher- und Adsorberharz-basierten Aufarbeitungsverfahrens fokussierten eine Optimierung des biokatalytischen Prozesses. Der Gleichgewichtsumsatz ist direkt mit dem Überschuss an Bicarbonat gegenüber Orcinol gekoppelt (K_{eq} ist ca. $5 \cdot 10^{-4}$). Es konnte gezeigt werden, dass höhere Substratkonzentrationen bei konstanter Bicarbonatkonzentration von 3 mol·L^{-1} zu geringeren Gleichgewichtsumsätzen führen. Während eine Substratkonzentration von 5 mmol·L^{-1} zu hohen Umsätzen führt (>80 %), führt eine Erhöhung auf 50 mmol·L^{-1} nur zu einem Umsatz von 68 %. Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration resultiert letztendlich in einer vollständigen Inhibierung des katalytischen Reaktionssystems (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1. Reaktionsumsätze verschiedener Orcinolkonzentrationen mit einer $KHCO_3$-Konzentration von 3 mol·L^{-1} und 30 mg·L^{-1} Biokatalysator bei 30 °C.

Orcinol/mmol·L^{-1}	Umsatz/%
5	80
10	80
50	68
100	2

Bei einer Substratkonzentration von 5 mmol·L^{-1} reichen bereits 10 mg des Ganzzellbiokatalysators pro mL Reaktionslösung aus, um maximale Gleichgewichtsumsätze zu erzielen (Abbildung 4.2 i). Eine Verzehnfachung der Substratkonzentrationen auf 50 mmol·L^{-1} benötigt eine höhere Katalysatormenge von 60 mg·mL^{-1} (Abbildung 4.2 ii). Eine Nachdosierung des Substrates (Fed-Batch-Prozess) zu je 10 mmol·L^{-1}pro Stunde führte zu keiner Steigerung der Ausbeute.

Dies zeigt deutlich, dass weitere Verbesserungen (z.B. durch «protein engineering») der katalytischen Robustheit gegenüber höheren Substratbeladungen mit höheren spezifischen Aktivitäten erforderlich sind, um die Wettbewerbsfähigkeit des Gesamtprozesses zu verbessern.

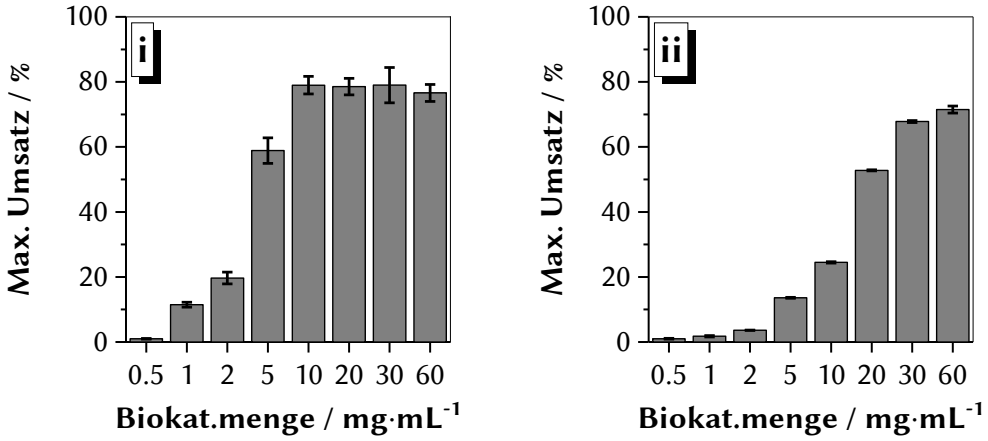


Abbildung 4.2. Benötigte Katalysatorbeladungen der enzymatischen Carboxylierung zum Erreichen des Gleichgewichtsumsatzes bei (i) 5 mmol·L^{-1} und (ii) 50 mmol·L^{-1} Substrat und 3 mol·L^{-1} Bicarbonat; 50 mmol·L^{-1} NaOAc-Puffer, T = 30 °C, U = 180 U·min^{-1}, Reaktionszeit = 24 h, End-pH = 8.5.

Optimierte Reaktionsbedingungen ergeben einen maximalen Umsatz von 60 % bei einer Substratkonzentration von 50 mmol·L^{-1} und 3 mol·L^{-1} $KHCO_3$ bei 30 °C und 60 mg·mL^{-1} Biokatalysator (Abbildung 4.3, hervorgehoben mit einem Stern). Zu beachten sei, dass der gezeigte Reaktions-Zeitverlauf selbst nur einen maximalen Umsatz von 50 % zeigt, da durch die erfolgte Probennahme und dem damit verbundenen Öffnen des Reaktionsgefäßes Verluste an gasförmigem Kohlendioxid aus dem Reaktionsgemisch verursacht werden. Ein Verlust des Bicarbonats ist also durch geschlossene Gefäße zu vermeiden, um den maximalen Umsatz zu erreichen.

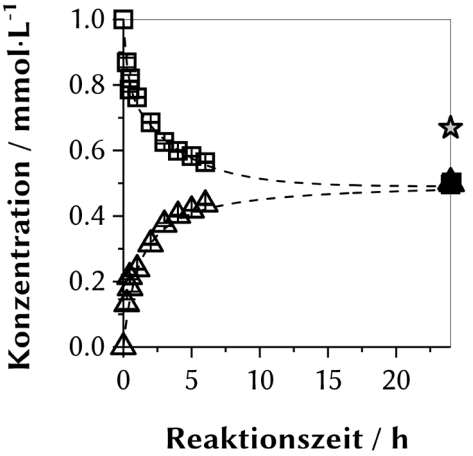


Abbildung 4.3. Zeitverlauf der enzymatischen Carboxylierung unter optimierten Bedingungen (50 mmol·L^{-1} NaOAc-Puffer, 3 mol·L^{-1} $KHCO_3$, 60 mg·mL^{-1} ganze Zellen, T = 30 °C, U = 180 U·min^{-1}, Σt = 24 h, End-pH = 8.5). Faktor der y-Achse durch Konzentrationsverdünnung (1:50) für die Analytik = 50.

Um die schlechte Atomeffizienz des Reaktionssystems zu verbessern, die vor allem durch die Vernichtung des 60-fachen Überschusses an Bicarbonat durch Ansäuerung resultiert, wurde der An-

satz verfolgt, sowohl das Produkt (DHMBA) als auch das restliche Substrat (Orcinol) aus der Reaktionslösung zu entfernen. Daher wurden für diese Studie zehn kommerziell erhältliche Adsorptionsharze gescreent und es konnte gezeigt werden, dass das Anionenaustauscherharz Dowex 1x2 (Cl) selbst bei hohen Bicarbonatkonzentrationen von 3 mol·L^{-1} sehr hohe Affinitäten zum Produkt und Substrat zeigte (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2. Adsorption des Produktes und des Substrates an zehn verschiedene Adsorber (anionische und nicht-ionische Spezies) bei 30 °C und 180 U·min^{-1} nach 30 min aus einer Testlösung (25 mmol·L^{-1} des Produktes und des Substrates in einer 2.5 mol·L^{-1} $KHCO_3$-Lösung). In Klammern ist je das entsprechende Anion angegeben.

⇓ **Adsorptionsharz**	**Adsorption Produkt/%**			**Adsorption Substrat/%**		
Dosis/g·mL^{-1} ⇒	0.02	0.1	0.2	0.02	0.1	0.2
a) Anion-Austauscher Harz						
Dowex 1x2 (Cl)	93	**>99**	**>99**	74	**>99**	**>99**
Diaion PA312 (Cl)	77	99	**>99**	51	96	**>99**
Diaion HPA-25 (Cl)	83	98	**>99**	52	98	**>99**
Diaion SA10A (Cl)	74	99	**>99**	46	96	**>99**
b) Nichtionischer Adsorber						
Dowex Optipore L493	48	97	**>99**	57	98	**>99**
Lewatit VP OC	20	44	61	21	55	72
Diaion HP-2MG	33	90	97	44	93	**>99**
Amberlite XAD-7HP	42	93	98	47	94	**>99**
Amberlite XAD-4	1	7	16	3	19	29
Amberlite XAD-1180N	2	4	13	1	8	14

Im Allgemeinen weisen die Anionenaustauscherharze eine wesentlich höhere Affinität zu Orcinol und DHMBA auf als die nichtionische Adsorbermaterialien. Die Anionenaustauscherharze weisen folgende Affinitäten in abnehmender Reihenfolge auf: Dowex 1x2 (Cl) > Diaion HPA-25 (Cl) > Diaion PA312 (Cl) > Diaion SA10A (Cl). Die höchste Adsorptionsaffinität gegenüber Orcinol und DHMBA wurde für Dowex 1x2 (Cl) gefunden. Es werden nur 0.1 g Adsorber pro 1 mL Reaktionslösung benötigt, um beide Hauptreaktanden vollständig zu entfernen. Daher wurde Dowex 1x2 (Cl) für die anschließende Abtrennung der Reaktanden verwendet. Der Grund für die hohe Adsorptionseffizienz besteht dabei hauptsächlich aus zwei Effekten: (i) Bei einem pH-Wert von 8.4 (verursacht durch 3 mol·L^{-1} $KHCO_3$) ist die Carboxylgruppe von DHMBA vollständig deprotoniert, im Gegensatz dazu liegt der Großteil des Substrates in seiner neutralen Form vor. DHMBA adsorbiert daher stärker über ionische Wechselwirkungen an das Anionenaustauscherharz, (ii) π-π-Wechselwirkungen beider Reaktanden bewirken eine Adsorption an die Polystyrol/*p*-Divinylbenzol-Matrix der Harze.

Die Desorption aus dem beladenen Harz erfolgte durch ein 2 mol·L^{-1} HCl/Aceton-Gemisch (20:80 v/v) in drei Schritten, um eine Rückgewinnungsrate von ≥90 % für beide Reaktanden zu erreichen. Nach der Filtration des ausgelaugten Adsorbers Dowex 1x2 (Cl) und der Destillation von Aceton fällt die freie DHMBA-Säure direkt aus der verbleibenden wässrigen HCl-Lösung aus. Der verbrauchte Adsorber und das verbleibende Orcinol (in Lösung) könnten in einem zweiten Reaktionskreislauf wiederverwendet werden.

Für die Konzeptstudie wurde eine enzymatische Carboxylierung von Orcinol im präparativen Maßstab durchgeführt. Es konnten 0.9 g des Produktes DHMBA mit einer Reinheit von >99 % in kristalliner Form ohne weitere Reinigungsschritte gewonnen werden (Abbildung 4.4).

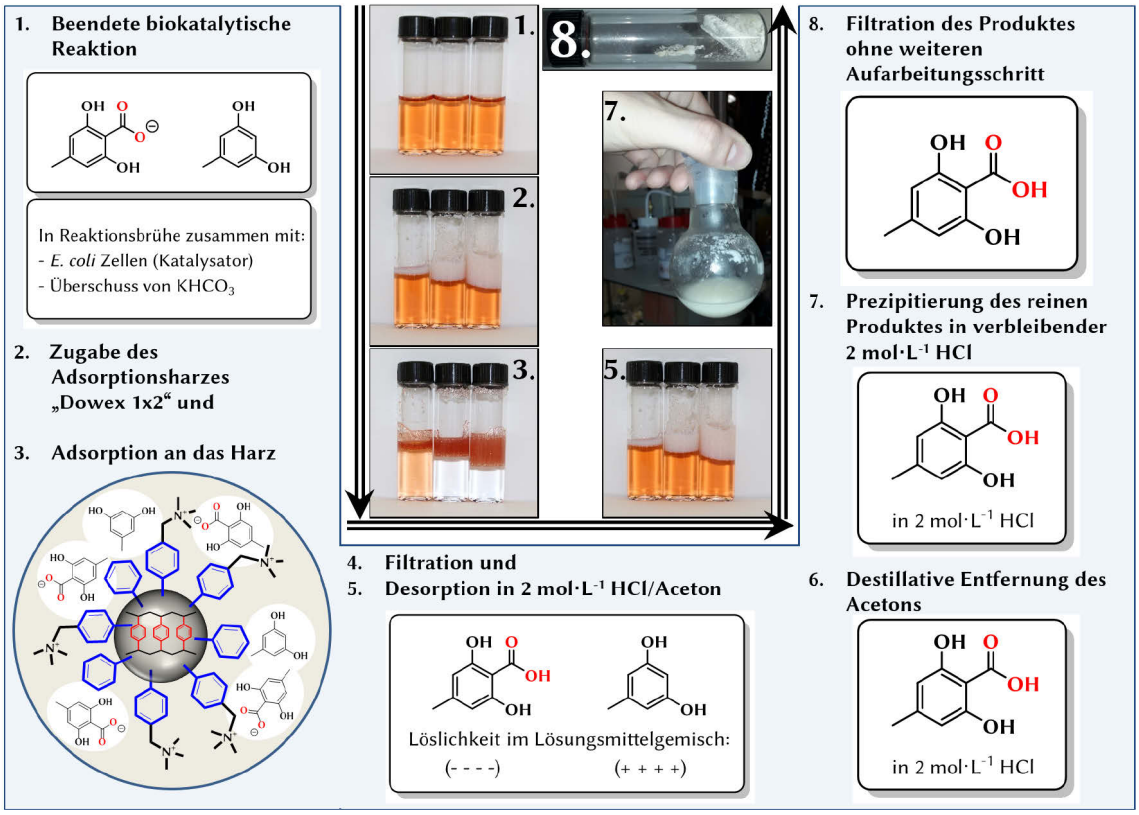
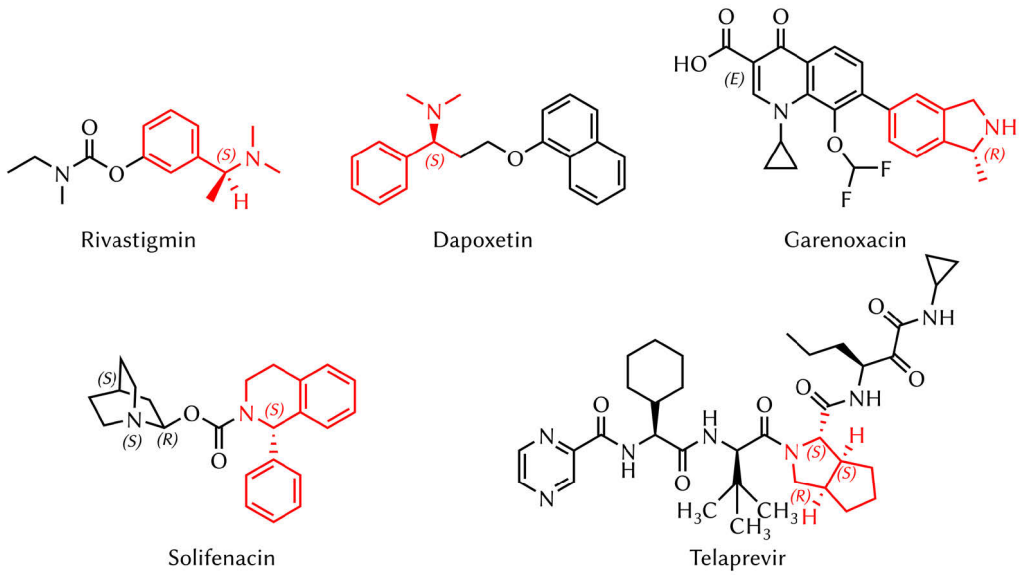


Abbildung 4.4. Schematische Darstellung der Aufarbeitung der enzymatischen Synthese von 2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoesäure (DHMBA) aus Orcinol, die ohne weitere Reinigungsschritte zu einem reinen Produkt führt. Klassische DSP-Konzepte für Carbonsäure aus Fermentationsprozessen beinhalten sonst hauptsächlich den Einsatz von Adsorption,[42,43] Extraktion[87] oder Kristallisation[88], welche wesentlich aufwendiger sind als das oben dargestellte Verfahren.

