
PROZESSENTWICKLUNG EINER KONTINUIERLICHEN *IN SITU*-PRODUKTKRISTALLISATION FÜR TRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN

Kumulative Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Dennis Hülsewede, geb. am 11.05.1991 in Bremen
aus Rostock

Rostock, 30.06.2021

1. Gutachter: **Dr. rer. nat. habil. Jan von Langermann**
Universität Rostock
Institut für Chemie
Arbeitsgruppe Biokatalytische Synthese
Albert-Einstein-Str. 3A
18059 Rostock, Deutschland
2. Gutachter: **Univ.-Prof.Dr.rer.nat Robert Kourist**
Technische Universität Graz
Institut für Molekulare Biotechnologie
Petersgasse 14
8010 Graz, Österreich

Eingereicht am: 30.06.2021
Promotionskolloquium: 19.10.2021

Die vorgelegte Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2017 bis Dezember 2020 unter der Betreuung von Dr. rer. nat. habil. Jan von Langermann in der Nachwuchsgruppe Biokatalytische Synthese, am Institut für Chemie der Universität Rostock durchgeführt.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne bestimmte Menschen so nicht möglich gewesen. Diesen Menschen möchte ich an dieser Stelle danken.

Zu Beginn danke ich ganz besonders Dr. habil. Jan von Langermann. Durch seine gute Betreuung hat er mir die Möglichkeit geboten, eigene Ideen umzusetzen und mir beigebracht, wie ich interdisziplinär arbeite und mich gleichzeitig in der wissenschaftlichen Welt präsentiere. Danke für das spannende Thema, die aufregende Zeit und alles was wir zusammen erreicht haben. Weiterhin möchte ich ihm und Prof. Dr. Udo Kragl herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen danken, in der ich die Möglichkeit hatte, verschiedene Bereiche der Chemie kennenzulernen.

Meine Zeit in der Technischen Chemie hat mir nicht zuletzt Spaß gemacht wegen der Menschen, die mit mir gearbeitet haben. Ganz besonders danke ich dabei Ann Jastram und Sandra Diederich. Ihr standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite und das nicht nur, wenn es um die Arbeit ging. Ich bin euch unsagbar dankbar für alles, was ihr für mich getan habt. Zusätzlich haben mich noch Jan-Niklas Dohm, Celina Lehnert, Eric Schönke und Paul Lehmann bei meiner Arbeit unterstützt. Es war mir eine Freude, mit euch zu arbeiten und ich hoffe, ich war ein angenehmer Betreuer. Neben diesen Menschen bin ich natürlich allen Doktoranden, Studenten und Mitarbeitern der Technischen Chemie dankbar. Die gemeinsamen Pausen, in denen wir mehr oder weniger sinnvolle Themen durchaus konstruktiv besprochen haben, waren Highlights meiner Promotion und die gemeinsamen Feierabendbierchen und Feiern haben immer viel Spaß gemacht.

Dankbar bin auch „Dr.“ Peter Kumm, Martin Riedel, Roland Weihs und Patrick Quade. Durch ihre Hilfe konnten all meine Ideen für Reaktoren Realität werden. Besonders „Dr.“ Peter Kumm, Sie haben überwältigende Arbeit geleistet und nicht einfach nur meine Konstruktionswünsche erfüllt, sondern sie jedes Mal bei Weitem übertrffen.

Dr. Dirk Michalik und Heike Borgwaldt bin ich dankbar dafür, dass sie sich immer wieder so schnell und sorgfältig um meine NMR-Messungen gekümmert haben. Zusätzlich hatte Dr. Dirk Michalik immer für einen Zeit, um Spektren zu besprechen, theoretische Grundlagen zu erklären und sich über NMR-Autosampler zu unterhalten.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Martin Köckerling danke ich für die Möglichkeit, meine XRPD-Messungen selbstständig durchzuführen. Im Speziellen danke ich Dr. Niels Ole Giltzau und Florian Schröder, dass sie mich in die Messtechnik eingearbeitet haben und mir bei den Messungen zur Seite standen.

Prof. Dr. Hubert Bahl, Prof. Dr. Mirko Basen, Dr. Ralf-Jörg Fischer und der ganzen Mikrobiologie möchte ich danken, dass ich bei euch arbeiten durfte und ihr mich regelrecht in euren Arbeitskreis aufgenommen habt. Ilona Boldt, Hella Goschke und Monika Timm haben mir bei jeder noch so kleinen Frage geholfen und mit Dr. Maria „Kary“ Lehmann, Laura Nissen und Christoph Baum habe ich nicht nur neue Kollegen, sondern auch neue Freunde gewonnen.

Marc, Amira und Elke sind bereits seit vielen Jahren Teil meines Lebens. Unsere Wege verliefen nicht immer gemeinsam, aber dennoch wart ihr immer für mich da, auch wenn man sich mal längere Zeit nicht gesehen oder gesprochen hat. Ihr seid für mich der Inbegriff von Freundschaft und ihr werdet mich nie wieder los.

Abschließend danke ich natürlich noch meinen Eltern und meiner Schwester. Ihr habt es überhaupt erst möglich gemacht, dass ich diesen Weg gehen kann und habt mich an jedem Punkt meines Lebens und bei jeder meiner Entscheidungen unterstützt. Ich bin euch so dankbar für alles!

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: ENERGIEDIAGRAMM EINER EXOTHERMEN REAKTION MIT UND OHNE KATALYSATOR.	1
ABBILDUNG 2: KRISTALLSTRUKTUR DER AMINTRANSAMINASE	3
ABBILDUNG 3: REAKTIONSZYKLUS VON PYRIDOXALPHOSPHAT UND PYRIDOXAMINPHOSPHAT IN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN.....	4
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ELEMENTARZELLE EINES NaCl-KRISTALLS....	6
ABBILDUNG 5: KRISTALLMORPHOLOGIE DER SALZE ISOPROPYLAMMONIUM-3,3-DIPHENYLPROPIONAT	7
ABBILDUNG 6:SCHEMATISCHER AUFBAU EINES BINÄREN, EUTEKTISCHEN PHASENDIAGRAMMS....	8
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER AUFBAU DER BINÄREN PHASENDIAGRAMME VON VERBINDUNGSBILDENDEN UND MISCHKRISTALLBILDENDEN GEMISCHEN.	9
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER AUFBAU VON TERNÄREN PHASENDIAGRAMMEN EINER EINFACHEN EUTEKTISCHEN MISCHUNG, VERBINDUNGSBILDENDE UND MISCHKRISTALLBILDENDE GEMISCHE. ...	9
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER LÖSLICHKEITSKURVE ALS AUSSCHNITT EINES BINÄREN EUTEKTISCHEN PHASENDIAGRAMMS.	10
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER KEIMBILDUNGSRÄTEN UND DER KEIMBILDUNGSARTEN.	11
ABBILDUNG 11: ZEIT- UND ORTSABHÄNGIGE KONZENTRATIONSVERLÄUFE FÜR DIE VERSCHIEDENEN IDEALEN REAKTORARTEN	12
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG VON DIREKTER UND INDIREKTER KRISTALLISATION IN INTERNEN UND EXTERNEN VERFAHREN.	13
ABBILDUNG 13: SPEZIELLE DONORAMINE FÜR TRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN	15
ABBILDUNG 14: DARSTELLUNG DER VIER GRUNDSÄTZLICHEN KASKADEN ARTEN	16
ABBILDUNG 15: ENZYMKASKADEN FÜR DIE UMWANDLUNG DES Co-PRODUKTS VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN MITTELNS DONORAMIN	16
ABBILDUNG 16: ENZYMKASKADE AUS TRANSAMINASE UND ALKOHOLDEHYDROGENASE ZUR HERSTELLUNG VON 1,2-AMINOALKOHOLEN.....	17
ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZIELS DIESER ARBEIT.	21
ABBILDUNG 18: CARBONSÄUREN FÜR DIE AMMONIUMKRISTALLISATION IN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN.	22
ABBILDUNG 19: KONZEPT ZUR KOMBINATION VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN UND <i>IN SITU</i> -PRODUKTKRISTALLISATION.	23
ABBILDUNG 20: EINFLUSS VON 43CNA, DPAA UND 3DPPA AUF AMINTRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN.	23
ABBILDUNG 21: ZEITVERLAUFSKURVEN FÜR EINE TRANSAMINASE-KATALYSIERTE SYNTHESE VON (S)-1-PHENYLETHYLAMIN MIT UND OHNE ISPC.	24
ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KONTINUIERLICHEN LÖSENS VON DONORSALZ UND KRISTALLISATION VON PRODUKSALZ BEI TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN. ..	26
ABBILDUNG 23: ATA-KATALYSIERTE REAKTION ZUR SYNTHESE VON 3MPEA ALS GRUNDBAUSTEIN FÜR RIVASTIGMIN.....	27
ABBILDUNG 24: PRÄPARATIVER ISPC-PROZESS FÜR DIE SYNTHESE VON (S)-1-(3-METHOXYPHENYL)ETHYLAMMONIUM-3,3-DIPHENYLPROPIONAT.	28
ABBILDUNG 25: REAKTORGEOMETRIE DES MEMBRANREAKTORS MIT POLYVINYLDENFLUORID-MEMBRAN.....	29
ABBILDUNG 26: 3MPEA-KONZENTRATIONSVERLAUF DER BEIDEN KAMMERN DES MEMBRANREAKTORS.....	30

ABBILDUNG 27: REAKTIONSSCHEMA DER KONTINUIERLICHEN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTION.....	31
ABBILDUNG 28: 3MPEA-KONZENTRATIONSVERLAUF IN DER ENZYMKAMMER UND DEM GESAMTEN REAKTORSYSTEM.....	32

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: GITTERKONSTANTEN UND WINKEL DER SIEBEN KRISTALLSYSTEME	7
TABELLE 2: E-FAKTOREN DER CHEMISCHEN INDUSTRIE	20
TABELLE 3: ERWEITERTES SUBSTRATSPEKTRUM FÜR ISPC-UNTERSTÜTZTE TRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN	25
TABELLE 4: OPTIMIERTE KONZENTRATIONEN FÜR DIE DONORSALZ-GESTÜTZTE ISPC VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN	27

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3DPPA	3,3-Diphenylpropionsäure (engl. <i>3,3-diphenylpropionic acid</i>)
3MAP	3-Methoxyacetophenon
3MPEA	(S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin
3MPEA-3DPPA	(S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylammonium-3,3-diphenylpropionat
43CNA	4-Chlor-3-nitrobenzoësäure (engl. <i>4-chloro-3-nitrobenzoic acid</i>)
AADH	Aminosäuredehydrogenase (engl. <i>amino acid dehydrogenase</i>)
ADH	Alkoholdehydrogenase
AP	Acetophenon
ATA	Amintransaminase
ATP	Adenosintriphosphat
CSTR	kontinuierlicher Rührkesselreaktor (engl. <i>continuously stirred tank reactor</i>)
DPAA	Diphenylessigsäure (engl. <i>diphenylacetic acid</i>)
E-Faktor	Umweltfaktor (engl. <i>environmental factor</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPA	Isopropylamin
IPA-3DPPA	Isopropylammonium-3,3-diphenylpropionat
ISPC	<i>in situ</i> -Produktkristallisation (engl. <i>in situ-product cristallization</i>)
ISPR	<i>in situ</i> -Produktentfernung (engl. <i>in situ product removal</i>)
LDH	Lactatdehydrogenase
NADP+	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PEA	(S)-1-Phenylethylamin
PFR	Strömungsrohrreaktor (engl. <i>plug flow reactor</i>)
PLP	Pyridoxalphosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>stirred tank reactor</i>)
STY	Raum-Zeit-Ausbeute (engl. <i>space time yield</i>)
TA	Transaminase
XRD	Röntgenbeugung (engl. <i>X-ray diffraction</i>)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	KATALYSE.....	1
1.2	BIOKATALYSE.....	2
1.2.1	AUFBAU VON ENZYMEN.....	2
1.2.2	ENZYMKLASSIFIZIERUNG	3
1.2.3	TRANSAMINASEN	4
1.2.4	EINSATZFORM VON BIOKATALYSATOREN.....	5
1.3	FÄLLUNG UND KRISTALLISATION	6
1.3.1	KRISTALLSTRUKTUR	6
1.3.2	PHASENDIAGRAMME	8
1.3.3	LÖSLICHKEIT UND NUKLEATION	10
1.3.4	KRISTALLISATION IN DER VERFAHRENSTECHNIK	11
1.4	GLEICHGEWICHTSVERSCHIEBUNG	14
1.4.1	AUSTRAGEN LEICHT FLÜCHTIGER PRODUKTE	14
1.4.2	SPEZIELLE DONOREN	15
1.4.3	ENZYMKASKADEN	15
1.4.4	<i>IN SITU</i> -PRODUKTKRISTALLISATION.....	17
1.5	KENNZAHLEN DER PROZESSENTWICKLUNG	18
II.	ZIEL DIESER ARBEIT.....	21
III.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	22
3.1	KOMBINATION VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN UND ISPC	22
3.2	GRUNDLAGEN FÜR EINE KONTINUIERLICHE REAKTIONSFÜHRUNG	26
3.3	DESIGN EINES REAKTORMODELLS	29
IV.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBlick.....	33
V.	LITERATURVERZEICHNIS	34
VI.	1. PUBLIKATION	38
VII.	2. PUBLIKATION	43
VIII.	3. PUBLIKATION	45
IX.	4. PUBLIKATION	53
X.	5. PUBLIKATION	68
XI.	6. PUBLIKATION	75
XII.	WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF	89
XIII.	DOKTORANDEN-ERKLÄRUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

KURZFASSUNG

Die vorgelegte Arbeit beschreibt eine nicht-katalytische Methode zur Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts und der Produktivität von Transaminase-katalysierten Reaktionen. Durch die Zugabe einer Carbonsäure wird selektiv das Produktamin als schwerlösliches Ammoniumsalz auskristallisiert und somit von der flüssigen Phase der Reaktionslösung abgetrennt. Diese als *in situ*-Produktkristallisation bezeichnete Methode verschiebt dabei das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite. Das Produktamin kann anschließend mittels Filtration von der Reaktionslösung abgetrennt werden.

Um den stöchiometrischen Einsatz des Donoramins möglich zu machen, wird dieses als Ammoniumsalz der Carbonsäure zugegeben. Dieser halbkontinuierliche Prozess ermöglicht zusätzlich eine automatische Nachdosierung des Donoramins und der Carbonsäure. Das so entwickelte Reaktionskonzept lässt sich auf verschiedene aromatische und aliphatische Substrate anwenden und ist von der Art der Transaminase unabhängig.

Zur weiteren Steigerung der Produktivität wurde ein semi-kontinuierliches Reaktorsystem entwickelt, welches den Ganzzellbiokatalysator in einem Membranreaktor immobilisiert. Sowohl die Substratnachdosierung als auch die Kristallisation des Produktsalzes werden dabei jeweils in externen Gefäßen durchgeführt, um die Reinheit des Produktamins dauerhaft zu gewährleisten. Somit können chirale Amine auf biokatalytischem Weg kontinuierlich hergestellt werden, ohne dass im Anschluss ein aufwendiges Downstream-Processing durchgeführt werden muss.

ABSTRACT

The presented work describes a non-catalytic method to shift the reaction equilibrium and productivity of transaminase-catalyzed reactions. The addition of a carboxylic acid selectively crystallizes the product amine as a sparingly soluble ammonium salt and thus separates it from the liquid phase of the reaction solution. This method, known as *in situ*-product crystallization, shifts the reaction equilibrium to the product side. The product amine can then be separated from the reaction solution by filtration.

To make the stoichiometric use of the donor amine possible, it is added as an ammonium salt of the carboxylic acid. This semi-continuous process also allows automatic feeding of the donor amine and the carboxylic acid. The reaction concept developed in this work can be applied to various aromatic and aliphatic substrates and is independent of the type of transaminase.