Mit dieser Konzeptstudie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch die Kombination der Grundoperationen von Adsorption und einfacher Desorption mit anschließender Kristallisation eine erhebliche Verbesserung des Prozesses der enzymatischen Carboxylierungen erreicht werden konnte.

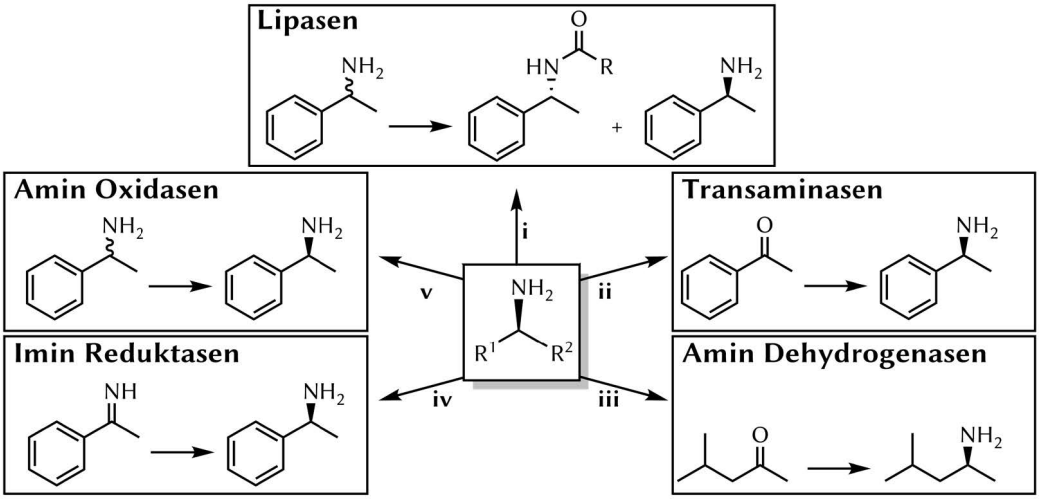
4.2 Imin Reduktase (IRED)-katalysierte Reaktionen

Imin Reduktasen (IREDs) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen [EC 1]. Zu den wichtigsten Kofaktoren der Oxidoreduktasen zählen NAD(P)H und FAD.[1] Eine Reihe von Oxidoreduktasen kann für die Synthese chiraler Aminbausteine genutzt werden, die wertvolle Präkursoren für die Synthese einer großen Auswahl an pharmazeutischen Wirkstoffen («active pharmaceutical ingredients», APIs), Agrochemikalien und Feinchemikalien liefern. Schema 4.9 gibt einen Überblick über aktuelle APIs, die ebendiese Bausteine enthalten und die größtenteils durch Übergangsmetallkatalyse gewonnen werden können.



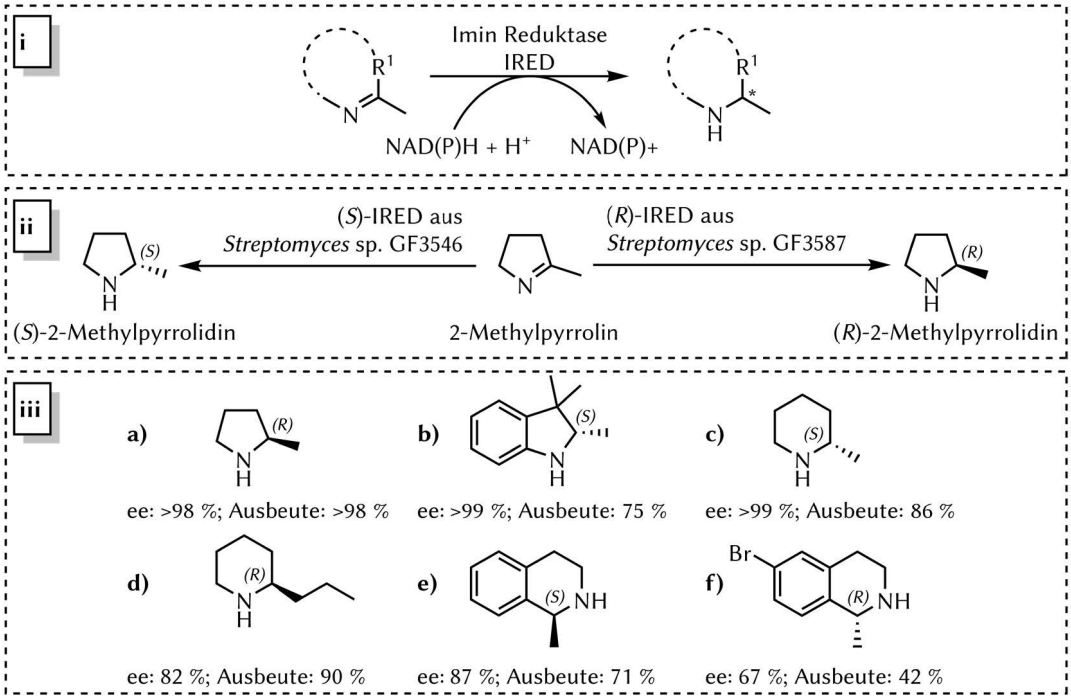
Schema 4.9. Auswahl chiraler Aminbausteine (rot) in Arzneimitteln, die sich derzeit in der Entwicklungsphase oder bereits in der klinischen Studie befinden. Modifiziert nach Turner 2009.[89]

Ein großes Ziel der biokatalytischen Forschungsgemeinschaft besteht (neben vielen weiteren) darin, die Synthese der oben gezeigten Strukturen durch enzymatische Prozesse zu substituieren. In einem ersten Schritt müssen dafür potenzielle Enzyme identifiziert werden, deren Aktivitäten dann gerichtet auf die Zielstrukturen angepasst werden können. Eine Möglichkeit besteht hier in der Anwendung der gerichteten Evolution, bei der mittels einer zufallsbasierten Mutagenese und nachfolgender Selektion Mutanten mit verbesserten Eigenschaften erhalten werden können. Für ihre Leistungen auf diesem Gebiet wurde Frances H. Arnold dafür 2018 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet,[90] was die aktuelle Bedeutsamkeit dieser Teildisziplin unter Beweis stellt. Zu den Enzymklassen, die die enantioselektive Synthese zu Aminen katalysieren, gehören Lipasen, Transaminasen, Amin Dehydrogenasen, Imin Reduktasen und Amin Oxidasen (Schema 4.10).



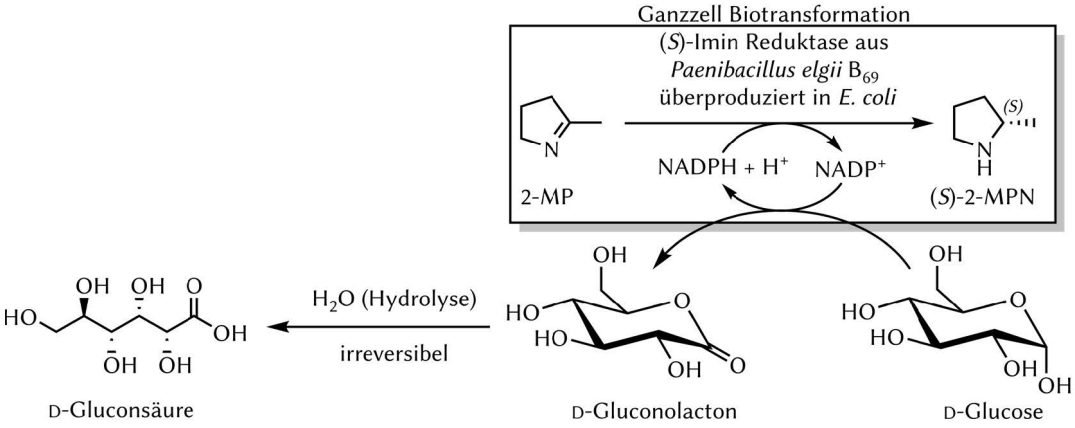
Schema 4.10. Enzymklassen, die die enantioselektive Synthese zu Aminen katalysieren: (i) Lipasen [EC 3.1], (ii) Transaminasen [EC 2.6.1], (iii) Amin Dehydrogenasen [EC 1.4.99.3], (iv) Imin Reduktasen [EC 1.5.1.48] und (v) Amin Oxidasen [EC 1.4.3.4]. Modifiziert nach Ghislieri und Turner 2014.[91]

Imin Reduktasen ermöglichen eine direkte Synthese von enantiomerenreinen sekundären Aminen ausgehend von prochiralen Iminen und verfügen über ein großes Substratspektrum (Schema 4.11 i). 2011 berichteten Mitsukura *et al.* zum ersten Mal über die Aufreinigung und Charakterisierung einer (*R*)-IRED aus *Streptomyces* sp. GF3587, die 2-Methylpyrrolin (2-MP) zu (*R*)-2-Methylpyrrolidin mit einem Enantiomerenüberschuss von 99% reduzieren kann.[92] Zwei Jahre später konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass mit der (*S*)-IRED von *Streptomyces* sp. GF3546 dasselbe Substrat zum entsprechenden *S*-Isomer umgesetzt werden kann (Schema 4.11 ii).[93] Seitdem wurde eine große Substratbreite und Enantioselektivität der IREDs entdeckt und ein breites Produktspektrum optisch aktiver sekundärer und tertiärer Amine konnte gefunden werden (Schema 4.11 iii), mit Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid [Phosphat] (NAD[P]H) als Kofaktor.[94]



Schema 4.11. Übersicht über IRED-katalysierte Reaktionen. (i) IREDs katalysieren ein breites Substratspektrum von azyklischen Iminen bis zu fünf- und sechsgliedrigen Heterozyklen, (ii) wobei diese Katalysatoren Substrate enantioselektiv zu den entsprechenden Produkten umsetzen können. (iii) Übersicht über einige umgesetzte Produkte: iii a),[95] iii b),[96] iii c+d),[97] iii e),[98] iii f).[99]

Aufgrund der breiten Verwendung von 2-Methylpyrrolin (2-MP) als Modellverbindung in IRED-katalysierten Reaktionen wurde es speziell für die Studie von **Publikation II** ausgewählt und für die präparative Synthese und Isolierung des entsprechenden enantiomerenreinen Produktes (*S*)-2-Methylpyrrolidin ((*S*)-2-MPN) verwendet. Die hoch (*S*)-selektive IRED aus *Paenibacillus elgii* B69 wurde dabei als Ganzzellbiokatalysator eingesetzt, D-Glucose diente als Substrat für die zellinterne Kofaktorregenerierung (Schema 4.12).



Schema 4.12. Ausgeführte IRED-katalysierte Testreaktion. 2-Methylpyrrolin (2-MP) wurde dabei in das entsprechende Produkt (*S*)-2-Methylpyrrolodin ((*S*)-2-MPN) reduziert. D-Glucose dient als Substrat für die zellinterne Kofaktorregenerierung und wird zu D-Gluconolacton umgewandelt. Die Hydrolyse zu D-Gluconsäure ist der letzte irreversible Teilschritt.

Um einen idealen biokatalytischen Prozess gestalten zu können, sind in einem ersten Schritt Optimierungsstudien durchgeführt worden. Ein vollständiger Umsatz kann im Bereich von 25 mmol·L^{-1} bis 150 mmol·L^{-1} an Substratkonzentration erreicht werden, höhere Konzentrationen führen zu einer Deaktivierung des IRED-Biokatalysators (Abbildung 4.5 i). Ein vollständiger Umsatz wird unter optimierten Reaktionsbedingungen (30 °C, Substratkonzentration: 150 mmol·L^{-1} und D-Glucose: 500 mmol·L^{-1}) von 24 h erreicht (Abbildung 4.5 ii).

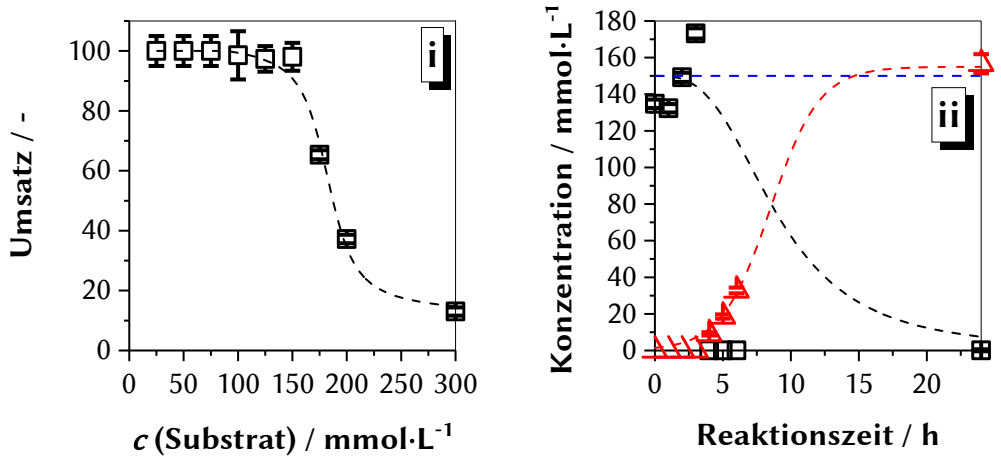


Abbildung 4.5. Optimierungsstudien der IRED-katalysierten Synthese: i) Umsatz vs. Substratkonzentration und ii) Zeitlicher Verlauf der IRED-katalysierten Reaktion bei einer Substratkonzentration von 150 mmol·L^{-1}. Alle Experimente wurden mit 100 mg·mL^{-1} Ganzzellkatalysator, 100 mmol·L^{-1} Natriumphosphatpuffer (NaP_i) pH 7,5 und 500 mmol·L^{-1} D-Glucose im 500 µL-Maßstab bei 30 °C durchgeführt. Die gestrichelten Linien dienen als Orientierungshilfe.

Die Vorteile der IRED-katalysierten Synthese sowie die beeindruckende Substratbreite dieser Enzymklasse wurde in der wissenschaftlichen Literatur seit der Erstveröffentlichung von Mitsukura *et al.* ausgiebig besprochen. Leider wurde bis dato kein Versuch unternommen, effektive Rückgewinnungsmethoden zu untersuchen, um etwaige Prozesse in einen größeren technischen Maßstab überführen zu können. Die meisten Veröffentlichungen berichten klassische Extraktions- und Destillationsschritte, die zusätzlichen Aufwand bei der Weiterverarbeitung erfordern.