To further increase productivity, a semi-continuous reactor system was developed that immobilizes the whole-cell biocatalyst in a membrane reactor. Both substrate feeding and crystallization of the product salt are carried out in external vessels to permanently guarantee the purity of the product amine. In this way, chiral amines can be produced continuously by biocatalytic methods without the need for complex downstream-processing.

I. EINLEITUNG

Eine chemische Reaktion ist nur dann thermodynamisch erlaubt, wenn die freie Reaktionsenthalpie negativ ist. Dieser Fall tritt ein, sobald die freie Enthalpie oder Gibbs-Energie des Produktes geringer ist als die des Substrates. Mit einer negativen freie Reaktionsenthalpie läuft die Reaktion freiwillig ab, da dadurch auch die Entropie steigt. Ist die freie Reaktionsenthalpie hingegen positiv, würde nur die Rückreaktion freiwillig ablaufen. Wenn eine Mischung aus Substrat und Produkt die geringste Gibbs-Energie und somit die höchste Entropie aufweist, befindet sich die Reaktion in einem thermodynamischen Gleichgewichtszustand. Daraus folgt, dass die Hin- und Rückreaktion nicht nur zeitgleich, sondern auch mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Dadurch sind die Konzentrationen von Substrat und Produkt konstant sowie ungleich Null.

1.1 KATALYSE

In einigen Fällen durchläuft die Reaktion einen Übergangszustand, der energetisch höher liegt als der Energiezustand der Substrate (Abbildung 1). Die Energiedifferenz zwischen Substrat und Übergangszustand ergibt die sogenannte Aktivierungsenergie ΔE_A . Diese Energie muss mindestens aufgebracht werden, damit die Reaktion ablaufen kann. Eine hohe Aktivierungsenergie bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass die Reaktion nicht ablaufen kann. Ihre Reaktionsgeschwindigkeit ist durch die hohe Energiebarriere lediglich stark verringert und demnach kinetisch gehemmt.

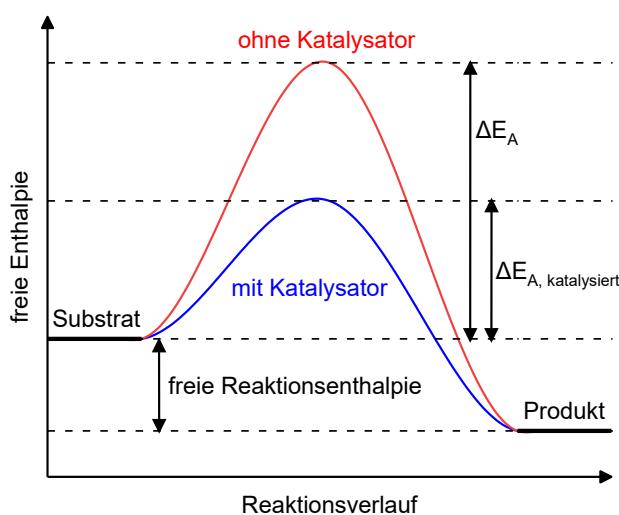


ABBILDUNG 1: ENERGEDIAGRAMM EINER EXOTHERMEN REAKTION MIT UND OHNE KATALYSATOR.

In vielen Fällen ist die Erhöhung der Reaktionstemperatur die einfachste Methode, um die Aktivierungsenergie zu überwinden. Wenn die Reaktionstemperatur auf Grund von sensiblen Substanzen oder zu hohen Kosten jedoch nicht erhöht werden kann, müssen andere Techniken genutzt werden. Eine etablierte Möglichkeit ist der Einsatz von Katalysatoren, welche zusammen mit dem Substrat einen energetisch niedrig liegenden Übergangszustand bilden, wodurch die Aktivierungsenergie gesenkt wird. Nachdem das Substrat zum Produkt

reagiert ist, trennt es sich vom Katalysator, welcher dann wieder in seiner Ursprungsform vorliegt. Zusätzlich kann die Selektivität erhöht werden, indem durch sterische Hinderungen unerwünschte Nebenreaktionen unterdrückt werden.

Katalysatoren können in verschiedene Kategorien unterteilt werden, wobei am häufigsten zwischen homogenen und heterogenen Katalysatoren unterschieden wird. Homogene Katalysatoren, in Form von organischen Verbindungen oder Metallionen mit organischen Liganden, befinden sich in derselben Phase wie das Substrat. Heterogene Katalysatoren hingegen, wie Metallionen auf einem festen Trägermaterial, in einer anderen Phase als das Substrat.

1.2 BIOKATALYSE

Eine gesonderte Kategorie bilden die Biokatalysatoren, welche in allen Lebewesen vorkommen und dort die Stoffwechselvorgänge katalysieren. Diese natürlichen Katalysatoren wurden im Zuge der Evolution an jeweils spezifische Bedingungen angepasst. Die dabei katalysierten Reaktionen weisen strukturbedingt in der Regel eine hohe Regio-, Chemo- und Stereoselektivität auf. Durch ihren komplexen Aufbau bieten diese Katalysatoren viele Möglichkeiten, mittels verschiedener biochemischer Methoden noch weiter auf bestimmte Anwendungen angepasst zu werden. Da Biokatalysatoren normalerweise recht einfach durch fermentative Prozesse hergestellt werden können und zudem auch biologisch abbaubar sind, stellen sie allein aus ökologischen Gründen eine gute Substitution für klassische homogene und heterogene Katalysatoren dar. Damit Biokatalysatoren eine hohe Produktivität erreichen, müssen diese in der Regel aufwendig optimiert werden. Die damit einhergehenden hohen Kosten werden durch die milden Reaktionsbedingungen, bei denen diese Katalysatoren aktiv sind, kompensiert.

1.2.1 AUFBAU VON ENZYMEN

In der Biokatalyse werden Enzyme als Katalysatoren für verschiedenste chemische Reaktionen eingesetzt. Sie bestehen zu großen Teilen bzw. vollständig aus Proteinen. Diese Makromoleküle sind aus einzelnen Aminosäuren aufgebaut, welche über Peptidbindungen verknüpft sind und dadurch Polypeptide bilden. Durch definierte Faltung im Raum formen sie das Protein. Der Aufbau eines Proteins kann in verschiedene Strukturelemente unterteilt werden:

- Primärstruktur: Reihenfolge oder Sequenz, in der die Aminosäuren miteinander verknüpft sind
- Sekundärstruktur: Faltung einzelner kleiner Abschnitte des Proteins (α -Helix, β -Faltblatt)
- Tertiärstruktur: Räumlicher Aufbau des gesamten Proteins (globulär, fibrillär).
- Quartärstruktur: Ausrichtung von mehreren Polypeptiden zueinander

Während die Primärstruktur durch Sequenzierung ermittelt werden kann, werden die übrigen Strukturelemente durch Röntgenbeugung und Kernspinresonanz bestimmt. Um Kristallstrukturen wie die in Abbildung 2 zu erhalten, muss das untersuchte Protein aufgereinigt und kristallisiert werden. Im Vergleich zur Sequenzierung und zu Kernspinresonanz-Messungen ist dies jedoch deutlich anspruchsvoller.

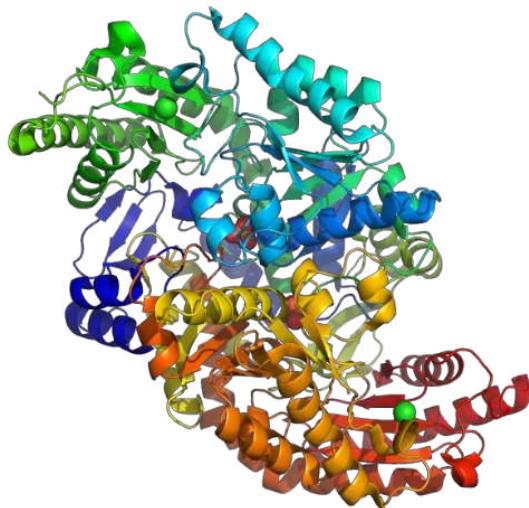


ABBILDUNG 2: KRISTALLSTRUKTUR DER AMINTRANSAMINASE EC 2.6.1.18 AUS RUEGERIA (*SILICIBACTER*) POMEROYI.^[1]

Durch die Faltung entstehen ein bzw. mehrere sogenannte aktive Zentren, an denen dann katalytische Reaktionen ablaufen können. In den meisten Fällen ist ein bloßes Polypeptid aber nicht ausreichend, um ein aktives Zentrum zu bilden. Viele Enzyme benötigen zusätzlich einen sogenannten Cofaktor, welcher im oder nahe dem aktiven Zentrum des Enzyms auf verschiedene Weisen gebunden sein kann. Diese kleinen organischen Moleküle (nicht Aminosäuren) oder Metallionen sind für die katalytische Reaktion unerlässlich und müssen in vielen Fällen nach der Reaktion regeneriert werden. Die Regeneration kann im Enzym selbst oder außerhalb des Enzyms passieren. Häufige Cofaktoren sind Adenosintriphosphat (ATP) für die Bereitstellung von Energie durch Abspaltung von Phosphatgruppen, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP^+) für Redoxreaktionen oder Pyridoxalphosphat (PLP) für die Übertragung von Aminogruppen.

1.2.2 ENZYMKLASSIFIZIERUNG

Anhand der Reaktion, welche ein Enzym katalysiert, kann es einer von sieben verschiedenen Enzymklassen zugeordnet werden. Um die Klassen voneinander zu unterscheiden, wurden die sogenannten EC-Nummern (engl. *Enzyme Commission numbers*) durch die *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* eingeführt. Die EC-Nummer besteht aus insgesamt vier Ziffern, die der genaueren Unterteilung in den jeweiligen Hauptklassen dienen:

- EC 1.-.-.: Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen
- EC 2.-.-.: Transferasen transferieren ganze funktionelle Gruppen
- EC 3.-.-.: Hydrolasen spalten Bindungen unter Nutzung von H_2O
- EC 4.-.-.: Lyasen katalysieren die Bildung oder Spaltung von Bindungen
- EC 5.-.-.: Isomerasen ermöglichen Umwandlungen innerhalb eines Moleküls
- EC 6.-.-.: Ligasen knüpfen kovalente Bindungen unter Nutzung von Energie (ATP)
- EC 7.-.-.: Translokasen katalysieren den Transport an Zellmembranen oder durch sie hindurch

Zur eindeutigen Kennzeichnung ist die EC-Nummer aber nicht ausreichend, da verschiedene Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren können. Wenn demnach zwei unterschiedliche

Enzyme eine Reaktion auf analoge Weise katalysieren, besitzen sie identische EC-Nummern. Um ein Enzym eindeutig zu klassifizieren, werden deswegen der Ursprung des Enzyms und gegebenenfalls weitere Modifikationen am Biokatalysator mit angegeben.

1.2.3 TRANSAMINASEN

Die erste Beschreibung einer Transaminierung erfolgte durch Dorothy M. Needham. 1930 versetzte sie zerkleinerte Taubenbrustmuskulatur mit Glutaminsäure, welche zersetzt wurde, ohne dass Ammoniak entstand.^[2] Dies führte sie zu der Annahme, dass die Aminogruppe auf ein anderes Molekül übertragen wurde. In den folgenden Jahren konnten Braunstein und Kitzmann die Annahme bestätigen, indem sie mittels Muskelbrei die Aminogruppe der Glutaminsäure auf Pyruvat übertrugen, wodurch Alanin entstand.^[3] Das Enzym, das für diese Reaktion verantwortlich ist, wurde dann später von Cohen als Transaminase definiert.^[4] Eine Transaminase (TA) ist demnach ein Enzym, das Aminogruppen von einem Donoramin auf einen Aminakzeptor überträgt und dabei im Idealfall sehr selektiv ein chirales Amin herstellen kann. Für die Übertragung ist der Cofaktor PLP notwendig, welcher über eine Phosphatgruppe im aktiven Zentrum koordinativ gebunden ist. Vor der Aufnahme einer Aminogruppe ist das PLP zusätzlich durch eine Iminbindung mit einem Lysin-Rest (Lys) des Enzyms im aktiven Zentrum fixiert.^[5]

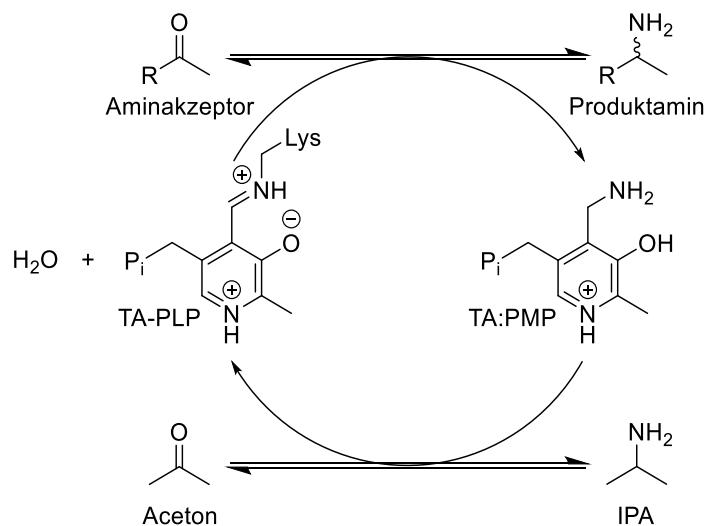


ABBILDUNG 3: REAKTIONSZYKLUS VON PYRIDOXALPHOSPHAT (PLP) UND PYRIDOXAMINPHOSPHAT (PMP) IN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN.

Aus Kostengründen wird im synthetischen und präparativen Bereich hauptsächlich das Donoramin Isopropylamin (IPA) eingesetzt. Dabei wird die Aminogruppe vom IPA auf das PLP übertragen, wodurch Pyridoxaminphosphat (PMP) gebildet wird. Als Nebenprodukt entsteht Aceton, welches das aktive Zentrum verlässt. Die Aminogruppe wird anschließend auf den Aminakzeptor übertragen. Dieser ist idealerweise durch die Form des aktiven Zentrums so ausgerichtet, dass selektiv nur ein Enantiomer hergestellt werden kann. Anschließend liegt der Cofaktor wieder als PLP im aktiven Zentrum vor, wodurch eine neue Aminogruppe aufgenommen werden kann. Je nach Substrat, können TAs in drei Gruppen unterteilt werden^[1]:

- α -Transaminasen: Übertragen von Aminogruppen zwischen α -Ketosäuren und α -Aminosäuren
- ω -Transaminasen: Transferieren von Aminogruppen zwischen Ketosäuren und Aminosäuren, bei denen die Keto- beziehungsweise Aminogruppe weiter von der Carboxylgruppe entfernt ist (zum Beispiel in β - oder γ -Position)
- Amintransaminasen: Untergruppe der ω -Transaminasen, die Amine und Ketone als Substrat annehmen, ohne dass Carboxylgruppen vorhanden sein müssen

Bei der in dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzten TA handelt es sich um die Amintransaminase aus *Ruegeria (Silicibacter) pomeroyi* (EC 2.6.1.18). Die Kristallstruktur dieser Amintransaminase ist in Abbildung 2 gezeigt.

1.2.4 EINSATZFORMEN VON BIORAETALYSATOREN

Enzyme können auf verschiedene Weisen in einer Reaktionslösung vorliegen. Bei der Fermentation werden lebendige Mikroorganismen eingesetzt, bei denen die gewünschten katalytischen Reaktionen Teil des (modifizierten) Stoffwechselsystems sind. Enzyme in ganzen Zellen sind in der Regel stabiler und die Regeneration des Cofaktors läuft in vielen Fällen automatisch ab. Da die Mikroorganismen lebendig sind, brauchen sie Nährstoffe und definierte Bedingungen, um während der Fermentationszeit zu überleben. Zusätzlich produzieren sie im Zuge ihres Metabolismus, unerwünschte Nebenprodukte. Sowohl die Nährstoffe als auch die Nebenprodukte können die anschließende Aufreinigung der Zielprodukte zusätzlich erschweren.