Daher wurden nach den anfänglichen Optimierungsstudien verschiedene kommerziell erhältliche Kationen- und Anionenaustauscherharze auf ihre Fähigkeit untersucht, das Produkt (*S*)-2-MPN und eventuell verbliebenes Substrat 2-MP aus der Reaktionslösung zu entfernen. Wie bei dem Beispiel der Decarboxylasen (Kapitel 4.1) wurde ein analoges Vorgehen ausgeführt: Zu Testlösungen mit je 100 mmol·L^{-1} des Produktes und des Substrates zusammen mit 500 mmol·L^{-1} D-Glucose in 100 mmol·L^{-1} NaP_i-Puffer pH 7,5 wurden drei verschiedene Mengen (0.02 g, 0.1 g und 0.2 g pro mL Testlösung) an Anionen- und Kationenaustauscherharz gegeben. Nach 30-minütiger Adsorption wurden die Restkonzentrationen in der Lösung gemessen und ausgewertet (Abbildung 4.6). Werden die Anionen- und Kationenaustauscherharze untereinander verglichen, ist festzustellen, dass die Kationenaustauscherharze (Einträge 1–4) im Vergleich zu den Anionenaustauscherharzen (Einträge 5–7) eindeutig zu einer stärkeren Entfernung aus dem wässrigen Reaktionsmedium führen. Werte über 100% begründen sich dadurch, dass das Lösungsmittel Wasser in die Harze eindringt und somit die Restkonzentration von 2-MP und 2-MPN erhöht wird. Nach 24 h ist dieser Effekt nicht mehr festzustellen, da der Adsorptionseffekt diesem Lösungsmitteleffekt schließlich überwiegt (Details siehe **Publikation II**).

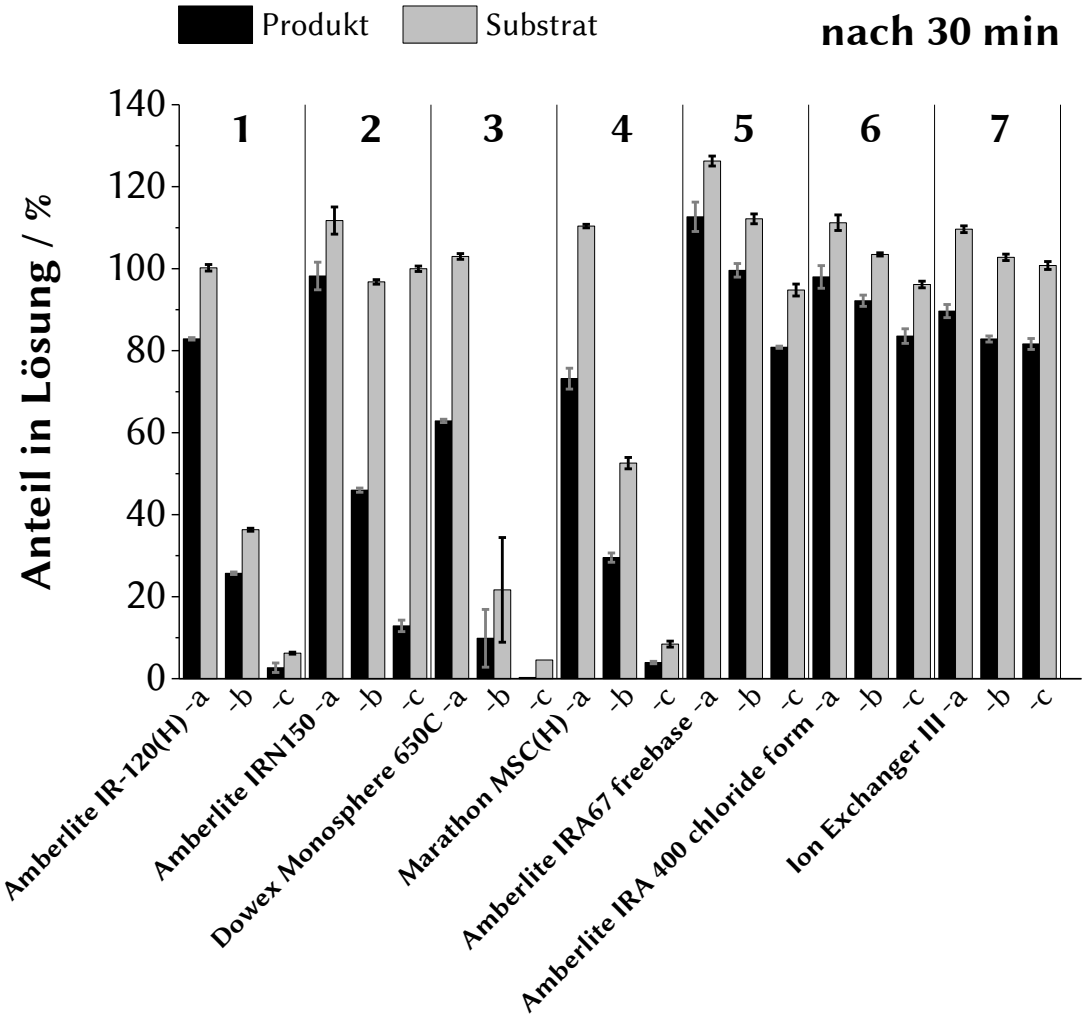


Abbildung 4.6. Adsorption nach 30 min des Iminsubstrates 2-MP und des Amin-Produktes (*S*)-2-MPN an handelsübliche Kationen- (Nr. 1–4) und Anionenaustauscherharze (Nr. 5–7) bei 30 °C aus einer Testlösung, die 100 mmol·L^{-1} des Substrates und des Produktes zusammen mit 500 mmol·L^{-1} D-Glucose in einer NaP_i-Pufferlösung bei pH 7.5 enthält. —a: 0.02 g·mL^{-1}, —b: 0.1 g·mL^{-1}, —c: 0.2 g·mL^{-1}.

Die Kationenaustauscher Amberlite IR-120(H) (Eintrag 1), IRN-150 (Eintrag 2), Dowex Monosphere 650C (Eintrag 3) und Dowex Marathon MSC (Eintrag 4) entfernen die Reaktanden aus der Lösung mit steigender Menge. Die getesteten Anionenaustauscherharze hingegen zeigen keine erfolgreiche Entfernung aus dem Reaktionsmedium. Dies bestätigt, dass die Reaktanden in ihrer kationischen Form vorliegen, was sich auch durch die Berechnung der Spezies im Verhältnis zum pH-Wert zeigen lässt (vgl. Abbildung 4.7).

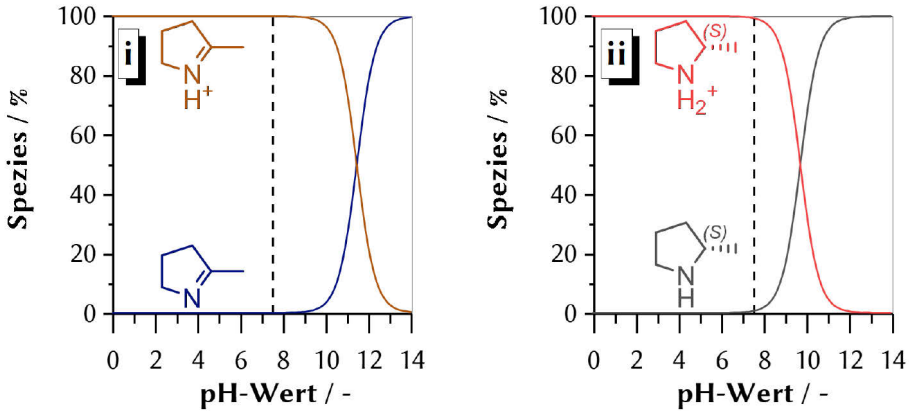


Abbildung 4.7. Speziesverteilung in Bezug zum pH-Wert: (i) Protonierte Form (braun) und nicht-protonierte Form (blau) des Iminsubstrates und (ii) protonierte Form (rot) und nicht-protonierte Form (grau) des Aminproduktes in Bezug auf den pH-Wert.

Alle in dieser Studie verwendeten Kationenaustauscherharze bestehen aus einer Styrol- und *p*-Divinylbenzolbasierten Matrix, die eine Sulfonsäurefunktionalität besitzt (vgl. auch Kapitel 3, Seite 14, Schema 3.1). Sowohl Amberlite IR-120(H), Dowex Monosphere 650C und Dowex Marathon MSC adsorbieren bei Dosierungen von 0.2 g·mL^{-1} über 90 % von 2-MP und 2-MPN aus der Testlösung. Für eine Demonstration der Anwendbarkeit im größeren Maßstab wurde schlussendlich der Kationenaustauscher Dowex Monosphere 650C gewählt und für die Aufarbeitung von 2-MPN eingesetzt und die IRED-katalysierte Reaktion im präparativen Maßstab (150 mL) durchgeführt. Die Reaktion zeigte nach 24 h einen vollständigen Umsatz und es wurden 30 g Dowex Monosphere 650C Kationenaustauscherharz (0.2 g·mL^{-1}) zu der Reaktionsbrühe gegeben und die Adsorption wurde für 30 min bei 30 °C unter Rühren ausgeführt. Das Produkt konnte fast vollständig aus der Reaktionslösung entfernt werden (>95%) und nach einer einfachen Filtration des Harzes und einer anschließenden Desorption in NaOH und Cyclopentylmethylether (CPME) konnten 1 g des reinen Produktes mit Hilfe von *in situ* generierter HCl aus dem Ether als Öl abgeschieden werden. Weitere Aufreinigungsschritte, z. B. durch Säulenchromatographie oder Rekristallisation, waren nicht erforderlich. Daher handelt es sich hier um eine einfache Methode, mehrere Grundoperationen (Adsorption, Extraktion, Kristallisation) zu vereinen. Dies vereinfacht das gesamte DSP des Prozesses erheblich. Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass diese Prozedur für Imin Reduktase-katalysierten Reaktionen bis zur Veröffentlichung von **Publikation II** noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

5 Fallstudie II: IL-basiertes thermomorphe Lösungsmittelsystem

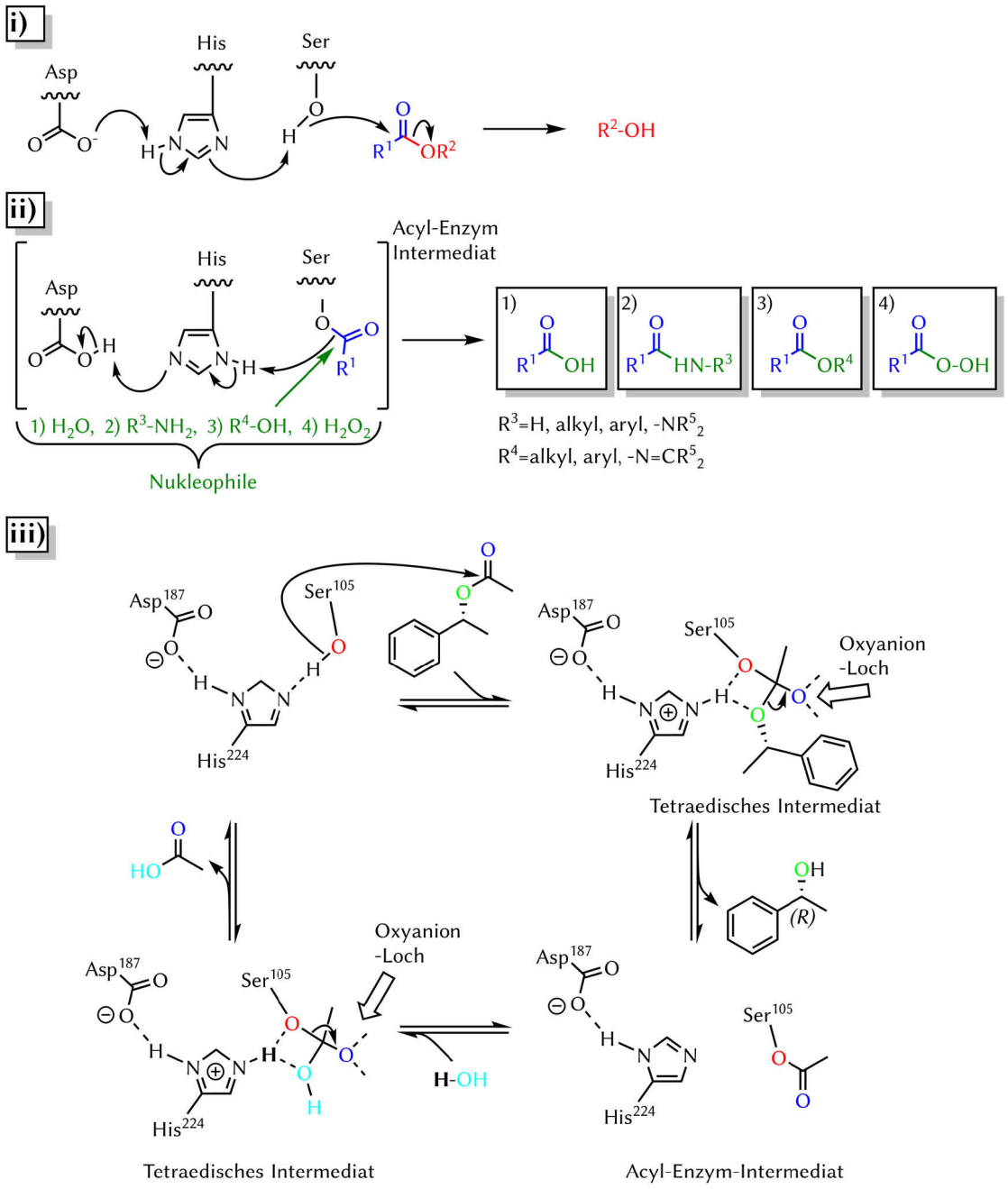
5.1 Lipasen-katalysierte Reaktionen

Lipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen [EC 3] und werden in der Untereinheit der Esterasen [EC 3.1] klassifiziert. Die hier betrachteten Lipasen gehören zur Untereinheit der Triacylglycerol-Hydrolasen [EC 3.1.1.3] und katalysieren formal die Hydrolyse von Triacylglycerol und Wasser zu Diacylglycerol und einem Carboxylat. Hydrolasen gelten im Allgemeinen als die wichtigste Enzymklasse mit dem größten synthetischen Nutzen, da diese keine empfindlichen Kofaktoren benötigen, in großer Anzahl verfügbar sind und über eine große Substratspezifität verfügen. Durch die hohe Robustheit der Enzyme können sie auch in Lösungsmittelsystemen mit niedriger Wasseraktivität eingesetzt werden (Zweiphasensysteme aus wässriger und OLM Phase, Ionische Flüssigkeiten).

Der Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse verläuft in starker Ähnlichkeit zur klassischen, basenkatalysierten Hydrolysereaktion. Der als katalytische Triade bekannte Mechanismus beschreibt die spezielle Anordnung von drei Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms. Am Beispiel von Serinhydrolasen sind dies Asparaginsäure (fungiert dabei als Säure), Histidin (fungiert dabei als Base) und Serin (fungiert dabei als Nukleophil), die dadurch eine kovalente Katalyse ermöglichen. Der Asparaginsäure-Rest befindet sich in einer für das Lösungsmittel unzugänglichen Tasche und bildet eine Wasserstoffbrücke zu der N–H-Gruppe des Histidinrestes aus. Der pK_a-Wert der Serin-Hydroxylgruppe wird dabei erniedrigt, wodurch ein nukleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe des Substrates ermöglicht wird. Ein etwaiges Nukleophil wiederum kann dieses Acyl-Enzym Intermediat angreifen und damit das aktive Zentrum unter der Freigabe der gebildeten Produkte regenerieren (Schema 5.1 i und ii).

Auf die Vorteile, biokatalytische Reaktionen in ILs durchzuführen, wurde bereits in Kapitel 3 eingegangen. Auch der Übersichtsartikel aus **Publikation V** bietet einen Überblick über die jüngsten Entwicklungen in der Biokatalyse in mehrphasigen IL-Reaktionssystemen. Vorangegangene Arbeiten aus dem eigenen Arbeitskreis konnten bereits zeigen, dass sich Proteine mit Hilfe von auf IL-basierten ATPS von Reaktionslösungen abtrennen lassen und sich somit mehrere Prozessschritte zu einer Grundoperation innerhalb der Aufarbeitung vereinen lassen.[100] Dieses Konzept konnte nun mit **Publikation III** um ein thermisch-schaltbares IL-basiertes Reaktionssystem erweitert werden. Grundlagen dazu sind auch 2019 mit der Dissertation von A. Gummesson erarbeitet worden.[101]

Ein effizientes DSP und die Wiederverwendbarkeit von eingesetzten (Bio-)Katalysatoren sind wichtige Parameter für die Entwicklung eines Prozesses und häufig ein wesentlicher Faktor für die Gesamtproduktionskosten.[102] Durch die Kombination aus Katalysatorimmobilisierung und der Erhöhung der Konzentration des Produktstromes lassen sich diese Prozessschritte zu einer Einheitsoperation vereinen und damit die Prozesseffizienz steigern.[32]



Schema 5.1. (i) Mechanismus und (ii) Substrat/Produkt Überblick der katalytischen Triade. Je nachdem, welches Nukleophil dem Reaktionssystem zu Verfügung steht, können unterschiedliche Produkte gebildet werden durch: 1) Hydrolyse, 2) Ester Aminolyse, 3) Acyltransfer, 4) Peroxycarbonsäurenbildung. Modifiziert nach Faber.[1] (iii) Im Detail gezeigt ist der Mechanismus der Lipasen-katalysierten Hydrolyse von 1-Phenylethylacetat, da diese Reaktion im entwickelten TMS-System durchgeführt wurde (s. u.).

Das Konzept eines thermisch-schaltbaren IL-basierten Reaktionssystems konnte durch die Anwendung von biokatalysatorverträglichen ILs zusammen mit einer diskreten wässrigen Pufferphase für den homogen löslichen Biokatalysator erfolgreich etabliert werden. Durch die Kombination von IL, anorganischem Salz und Wasser in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis zueinander, lässt sich gezielt eine Mischungslücke bei einer bestimmten Temperatur induzieren. Zusätzlich lassen sich die Trübungstemperatur durch die Zugabe verschiedener Phasenvermittler beeinflussen. Dadurch kann das volle Potential des löslichen Biokatalysators unter einphasigen Bedingungen

ausgeschöpft werden und die Aufarbeitung und das Biokatalysator-Recycling wird durch die Bildung des zweiphasigen Systems nach anschließender Abkühlung erreicht. Das resultierende Zweiphasensystem besteht aus sehr gegensätzlichen Phasenzusammensetzungen. Dadurch wird eine Anreicherung des löslichen Biokatalysators in der wässrigen und der hydrophoben Reaktanden in der IL-Phase aufgrund der hohen Verteilungskoeffizienten ermöglicht (Abbildung 5.1). Die in dem TMS-System durchgeführte Testreaktion ist hoch (*R*)-selektiv und es entstehen Essigsäure (bzw. Acetat) und der entsprechende (*R*)-Phenylethanol unter Wasserverbrauch. Der genaue Mechanismus ist in Schema 5.1 iii gezeigt.

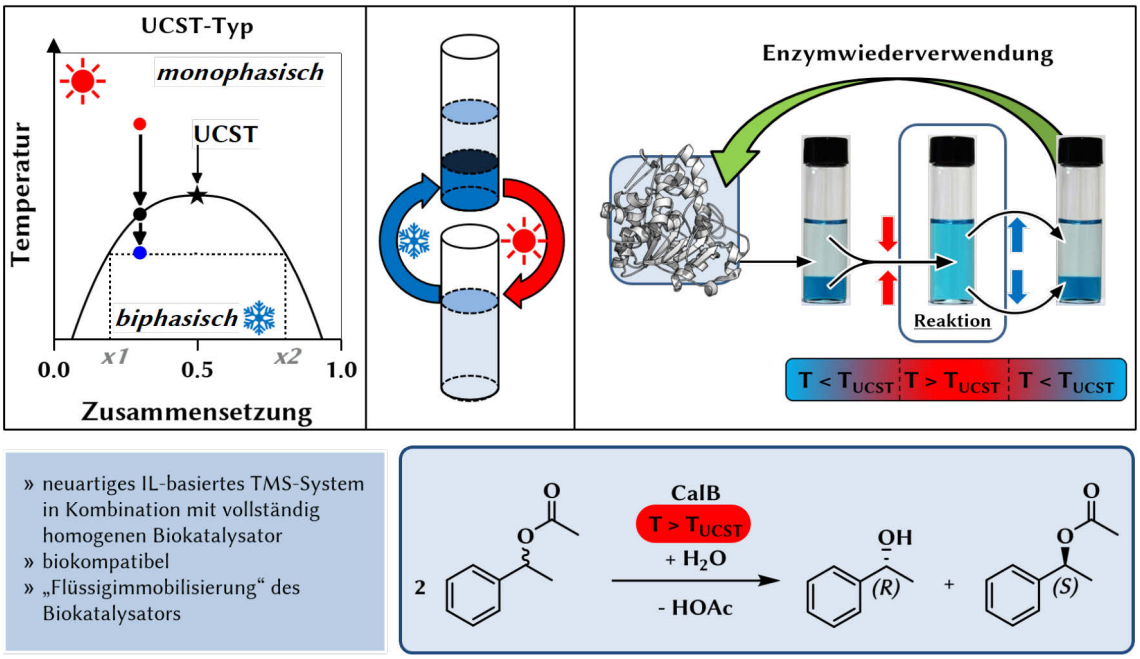
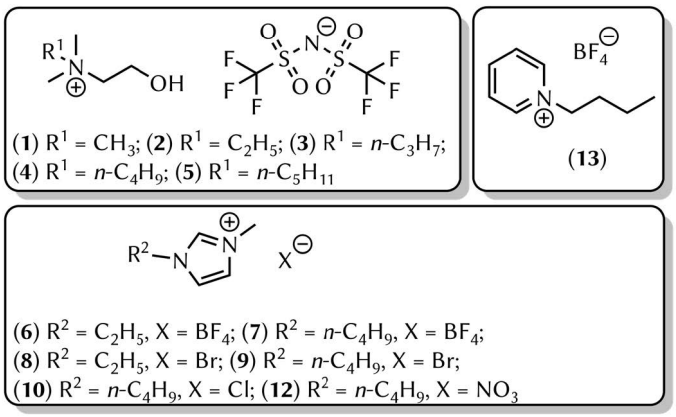


Abbildung 5.1. Konzept des entwickelten TMS-IL-basierten Reaktionssystems.

Bei den in **Publikation III** verwendeten ILs handelt es sich um Cholinium-[N_{11n2}(OH)][NTf_2]; n = 1–5 (**1**–**5**), Imidazolium(**6**–**9**)- und Pyridinium(**13**)-basierten ILs als Reaktionsmedium (Schema 5.2). Diese gelten als besonders biokompatibel und proteinstabilisierend.[103]



Schema 5.2. Untersuchte ILs mit hoher Biokompatibilität für den Einsatz in thermomorphen IL-basierten Lösungsmittelsystemen.

Neben dem interessanten Phasenverhalten, das ausgiebig in **Publikation III** beschrieben ist, konnte gezeigt werden, dass die kinetische Racematspaltung im 1-Butyl-3-Methylimidazolium-Tetrafluoroborat(**7**)/Natriumphosphat-Puffer (NaP_i)/Wasser-System mit einer Aktivität von 64.7 mU·mL^{-1} bei T = 40 °C unter optimalen Parametern abläuft (Abbildung 5.2). Bereits nach 120 min zeigt das Reaktionssystem einen Umsatz von >49.9 % mit einem Enantiomerenüberschuss von >99.9 % (Abbildung 5.2 i und iii). Neben einer sehr hohen Enantioselektivität von >200 (Abbildung 5.2 ii, Gleichung (1.4)) konnte das Enzym durch die „Flüssigimmobilisierung" bis zu fünfmal wiederverwendet werden (Abbildung 5.2 iv).

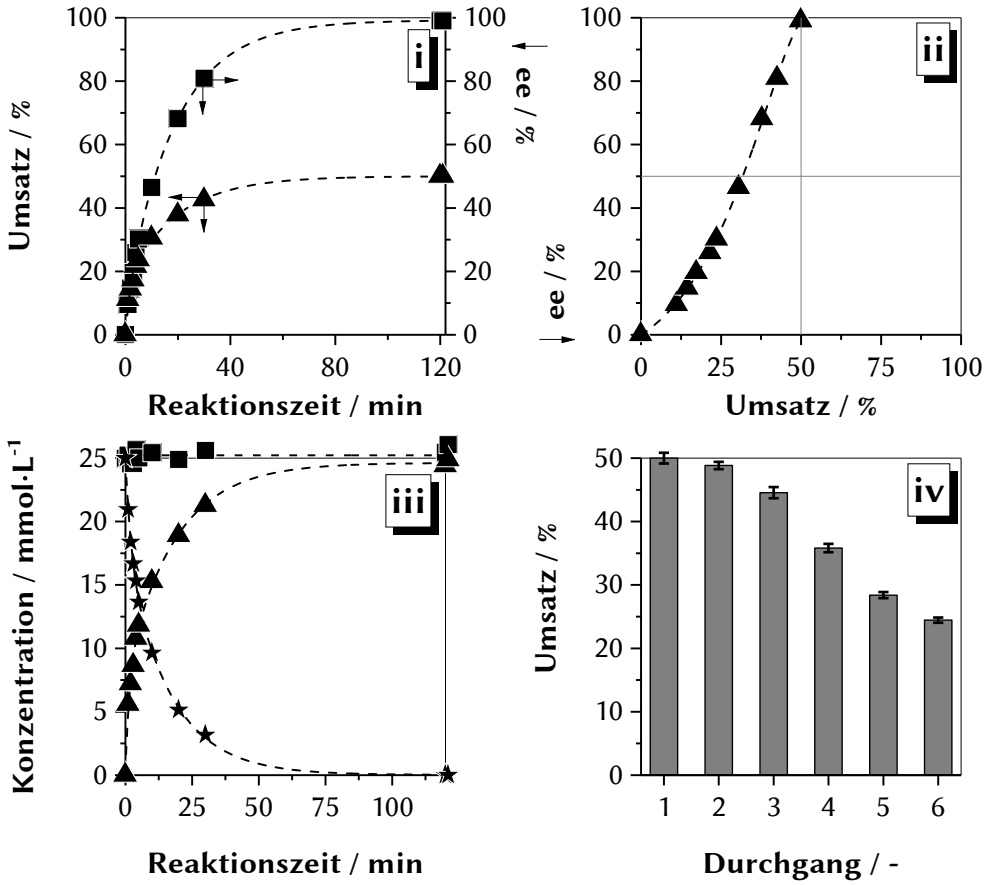


Abbildung 5.2. Kinetische Racematspaltung ((i) Umsatz/ee vs. Zeit, (ii) ee vs. Umsatz, (iii) Konzentration vs. Zeit) in einem 35 % (w/w) IL(**7**)/150 mmol·L^{-1} NaP_i/Wasser-System mit 50 mmol·L^{-1} Substrat und einer Enzymaktivität von 64.7 mU·mL^{-1} bei T = 40 °C (monophasische Bedingungen) bezüglich der (*S*)-(■) und (*R*)-(★) Substrat-Isomere und des (*R*)-(▲)-Produktes, (iv) Umsetzung pro Recyclinglauf bei der Wiederverwendung des Enzyms im TMS-System mit einer Enzymaktivität von 400 mU·mL^{-1} bei T = 40 °C und 30 min für jeden Recyclinglauf.

Die Abnahme des Umsatzes bei der Wiederverwendung des Katalysators lässt sich mit der allgemeinen Abnahme der Enzymaktivität im IL(**7**)/150 mmol·L^{-1} NaP_i/Wasser-System erklären. Es konnte eine Abnahme im IL-basierten System um ca. 50 % im Vergleich zum klassischen wässrigen System festgestellt werden. Es wurde stets die obere wässrige Phase nach der Abkühlung des Systems wiederverwendet, um einen Verlust des Biokatalysators nahezu ausschließen zu können. Die Verteilung des Enzyms kann mittels SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Probennahme der unteren IL-angereicherten Phase führt zu einem sehr schwachen Signal im Gel (Abbildung 5.3 iiC), während die Intensität des oberen Bandes der wässrigen Phase (Abbildung 5.3 iiB) deutlich stärker ist (Abbildung 5.3 iiD). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich der wesentliche Teil des Enzyms in der wässrigen Phase verteilt.

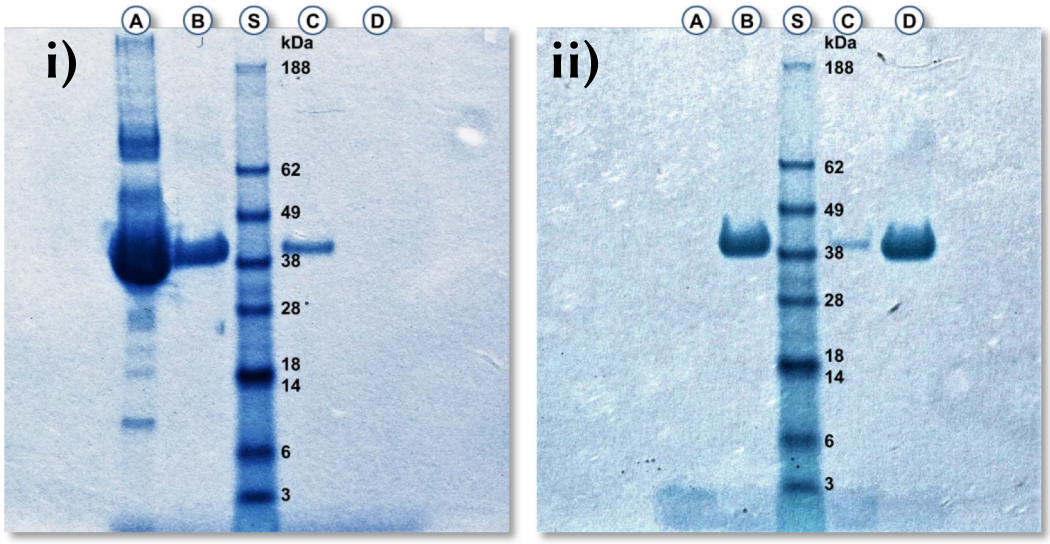


Abbildung 5.3. (i) SDS-Gel des Enzyms CalB bei verschiedenen Konzentrationen (S = Proteinstandard SeeBlue, A = Enzym ohne Verdünnung, B = 1:10-Verdünnung, C = 1:100-Verdünnung, D = 1:1000-Verdünnung. (ii) SDS-Gel des Enzyms CalB in den verschiedenen Phasen des [BMIm][BF_4]/H_2O/NaP_i-Systems (S = Proteinstandard SeeBlue, A = Blindprobe ohne Enzym, B = Probe aus dem monophasischen System, C = Probe aus der unteren IL-Phase des biphasischen Systems, D = Probe aus der oberen wässrigen Phase des biphasischen Systems).