In vielen Fällen ist es deswegen einfacher, die Überexpression des Zielenzyms in einer Zelle durchzuführen. Dabei wird das Enzym verstärkt hergestellt und dann direkt genutzt, ohne die Zelle aktiv am Leben zu halten. Da es bei der Ganzzellbiokatalyse verstärkt zu Nebenreaktionen kommen kann, auf Grund anderer zelleigener Enzyme oder durch Diffusionsprobleme durch die Zellmembran, werden die Enzyme in vielen Fällen noch aufgereinigt. Hierfür wird die Zelle anhand verschiedener Methoden lysiert (Aufbrechen der Zellmembran mit Hilfe von Scherkräften, Ultraschall oder Chemikalien) und die großen Zellfragmente mittels Zentrifugation abgetrennt. Das so erhaltene Rohextrakt kann dann genutzt oder mithilfe chromatographischer Methoden weiter aufgereinigt werden, um das isolierte Enzym zu erhalten. Durch die meist zeit- und kostenintensive Aufreinigung kann die spezifische Aktivität deutlich gesteigert und Nebenreaktionen unterdrückt werden, was jedoch in vielen Fällen die Stabilität des Enzyms senkt. Um dies zu verhindern kann das Enzym in vielen Fällen immobilisiert werden, was einerseits eine Rezyklierbarkeit der Enzyme gewährleisten und andererseits eine Kontamination der Produkte vermeiden kann. Da die Art der Immobilisierung in der Regel auf das Enzym angepasst werden muss, haben sich verschiedene Techniken entwickelt, die in drei grundlegende Kategorien unterteilen werden können.

Bei der Bindung an ein Trägermaterial wird das Enzym an der Oberfläche, zum Beispiel durch ionische oder kovalente Bindung, immobilisiert. Ähnlich dazu ist die Einschlusimmobilisierung, bei der das Enzym in einer anorganischen oder organischen Polymermatrix eingebettet wird. Für die dritte Methode werden sogenannte Cross-Linker genutzt, um Enzyme untereinander zu verbinden und somit makroskopische Partikel zu formen, die gegebenenfalls durch Filter und Membranen zurückgehalten werden können.^[6]

1.3 FÄLLUNG UND KRISTALLISATION

Als Fällung wird das Ausscheiden einer Substanz aus einer Lösung bezeichnet. Durch die Änderung der Umgebungsbedingungen kann die Löslichkeit einer Substanz überschritten werden, wodurch sie sich in fester Form niederschlägt. Die feste Substanz kann dann als amorphe Verbindung (keine Fernordnung in der festen Phase) vorliegen. Wenn sie hingegen eine kristalline Struktur und somit eine Fernordnung aufweist, wird der Vorgang als Kristallisation bezeichnet.

1.3.1 KRISTALLSTRUKTUR

Im Gegensatz zu amorphen Verbindungen besitzen Kristalle eine in alle Raumrichtungen periodisch aufgebaute Struktur. Die sogenannte Elementarzelle ist dabei der kleinstmögliche Baustein, welcher durch Erweiterung in alle Raumrichtungen das Kristallgitter beschreibt. Eine Elementarzelle kann aus einem oder mehreren Atomen, Molekülen oder Ionen bestehen und wird durch die Gitterkonstanten a , b und c sowie die Winkel α , β und γ beschrieben (Abbildung 4).^[7]

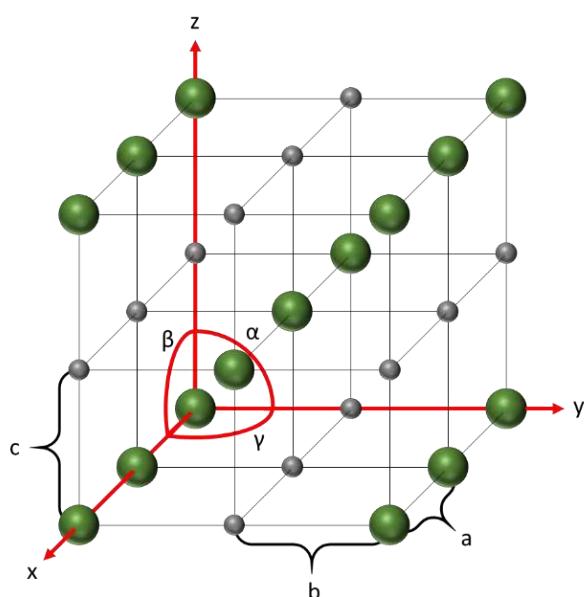


ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ELEMENTARZELLE EINES NaCl-KRISTALLS.

Die Elementarzellen von Kristallen können, basierend auf den unterschiedlichen Gitterkonstanten und Winkeln, in sieben verschiedene Kristallklassen unterteilt werden. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

TABELLE 1: GITTERKONSTANTEN UND WINKEL DER SIEBEN KRISTALLSYSTEME.^[8]

System	Gitterkonstanten	Winkel
Kubisch (regulär)	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b; c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Rhombisch (orthorhombisch)	$a; b; c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Monoklin	$a; b; c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta$
Trigonal (rhomboedrisch)	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma$
Hexagonal	$a = b; c$	$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$
Triklin	$a; b; c$	$\alpha; \beta; \gamma$

Auf Grundlage der Kristallklasse kann aber noch keine eindeutige Aussage über die Form des Kristalls getroffen werden. Um die äußere Form zu beschreiben sind die Kristalltracht (Tracht) und der Kristallhabitus (Habitus) notwendig. Die Tracht beschreibt die Zahl und Art der äußeren Flächen des Kristalls, wohingegen der Habitus die Größenverhältnisse der Flächen zueinander darstellt.^[9] Die in dieser Arbeit verwendeten Salze Isopropylammonium-3,3-diphenylpropionat (IPA-3DPPA) und (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylammonium-3,3-diphenylpropionat (3MPEA-3DPPA) weisen zum Beispiel einen prismatischen bis nadelförmigen Habitus (Abbildung 5) auf.

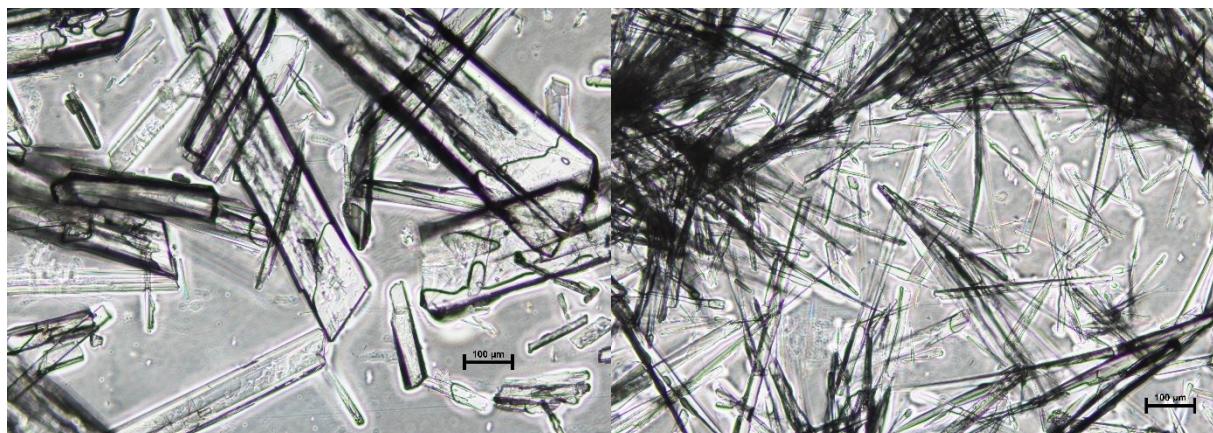


ABBILDUNG 5: KRISTALLMORPHOLOGIE DER SALZE ISOPROPYLAMMONIUM-3,3-DIPHENYLPROPIONAT (LINKS) UND (S)-1-(3-METHOXYPHENYL)ETHYLAHMONIUM-3,3-DIPHENYLPROPIONAT (RECHTS).

Zur Strukturaufklärung von Kristallen werden in der Regel Röntgenbeugungsmessungen (engl. *X-ray diffraction*, XRD) von Einkristallen durchgeführt. Durch die XRD-Messungen können dann Aussagen über das Kristallgitter getroffen werden. Tracht und Habitus sowie das Wachstumsverhalten werden hingegen über mikroskopische Messungen bestimmt.

1.3.2 PHASENDIAGRAMME

Mittels Phasendiagrammen werden die Verhältnisse der einzelnen Phasen eines Systems, unter definierten Bedingungen (Temperatur, Druck, Zusammensetzung), im Gleichgewichtszustand dargestellt. In Abbildung 6 ist ein schematisches, binäres, eutektisches Phasendiagramm gezeigt, an dem im Folgenden der Aufbau erklärt werden soll. Ein solches binäres Schmelzphasen-Diagramm zeigt, in welcher Form zwei Substanzen im Gleichgewicht vorliegen. Auf der Abszisse werden die Massenanteile der Substanzen in der Mischung aufgetragen, wobei in den Außenbereichen die reinen Substanzen A und B vorliegen. Die beiden markierten Schnittpunkte T_A und T_B auf der temperaturabhängigen Ordinate stellen die Schmelzpunkte der reinen Substanzen dar. Durch Verringerung des Molenbruchs x kommt es zu einer Schmelzpunktterniedrigung, welche durch den Abfall der sogenannten Liquiduskurve (blau) gezeigt wird.^[10] Diese Liquiduskurve kann theoretisch mittels der Schröder-van Laar-Gleichung beschrieben werden:

$$\ln x = \frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right)$$

wobei x den Molenbruch der Verbindung in der Mischung, ΔH_m und T_m die Schmelzenthalpie und Schmelztemperatur der reinen Verbindung, T die Temperatur des Gemisches und R die universelle Gaskonstante darstellt.^[11]

Der Schnittpunkt der beiden Liquiduskurven bildet das sogenannte Eutektikum E, welches auf der horizontal verlaufenden Soliduslinie (rot) liegt.

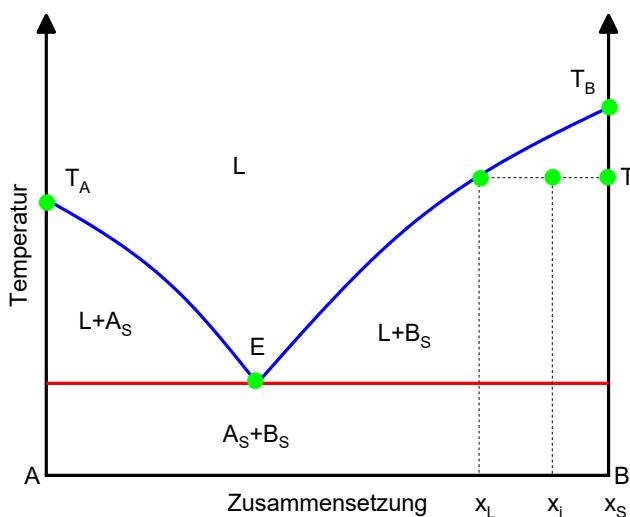


ABBILDUNG 6:SCHEMATISCHER AUFBAU EINES BINÄREN, EUTEKTISCHEN PHASENDIAGRAMMS.

Oberhalb der beiden Liquiduskurven sind die beiden Substanzen ineinander mischbar und liegen als Flüssigkeit vor (engl. *liquid*, L). Unterhalb der Soliduslinie existieren die beiden Substanzen als vermischt Kristalle und bilden eine vollständige feste Phase (engl. *solid*, S). In den beiden Bereichen zwischen Lösung und fester Phase liegen die entsprechende reine Substanz zum Teil fest und eine Mischung flüssig vor.

Bei einer gegebenen Temperatur T_i und einer gegebenen Zusammensetzung x_i kann über das Hebelgesetz der relative Anteil der flüssigen Phase f_L und der festen Phase f_S bestimmt werden (Abbildung 6).^[12]

$$f_L = \frac{x_S - x_i}{x_S - x_L} \quad f_S = \frac{x_i - x_L}{x_S - x_L}$$

Bei der Ausbildung von Verbindungen V der beiden Substanzen, wird das Phasendiagramm etwas komplexer (Abbildung 7A). Durch die Verbindung tritt ein lokales Maximum auf, welches auch durch eine der Liquiduskurven „verdeckt“ sein kann.

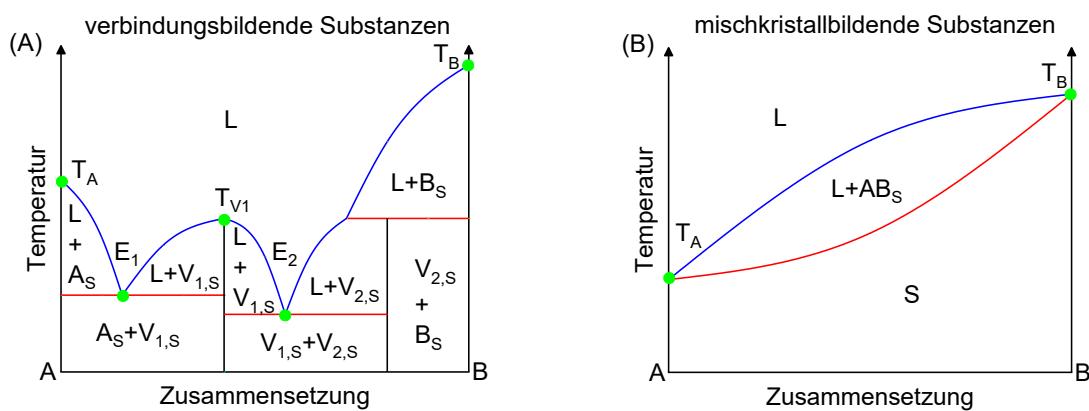


ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER AUFBAU DER BINÄREN PHASENDIAGRAMME VON VERBINDUNGSBILDENDEN (A) UND MISCHKRISTALLBILDENDEN (B) GEMISCHEN.

Wenn die beiden Substanzen Mischkristalle in jedem Verhältnis bilden, zeigt sich hingegen das entsprechende Diagramm in Abbildung 7B. In diesem Fall können die beiden Substanzen nur mit deutlich aufwendigeren Kristallisierungsverfahren voneinander getrennt werden.^[13] Bei Zugabe einer dritten Substanz, wie zum Beispiel einem Lösungsmittel, ergeben sich daraus die in Abbildung 8 gezeigten isothermen ternären Phasendiagramme. Auch bei diesen Diagrammen kann zwischen einfach eutektischen, verbindungsgebildenden und mischkristallbildenden Gemischen unterschieden werden.

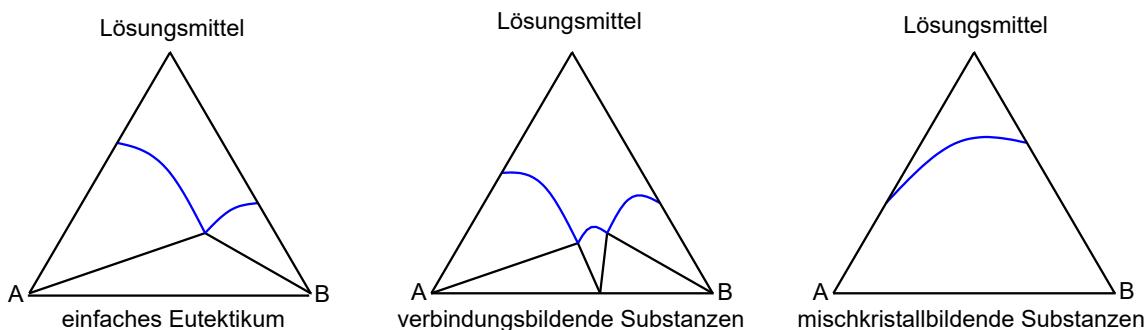


ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER AUFBAU VON TERNÄREN PHASENDIAGRAMMEN EINER EINFACHEN EUTEKTISCHEN MISCHUNG, VERBINDUNGSBILDENDE UND MISCHKRISTALLBILDENDE GEMISCHE.