Zu den geeignetsten IL-Kandidaten für die Herstellung eines TMS-Systems mit UCST-Phasenverhalten zählen 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborat [BMIm][BF_4] (**7**) und 1-Butylpyridinium Tetrafluoroborat [Bpy][BF_4] (**13**). Hier werden alle Bedingungen eines optimalen TMS-Systems erfüllt. Die IL 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborat [EMIm][BF_4] (**6**) zeigte hingegen Schwächen dabei, das Substrat vollständig zu lösen. Als vollkommen ungeeignet hat sich dagegen die IL 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chlorid [BMIm][Cl] (**10**) erwiesen (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1. Charakterisierung verschiedener IL/NaP_i/Wasser-Systeme. Parameter des Konzentrationsoptimums: T_{UCST} = 40 °C und IL = 35 *w*%. [a]++++ alle Parameter werden erreicht (Löslichkeit des Substrates, UCST-Phasenverhalten, hohe Reaktionsgeschwindigkeiten), [a]++ Unmischbarkeit des Substrates, [a]0 geringe Phasentrennung nach dem Abkühlen und Unmischbarkeit des Substrates, [a]— keine Phasentrennung tritt ein.

IL	Konzentrationsoptimum von NaP_i / mmol·L^{-1}	Rangfolge[a]
[BMIm][BF_4] (**7**)	150	++++
[Bpy][BF_4] (**13**)	233	++++
[EMIm][BF_4] (**6**)	567	++
[BMIm][Br] (**9**)	333	0
[BMIm][NO_3] (**12**)	350	0
[EMIm][Br] (**8**)	470	0
[BMIm][Cl] (**10**)	—	—

Mit dieser Fallstudie konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von IL-basierten TMS-Systemen für enzymatische Reaktionen höhere volumetrische Produktivitäten im Vergleich zu konventionellen zweiphasigen Systemen aus organischen Lösungsmitteln und einer Pufferphase erreicht werden können. Die zusätzliche einfache Katalysatorwiederverwendung zeigt außerdem das enorme Potential dieser Systeme auf.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Dissertationsschrift wurde die Anwendung von thermischen Trennverfahren zur integrierten Aufarbeitung bei biokatalytischen Reaktionen anhand von zwei Fallstudien untersucht. Die Grundoperation der Adsorption wurde dahingehend untersucht und angewendet, das Aufarbeitungsverfahren der enzymatischen Carboxylierung von phenolischen Derivaten sowie der biokatalysierten Reduktion von Aminen zu verbessern und zu optimieren. Die Grundoperation der Extraktion wurde zusammen mit einer „Flüssigimmobilisierung" des Biokatalysators in ein thermomorphes Lösungsmittelsystem integriert.

In der ersten Studie wurde die regioselektive enzymatische Carboxylierung von 3,5-Dihydroxytoluol (Orcinol) zu 2,6-Dihydroxy-4-Methylbenzoesäure (DHMBA) im Detail untersucht. Die Reaktion wurde als Ganzzellbiotransformation unter Verwendung der rekombinanten, nicht-oxidativen 2,3-Dihydroxybenzoesäuredecarboxylase aus *Aspergillus oryzae* (2,3-DHBD_*Ao*) ausgeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass die Enzymaktivität unter hohen Substrat- und Produktinhibierungen leidet und daher eine große Menge des Biokatalysators (60 $mg \cdot mL^{-1}$ ganze Zellen) nötig ist, um einen Umsatz von 80 % zu erreichen. Nach dem Ende der Reaktion konnte das Produkt (und das in Lösung verbliebende Substrat) durch einen Adsorptions-Desorptionszyklus mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Anionenaustauscherharzes „Dowex 1x2 (Cl)" aus der Reaktionslösung adsorbiert und nach einer anschließenden einfachen Kristallisation mit einer Reinheit von >99% ohne vollständige Entfernung des überschüssigen Bicarbonats (3 $mol \cdot L^{-1}$) aus der Reaktionslösung erhalten werden. Das vorgestellte Konzept erfordert keine abschließende weitere Aufreinigung des Produktes und stellt damit das erste erfolgreiche Beispiel eines einfachen DSP im Bereich der biokatalytischen Variante der Kolbe-Schmitt-Reaktion dar.

Die zweite Studie konnte innerhalb der Fallstudie der Adsorptionsharz-basierten Aufarbeitung anhand einer Imin Reduktase (IRED)-katalysierten Reaktion zeigen, dass auch hier der Einsatz von Ionenaustauscherharzen das DSP erheblich verbessern kann. Das prochirale Substrat 2-Methylpyrrolin wurde dabei biokatalytisch zu seinem entsprechenden Produkt (*S*)-2-Methylpyrrolodin enantiomerenrein mit einem Umsatz von >99% durch die hoch (*S*)-selektive IRED aus *Paenibacillus elgii* B69 reduziert. Auch hier wurden in einem ersten Schritt die Reaktionsbedingungen optimiert, sodass bei 30 °C, einer Substratkonzentration von 150 $mmol \cdot L^{-1}$ und 500 $mmol \cdot L^{-1}$ D-Glucose ein vollständiger Umsatz erreicht werden konnte. Schüttelkolbenexperimente mit sieben kommerziell erhältlichen Kationen- und Anionenaustauscherharzen wurden durchgeführt und somit ihr Potential untersucht, das Produkt aus der Reaktionslösung zu gewinnen. Hier zeigten die Kationenaustauscherharze Amberlite IR-120(H), IRN-150, Dowex Monosphere 650C und Dowex Marathon MSC hohe Adsorptionskapazitäten (bis zu >90%) gegenüber 2-Methylpyrrolin und (*S*)-2-Methylpyrrolodin. Eine Reaktion im präparativen 150 mL-Maßstab wurde durchgeführt und es konnten durch einen Adsorptions-Desorptionszyklus und einer anschließenden Behandlung mit gasförmiger HCl das ölige Hydrochlorid-Produkt mit Reinheiten >99 % erhalten werden. Auch hier waren keine weiteren Aufreinigungsschritte wie Säulenchromatographie oder Umkristallisation nötig. Dieses leicht durchführbare Verfahren ist nach bestem Wissen das erste Beispiel, dass die Aufarbeitung von Imin Reduktasen-katalysierten Reaktionen hinsichtlich der Grundoperation Adsorption systematisch untersucht wurde.

Das in der zweiten Fallstudie vorgestellte System basiert auf der Anwendung thermomorpher Lösungsmittelsysteme (TMS) auf der Basis von Ionischen Flüssigkeiten, Wasser und anorganischen Puffersalzen. Es wurden Cholinium- und Imidazolium-basierte ionische Flüssigkeiten verwendet,

um einen temperaturabhängigen Phasenwechsel zu ermöglichen. Die resultierenden Systeme zeigten dabei alle ein UCST-Verhalten, was bedeutet, dass die anfangs biphasischen Systeme durch eine Temperaturerhöhung in monophasische Systeme überführt werden können. Die Trübungstemperatur («cloud point temperatur») konnte dabei durch die Zugabe von Salzen oder polaren organischen Lösungsmitteln eingestellt werden. Bei erhöhten Temperaturen konnten hohe enzymatische Aktivitäten und vollständige Umsätze bestimmt werden. Durch eine anschließende Phasentrennung bei niedrigeren Temperaturen war es zusätzlich möglich, den Biokatalysator leicht aus dem Reaktionssystem abzutrennen und sogar in vier weiteren Reaktionsschritten wiederzuverwenden. Durch das integrierte Extraktionssystem zusammen mit dieser „Flüssigimmobilisierung" konnte der Gesamtprozess verbessert werden. Zusätzlich handelt es sich um die erste Beschreibung eines biokompatiblen wässrigen/IL-thermomorphen Lösungsmittelsystems, das neben der Immobilisierung des homogenen Katalysators die gleichzeitige Separierung der Produkte und der Biokatalysatoren ermöglicht und somit auch eine Wiederverwendung des Enzyms gestattet.

Zwar nicht direkter Bestandteil dieser Arbeit, soll in diesem Zusammenhang aber als Ausblick auf den Übersichtsartikel „Recent Developments in Biocatalysis in Multiphasic Ionic Liquid Reaction Systems" (**Publikation V**) hingewiesen werden, der ähnliche IL-basierte Prozessmethoden wie das vorgestellte TMS-System rezensiert. Es werden mehrphasige Reaktionskonzepte auf der Basis Ionischer Flüssigkeiten präsentiert, wobei auf klassische zweiphasige IL-Systeme einschließlich thermoregulierter Mehrkomponenten-Lösungsmittelsysteme (TMS) und polymerisierte Ionische Flüssigkeiten eingegangen wird.

Reaktionskonzepte, die auf die Gleichgewichtsverschiebung durch *in situ* Produktentfernungsmethoden basieren, finden Rezension in dem Übersichtsartikel „Application of In Situ Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes" (**Publikation IV**). Hauptsächlich werden die Anwendung der Kristallisation als sehr leistungsfähige *in situ* Produktentfernungstechniken (ISPR) bei der biokatalytischen Prozessgestaltung besprochen, um ungünstige thermodynamische Reaktionsgleichgewichte und/oder unerwünschte Nebenreaktionen zu überwinden. Auch hier liegt ein Hauptaugenmerk auf der Kombination verschiedener Grundoperationen, um ganzheitliche Lösungen für Bioprozesse zu finden. Darüber hinaus werden Parallelen zur Nutzung der Adsorption als ähnliche Technik gezogen und Gemeinsamkeiten diskutiert.

Weitere Studien könnten sich der gezielten Untersuchung der in dieser Arbeit gefundenen Adsorber widmen und durch die Bestimmung der Sorptionsisothermen biokatalytische Prozesse im kontinuierlichen Betrieb ermöglichen. Dabei wäre es möglich, einen Flussbetrieb zu entwickeln, bei dem das Produkt mittels Adsorbermaterialien kontinuierlich aus dem Reaktor entfernt wird. Durch eine parallele Anordnung dieser Adsorberkolonnen könnte ein beladender Adsorber desorbiert werden, während auf der anderen Seite eine gleichzeitige Adsorption aus der Reaktion stattfindet.

7 Literaturverzeichnis

[1] K. Faber. Biotransformations in Organic Chemistry. *A Textbook,* 7. Aufl., Springer International Publishing, Cham, **2018**.

[2] K.-E. Jaeger, A. Liese, C. Syldatk (Hrsg.) *Einführung in die Enzymtechnologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.

[3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, G. J. Gatto. Biochemie, 7. Aufl., Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2014**.

[4] a) M. Schuster, A. Aaviksaar, H.-D. Jakubke. Enzyme-catalyzed peptide synthesis in ice. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 8093–8102; b) Y. Yeh, R. E. Feeney. Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 601–618; c) R. Karan, M. D. Capes, S. Dassarma. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat. Biosyst.* **2012**, *8*, 4; d) D. W. Hough, M. J. Danson. Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 39–46; e) J. Gomes, W. Steiner. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 223–235.

[5] N. Gupta, P. Rathi, R. Gupta. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.* **2002**, *311*, 98–99.

[6] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas. Hydrolases in organic synthesis. *Regio- and stereoselective biotransformations,* 2. Aufl., John Wiley, Weinheim, Chichester, **2006**.

[7] a) A. Liese, U. Kragl. Einfluss der Reaktorkonfiguration auf die Enantioselektivität einer kinetischen Racematspaltung. *Chem. Ing. Tech.* **2013**, *85*, 826–832; b) Y. Fan, Z. Xie, H. Zhang, J. Qian. Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems. *Kinet. Catal.* **2011**, *52*, 686–690; c) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.

[8] a) A.J.J. Straathof, J. A. Jongejan. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559–571; b) C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.

[9] N. Kaftzik, W. Kroutil, K. Faber, U. Kragl. Mandelate racemase activity in ionic liquids: scopes and limitations. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *214*, 107–112.

[10] a) D. A. Schichl, S. Enthaler, W. Holla, T. Riermeier, U. Kragl, M. Beller. Dynamic Kinetic Resolution of α-Amino Acid Esters in the Presence of Aldehydes. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3506–3512; b) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall. Combination of enzymes and metal catalysts. A powerful approach in asymmetric catalysis. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3262; c) F. F. Huerta, A. B. E. Minidis, J.-E. Bäckvall. Racemisation in asymmetric synthesis. Dynamic kineticresolution and related processes in enzyme and metal catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2001**,

30, 321–331; d) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J.-E. Bäckvall. Ruthenium- and Enzyme-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645–1650.

[11] G. E. Jeromin, M. Albertz. Optically active α-acetoxycarboxylic acids and α-hydroxycarboxylic acids by enzyme-aided syntheses. *J. Prakt. Chem.* **1992**, *334*, 526–528.

[12] U. T. Strauss, K. Faber. Deracemization of (±)-mandelic acid using a lipase–mandelate racemase two-enzyme system. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4079–4081.

[13] A. Vogel, O. May. Industrial enzyme applications, 1. Aufl., Wiley, Weinheim, Germany, **2019**.

[14] a) M. T. Reetz. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194; c) J. M. Woodley. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 4733–4739; d) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **2001**, *409*, 258–268; e) Erick J. Vandamme, An Cerdobbel, Wim Soetaert. Biocatalysis on the rise: Part 1 Principles. *Chim. Oggi* **2005**, *23*, 47–51; f) J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443–1454; g) A. J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556; h) G. Hughes, J. C. Lewis. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1–3; i) K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner. Biocatalysis: Ready to Master Increasing Complexity. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2373–2376; j) R. Wohlgemuth. The locks and keys to industrial biotechnology. *N. Biotechnol.* **2009**, *25*, 204–213.

[15] S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl. Industrial biotechnology - the future of green chemistry? *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007.

[16] J. Sun, H. S. Alper. Metabolic engineering of strains: from industrial-scale to lab-scale chemical production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *42*, 423–436.

[17] K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **1977**, *198*, 1056–1063.

[18] a) E. Russo. The birth of biotechnology. *Nature* **2003**, *421*, 456–457; b) G. Walsh. Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 769–776.

[19] a) M. L. Cacicedo, R. M. Manzo, S. Municoy, H. L. Bonazza, G. A. Islan, M. Desimone, M. Bellino, E. J. Mammarella, G. R. Castro in *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier, **2019**, S. 169–200; b) S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* **2013**, *3*, 1–9; c) R. A. Sheldon, S. van Pelt. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.