Die Achsen stellen hier die Massenanteile der binären Mischungen dar, wobei jeder Punkt im Diagramm ein ternäres Gemisch ist.

1.3.3 LÖSLICHKEIT UND NUKLEATION

In einer Lösung liegt eine Substanz homogen verteilt in einem Lösungsmittel vor. Die Löslichkeitskurve beschreibt die maximal mögliche Menge an Substanz, die im Gleichgewicht gelöst werden kann. Sie ist ein Ausschnitt der Liquiduskurve, aus dem Phasendiagramm mit vertauschten Achsen (Abbildung 9). Die exakte Löslichkeit einer Substanz hängt hierbei von diversen Faktoren ab, wie zum Beispiel der Temperatur, dem Druck oder den ionischen und nichtionischen Zusätzen.

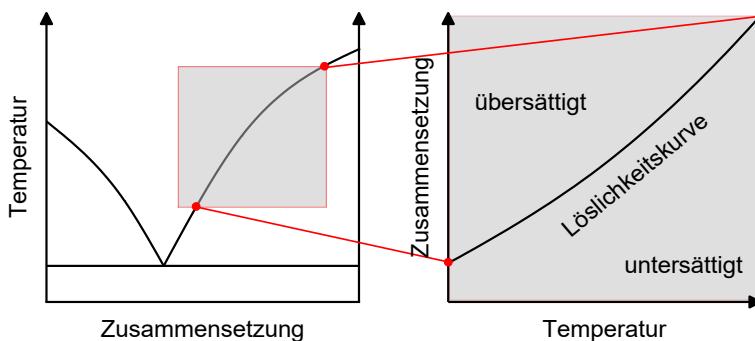


ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER LÖSLICHKEITSKURVE ALS AUSSCHNITT EINES BINÄREN EUTEKTISCHEN PHASENDIAGRAMMS.

Die Löslichkeitskurve teilt das Löslichkeitsdiagramm in zwei Bereiche, den untersättigten und den übersättigten Bereich. Im untersättigten Bereich liegt im Gleichgewicht eine vollständig homogene Lösung vor, da die Konzentration der gelösten Substanz die Löslichkeit in dem gewählten Lösungsmittel nicht überschreitet. Im übersättigten Bereich überschreitet die Konzentration der gelösten Substanz jedoch die Löslichkeit, was dazu führt, dass im Gleichgewicht ein Teil der Substanz als Feststoff und nicht gelöst vorliegt. In diesem Fall wird von einer gesättigten Lösung gesprochen, da die maximal mögliche Menge an Substanz im Lösungsmittel gelöst ist. Wenn die Löslichkeitskurve durch das Verringern der Temperatur überschritten wird und sich noch keine feste Phase ausbildet, ist die Lösung übersättigt. Hierbei ist mehr Substanz homogen gelöst, als das thermodynamische Gleichgewicht zulässt. Diese Übersättigung ist in einem gewissen Bereich kinetisch stabilisiert. In diesem metastabilen Bereich kann es zu einem beliebigen Zeitpunkt zur Keimbildung kommen, wodurch die Übersättigung abgebaut wird. Es wird hauptsächlich zwischen zwei Arten der Keimbildung unterschieden, der primären und der sekundären Keimbildung.^[10]

Bei der primären Keimbildung sind keine arteigenen Kristallisationskeime in der Lösung vorhanden. Durch eine hohe Übersättigung kommt es deswegen zum Entstehen vieler kleiner Kristallisationskeime, was zum Abbau der hohen Konzentration führt. Zusätzlich wird noch zwischen homogener und heterogener Keimbildung unterschieden. Bei der heterogenen Keimbildung sind Fremdkörper, wie zum Beispiel Staubpartikel in der Lösung, an deren Oberfläche es zum Kristallwachstum kommen kann. Die homogene Keimbildung tritt hingegen nur in klaren Lösungen auf. Durch dieses Kristallwachstum wird dann bereits bei geringeren Übersättigungen die schlagartige Bildung von vielen Kristallisationskeimen initiiert (Abbildung 10A). Bei der sekundären Keimbildung handelt es sich hingegen um die durch Abrieb hervorgerufene Vermehrung dieser Keime. Wenn demnach bereits arteigene Kristalle in der Lösung vorhanden sind und diese durch Kollisionen mit anderen Kristallen oder Reaktorkomponenten Teile abspalten, steigt die Zahl der Kristallisationskeime in der Lösung,

wodurch die Übersättigung abgebaut werden kann. Die Größe des bereits angesprochenen metastabilen Bereichs resultiert aus der Art der Keimbildung (Abbildung 10B). Diese ist wiederum von der Höhe der Übersättigung abhängig.

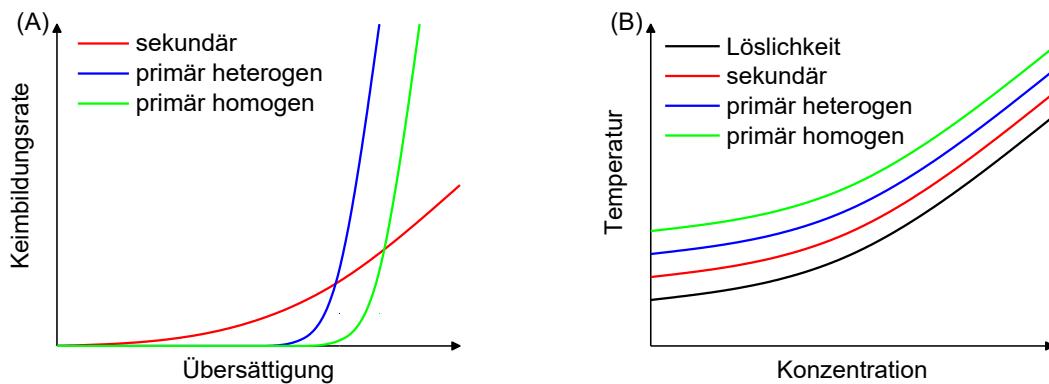


ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT DER KEIMBILDUNGSRÄTEN (A) UND DER KEIMBILDUNGSARTEN (B).

Die gängigste Methode zur Kristallisation ist die Kühlungskristallisation, bei der die Temperatur gesenkt wird, um die Löslichkeit der Zielsubstanz zu verringern. Alternativ dazu kann bei der Verdampfungskristallisation die Temperatur erhöht oder der Druck vermindert werden, um das Lösungsmittel zu evaporieren. Dadurch wird die Zielsubstanz aufkonzentriert und kann infolgedessen auskristallisieren. Eine ebenfalls häufig eingesetzte Technik ist die sogenannte Antisolvent-Kristallisation, bei der ein weiteres Lösungsmittel zugegeben wird, in dem die Zielsubstanz schlechter löslich ist. Wenn diese Methoden auf Grund des Löslichkeitsverhaltens der Zielsubstanz nicht zur Kristallisation führen, können Additive eingesetzt werden. Durch Interaktionen mit der Zielsubstanz, bildet sich eine neue Verbindung mit geringerer Löslichkeit. Die beschriebenen Kategorien einer induzierten Kristallisation werden wiederum hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilt. Bei der induzierten Kristallisation durch Salzbildung wird ein entsprechendes Anion oder Kation zugegeben, wodurch die Zielsubstanz als Salz auskristallisiert. Die Änderung des pH-Wertes ist ein besonderer Fall dieser Kristallisation. Durch die Zugabe von Säuren oder Basen wird die Zielsubstanz protoniert oder deprotoniert, wodurch die Löslichkeit stark gesenkt werden kann. Bei der induzierten Kristallisation durch Verbindungsbildner hingegen, werden Substanzen zugegeben, die zusammen mit der Zielsubstanz auskristallisieren, ohne ihren Ladungszustand zu verändern. Ein Beispiel ist die Hydratbildung von vielen chemischen Substanzen in Wasser.

1.3.4 KRISTALLISATION IN DER VERFAHRENSTECHNIK

Bei Reaktionsansätzen im Labormaßstab ist es apparativ meist recht einfach, eine Kristallisation durchzuführen, da eine Vielzahl von Reaktionsgefäßern zur Verfügung stehen und sowohl die Zugabe als auch das Entziehen von Substanzen im kleinen Maßstab leichter realisierbar sind. Wenn eine Reaktion in einen größeren Maßstab überführt werden soll, müssen durch verfahrenstechnische Methoden Reaktoren konzipiert werden, die auf die Bedingungen der Reaktion abgestimmt sind. Diese lassen sich im Wesentlichen auf die nachstehenden Reaktorarten zurückführen.

Der einfachste Reaktortyp ist der diskontinuierliche Satzreaktor oder Rührkesselreaktor (engl. *stirred tank reactor*, STR). Das Reaktionsgefäß wird hierbei zu Beginn mit der gesamten Reaktionslösung befüllt und am Ende wieder vollständig entleert. Wie am Namen zu erkennen, wird das Durchmischen der Reaktionslösung in der Regel durch einen Rührer erzielt. Der Vorteil eines STR's liegt in einer hohen Flexibilität, da gerade verschiedene Reaktionszeiten leicht zu realisieren sind. Der STR ist normalerweise nicht auf eine bestimmte Reaktion abgestimmt, weswegen er für verschiedenste Anwendungen eingesetzt werden kann. Wie dem Konzentration-Zeit-Diagramm eines idealen STR's in Abbildung 11 zu entnehmen ist, steigt die Produktkonzentration mit der Zeit während die Substratkonzentration abnimmt. Daraus lassen sich die Nachteile eines STR's ableiten. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Substratkonzentration und sinkt mit der Zeit. Im Gegensatz dazu steigt die Wahrscheinlichkeit für Folgereaktionen durch die zunehmende Produktkonzentration.

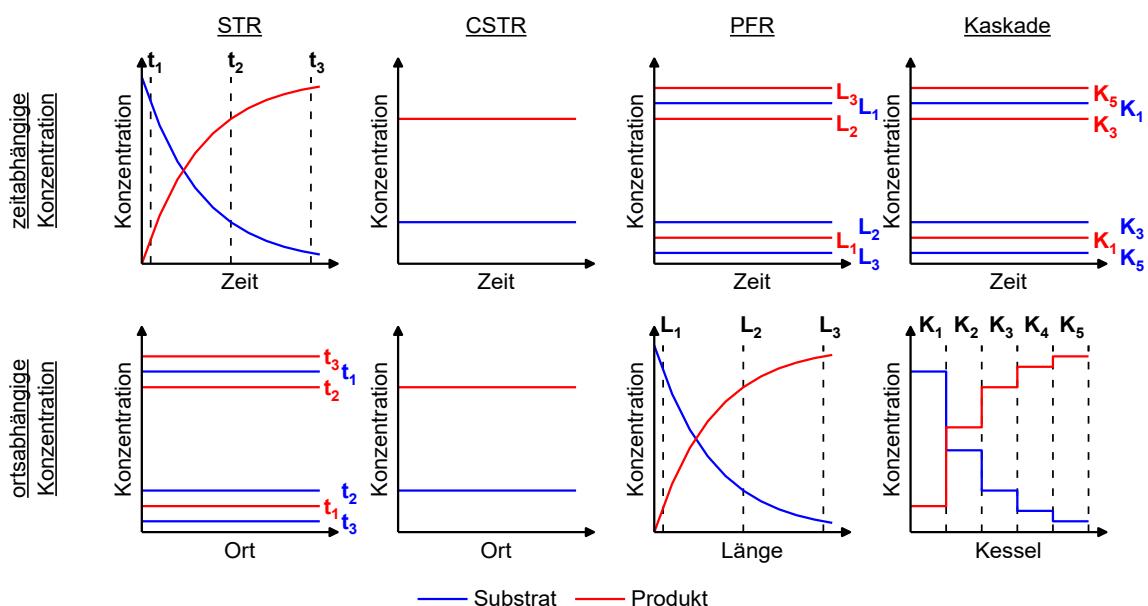


ABBILDUNG 11: ZEIT- UND ORTSABHÄNGIGE KONZENTRATIONSVERLÄUFE FÜR DIE VERSCHIEDENEN IDEALEN REAKTORARTEN, T = ZEITPUNKTE, L = LÄNGE DES PFR, K = KESSEL.

Beim kontinuierlichen Rührkesselreaktor (engl. *continuously stirred tank reactor*, CSTR) handelt es sich um einen STR zu dem kontinuierlich frisches Reaktionsmedium (ohne Produkt) zugeführt und zeitgleich ein Teil des Reaktorinhalts, proportional zur zugeführten Menge, wieder abgeführt wird. Somit liegt im Idealfall zu jeder Zeit und an jedem Ort im Reaktor die gleiche Konzentration an Substrat und Produkt vor. Dadurch können Probleme wie Nebenreaktionen oder Inhibitoren des Enzyms umgangen werden.

Kontinuierliche Reaktoren wie der CSTR eignen sich sehr gut für große Produktionsmengen, da sie in ihrer Laufzeit theoretisch unbegrenzt sind. Durch den zusätzlichen apparativen Aufwand entstehen jedoch höhere Kosten. Außerdem sind kontinuierliche Reaktoren in der Regel auf eine bestimmte Reaktion abgestimmt und dadurch auch nicht so flexibel einsetzbar wie der zuvor beschriebene STR.

Der letzte Reaktorgrundtyp ist der Strömungsrohrreaktor (engl. *plug flow reactor*, PFR). Beim PFR handelt es sich um ein Rohr, durch welches das Reaktionsmedium strömt. Im Idealfall weist das Strömungsprofil dieses kontinuierlichen Reaktors eine pfeiffförmige Strömung (engl. *plug flow*) auf, woraus sich der Name ableitet. Die Konzentration verändert sich über die Länge des Reaktors und ist in jedem Querschnitt des idealen PFR identisch.

Diese drei Reaktorgrundarten können beliebig miteinander kombiniert werden, um ein Reaktorsystem optimal auf eine Reaktion anzupassen. Basierend auf den Grundtypen haben sich weitere Variationen etabliert wie der halbkontinuierliche STR, die Rührkesselkaskade oder der Kreuzstromreaktor. Ein STR mit einem Zulauf aber keinem Ablauf, bzw. einem Ablauf aber keinem Zulauf, wird als halbkontinuierlicher STR bezeichnet. Im Gegensatz dazu besteht die Rührkesselkaskade aus aneinandergereihten CSTRs. Die Kesselzahl beschreibt dabei die Anzahl an CSTRs in der Kaskade. Die ortsabhängige Konzentration der Rührkesselkaskade (Abbildung 11) verdeutlicht, dass diese Reaktorform den Übergang vom CSTR zum PFR darstellt. Mit steigender Kesselzahl nähert sich ihr Konzentrationsprofil dem des idealen PFR an. Ein Kreuzstromreaktor hingegen ist ein kontinuierlicher Reaktor, bei dem an unterschiedlichen Punkten zusätzliche Zu- oder Abläufe angebracht sind.^[14]

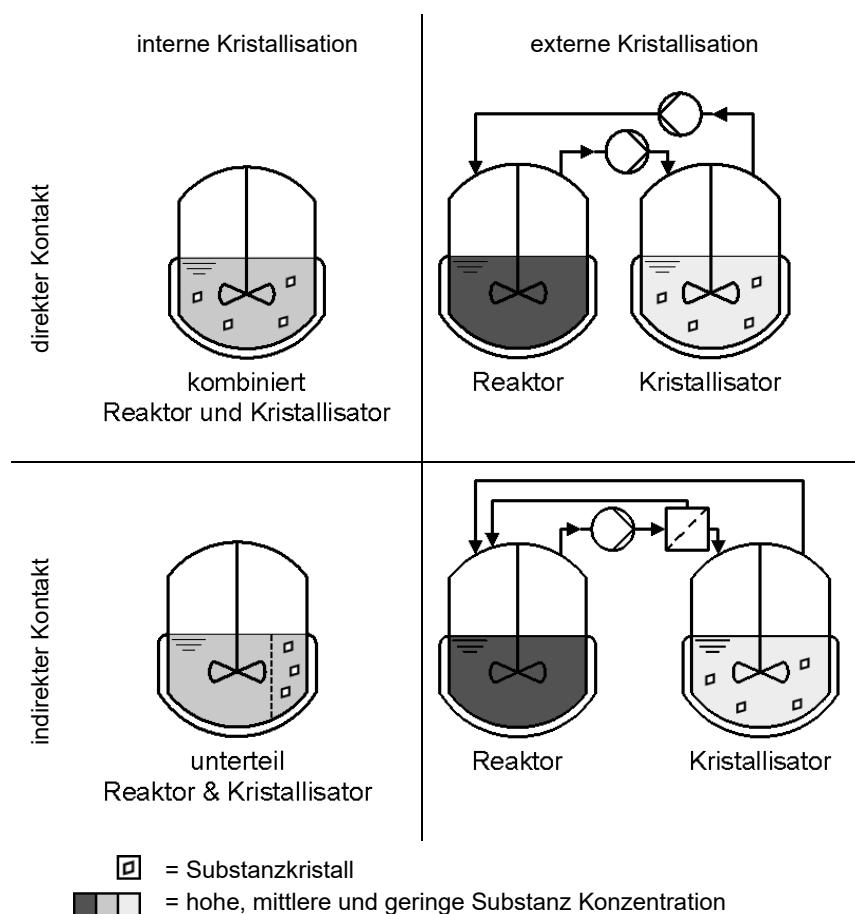


ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG VON DIREKTER UND INDIREKTER KRISTALLISATION IN INTERNEN UND EXTERNEN VERFAHREN.

Um die Kristallisation eines Reaktionsproduktes in größeren Reaktionsgefäßern oder sogar kontinuierlich zu realisieren, können verschiedene Prozesse eingesetzt werden. Die vier grundlegenden Konzepte sind in Abbildung 12 zusammengefasst.

Die einfachste Methode besteht in der internen Kristallisation mit direktem Kontakt. Hierbei wird die Kristallisation in demselben Reaktor durchgeführt wie die Reaktion. Gerade bei biokatalytischen Prozessen mit Ganzzell-Katalysatoren kommt es beim Downstream-Processing zu Trennproblemen, da die Zellen das einfache Abfiltrieren der Kristalle erschweren können. Um dieses Problem zu umgehen, kann ein komplexerer Aufbau mit zwei Reaktoren gewählt werden. Bei solch einer externen Kristallisation steht der Reaktor im direkten oder indirekten Kontakt zu einem zusätzlichen Gefäß, dem sogenannten Kristallisator.

Durch diesen Aufbau sind optimierte Bedingungen für die Kristallisation realisierbar. Zusätzlich kann beim indirekten Kontakt der Biokatalysator durch eine Membran von den Kristallen räumlich getrennt werden. Ähnlich dazu ist die interne Kristallisation mit indirektem Kontakt, bei der die Reaktion zwar in demselben Reaktor wie die Kristallisation stattfindet, es wird jedoch eine Kompartimentierung vorgenommen, um die Kristalle zu separieren.^[15]

1.4 GLEICHGEWICHTSVERSCHEIBUNG

Wie schon in der Einleitung erwähnt, können sich Reaktionen in einem thermodynamischen Gleichgewichtszustand befinden, sobald die Hin- und Rückreaktion die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen. Diese Gleichgewichtslage liegt bei Transaminase-katalysierten Reaktionen in der Regel auf der Seite des Substrates, was für eine geringe Produktivität sorgt. Um die Gleichgewichtslage positiv zu beeinflussen, können unter anderem die Substratmoleküle strukturell so verändert werden, dass sie eine höhere Enthalpie aufweisen als das resultierende Produkt. Solche Veränderungen können aber in vielen Fällen dafür sorgen, dass die Reaktion nicht mehr durchführbar, zu aufwendig, zu teuer oder nicht mehr zielführend ist. Aus diesen Gründen wird vorwiegend auf das Prinzip von Le Chatelier zurückgegriffen. In seiner Publikation zum Thema „Allgemeine Aussage über die Gesetze des chemischen Gleichgewichts“ schreibt Le Chatelier wörtlich übersetzt: „Dies besagt, wenn ein System, das sich im chemischen Gleichgewicht befindet, einer äußeren Änderung der Temperatur, des Drucks, der Konzentration oder der Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit ausgesetzt wird, geht das System in ein neues Gleichgewicht über. Diese Änderung des Gleichgewichtes besitzt ein Vorzeichen, welches dem der äußeren Änderung entgegengesetzt ist.“^[16] Vereinfacht gesagt: Wird ein äußerer Zwang auf das Gleichgewicht ausgeübt, verändert sich das Gleichgewicht, um diesen Zwang zu minimieren (Prinzip des kleinsten Zwanges). Die effektivste Methode, um einen solchen Zwang auf ein bestehendes Reaktionssystem auszuüben, ist der Einsatz höherer Substratkonzentrationen oder das Entziehen von Produkten aus der Reaktionslösung. Durch einen Substratüberschuss gerät die Reaktion aus dem Gleichgewichtszustand, wodurch mehr Produkt entsteht. Infolgedessen sinkt die Substratkonzentration und der Gleichgewichtszustand stellt sich wieder ein. Ein Substratüberschuss ist jedoch nur dann eine Option, wenn das Substrat nicht zu teuer ist und es die Reaktion nicht hemmt. Substratinhibition kann dabei durch bestimmte Reaktionsführungen, wie eine kontinuierliche Substratzufuhr in einem halbkontinuierlichen Reaktor, verhindert werden. Um Produkte aus der Reaktionslösung zu entziehen, gibt es verschiedene Methoden. Damit das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben wird, müssen die Maßnahmen zeitgleich zur Reaktion, also „*in situ*“ (lat. am Ort), stattfinden. Aus diesem Grund wird von der *in situ*-Produktentfernung (engl. *in situ product removal*, ISPR) gesprochen. Die gängigsten ISPR-Techniken werden im Folgenden vorgestellt.^[17]

1.4.1 AUSTRAGEN LEICHT FLÜCHTIGER PRODUKTE

Wenn ein Produkt einen hohen Dampfdruck aufweist, kann es durch den Übergang in die Gasphase aus der Reaktionslösung ausgetragen werden. Dadurch steht es für die Rückreaktion in der flüssigen Phase nicht mehr direkt zur Verfügung. Da dieser Prozess in der Regel recht langsam ist, kann er durch das Einleiten von Inertgas oder durch Minderung des Druckes im Reaktionssystem beschleunigt werden. Ein Beispiel dafür ist das Abtrennen des Co-Produktes Aceton, welches aus dem Donoramin IPA entsteht. Im kleinen Maßstab, kann

dadurch eine Produktionssteigerung erzielt werden. Andere Substanzen mit hohem Dampfdruck, wie zum Beispiel das Substrat oder das Lösungsmittel, können hierbei jedoch ebenfalls ausgetragen werden. Besonders in größeren Maßstäben können dadurch signifikante Mengen einiger relevanter Reaktanten verloren gehen. Zusätzlich ist das Erzeugen eines Unterdrucks in großen Reaktionsgefäßen apparativ sehr aufwendig.

1.4.2 SPEZIELLE DONOREN

Eine selektivere Methode zur Gleichgewichtsverschiebung stellt der Einsatz von speziellen Donoraminen dar. Die Carbonylfunktion des erhaltenen Co-Produkts, welches durch Desaminierung des Donoramins entsteht, kann als Substrat für weitere Reaktionen dienen. Eine Möglichkeit ist die Bildung eines Imins aus einem Diamin durch eine nachgeschaltete Zykлизierungsreaktion. Damit dieses Nebenprodukt irreversibel der Reaktionslösung entzogen wird, können die Imine spontan oligomerisieren (Abbildung 13).

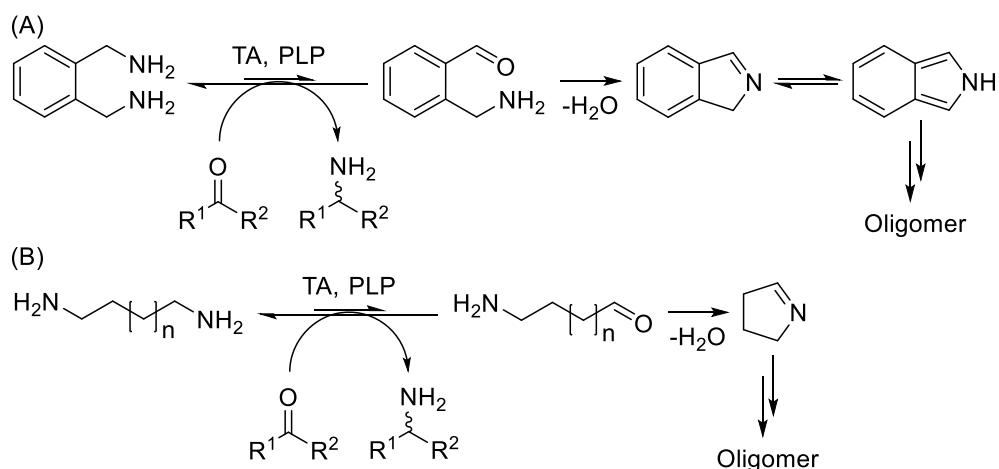


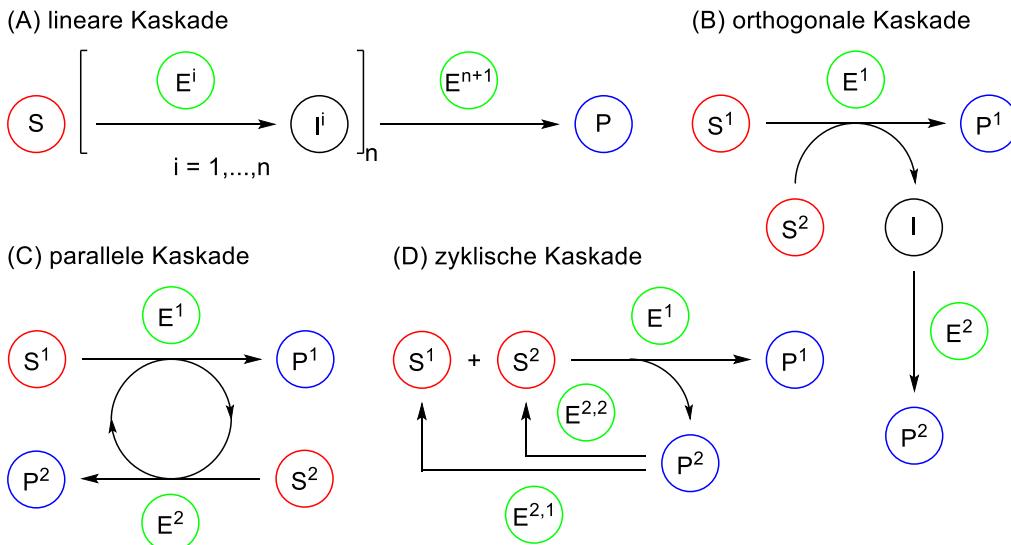
ABBILDUNG 13: SPEZIELLE DONORAMINE FÜR TRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN (A) o-XYLYLENE DIAMINDIHYDROCHLORID, (B) LANGKETTIGEN DIAMINEN UND ANSCHLIEßENDE SPONTANE OLIGOMERISIERUNG.^[18]

Der Nachteil dieser häufig kostenintensiven Donoramine liegt in ihrer verringerten Anwendbarkeit, da sie nicht von jeder TA als Substrat akzeptiert werden. Zudem kann das anschließende Downstream-Processing durch die entstehenden Oligomere deutlich komplexer werden.

1.4.3 ENZYMKASKADEN

Eine deutlich vielseitigere Methode ist der gleichzeitige Einsatz verschiedener Enzyme, welche mehrstufige Synthesen auf biokatalytischem Weg realisieren. Auf Grund der hohen Selektivität können unterschiedliche Enzyme oft zeitgleich in einem Reaktor oder einer Zelle eingesetzt werden, ohne dass es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommt. Werden mehrstufige Synthesen auf diese Art durchgeführt, wird dies in der Regel als Enzymkaskade bezeichnet. Diese können in vier grundlegende Konzepte unterteilt werden, welche in Abbildung 14 gezeigt sind.^[19] Bei der linearen Kaskade (A), wird das Produkt durch zwei oder mehr aneinander gereihte Reaktionen hergestellt. Dabei bilden sich Intermediate, die vom jeweils nächsten Enzym als Substrat genutzt werden. Bei der orthogonalen Kaskade (B) hingegen stellt ein Nebenprodukt das Intermediat dar, welches durch ein weiteres Enzym zu einem zweiten Produkt umgewandelt wird. Im Bereich der biokatalytischen Redoxreaktionen wird die parallele

Kaskade am häufigsten eingesetzt. Hierbei produzieren zwei Reaktionen Nebenprodukte, die als Co-Substrat für die jeweils andere Reaktion fungieren. Ein typisches Beispiel ist die Cofaktor-Regeneration von NAD(P)H, welche auch in den meisten der hier gezeigten Kaskaden eine Rolle spielt. Wenn im Vergleich dazu das Produkt der zweiten Reaktion ein Substrat für die erste Reaktion darstellt, wird dies als zyklische Kaskade (D) bezeichnet.



E = Enzym, S = Substrat, I = Intermediat, P = Produkt

ABBILDUNG 14: DARSTELLUNG DER VIER GRUNDSÄTZLICHEN KASKADEN ARTEN^[19]

Für TAs wird häufig eine orthogonale Kaskade zur Umwandlung des Co-Produkts eingesetzt. Die günstigen und häufig eingesetzten Donoramine IPA und Alanin bieten dafür eine gute Grundlage, da sie nach der Desaminierung durch einfache Reaktionen umgewandelt und somit aus dem Reaktionsgleichgewicht der TA entzogen werden können (Abbildung 15).

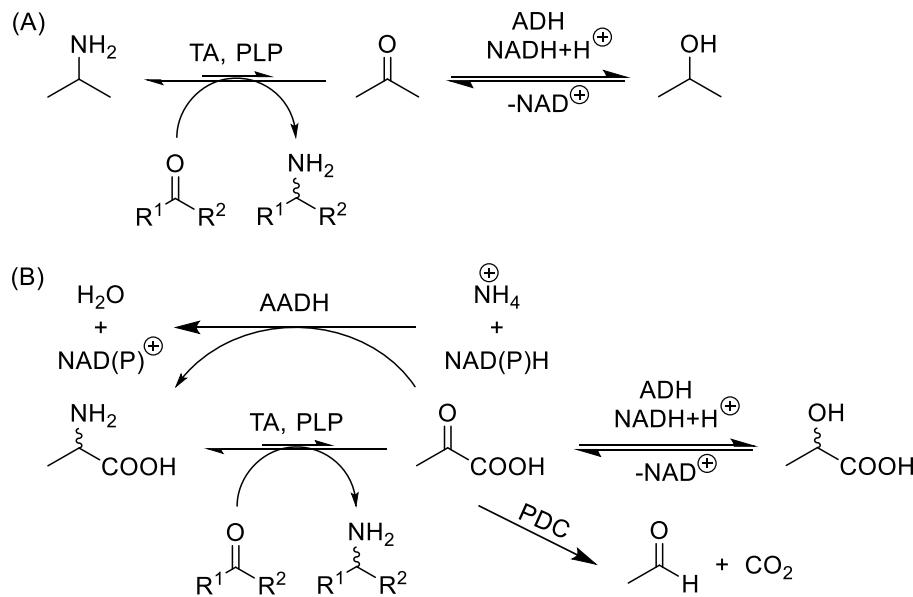


ABBILDUNG 15: ENZYMKASSEN FÜR DIE UMWANDLUNG DES CO-PRODUKTS VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN MITTELST DONORAMIN ISOPROPYLAMIN (A) UND ALANIN (B).