[20] a) C. Willrodt, R. Karande, A. Schmid, M. K. Julsing. Guiding efficient microbial synthesis of non-natural chemicals by physicochemical properties of reactants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 52–62; b) M. Schrewe, M. K. Julsing, B. Bühler, A. Schmid. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6346–6377.

[21] a) J. Sun, H. S. Alper. Metabolic engineering of strains: from industrial-scale to lab-scale chemical production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *42*, 423–436; b) D. Porro, P. Branduardi, M. Sauer, D. Mattanovich. Old obstacles and new horizons for microbial chemical production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 101–106; c) J. A. Jones, Ö. D. Toparlak, M. A. G. Koffas. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 52–59; d) C. J. Paddon, J. D. Keasling. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 355–367.

[22] M. C. Cuellar, A. J. Straathof. Downstream of the bioreactor: advancements in recovering fuels and commodity chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *62*, 189–195.

[23] a) A. Grollmisch, F. Langschwager, U. Kragl in *Springer Reference Naturwissenschaften* (Hrsg.: W. Freeden, R. Rummel), Springer Spektrum, Berlin, **2017**, S. 1–39; b) R. Gani, J. Bałdyga, B. Biscans, E. Brunazzi, J.-C. Charpentier, E. Drioli, H. Feise, A. Furlong, K. M. van Geem, J.-C. de Hemptinne et al. A multi-layered view of chemical and biochemical engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *155*, 133–145; c) M. Biselli, U. Kragl, C. Wandrey in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley, **2002**, S. 185–257.

[24] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey. Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, Hoboken, **2006**.

[25] D. Hülsewede, L.-E. Meyer, J. von Langermann. Application of In Situ Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4871–4884.

[26] a) P. Richardson, A. Steven, R. Kargbo, C. C. Nawrat, A. A. Zlota, A. Ramirez, J. Knight. Some Items of Interest to Process R&D Chemists and Engineers. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 1281–1291; b) R. A. Sheldon, D. Brady. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088–6104; c) R. A. Sheldon, P. C. Pereira. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678–2691.

[27] a) P. T. Anastas, J. C. Warner. Green chemistry. *Theory and practice,* 1. Aufl., Oxford Univ. Press, Oxford, **2000**; b) P. Anastas, N. Eghbali. Green chemistry: principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312; c) News & Views Preface. Twelve more green chemistry principles. *Green Chem.* **2001**, *3*, G73.

[28] R. A. Sheldon. Organic synthesis. Past, present and future. *Chem. Ind. (London)* **1992**, 903–906.

[29] R. A. Sheldon. The E Factor: fifteen years on. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1273–1283.

[30] B. M. Trost. The atom economy-a search for synthetic efficiency. *Science* **1991**, *254*, 1471–1477.

[31] M. P. Meissner, P. Süss, H. Brundiek, J. M. Woodley, J. von Langermann. Scoping the Enantioselective Desymmetrization of a Poorly Water-Soluble Diester by Recombinant Pig Liver Esterase. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 1518–1523.

[32] R. A. Sheldon, J. M. Woodley. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.

[33] P. Domínguez de María, F. Hollmann. On the (Un)greenness of Biocatalysis: Some Challenging Figures and Some Promising Options. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1257.

[34] K. Sattler. Thermische Trennverfahren, John Wiley & Sons, Hoboken, **2012**.

[35] a) J. Diebler, J. von Langermann, A. Mell, M. Hein, P. Langer, U. Kragl. Synthesis of Aliphatic and α-Halogenated Ketone Cyanohydrins with the Hydroxynitrile Lyase from *Manihot esculenta*. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 987–991; b) G. Carrea (Hrsg.) *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.

[36] U. Kragl, M. Eckstein, N. Kaftzik. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 565–571.

[37] a) A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* **2003**, 70–71; b) J. T. Gorke, F. Srienc, R. J. Kazlauskas. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **2008**, 1235–1237; c) M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann. Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 943–959; d) P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W.-Y. Lou. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **2017**, *4*, 34.

[38] a) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757–2785; b) P. Wasserscheid, T. Welton (Hrsg.) *Ionic liquids in synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**; c) T. Welton. Ionic liquids: a brief history. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 691–706; d) T. Itoh. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10567–10607; e) J. Claus, F. O. Sommer, U. Kragl. Ionic liquids in biotechnology and beyond. *Solid State Ionics* **2018**, *314*, 119–128.

[39] M. H. Vermue, J. Tramper. Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects (Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 345–373.

[40] E. Wehtje, P. Adlercreutz. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 798–806.

[41] P. J. Halling. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 178–206.

[42] M. A. Mirata, H. Schewe, D. Holtmann, J. Schrader. Integrierte Bioproduktion und selektive Aufreinigung von Perillasäure. *Chem. Ing. Tech.* **2010**, *82*, 101–109.

[43] M. A. Mirata, D. Heerd, J. Schrader. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 764–771.

[44] J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, M. R. Reinhard, B. E. Landen, W. L. Muth, P. G. Marler. Large-scale stereoselective enzymatic ketone reduction with *in situ* product removal via polymeric adsorbent resins. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 494–499.

[45] T. Phillips, M. Chase, S. Wagner, C. Renzi, M. Powell, J. DeAngelo, P. Michels. Use of *in situ* solid-phase adsorption in microbial natural product fermentation development. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 411–425.

[46] F. Dechow. Separation and Purification Techniques in Biotechnology, William Andrew, Norwich, N.Y, **1989**.

[47] D. Lüdecke, C. Lüdecke. Thermodynamik. *Physikalisch-chemische Grundlagen der thermischen Verfahrenstechnik*, Springer, Berlin, **2000**.

[48] K. E. Gutowski, G. A. Broker, H. D. Willauer, J. G. Huddleston, R. P. Swatloski, J. D. Holbrey, R. D. Rogers. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6632–6633.

[49] a) Y. Kohno, H. Ohno. Temperature-responsive ionic liquid/water interfaces: relation between hydrophilicity of ions and dynamic phase change. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5063–5070; b) K. Fukumoto, H. Ohno. LCST-type phase changes of a mixture of water and ionic liquids derived from amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1852–1855; *Angew. Chem.*, **2007**, *119*, 1884–1887; c) Y. Kohno, H. Ohno. Ionic liquid/water mixtures: from hostility to conciliation. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7119–7130; d) N. J. Bridges, K. E. Gutowski, R. D. Rogers. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS). *Green Chem.* **2007**, *9*, 177–183; e) A. Behr, L. Johnen, B. Daniel. A liquid immobilisation concept for enzymes by thermomorphic solvent systems. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3168–3172; f) A. Vorholt, P. Neubert, A. Behr. Katalytische Funktionalisierungen von Oleylalkohol in thermomorphen Lösungsmittelsystemen zur Synthese potenzieller Biotenside und -Monomere. *Chem. Ing. Tech.* **2013**, *85*, 1540–1547; g) B. Onghena, T. Opsomer, K. Binnemans. Separation of cobalt and nickel using a thermomorphic ionic-liquid-based aqueous biphasic system. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15932–15935; h) S. Ikeda, T. Mori, Y. Ikeda, K. Takao. Microwave-Assisted Solvent Extraction of Inert Platinum Group Metals from HNO_3 (aq) to Betainium-Based Thermomorphic Ionic Liquid. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 2459–2463; i) H. Passos, A. Luís, J. A. P. Coutinho, M. G. Freire. Thermoreversible (Ionic-Liquid-Based) Aqueous Biphasic Systems. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20276; j) A. M. Ferreira, H. Passos, A. Okafuji, A. P. M. Tavares, H. Ohno, M. G. Freire, J. A. P. Coutinho. An integrated process for enzymatic catalysis allowing product recovery and enzyme reuse by applying thermoreversible aqueous biphasic systems. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1218–1223; k) J. Esteban, A. J. Vorholt. Obtaining glycerol carbonate and glycols using thermomorphic systems based on glycerol and cyclic organic carbonates: Kinetic studies. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *63*, 124–132; l) S. Kono, H. Kazama, T. Mori, T. Arai, K. Takao. Significant Acceleration of PGMs Extraction with UCST-Type Thermomorphic Ionic Liquid at Elevated Temperature. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 1555–1559; m) T. Gaide, A.

Behr, M. Terhorst, A. Arns, F. Benski, A. J. Vorholt. Katalysatorvergleich bei der Hydroesterifizierung von 10-Undecensäuremethylester in thermomorphen Lösungsmittelsystemen. *Chem. Ing. Tech.* **2016**, *88*, 158–167; n) E. Schäfer, Y. Brunsch, G. Sadowski, A. Behr. Hydroformylation of 1-Dodecene in the Thermomorphic Solvent System Dimethylformamide/Decane. Phase Behavior–Reaction Performance–Catalyst Recycling. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 10296–10306; o) M. Gras, N. Papaiconomou, N. Schaeffer, E. Chainet, F. Tedjar, J. A. P. Coutinho, I. Billard. Ionic-Liquid-Based Acidic Aqueous Biphasic Systems for Simultaneous Leaching and Extraction of Metallic Ions. *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 1579–1582; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 1563–1566.

[50] a) M. G. Freire, A. F. M. Claudio, J. M. M. Araujo, J. A. P. Coutinho, I. M. Marrucho, J. N. Canongia Lopes, L. P. N. Rebelo. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4966–4995; b) Y. Qiao, W. Ma, N. Theyssen, C. Chen, Z. Hou. Temperature-Responsive Ionic Liquids: Fundamental Behaviors and Catalytic Applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 6881–6928.

[51] a) M. Lobell, D. H. G. Crout. Pyruvate Decarboxylase: A Molecular Modeling Study of Pyruvate Decarboxylation and Acyloin Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1867–1873; b) F. Dyda, W. Furey, S. Swaminathan, M. Sax, B. Farrenkopf, F. Jordan. Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6165–6170.

[52] a) C. F. Gunsalus, R. Y. Stanier, I. C. Gunsalus. The enzymatic conversion of mandelic acid to benzoic acid. III. Fractionation and properties of the soluble enzymes. *J. Bacteriol.* **1953**, *66*, 548–553; b) P. Dünkelmann, D. Kolter-Jung, A. Nitsche, A. S. Demir, P. Siegert, B. Lingen, M. Baumann, M. Pohl, M. Müller. Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: the first asymmetric cross-benzoin condensation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12084–12085.

[53] U. Feller, I. Anders, T. Mae. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 1615–1624.

[54] S. M. Glueck, S. Gumus, W. M. F. Fabian, K. Faber. Biocatalytic carboxylation. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 313–328.

[55] I. C. Prentice, G. D. Farquhar, M. J.R. Fasham, M. L. Goulden, M. Heimann, V. J. Jaramillo, H. S. Kheshgi, C. Le Quéré, R. J. Scholes, D. W.R. Wallace in *Climate change 2001. The scientific basis; contribution of Working Group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Hrsg.: J. Houghton), Cambridge Univ. Press, Cambridge, **2001**, S. 183–237.

[56] a) G. G. B. Tcherkez, G. D. Farquhar, T. J. Andrews. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 7246–7251; b) S. Saschenbrecker, A. Bracher, K. V. Rao, B. V. Rao, F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl. Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell* **2007**, *129*, 1189–1200.

[57] *BP Statistical Review of World Energy*, *68th edition*, **2019**.

[58] S. E. Payer, K. Faber, S. M. Glueck. Non-Oxidative Enzymatic (De)Carboxylation of (Hetero)Aromatics and Acrylic Acid Derivatives. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2402–2420.

[59] a) A. S. Lindsey, H. Jeskey. The Kolbe-Schmitt Reaction. *Chem. Rev.* **1957**, *57*, 583–620; b) F. Wessely, K. Benedikt, H. Benger, G. Friedrich, F. Prillinger. Zur Kenntnis der Carboxylierung von Phenolen. *Monatsh. Chem.* **1950**, *81*, 1071–1091.

[60] K. Kirimura, H. Gunji, R. Wakayama, T. Hattori, Y. Ishii. Enzymatic Kolbe-Schmitt reaction to form salicylic acid from phenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *394*, 279–284.

[61] K. Kirimura, S. Yanaso, S. Kosaka, K. Koyama, T. Hattori, Y. Ishii. Production of *p*-Aminosalicylic Acid through Enzymatic Kolbe–Schmitt Reaction Catalyzed by Reversible Salicylic Acid Decarboxylase. *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 206–208.

[62] a) O. El-Kabbani, P. J. Scammells, J. Gosling, U. Dhagat, S. Endo, T. Matsunaga, M. Soda, A. Hara. Structure-guided design, synthesis, and evaluation of salicylic acid-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3259–3264; b) S. A. Hawley, M. D. Fullerton, F. A. Ross, J. D. Schertzer, C. Chevtzoff, K. J. Walker, M. W. Peggie, D. Zibrova, K. A. Green, K. J. Mustard et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* **2012**, *336*, 918–922; c) S. Barman, S. K. Mukhopadhyay, K. K. Behara, S. Dey, N. D. P. Singh. 1-Acetylpyrene-salicylic acid. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2014**, *6*, 7045–7054.

[63] a) J. Luo, S. Preciado, I. Larrosa. Salicylic acids as readily available starting materials for the synthesis of meta-substituted biaryls. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3127–3130; b) Y. Wang, V. Gevorgyan. General method for the synthesis of salicylic acids from phenols through palladium-catalyzed silanol-directed C-H carboxylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2255–2259; *Angew. Chem.*, **2015**, *127*, 2283–2287; c) J. Luo, S. Preciado, I. Larrosa. Overriding ortho-para selectivity via a traceless directing group relay strategy. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4109–4112; d) H. Furukawa, K. E. Cordova, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi. The chemistry and applications of metal-organic frameworks. *Science* **2013**, *341*, 1230444; e) A. Ooguri, K. Nakai, T. Kurahashi, S. Matsubara. Nickel-catalyzed cycloaddition of salicylic acid ketals to alkynes via elimination of ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13194–13195; f) C. Wang, I. Piel, F. Glorius. Palladium-catalyzed intramolecular direct arylation of benzoic acids by tandem decarboxylation/C-H activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4194–4195; g) D. L. Caulder, C. Brückner, R. E. Powers, S. König, T. N. Parac, J. A. Leary, K. N. Raymond. Design, Formation and Properties of Tetrahedral M_4L_4 and M_4L_6 Supramolecular Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8923–8938.

[64] C. Wuensch, S. M. Glueck, J. Gross, D. Koszelewski, M. Schober, K. Faber. Regioselective enzymatic carboxylation of phenols and hydroxystyrene derivatives. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1974–1977.

[65] C. Wuensch, J. Gross, G. Steinkellner, A. Lyskowski, K. Gruber, S. M. Glueck, K. Faber. Regioselective *ortho*-carboxylation of phenols catalyzed by benzoic acid decarboxylases. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 9673–9679.

[66] a) R. Santha, N. Appaji Rao, C. S. Vaidyanathan. Identification of the active-site peptide of 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase from *Aspergillus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1293*, 191–200; b) R. Santha, H. S. Savithri, N. A. Rao, C. S. Vaidyanathan. 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Decarboxylase from *Aspergillus niger*. A Novel Decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 104–110.