Das Co-Produkt Aceton, welches bei der Nutzung von IPA als Donoramin gebildet wird, kann zum Beispiel durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Isopropanol umgewandelt werden.^[20] Bei Pyruvat, welches aus dem Donoramin Alanin entsteht, können verschiedene Enzyme zum Einsatz kommen. Eine Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert Pyruvat zur Milchsäure, wohingegen eine Pyruvatdecarboxylase (PDC) Pyruvat in Acetaldehyd und Kohlenstoffdioxid aufspaltet.^[21] Im Vergleich zu den bisher genannten orthogonalen Kaskaden stellt die Aminosäuredehydrogenase (engl. *amino acid dehydrogenase*, AADH) in Kombination mit einer TA eine zyklische Kaskade dar, die das Pyruvat reduziert und mit Hilfe von Ammoniak wieder in Alanin umwandelt. Durch diesen Schritt liegt wieder neues Alanin für die Transaminierung vor und der Ammoniak wird zum eigentlichen Donoramin der Reaktion.^[22] Eine solche Kaskade kann alternativ auch für das eigentliche Zielprodukt eingesetzt werden. Damit das Zielprodukt anschließend durch möglichst einfache Aufarbeitungsschritte erhalten werden kann, muss der zweite Reaktionsschritt reversibel sein. Diese Voraussetzung entfällt, wenn es sich um eine mehrstufige Synthese handelt und das Zielprodukt erst durch den zweiten Reaktionsschritt gebildet wird. Ein sehr elegantes Beispiel hierfür ist die Zweistufensynthese von 1,2-Aminoalkoholen. Dabei wird aus einem Diketon selektiv ein Aminoalkohol mit zwei vicinalen chiralen Zentren gebildet.^[23] Wie in Abbildung 16 gezeigt, wird das Diketon mittels TA zu einem Aminoketon und *in situ* durch eine ADH zum gewünschten Aminoalkohol umgewandelt. Auf diesem Weg können durch den Einsatz von TAs und ADHs mit unterschiedlichen Selektivitäten alle vier Diastereomere des Aminoalkohols synthetisiert werden.

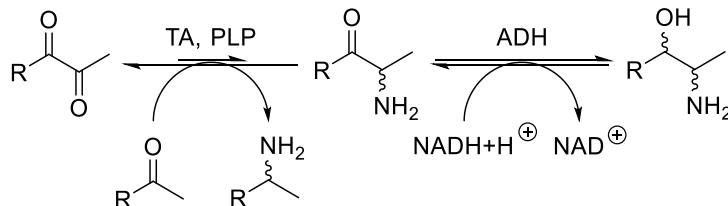


ABBILDUNG 16: ENZYMKASKADE AUS TRANSAMINASE (TA) UND ALKOHOLDEHYDROGENASE (ADH) ZUR HERSTELLUNG VON 1,2-AMINOALKOHOLEN.

Eine spezielle Herausforderung bei der Verwendung von Kaskaden ist die Wahl der optimalen Reaktionsbedingungen für zwei oder mehrere Teilreaktionen. Diese aufeinander abzustimmen, geht in der Regel mit Aktivitätseinbußen einher oder muss mit komplexeren Reaktionsauslegungen wie zum Beispiel Kompartimentierungen, umgangen werden.

1.4.4 *IN SITU*-PRODUKTKRISTALLISATION

Die Kristallisation ist eine im Downstream-Processing etablierte Methode zur Abtrennung oder Aufreinigung von Produkten. Wenn die Kristallisation jedoch zeitgleich zur Reaktion stattfindet, wird dies als *in situ*-Produktkristallisation (engl. *in situ-product crystallization*, ISPC) bezeichnet.^[15] Durch die ISPC können zusätzlich Reaktionsgleichgewichte positiv beeinflusst und Produktinhibierungen vermindert werden. Um ein ISPC-Konzept in eine Reaktion zu integrieren, muss die Löslichkeit des Produkts unterhalb der Gleichgewichtskonzentration der Reaktion liegen. In den meisten Fällen ist die Löslichkeit aber zu groß und muss durch die in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Methoden gesenkt werden. Sind die dadurch definierten Kristallisierungsbedingungen nicht mit den Reaktionsbedingungen kompatibel, muss die Reaktion auf eine externe Reaktionszone ausgelagert werden (Abschnitt 1.3.4).

Die direkte interne ISPC ist die einfachste Prozessmöglichkeit und findet bei der Synthese einiger Aminosäuren Anwendung. Diese weisen meistens eine geringe Löslichkeit auf und können somit direkt nach ihrer Synthese aus der Reaktionslösung auskristallisiert werden.^[24] Im Gegensatz dazu kann bei Carbonsäuren durch Zugabe von Metallionen eine ISPC durch Salzbildung induziert werden.^[25] In einigen besonderen Fällen muss die Reaktionslösung hierbei in einem zweiten Reaktor zeitweise heruntergekühlt werden, um die Kristallisation zu initialisieren.^[26] Ein besonderes Beispiel bildet die Synthese von Ampicillin, welches als Trihydrat kristallisiert werden kann. Die eingesetzte Penicillin-Acylase wurde in einem speziellen Reaktor immobilisiert und die pH-abhängigen Löslichkeiten der einzelnen Substanzen wurden untersucht. Die Kombination dieser Methoden und der Einsatz von Impfkristallen konnte die Ausbeute auf > 95 wt % steigern. Auf diese Art kann der Katalysator für über 200 h aktiv genutzt und die Hydrolyse vom Substrat sowie des Produkts, erfolgreich unterdrückt werden.^[27] Ein ebenfalls nennenswertes ISPC-Konzept wurde von Urbanus *et al.* entwickelt. Durch Elektroden in einer externen Kristallisierungszelle kann auf elektrochemischen Weg der lokale pH-Wert gesenkt werden. Der geringere pH-Wert protoniert die fermentativ hergestellte Zimtsäure, welche anschließend zusammen mit 3-Nitrobenzamid als Co-Kristall ausgefällt.^[28] Im Vergleich dazu fallen bei der herkömmlichen fermentativen Herstellung von Fumarsäure 1,3 Tonnen Nebenprodukte je Tonne Produkt an. Dies sind hauptsächlich Salze, die sich aus dem Einstellen des pH-Wertes ergeben. Die so generierten Salzabfälle können durch die elektrochemische Variante vollständig vermieden werden.^[29]

Vergleichbare ISPC-Konzepte werden zudem in der Literatur oftmals anders betitelt. Häufig auftauchende Begriffe in diesem Zusammenhang, sind die Reaktivfällungen und die Reaktivkristallisation. Oftmals wird der Einsatz der Kristallisation zur Optimierung der Reaktion in der Literatur nicht gesondert betitelt. In der Summe weist die ISPC als interdisziplinäre Kombination von biokatalytischen Prozessen und Kristallisation mehrere Vorteile auf. Neben der positiven Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichts und der Unterdrückung von Folgereaktionen, wird das Downstream-Processing erleichtert, da das Produkt als kontaminationsarmer Feststoff gewonnen werden kann.

1.5 KENNZAHLEN DER PROZESSENTWICKLUNG

Um chemische und biokatalytische Prozesse zu quantifizieren, gibt es verschiedene Kennzahlen. Als Grundlage der Kinetik beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit r die Änderung der Konzentration c über die Zeit t .

$$r = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

Wie die meisten anderen Kennzahlen ist die Reaktionsgeschwindigkeit von den Zustandsgrößen wie dem Druck und der Temperatur abhängig. Im Speziellen bei katalytischen Prozessen wird die Reaktionsgeschwindigkeit aber auch durch die Struktur des Katalysators beeinflusst. Kennzahlen, die das Augenmerk auf das Produkt der Reaktion legen, sind die Ausbeute A , der Umsatz U und die Selektivität S .

$$A = \frac{n_p}{n_{p,max}} \cdot 100 \%$$

$$U = \frac{n_{S,0} - n_S}{n_{S,0}} \cdot 100 \%$$

Die Ausbeute beschreibt wie viel Produkt n_P sich prozentual von der theoretisch maximal möglichen Produktmenge $n_{P,\max}$ gebildet hat. Im Gegensatz dazu beschreibt der Umsatz die prozentual verbrauchte Menge des Substrats und berechnet sich aus der noch vorhandenen Substratmenge n_S sowie der Substratanfangskonzentration $n_{S,0}$. Somit stellt es die Summe der Ausbeuten aller Substanzen dar, welche aus dem eingesetzten Substrat gebildet wurden. Aus dem Quotienten der Ausbeute und des Umsatzes kann dann die Selektivität berechnet werden.

$$S = \frac{A}{U}$$

Die Selektivität ist somit ein Maß dafür, wie viel des verbrauchten Substrats in das Zielprodukt umgewandelt wurde.

Um einen Katalysator zu quantifizieren, wird die Aktivität a bestimmt. Diese sagt aus welche Stoffmenge Produkt n_P ein Katalysator in einer bestimmten Zeit t herstellen kann.

$$a = \frac{\Delta n_P}{\Delta t}$$

Die SI-Einheit der Aktivität ist das Katal (kat = mol/s). Im Bereich der Biokatalyse ist die Unit ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) dagegen eine gängige Einheit zur Angabe von Enzymaktivitäten. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität a_s wird die Aktivität a pro Masse des Katalysators $m_{\text{Kat.}}$ beschrieben.

$$a_s = \frac{a}{m_{\text{Kat.}}} = \frac{\Delta n_P}{\Delta t \cdot m_{\text{Kat.}}}$$

Die bisher genannten Kennzahlen beschreiben nur die zugrundeliegende Reaktion und beziehen nicht das Reaktionsgefäß beziehungsweise die entsprechende Reaktionsführung mit ein. Um verschiedene Reaktoren beziehungsweise Prozessalternativen unter Verwendung der gleichen Reaktion zu vergleichen, wurde die sogenannte Raum-Zeit-Ausbeute (engl. *space time yield*, STY) eingeführt.

$$\text{STY} = \frac{m_P}{V_R \cdot t}$$

Sie beschreibt die Masse an Produkt m_P die pro Zeit t und Reaktorvolumen V_R gebildet wird. Sie findet häufig bei kontinuierlichen Reaktoren Anwendung.

Bereits 1998 haben Paul Anastas und John C. Warner die zwölf Prinzipien der *Grünen Chemie* aufgestellt. Diese sollen als Grundsätze für eine nachhaltige, umweltschonende und energiesparende Chemie fungieren.^[30]

1. Abfall vermeiden
2. Atomökonomie / Atomeffizienz
3. Ungefährliche Synthesen
4. Entwicklung sicherer Chemikalien
5. Sichere Lösungsmittel und Hilfsmittel
6. Energieeffizienz
7. Nachwachsende Rohstoffe
8. Derivatisierung vermeiden
9. Katalyse
10. Abbaubarkeit
11. Echtzeitanalysen
12. Unfallverhütung

Die Biokatalyse erfüllt bereits die meisten der zwölf Prinzipien, was sich oft auch in den folgenden zwei Kennzahlen widerspiegelt. Zur Normierung der Abfallmenge wurde der sogenannte Umweltfaktor (engl. *environmental factor*), kurz E-Faktor, eingeführt.

$$E - \text{Faktor} = \frac{m_{\text{Abfall}}}{m_P}$$

Er setzt die Masse an Abfall m_{Abfall} mit der Masse an Produkt m_P ins Verhältnis und sollte optimalerweise möglichst gering sein. In Tabelle 2 sind typische E-Faktoren aus den verschiedenen Bereichen der chemischen Industrie aufgeführt.^[31]

TABELLE 2: E-FAKTOREN DER CHEMISCHEN INDUSTRIE.^[31]

Industriebereich	Masse Produkt	E-Faktor
Erdölraffinerie	$10^6 - 10^8$	< 0,1
Bulk-Chemikalien	$10^4 - 10^6$	< 1 - 5
Feinchemikalien	$10^2 - 10^4$	5 - 50
Pharmazeutika	$10 - 10^3$	25 - 100

Die Atomökonomie oder Atomeffizienz AE hingegen, bezieht sich nicht auf die Abfallmenge, sondern die effektiv genutzte Substratmenge. Sie beschreibt das prozentuale Verhältnis der eingesetzten Ausgangsstoffe im erhaltenen Produkt.^[32] AE wird aus der Masse des hergestellten Produktes m_P und der Masse des eingesetzten Substrates m_S berechnet und liegt im Idealfall bei 100%.

$$AE = \frac{m_P}{m_S} \cdot 100 \%$$

Zusätzlich zu den Kennzahlen ist die Kostenstruktur des Gesamtprozesses relevant. Dieser Aspekt umfasst unter anderem die anfallenden Substratkosten, Energie- und Arbeitskosten sowie allgemeine Betriebskosten. Hier ist insbesondere die Aufarbeitung des Produktes zu nennen, welche häufig einen Großteil der Gesamtkosten ausmacht.

II. ZIEL DIESER ARBEIT

Das Kernziel dieser Arbeit ist die Überwindung der ungünstigen Gleichgewichtslage innerhalb der Transaminase-katalysierten Reaktionen durch den Einsatz einer *in situ*-Produktkristallisation. Hierbei soll durch die Zugabe einer Carbonsäure das Produktamin als schwerlösliches Ammoniumsalz auskristallisiert werden. Infolgedessen verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite.

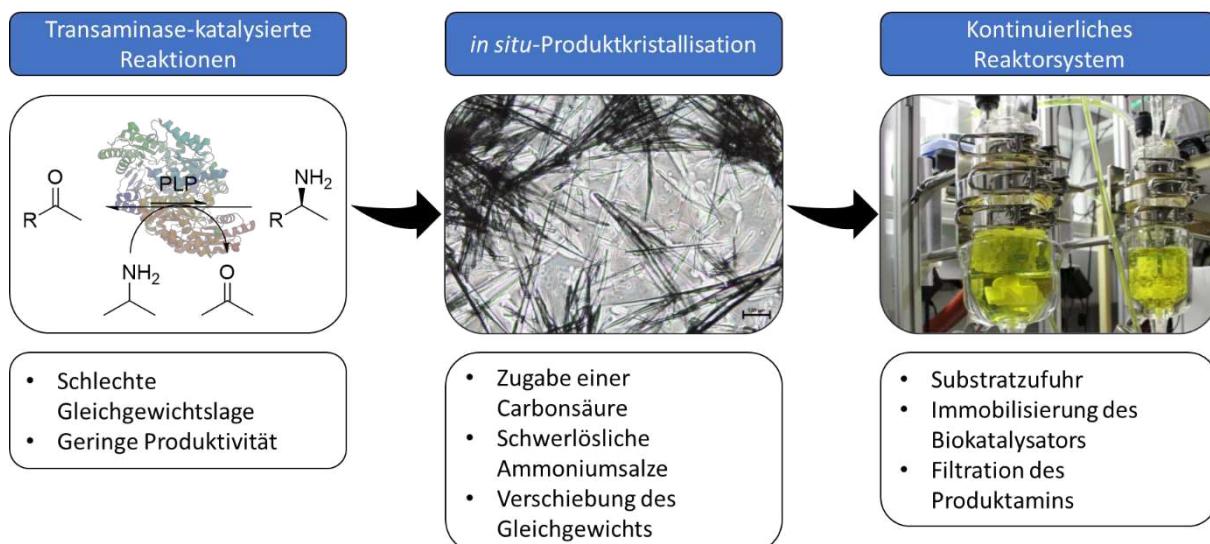


ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ZIELS DIESER ARBEIT.

Um die Produktivität des gesamten Reaktionssystems noch weiter zu steigern, soll es zu einem kontinuierlichen Prozess erweitert werden. Hierfür soll die kontinuierliche Nachdosierung der Substrate und der Carbonsäure untersucht werden. Dabei soll das Produktamin mittels Filtration und ohne Kontamination durch das Donoramin von der Reaktionslösung separierbar sein. Abschließend soll ein Reaktor entwickelt werden, der den kontinuierlichen Prozess in den Gramm-Maßstab skaliert und somit die Eignung für eine präparative Nutzung demonstriert.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION**3.1 KOMBINATION VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN UND ISPC**

In einem Screening bei einem pH-Wert von 7,5 wurde das Löslichkeitsverhalten von zwölf Ammoniumsalzen mit 79 Carbonsäuren untersucht.^[33] Die Carbonsäuren, die dabei schwerlösliche Salze ausbildeten, wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Zusätzlich wurden die verwendeten Amine in die Kategorien Donoramin und Produktamin eingeteilt. Kleine, kostengünstige Amine wie zum Beispiel IPA werden in Transaminase-katalysierten Reaktionen häufig als Donoramin eingesetzt. Substituierte, aromatische Amine wurden beim Screening als Produktamine angesehen, da sie aus synthetischer Sicht interessanter sind und als Vorstufen für komplexere Synthesen eingesetzt werden können. Eine Carbonsäure, die Produktamine auskristallisiert, Donoramine aber nicht, kann als selektives Fällungsmittel für das ISPC-Konzept eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde diese Unterteilung bereits beim Löslichkeitsscreening berücksichtigt. Die drei in Abbildung 18 gezeigten Carbonsäuren erwiesen sich schließlich als vielversprechend.

4-Chlor-3-nitrobenzoësäure (engl. *4-chloro-3-nitrobenzoic acid*, 43CNA) und Diphenylessigsäure (engl. *diphenylacetic acid*, DPAA) bildeten dabei mit allen Produktaminen sowie mit wenigen Donoraminen einen sichtbaren Niederschlag. 3,3-Diphenylpropionsäure (engl. *3,3-diphenylpropionic acid*, 3DPPA) hingegen wies keine außerordentliche Selektivität auf, da es sowohl Produktamine als auch Donoramine auskristallisierte. Die Carbonsäure wurde dennoch für weitere Untersuchungen eingesetzt, da sie mit zehn der getesteten Amine schwerlösliche Salze bildete.

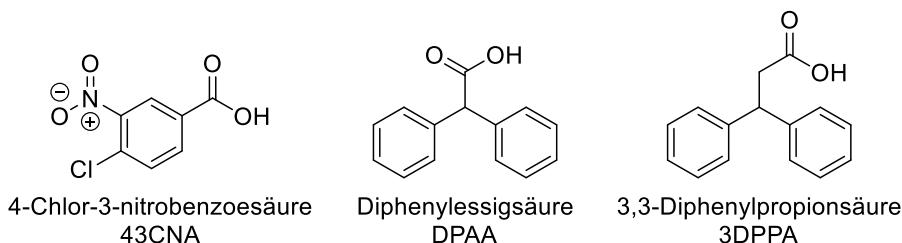


ABBILDUNG 18: CARBONSÄUREN FÜR DIE AMMONIUMKRISTALLISATION IN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN.

Um die Verträglichkeit der Carbonsäuren gegenüber TAs zu überprüfen, wurde die in Abbildung 19 gezeigte Modellreaktion aufgestellt. Acetophenon (AP) wird dabei als Aminakzeptor eingesetzt und IPA als Donoramin, da beide sehr kostengünstig sind und von den meisten TAs als Substrat angenommen werden. Zusätzlich bildet das durch die Reaktion entstehende (S)-1-Phenylethylamin (PEA) schwerlösliche Salze mit den drei ausgewählten Carbonsäuren.

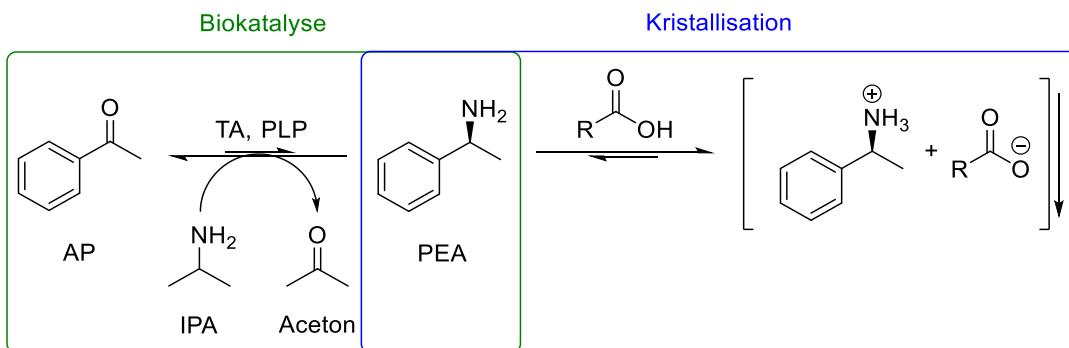


ABBILDUNG 19: KONZEPT ZUR KOMBINATION VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN UND IN SITU-PRODUKTKRISTALLISATION.

Im Zuge dieser Arbeit wurden sechs (*S*)-selektive Amintransaminasen (ATA) aus *Aspergillus fumigatus* (AfATA), *Gibberella zeae* (GzATA), *Neosartorya fischeri* (NfATA), *Aspergillus oryzae* (AoATA), *Aspergillus terreus* (AtATA), und *Ruegeria (Silicibacter) pomeroyi* (SpATA) und eine (*R*)-selektive ATA aus *Mycobacterium vanbaalenii* (MvATA) mit sehr hohen Selektivitäten (ee >99 %) eingesetzt. Die Selektivität wurde nicht weiter betrachtet oder untersucht, da sie durch die Kristallisation nicht beeinflusst werden kann. Unter Verwendung dieser sieben ATAs zeigte sich schließlich, dass sowohl 43CNA, als auch DPAA den Großteil der ATAs nahezu vollständig inhibieren (Abbildung 20).

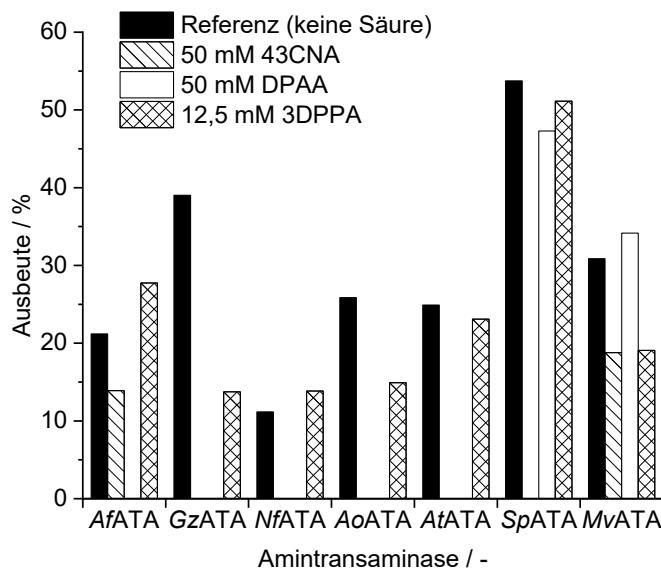


ABBILDUNG 20: EINFLUSS VON 43CNA, DPAA UND 3DPAA AUF AMINTRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN.
REAKTIONSBEDINGUNGEN: 200 mM PHOSPHATPUFFER PH 7,5, 10 mM ACETOPHENON, 500 mM (43CNA UND DPAA) ODER
250 mM (3DPAA) ISOPROPYLAMIN, 5 MG/ML LYOPHILISIERTES ZELLEXTRAKT, 30 °C, 22 H.

3DPAA zeigte auf Grund der geringen Löslichkeit von ≤ 25 mM unter den gewählten Bedingungen nur eine geringe bis nicht messbare Inhibition der untersuchten ATAs. Um zu belegen, dass 3DPAA keinen negativen Einfluss auf die ATAs hat, und zusätzlich auch das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite schiebt, wurden anschließend Vergleichsexperimente durchgeführt. Hierfür und für alle folgenden Experimente wurde die ATA aus *Ruegeria (Silicibacter) pomeroyi* genutzt.

Die in Abbildung 21 aufgeführten Daten zeigen, dass durch die Zugabe der Carbonsäure eine deutliche Steigerung der Ausbeute möglich ist.

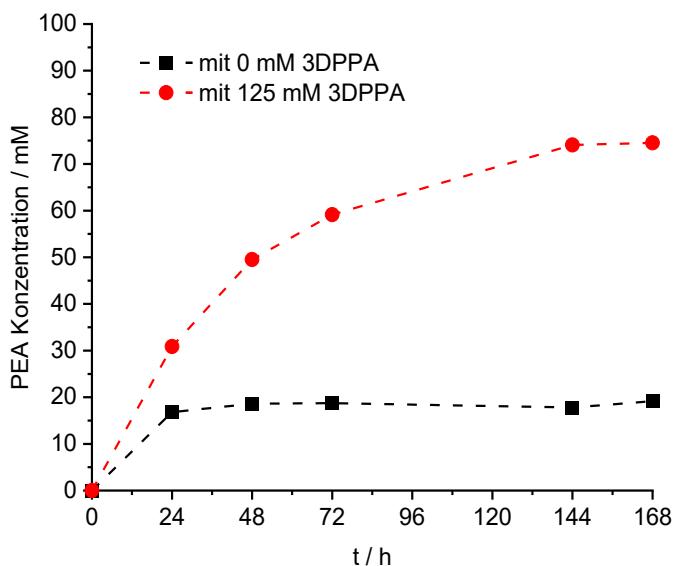


ABBILDUNG 21: ZEITVERLAUFSKURVEN FÜR EINE TRANSAMINASE-KATALYSIERTE SYNTHESЕ VON (S)-1-PHENYLETHYLAMIN MIT UND OHNE ISPC. REAKTIONSBEDINGUNGEN: 200 mM PHOSPHATPUFFER PH 7,5, 100 mM ACETOPHENON, 250 mM ISOPROPYLAMIN, 15 MG/ML LYOPHILISIERTER GANZE ZELLEN, 30 °C UND 0 mM BZW. 125 mM 3DPPA.

Zu sehen ist, dass die Modellreaktion nach etwa 24 h ihre Gleichgewichtslage bei ca. 19 mM erreicht hat, was dem thermodynamischen Gleichgewichtszustand bei einem 2,5-fachen Überschuss von IPA entspricht. Durch die Zugabe von 125 mM 3DPPA steigt neben der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, auch die Produktkonzentration im Gleichgewichtszustand auf 75 mM. Zusätzlich wurde in der nachfolgenden Aufreinigung eine hohe Produktsalz-Reinheit bestimmt, was auf eine selektive Kristallisation hinweist. Die Selektivität der Kristallisation lässt sich mit der geringen Löslichkeit von 3DPPA begründen. Diese liegt deutlich unterhalb der Löslichkeit des Ammoniumsalzes von IPA (ca. 55 mM). Demzufolge ist die 3DPPA-Konzentration in Lösung unter den gegebenen Bedingungen nicht hoch genug, um die Löslichkeitsgrenze des IPA-Salzes zu überschreiten. Abschließend konnte gezeigt werden, dass sich dieses Prinzip auf substituierte und aliphatische Substrate übertragen lässt. Hierfür wurden, wie in Tabelle 3 zu sehen, verschiedene aromatische und aliphatische Substrate ausgewählt und unter den gleichen Reaktionsbedingungen umgesetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TABELLE 3: ERWEITERTES SUBSTRATSPEKTRUM FÜR ISPC-UNTERSTÜTZTE TRANSAMINASE-KATALYSIERTE REAKTIONEN.
REAKTIONSBEDINGUNGEN: 200 mM PHOSPHATPUFFER PH 7,5, 100 mM ACETOPHENON, 250 mM ISOPROPYLAMIN, 15
MG/ML LYOPHILISIERTE GANZE ZELLEN, 30 °C UND 125 mM 3DPPA FÜR ISPC.

R	n	Referenz Umsatz / %	ISPC Umsatz / %	ee(S) / %
Ph	0	19	75	> 99,5
m-F-Ph	0	21	69	> 99,5
p-F-Ph	0	11	61	> 99,5
m-Cl-Ph	0	8	46	> 99,5
p-Cl-Ph	0	8	65	> 99,5
m-MeO-Ph	0	10	37	> 99,5
p-MeO-Ph	0	4	8	> 99,5
Cyclohexyl	0	0	8	n.d.
Me	2	61	53	n.d.
Me	3	37	72	> 99,5
Me	4	20	78	98,7
iPr	1	36	96	n.d.

In nahezu allen Experimenten führte der Einsatz des ISPC-Konzeptes zu einer Erhöhung des Gleichgewichtsumsatzes. Die einzige Ausnahme bildete 2-Pentanon ($R = Me, n = 2$), da das Reaktionsprodukt (S)-2-Aminopentan strukturell dem Donoramin IPA sehr ähnlich ist, wodurch die Löslichkeiten der Salze ebenfalls sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund kann das Reaktionsprodukt in diesem Fall nicht selektiv auskristallisiert werden.

Das hier gezeigte ISPC-Konzept kann unabhängig von der Art der ATA eingesetzt werden, sofern die eingesetzte Carbonsäure nicht inhibierend wirkt. Somit ist es für eine Vielzahl von Aminsynthesen anwendbar und kann durch den Einsatz verschiedener Carbonsäuren noch weiter optimiert werden. Des Weiteren wurde das vorgestellte Konzept zum Patent angemeldet, welches am 10.06.2020 erteilt wurde.^[34]

3.2 GRUNDLAGEN FÜR EINE KONTINUIERLICHE REAKTIONSFÜHRUNG

Obwohl das vorgestellte ISPC-Konzept grundlegend die Ausbeute von ATA-katalysierten Reaktionen erhöht, ist es für großtechnische Anwendungen noch nicht geeignet, da infolge einer geringen Reaktionsgeschwindigkeit eine unzureichende Produktivität erzielt wird. Dies äußert sich primär durch Reaktionszeiten von bis zu sieben Tagen. Eine Option zur Überwindung dieser geringen Produktivität ist die Überführung des Konzepts in einen kontinuierlichen Prozess. Die Substratzufuhr ist dabei das Hauptproblem, da das Produktamin durch die ISPC aus der Reaktionslösung gefällt wird und das Nebenprodukt Aceton theoretisch durch Inertgas oder Vakuum entfernt werden kann. In den bisherigen Experimenten hatten AP-Konzentrationen von 100 mM zudem keinen sichtbar inhibierenden Einfluss auf die Reaktion. Aus diesem Grund wird diese vergleichsweise hohe Konzentration auch für alle folgenden Experimente eingesetzt.

Ein Problem stellt der Einsatz und das Nachdosieren größerer Mengen IPA und 3DPPA dar. Beide Substanzen beeinflussen den pH-Wert, welcher infolgedessen überwacht und nachjustiert oder über konzentrierte Pufferlösungen stabilisiert werden muss. Zusätzlich liegt 3DPPA auf Grund seiner geringen Löslichkeit als Suspension vor, die sich kontinuierlich nachlässt.

Eine alternative Option, die das Dosierproblem von IPA und 3DPPA umgeht, ist die Verwendung eines Donorsalzes.^[35] Hierbei handelt es sich um ein Salz aus IPA und 3DPPA, welches als Feststoff in die Reaktionslösung gegeben werden kann. Das Salz wird im Reaktionsfortschritt kontinuierlich nachgelöst und hält hierdurch die Konzentrationen von IPA und 3DPPA auf einem nahezu konstanten Wert. Da es beim Nachlösen des Donorsalzes zu keiner Veränderung des pH-Wertes kommt, muss dieser auch nicht nachjustiert werden. Zusätzlich hat die feste Donorsalzphase keinen Einfluss auf die Reaktion, weswegen das Salz auch in größeren Mengen dazugegeben werden kann. Das Nachdosieren erfolgt dadurch automatisch. Somit wird das bisherige ISPC-Konzept, wie in Abbildung 22 dargestellt, um den Einsatz des Donorsalzes erweitert.