[67] T. Matsui, T. Yoshida, T. Yoshimura, T. Nagasawa. Regioselective carboxylation of 1,3-dihydroxybenzene by 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Pandoraea sp.* 12B-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 95–102.

[68] M. Yoshida, N. Fukuhara, T. Oikawa. Thermophilic, reversible γ-resorcylate decarboxylase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005: purification, molecular characterization, and expression. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6855–6863.

[69] Y. Iwasaki, K. Kino, H. Nishide, K. Kirimura. Regioselective and enzymatic production of γ-resorcylic acid from resorcinol using recombinant *Escherichia coli* cells expressing a novel decarboxylase gene. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 819–822.

[70] a) J. Liu, X. Zhang, S. Zhou, P. Tao. Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Chlamydophila pneumoniae* AR39. *Curr. Microbiol.* **2007**, *54*, 102–107; b) T. Matsui, T. Yoshida, T. Hayashi, T. Nagasawa. Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P240. *Arch. Microbiol.* **2006**, *186*, 21–29; c) J. Huang, Z. He, J. Wiegel. Cloning, characterization, and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5119–5122.

[71] a) T. Yoshida, Y. Inami, T. Matsui, T. Nagasawa. Regioselective carboxylation of catechol by 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 701–705; b) Z. He, J. Wiegel. Purification and characterization of an oxygen-sensitive, reversible 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 3539–3543.

[72] a) M. Boll, G. Fuchs. Unusual reactions involved in anaerobic metabolism of phenolic compounds. *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 989–997; b) M. Aresta, E. Quaranta, R. Liberio, C. Dileo, I. Tommasi. Enzymatic synthesis of 4-OH-benzoic acid from phenol and CO_2: the first example of a biotechnological application of a Carboxylase enzyme. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8841–8846.

[73] a) M. Wieser, T. Yoshida, T. Nagasawa. Carbon dioxide fixation by reversible pyrrole-2-carboxylate decarboxylase and its application. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 179–184; b) T. Yoshida, T. Nagasawa. Enzymatic functionalization of aromatic *N*-heterocycles: Hydroxylation and carboxylation. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 111–118.

[74] T. Yoshida, K. Fujita, T. Nagasawa. Novel reversible indole-3-carboxylate decarboxylase catalyzing nonoxidative decarboxylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 2388–2394.

[75] I. Tommasi. Carboxylation of Hydroxyaromatic Compounds with HCO_3^- – by Enzyme Catalysis: Recent Advances Open the Perspective for Valorization of Lignin-Derived Aromatics. *Catalysts* **2019**, *9*, 37.

[76] R. Kluger. Decarboxylation, CO_2 and the reversion problem. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2843–2849.

[77] A. M. Appel, J. E. Bercaw, A. B. Bocarsly, H. Dobbek, D. L. DuBois, M. Dupuis, J. G. Ferry, E. Fujita, R. Hille, P. J. A. Kenis et al. Frontiers, opportunities, and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO_2 fixation. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6621–6658.

[78] a) X. Sheng, Y. Patskovsky, A. Vladimirova, J. B. Bonanno, S. C. Almo, F. Himo, F. M. Raushel. Mechanism and Structure of γ-Resorcylate Decarboxylase. *Biochemistry* **2018**, *57*, 3167–3175; b) X. Sheng, K. Plasch, S. E. Payer, C. Ertl, G. Hofer, W. Keller, S. Braeuer, W. Goessler, S. M. Glueck, F. Himo et al. Reaction Mechanism and Substrate Specificity of *Iso*-orotate Decarboxylase: A Combined Theoretical and Experimental Study. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 608; c) X. Sheng, W. Zhu, J. Huddleston, D. F. Xiang, F. M. Raushel, N. G. J. Richards, F. Himo. A Combined Experimental-Theoretical Study of the LigW-Catalyzed Decarboxylation of 5-Carboxyvanillate in the Metabolic Pathway for Lignin Degradation. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4968–4974.

[79] a) X. Zhang, J. Ren, P. Yao, R. Gong, M. Wang, Q. Wu, D. Zhu. Biochemical characterization and substrate profiling of a reversible 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase for biocatalytic Kolbe-Schmitt reaction. *Enzyme Microb. Technol.* **2018**, *113*, 37–43; b) M. Sato, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, K. Kino. Enzymatic carboxylation of hydroxystilbenes by the γ-resorcylic acid decarboxylase from *Rhizobium radiobacter* WU-0108 under reverse reaction conditions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *122*, 348–352; c) S. Ienaga, S. Kosaka, Y. Honda, Y. Ishii, K. Kirimura. *p*-Aminosalicylic Acid Production by Enzymatic Kolbe–Schmitt Reaction Using Salicylic Acid Decarboxylases Improved through Site-Directed Mutagenesis. *BCSJ* **2013**, *86*, 628–634; d) M. Goto, H. Hayashi, I. Miyahara, K. Hirotsu, M. Yoshida, T. Oikawa. Crystal structures of nonoxidative zinc-dependent 2,6-dihydroxybenzoate (γ-resorcylate) decarboxylase from *Rhizobium sp.* strain MTP-10005. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34365–34373; e) Y. Ishii, Y. Narimatsu, Y. Iwasaki, N. Arai, K. Kino, K. Kirimura. Reversible and nonoxidative γ-resorcylic acid decarboxylase: characterization and gene cloning of a novel enzyme catalyzing carboxylation of resorcinol, 1,3-dihydroxybenzene, from *Rhizobium radiobacter*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 611–620.

[80] K. Plasch, V. Resch, J. Hitce, J. Poplonski, K. Faber, S. M. Glueck. Regioselective Enzymatic Carboxylation of Bioactive (Poly)phenols. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 959–965.

[81] C. Wuensch, N. Schmidt, J. Gross, B. Grischek, S. M. Glueck, K. Faber. Pushing the equilibrium of regio-complementary carboxylation of phenols and hydroxystyrene derivatives. *J. Biotechnol.* **2013**, *168*, 264–270.

[82] J. Ren, P. Yao, S. Yu, W. Dong, Q. Chen, J. Feng, Q. Wu, D. Zhu. An Unprecedented Effective Enzymatic Carboxylation of Phenols. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 564–567.

[83] L. Pesci, P. Gurikov, A. Liese, S. Kara. Amine-Mediated Enzymatic Carboxylation of Phenols Using CO_2 as Substrate Increases Equilibrium Conversions and Reaction Rates. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, 1700332.

[84] R.-Y. Qu, Y.-C. Liu, Q.-Y. Wu, Q. Chen, G.-F. Yang. An efficient method for syntheses of functionalized 6-bulkysubstituted salicylates under microwave irradiation. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8123–8130.

[85] T. P. Blaisdell, J. P. Morken. Hydroxyl-Directed Cross-Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8712–8715.

[86] a) E. R. Aig, J. W. Coffey, A. J. Lovey, M. Rosenberger, US4894480 (A), Hoffmann-La Roche Inc., **1990**; b) M. Klaus, A. J. Lovey, P. Mohr, M. Rosenberger, US5986131 (A), Hoffmann-La Roche Inc., **1999**.

[87] M. Jung, B. Schierbaum, H. Vogel. Extraction of Carboxylic Acids from Aqueous Solutions with the Extractant System Alcohol/Trin-Alkylamines. *Chem. Eng. Technol.* **2000**, *23*, 70–74.

[88] C. S. Lopez-Garzon, A. J. J. Straathof. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 873–904.

[89] N. J. Turner. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573.

[90] U. T. Bornscheuer, B. Hauer, K. E. Jaeger, U. Schwaneberg. Directed Evolution Empowered Redesign of Natural Proteins for the Sustainable Production of Chemicals and Pharmaceuticals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 36–40; *Angew. Chem.*, **2019**, *131*, 36–41.

[91] D. Ghislieri, N. J. Turner. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284–300.

[92] K. Mitsukura, M. Suzuki, S. Shinoda, T. Kuramoto, T. Yoshida, T. Nagasawa. Purification and characterization of a novel (*R*)-imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3587. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1778–1782.

[93] K. Mitsukura, T. Kuramoto, T. Yoshida, N. Kimoto, H. Yamamoto, T. Nagasawa. A NADPH-dependent (*S*)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: purification, characterization, gene cloning, and expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8079–8086.

[94] a) M. Höhne. Engineering imine reductases for industrial applications. *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 841–842; b) N. Zumbrägel, P. Machui, J. Nonnhoff, H. Gröger. Enantioselective Biocatalytic Reduction of 2 H-1,4-Benzoxazines Using Imine Reductases. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 1440–1447; c) N. Borlinghaus, B. M. Nestl. Switching the Cofactor Specificity of an Imine Reductase. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 183–187; d) S. C. Cosgrove, A. Brzezniak, S. P. France, J. I. Ramsden, J. Mangas-Sanchez, S. L. Montgomery, R. S. Heath, N. J. Turner. Imine Reductases, Reductive Aminases, and Amine Oxidases for the Synthesis of Chiral Amines: Discovery, Characterization, and Synthetic Applications. *Methods Enzymol.* **2018**, *608*, 131–149; e) S. P. France, R. M. Howard, J. Steflik, N. J. Weise, J. Mangas-Sanchez, S. L.

Montgomery, R. Crook, R. Kumar, N. J. Turner. Identification of Novel Bacterial Members of the Imine Reductase Enzyme Family that Perform Reductive Amination. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 510–514; f) S. Velikogne, V. Resch, C. Dertnig, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil. Sequence-Based In-silico Discovery, Characterisation, and Biocatalytic Application of a Set of Imine Reductases. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 3236–3246; g) M. Lenz, P. N. Scheller, S. M. Richter, B. Hauer, B. M. Nestl. Cultivation and purification of two stereoselective imine reductases from *Streptosporangium roseum* and *Paenibacillus elgii*. *Protein Expression Purif.* **2017**, *133*, 199–204; h) J. Mangas-Sanchez, S. P. France, S. L. Montgomery, G. A. Aleku, H. Man, M. Sharma, J. I. Ramsden, G. Grogan, N. J. Turner. Imine reductases (IREDs). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 19–25; i) Z. Maugeri, D. Rother. Reductive amination of ketones catalyzed by whole cell biocatalysts containing imine reductases (IREDs). *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 167–170; j) M. Gand, C. Thöle, H. Müller, H. Brundiek, G. Bashiri, M. Höhne. A NADH-accepting imine reductase variant: Immobilization and cofactor regeneration by oxidative deamination. *J. Biotechnol.* **2016**, *230*, 11–18; k) G. Grogan, N. J. Turner. InspIRED by Nature: NADPH-Dependent Imine Reductases (IREDs) as Catalysts for the Preparation of Chiral Amines. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 1900–1907; l) Z. Maugeri, D. Rother. Application of Imine Reductases (IREDs) in Micro-Aqueous Reaction Systems. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 2745–2750; m) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil. Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685; n) M. Gand, H. Müller, R. Wardenga, M. Höhne. Characterization of three novel enzymes with imine reductase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *110*, 126–132; o) F. Leipold, S. Hussain, D. Ghislieri, N. J. Turner. Asymmetric Reduction of Cyclic Imines Catalyzed by a Whole-Cell Biocatalyst Containing an (*S*)-Imine Reductase. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3505–3508; p) P. N. Scheller, S. Fademrecht, S. Hofelzer, J. Pleiss, F. Leipold, N. J. Turner, B. M. Nestl, B. Hauer. Enzyme toolbox: novel enantiocomplementary imine reductases. *ChemBioChem.* **2014**, *15*, 2201–2204; q) M. Rodríguez-Mata, A. Frank, E. Wells, F. Leipold, N. J. Turner, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan. Structure and activity of NADPH-dependent reductase Q1EQE0 from *Streptomyces kanamyceticus*, which catalyses the *R*-selective reduction of an imine substrate. *ChemBioChem.* **2013**, *14*, 1372–1379.

[95] S. Hussain, F. Leipold, H. Man, E. Wells, S. P. France, K. R. Mulholland, G. Grogan, N. J. Turner. An (*R*)-Imine Reductase Biocatalyst for the Asymmetric Reduction of Cyclic Imines. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 579–583.

[96] H. Li, G.-X. Zhang, L.-M. Li, Y.-S. Ou, M.-Y. Wang, C.-X. Li, G.-W. Zheng, J.-H. Xu. A Novel (*R*)-Imine Reductase from *Paenibacillus lactis* for Asymmetric Reduction of 3 *H*-Indoles. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 724–727.

[97] H. Man, E. Wells, S. Hussain, F. Leipold, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, G. Grogan. Structure, Activity and Stereoselectivity of NADPH-Dependent Oxidoreductases Catalysing the *S*-Selective Reduction of the Imine Substrate 2-Methylpyrroline. *ChemBioChem.* **2015**, *16*, 1052–1059.

[98] G. A. Aleku, H. Man, S. P. France, F. Leipold, S. Hussain, L. Toca-Gonzalez, R. Marchington, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan et al. Stereoselectivity and Structural Characterization of an Imine Reductase (IRED) from *Amycolatopsis orientalis*. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3880–3889.

[99] D. Wetzl, M. Berrera, N. Sandon, D. Fishlock, M. Ebeling, M. Müller, S. Hanlon, B. Wirz, H. Iding. Expanding the Imine Reductase Toolbox by Exploring the Bacterial Protein-Sequence Space. *ChemBioChem.* **2015**, *16*, 1749–1756.

[100] a) S. Dreyer, P. Salim, U. Kragl. Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 176–185; b) S. Dreyer, U. Kragl. Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1416–1424; c) S. Oppermann, F. Stein, U. Kragl. Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 493–499.

[101] A. Gummesson, *Dissertation: Thermomorphe Lösungsmittelsysteme unter Verwendung von Ionischen Flüssigkeiten und deren Einsatz in der Biokatalyse*, Universität Rostock, doi: 10.18453/rosdok_id00002592, **2019**.

[102] M. Nordblad, M. D. Gomes, M. P. Meissner, H. Ramesh, J. M. Woodley. Scoping Biocatalyst Performance Using Reaction Trajectory Analysis. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 1101–1114.

[103] a) A. J. L. Costa, M. R. C. Soromenho, K. Shimizu, I. M. Marrucho, J. M. S. S. Esperança, J. N. C. Lopes, L. P. N. Rebelo. Density, thermal expansion and viscosity of cholinium-derived ionic liquids. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1902–1909; b) R. M. Vrikkis, K. J. Fraser, K. Fujita, D. R. Macfarlane, G. D. Elliott. Biocompatible ionic liquids: a new approach for stabilizing proteins in liquid formulation. *J. Biomech. Eng.* **2009**, *131*, 74514; c) H. Weingärtner, C. Cabrele, C. Herrmann. How ionic liquids can help to stabilize native proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 415–426; d) M. Petkovic, J. L. Ferguson, H. Q. N. Gunaratne, R. Ferreira, M. C. Leitão, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo, C. S. Pereira. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids—toxicity and biodegradability. *Green Chem.* **2010**, *12*, 643–649; e) A. Pedro, P. Pereira, M. V. Quental, A. Carvalho, S. M. Santos, J. A. Queiroz, F. Sousa, M. G. Freire. Cholinium-based Good's buffers ionic liquids as remarkable stabilizers and recyclable preservation media for recombinant small RNAs. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**.

Anhang: Originalpublikationen

A.1 Publikation I, Full Paper:

L.-E. Meyer, K. Plasch, U. Kragl, J. von Langermann. Adsorbent-Based Downstream-Processing of the Decarboxylase-Based Synthesis of 2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoic Acid. *Organic Process Research & Development* **2018**, *22*, 963–970.
DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00104

Das Konzept dieser Studie wurde von J. von Langermann und U. Kragl erarbeitet. Sämtliche experimentelle Arbeiten wurden von L.-E. Meyer durchgeführt. Die Ergebnisse wurden von L.-E. Meyer und J. von Langermann analysiert und ausgewertet. Der Manuskriptentwurf wurde von L.-E. Meyer verfasst und anschließend von J. von Langermann überarbeitet. K. Plasch lieferte die Plasmide für die Proteinproduktion.

A.2 Publikation II, Full Paper:

L.-E. Meyer, H. Brundiek, J. von Langermann. Integration of ion exchange resin materials for a downstream-processing approach of an imine reductase-catalyzed reaction. *Biotechnology Progress* **2020**, e3024.
DOI: 10.1002/btpr.3024

Ebenfalls als nicht begutachteter Vorabdruck auf Authorea erschienen mit folgender
DOI: 10.22541/au.157971232.26293480

Das Konzept dieser Studie wurde von J. von Langermann und L.-E. Meyer erarbeitet. Sämtliche experimentelle Arbeiten wurden von L.-E. Meyer durchgeführt. Die Ergebnisse wurden von L.-E. Meyer und J. von Langermann analysiert und ausgewertet. Der Manuskriptentwurf wurde von L.-E. Meyer verfasst und anschließend von J. von Langermann überarbeitet. H. Brundiek lieferte die Plasmide für die Proteinproduktion.

A.3 Publikation III, Full Paper:

L.-E. Meyer, A. Gummesson, U. Kragl, J. von Langermann. Development of Ionic Liquid-Water-Based Thermomorphic Solvent (TMS)-Systems for Biocatalytic Reactions. *Biotechnology Journal* **2019**, *14*, 1900215.
DOI: 10.1002/biot.201900215

Das Konzept dieser Studie wurde von J. von Langermann erarbeitet. Sämtliche experimentelle Arbeiten wurden von L.-E. Meyer und A. Gummesson durchgeführt. Die Ergebnisse wurden von L.-E. Meyer, A. Gummesson und J. von Langermann analysiert und ausgewertet. Der Manuskriptentwurf wurde von L.-E. Meyer verfasst und anschließend von J. von Langermann und U. Kragl überarbeitet.

A.4 **Publikation IV, Review Paper:**

D. Hülsewede*, L.-E. Meyer*, J. von Langermann. Application of In Situ Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes.
Chemistry – a European Journal **2019**, *25*, 4871–4884.
DOI: 10.1002/chem.201804970

*Beide Autoren haben gleichermaßen beigetragen; geteilte Erstautorschaft.

Das Konzept dieses Übersichtsartikels wurde von J. von Langermann erarbeitet. Die Ergebnisse der Literaturrecherche wurden von L.-E. Meyer, D. Hülsewede und J. von Langermann analysiert und ausgewertet. Der Manuskriptentwurf wurde von L.-E. Meyer und D. Hülsewede verfasst und anschließend von J. von Langermann überarbeitet.

A.5 **Publikation V, Review Paper:**

L.-E. Meyer, J. von Langermann, U. Kragl. Recent Developments in Biocatalysis in Multiphasic Ionic Liquid Reaction Systems.
Biophysical Reviews **2018**, *10*, 901–910.
DOI: 10.1007/s12551-018-0423-6

Das Konzept dieses Übersichtsartikels wurde von L.-E. Meyer, J. von Langermann und U. Kragl erarbeitet. Die Ergebnisse der Literaturrecherche wurden von L.-E. Meyer und J. von Langermann analysiert und ausgewertet. Der Manuskriptentwurf wurde von L.-E. Meyer und J. von Langermann verfasst und anschließend von U. Kragl überarbeitet.

A.1 Publikation I

Full Paper. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 963–970.

Adsorbent-Based Downstream-Processing of the Decarboxylase-Based Synthesis of 2,6-Dihydroxy-4-methylbenzoic Acid.

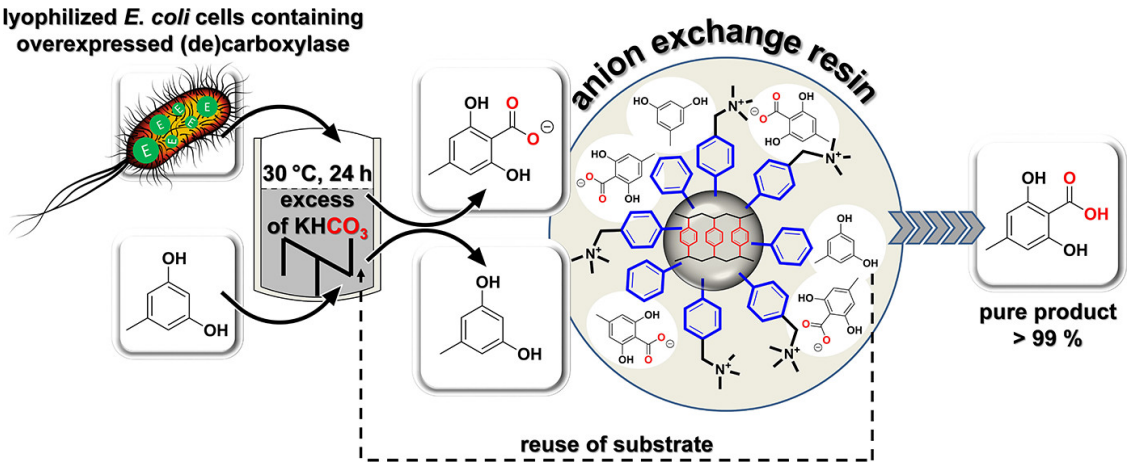
L.-E. Meyer, K. Plasch, U. Kragl, J. von Langermann

Eingereicht: 12. April 2018, Angenommen: 29. Juni 2018

DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00104

Reprinted (adapted) with permission from American Chemical Society.
Copyright 2018 American Chemical Society.

Abstract: In this case study the regioselective enzymatic carboxylation of 3,5-dihydroxytoluene (orcinol) using the nonoxidative 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase from *Aspergillus oryzae* (2,3-DHBD_*Ao*), followed by an adsorbent-based downstream approach, has been investigated. The product 2,6-dihydroxy-4-methylbenzoic acid (DHMBA) was herein purified by an adsorption–desorption cycle and subsequently obtained with purities >99% without a full elimination of the excess bicarbonate from its reaction solution. Ten adsorbent resins were studied in respect of their ability to recover the product from the reaction solution, whereas the strong anion exchange resin Dowex 1x2 in its chloride form showed affinities >99%, even at bicarbonate concentrations of >3 mol·L^{-1}. Desorption from loaded resin was carried out by a 2 mol·L^{-1} HCl/acetone mixture, followed by product crystallization during acetone evaporation. This presented concept does not require a final column preparation step and improves the overall atom efficiency of the biocatalytic reaction system.



DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00104

A.2 Publikation II

Full Paper. *Biotechnol. Progr.* **2020**, e3024.

Integration of ion exchange resin mate-rials for a downstream-processing approach of an imine reductase-catalyzed reaction

L.-E. Meyer, H. Brundiek, J. von Langermann

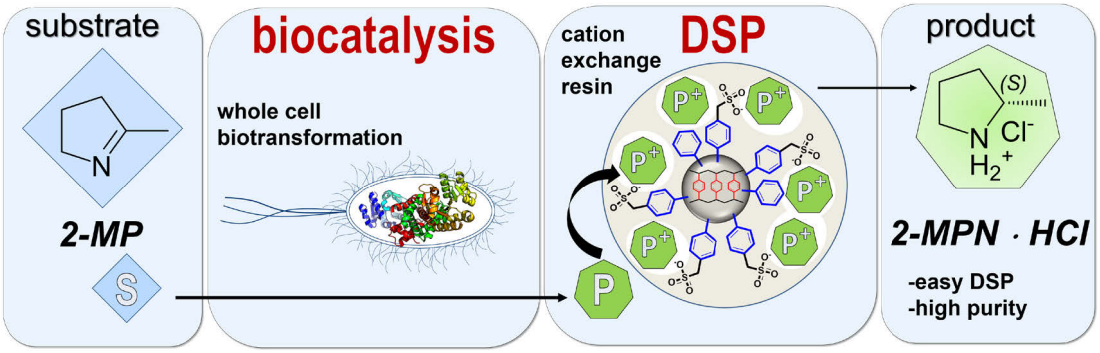
Eingereicht: 30. Januar 2020, Angenommen: 9. Mai 2020

DOI: 10.1002/btpr.3024

Ebenfalls erschienen als Vorabdruck: *Authorea*. Januar 22, 2020.

DOI (Authorea): 10.22541/au.157971232.26293480

Abstract: In this study an ion exchange resin-based downstream-processing approach for imine reductase (IRED)-catalyzed reactions was investigated. As a model reaction, 2-methylpyrroline was converted to its corresponding product (*S*)-2-methylpyrrolodine with >99% of conversion by the (*S*)-selective IRED from *Paenibacillus elgii* B69. Under optimized reaction conditions full conversion was achieved using a substrate concentration of 150 mmol·L^{-1} and 500 mmol·L^{-1} of D-glucose. Seven commercially available cation and anion exchange resins were studied with respect to their ability to recover the product from the reaction solution. Without any pre-treatment, cation exchange resins Amberlite IR-120(H), IRN-150, Dowex Monosphere 650C and Dowex Marathon MSC showed high capacities (up to >90%). A 150 mL-preparative-scale reaction was performed yielding ca. 1 g product with >99% purity. Any further purification steps, e.g. by column chromatography or recrystallization, were not required.



DOI: 10.1002/btpr.3024

A.3 Publikation III

Full Paper. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*, 1900215.

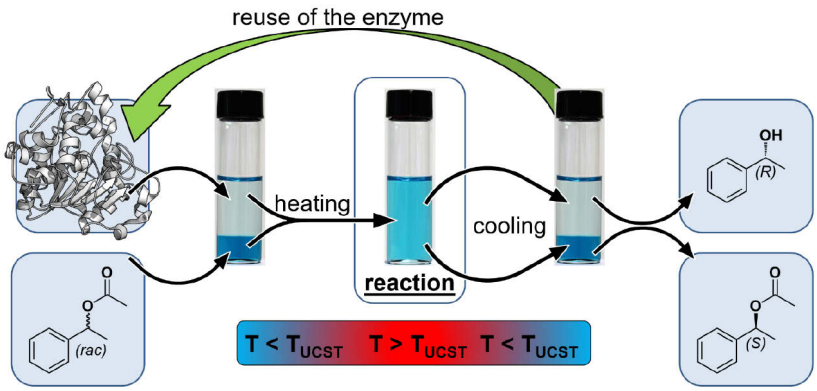
Development of Ionic Liquid-Water-Based Thermomorphic Solvent (TMS)-Systems for Biocatalytic Reactions.

L.-E. Meyer, A. Gummesson, U. Kragl, J. von Langermann

Eingereicht: 21 Mai 2019, Angenommen: 05. Juni 2019

DOI: 10.1002/biot.201900215

Abstract: The applicability of ionic liquid-water-based thermomorphic solvent (TMS)-systems with an upper critical solution temperature (UCST) for homogeneous biocatalysis was investigated. Cholinium- and imidazolium based ionic liquids were used to facilitate a temperature-depended phase change, which can be easily fine-tuned by adding salts or polar organic solvents. Within the TMS-system, a high enzymatic activity and subsequently full conversion was achieved in the intermittent monophasic reaction system of the TMS-system, therefore the biocatalyst can be easily recycled after separating the phases at lower temperatures.



DOI: 10.1002/biot.201900215

A.4 Publikation IV

Review Article. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4871–4884.

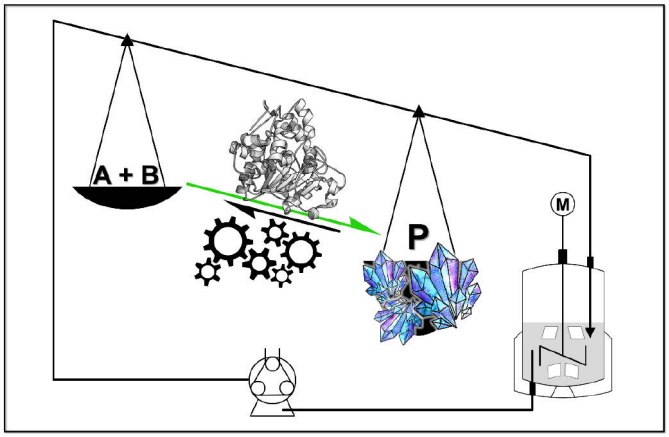
Application of In Situ Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes.

D. Hülsewede*, L.-E. Meyer*, J. von Langermann
*Both authors have contributed equally.

Eingereicht: 01. Oktober 2018, Angenommen: 05. November 2018

DOI: 10.1002/chem.201804970

Abstract: This Minireview highlights the application of crystallization as a very powerful in situ product removal (ISPR) technique in biocatalytic process design. Special emphasis is placed on its use for in situ product crystallization (ISPC) to overcome unfavorable thermodynamic reaction equilibria, inhibition, and undesired reactions. The combination of these unit operations requires an interdisciplinary perspective to find a holistic solution for the underlying bioprocess intensification approach. Representative examples of successful integrated process options are selected, presented, and assessed regarding their overall productivity and applicability. In addition, parallels to the use of adsorption as a very similar technique are drawn and similarities discussed.



Crystallization and biocatalysis: In situ product crystallization is a powerful technique to overcome fundamental limitations in biocatalytic reactions, for example, unfavorable reaction equilibria or product inhibitions (see figure). This Minireview presents basic process considerations within (early) process development and illustrates the high potential of crystallization with selected examples.

DOI: 10.1002/chem.201804970

A.5 Publikation V

Review Article. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 901–910.

Recent Developments in Biocatalysis in Multiphasic Ionic Liquid Reaction Systems.

L.-E. Meyer, J. von Langermann, U. Kragl

Eingereicht: 03. April 2018, Angenommen: 08. April 2018

DOI: 10.1007/s12551-018-0423-6

Abstract: Ionic liquids are well known and frequently used 'designer solvents' for biocatalytic reactions. This review highlights recent achievements in the field of multiphasic ionic liquid-based reaction concepts. It covers classical biphasic systems including supported ionic liquid phases, thermo-regulated multi-component solvent systems (TMS) and polymerized ionic liquids. These powerful concepts combine unique reaction conditions with a high potential for future applications on a laboratory and industrial scale. The presence of a multiphasic system simplifies downstream processing due to the distribution of the catalyst and reactants in different phases.

DOI: 10.1007/s12551-018-0423-6