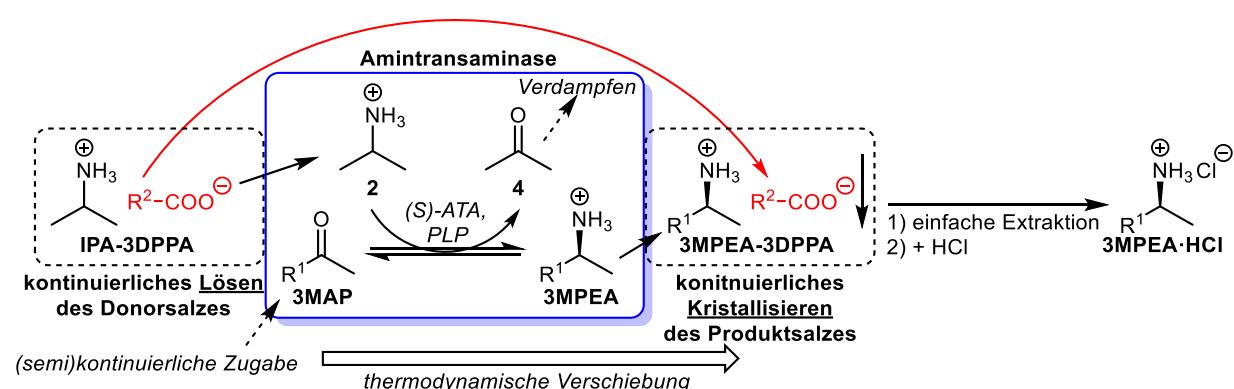


ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KONTINUIERLICHEN LÖSENS VON DONORSALZ UND KRISTALLISATION VON PRODUKTSALZ BEI TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN. R¹=ALIPHATISCH/AROMATISCH, R²=CH₂-CH(PH)₂.

Anschließend wurden Untersuchungen zur Optimierung der verschiedenen Parameter durchgeführt, woraus sich die in Tabelle 4 gezeigten Reaktionsbedingungen ergaben.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TABELLE 4: OPTIMIERTE KONZENTRATIONEN FÜR DIE DONORSALZ-GESTÜTZTE ISPC VON TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN BEI PH 7,5 UND 30 °C.

Substanz	Konzentration
HEPES	25 mM
3MAP	100 mM
IPA-3DPPA	125 mM
IPA	100 mM
PLP	5 mM
Enzym	12 U/ml

Für die folgenden Versuche wurde 3-Methoxyacetophenon (3MAP) als Substrat eingesetzt, da es bereits in früheren Experimenten gute Umsätze erzielte (Tabelle 3, R = m-MeO-Ph). Zusätzlich hat das Reaktionsprodukt (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (3MPEA) als Grundbaustein für das Medikament Rivastigmin eine pharmazeutische Anwendung und ist somit von industriellem Interesse (Abbildung 23). Rivastigmin ist ein hochpotentes Arzneimittel zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit im Frühstadium. Studien zeigten, dass das (S)-Enantiomer potenter ist als das (R)-Enantiomer. Um Komplikationen zu vermeiden sollte demnach die enantiomerenreine (S)-Form eingesetzt werden.^[36]

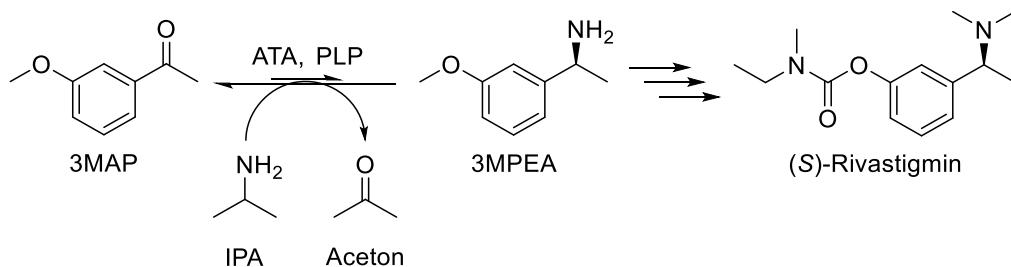


ABBILDUNG 23: ATA-KATALYSIERTE REAKTION ZUR SYNTHESE VON 3MPEA ALS GRUNDBAUSTEIN FÜR RIVASTIGMIN

Die oben genannten Bedingungen mit 3MAP als Substrat ermöglichen die Durchführung einer halbkontinuierlichen Reaktion, deren Ergebnisse in Abbildung 24 gezeigt sind. Das entstandene Aceton wurde ausgetragen, indem alle 24 h für eine Stunde ein leichtes Vakuum angelegt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung beprobt, um die Produkt- und Substratkonzentration zu bestimmen. Basierend darauf wurde dann die Konzentration von 3MAP und IPA-3DPPA auf ihre Ausgangskonzentration eingestellt.

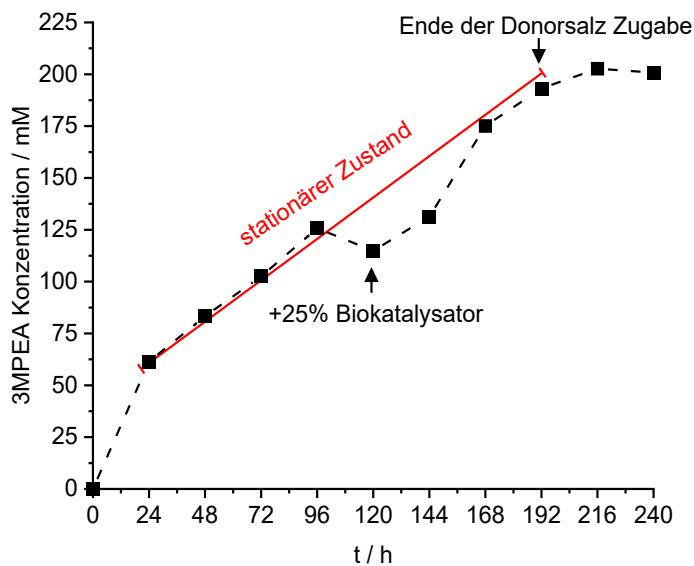


ABBILDUNG 24: PRÄPARATIVER ISPC-PROZESS FÜR DIE SYNTHESE VON (S)-1-(3-METHOXYPHENYL)ETHYLAMMONIUM-3,3-DIPHENYLPROPIONAT. REAKTIONSBEDINGUNGEN: 30°C, 25 mM HEPES-PUFFER PH 7,5, 100 mM 3MAP, 125 mM IPA-3DPPA 100 mM IPA, 12 U/ML LYOPHILISIERTE GANZE ZELLEN MIT 1 H PARTIELLEN ACETON-ENTFERNUNG ALLE 24 H.

Der beobachtete Einbruch in der steigenden Ausbeute ist durch einen Verlust an Enzymaktivität zu erklären, welche durch Zugabe von zusätzlicher ATA aufgefangen werden konnte. Um die Reaktion zu beenden, wurde nach 192 h ausschließlich 3MAP zugegeben. Infolgedessen wird das restliche, fest vorliegende IPA-3DPPA aufgebraucht und die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. Durch diesen hauptsächlich verfahrenstechnischen Ansatz konnte die Ausbeute nochmal deutlich gesteigert werden. Eine detaillierte Ausführung des Reaktionskonzeptes findet sich darüber hinaus auch in „Applied Biocatalysis: The Chemist’s Enzyme Toolbox“, welches 2020 erschien.^[37]

3.3 DESIGN EINES REAKTORMODELLS

Obwohl der in Abschnitt 3.2 entwickelte halbkontinuierliche Prozess bereits vergleichsweise überdurchschnittlich hohe Produktkonzentrationen erreichen konnte, bietet er Ansätze für Verbesserungen. Die mit zunehmender Feststoffmenge steigende Viskosität der Reaktionsmischung erschwert zum Beispiel eine homogene Durchmischung. Zusätzlich besteht die Salzphase während der Reaktion nicht mehr nur aus Produktamin und Carbonsäure, sondern auch zu großen Teilen aus Donoraminsalz. Dies kann zwar durch das Auslassen der Nachdosierung des Donorsalzes verringert werden, gänzlich ausgeschlossen ist die IPA-Kontamination dadurch aber nicht. Das kontinuierliche Abtrennen des Produktsalzes ist infolgedessen praktisch unmöglich. Damit das Produktsalz permanent und rein aus der Reaktionslösung gewonnen werden kann, sollte es räumlich vom Donorsalz getrennt werden. Dies bedingt den Einsatz eines alternativen Reaktormodells. Zusätzlich müssen die Zellen in einem Teil des Reaktors zurückgehalten werden, um die Kontamination des Produktsalzes mit Zellen zu vermeiden. Zeitgleich soll dadurch das Verstopfen von Filtern, die im späteren Reaktorsystem oder bei der Aufarbeitung eingesetzt werden, verhindert werden. Für das Zurückhalten der Zellen wurde der in Abbildung 25 gezeigte Membranreaktor mit einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) konstruiert.^[38]

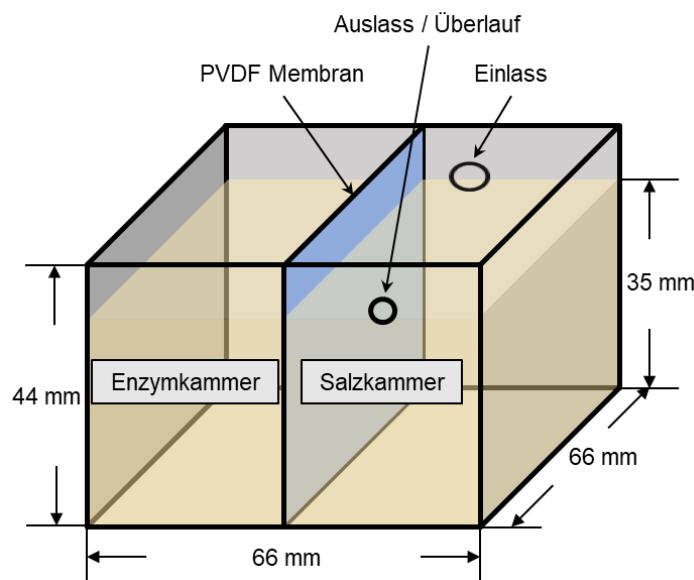


ABBILDUNG 25: REAKTORGEOMETRIE DES MEMBRANREAKTORS MIT POLYVINYLDENFLUORID-MEMBRAN (PVDF).

Die Membran mit einem cut-off von $0,2 \mu\text{m}$ unterteilt den Reaktor in zwei Kammern, der Enzymkammer und der Salzkammer. In der Enzymkammer werden die Zellen durch die Membran zurückgehalten, sodass sie nicht in die Salzkammer und somit auch nicht ins restliche Reaktorsystem gelangen. Zusätzlich basiert der Durchfluss durch die Membran ausschließlich auf Diffusion der Reaktanten und wird nicht durch einen Druckunterschied erzwungen. Dadurch wird das Risiko für Fouling, also das Verschmutzen und dadurch Blockieren der Membran, gesenkt. Für die Durchführung der Transaminase-katalysierten Reaktion im Membranreaktor, wurde die ATA in die Enzymkammer gegeben. Die Salzkammer ist sowohl mit festem Donorsalz zur Sättigung als auch mit festem Produktsalz ausgestattet, welches als Impfkristall dient.

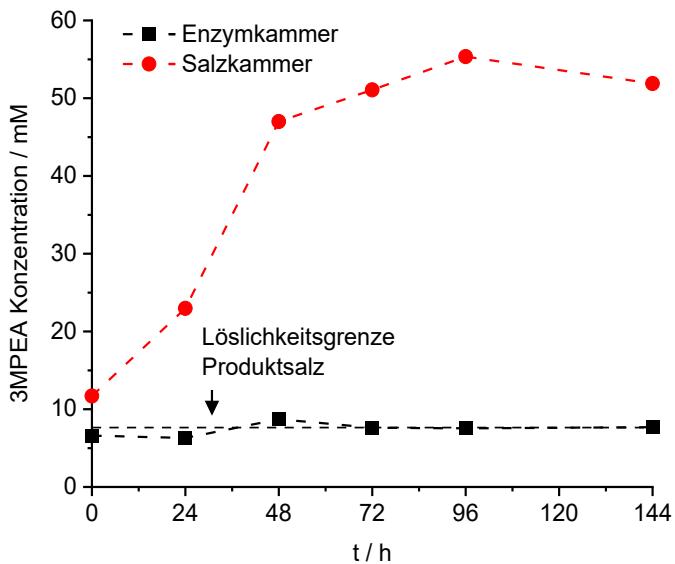


ABBILDUNG 26: 3MPEA-KONZENTRATIONSVERLAUF DER BEIDEN KAMMERN DES MEMBRANREAKTORS.
REAKTIONSBEDINGUNGEN: 30°C, 25 mM HEPES-PUFFER PH 7,5, 100 mM 3MAP, 125 mM IPA-3DPPA, 100 mM IPA, 12 U/mL LYOPHILISIERTE GANZE ZELLEN UND 566 MG 3MPEA-3DPPA ALS IMPFKRISTALLE IN DER SALZKAMMER.

Abbildung 26 zeigt, dass sich das Produkt hauptsächlich in der Salzkammer akkumuliert. Die Produktkonzentration bleibt in der Enzymkammer konstant und entspricht der Löslichkeitsgrenze des Produktsalzes. In der Salzkammer steigt sie dagegen bis zur Gleichgewichtslage der gesamten Reaktion an. Darüber hinaus wurde durch einen Bradford-Test die Akkumulation des Proteins in der Salzkammer ausgeschlossen. Somit ist gezeigt, dass die Diffusion des Produktamins durch die PVDF-Membran und die Wachstumsgeschwindigkeit der Produktsalzkristalle höher sind als die Reaktionsgeschwindigkeit der ATA. Bei gleicher Geschwindigkeit wäre eine Nukleation in der Enzymkammer möglich. Der Membranreaktor wurde anschließend zu dem in Abbildung 27 dargestellten Reaktorsystem erweitert. Aus dem Blickwinkel der Reaktionsführung ändern sich die Reaktionsbedingungen durch diesen Versuchsaufbau nur geringfügig. Die biokatalytische Reaktion findet weiterhin in der Enzymkammer statt, wohingegen die Salzkammer nur noch einen simplen Durchflussbereich für die klare Mutterlauge darstellt. Der Kontakt der Mutterlauge mit der Enzymkammer besteht wie zuvor über die Membran. Über sie kann frisches Substrat in die Enzymkammer diffundieren und entstandenes Produktamin aus dieser heraus. Anschließend fließt die Reaktionslösung in den ersten CSTR, den Kristallisator, in dem Impfkristalle des Produktsalzes vorliegen. Der automatische Fluss wurde an dieser Stelle des Versuchsaufbaus durch einen Höhenunterschied zwischen Membranreaktor und Kristallisator sichergestellt. Das Durchströmen des Membranreaktors führt zu einer Übersättigung der Mutterlauge mit dem Produktsalz. Die Übersättigung wird anschließend im Kristallisator an den Impfkristallen abgebaut und somit auf die Löslichkeitskonzentration reduziert. Durch einen Filter, mit einer Porengröße von 11 µm, werden die festen Salze zurückgehalten und die Mutterlauge in den zweiten CSTR, den sogenannten Sättiger, überführt. In diesem Reaktionsgefäß werden das im Membranreaktor verbrauchte Donoramin und die im Kristallisator ausgefällte Carbonsäure automatisch bis zur Löslichkeitsgrenze des Donorsalzes nachdosiert. Von hier wird die klare Mutterlauge wieder in den erstgenannten Membranreaktor transferiert und der Kreislauf geschlossen.

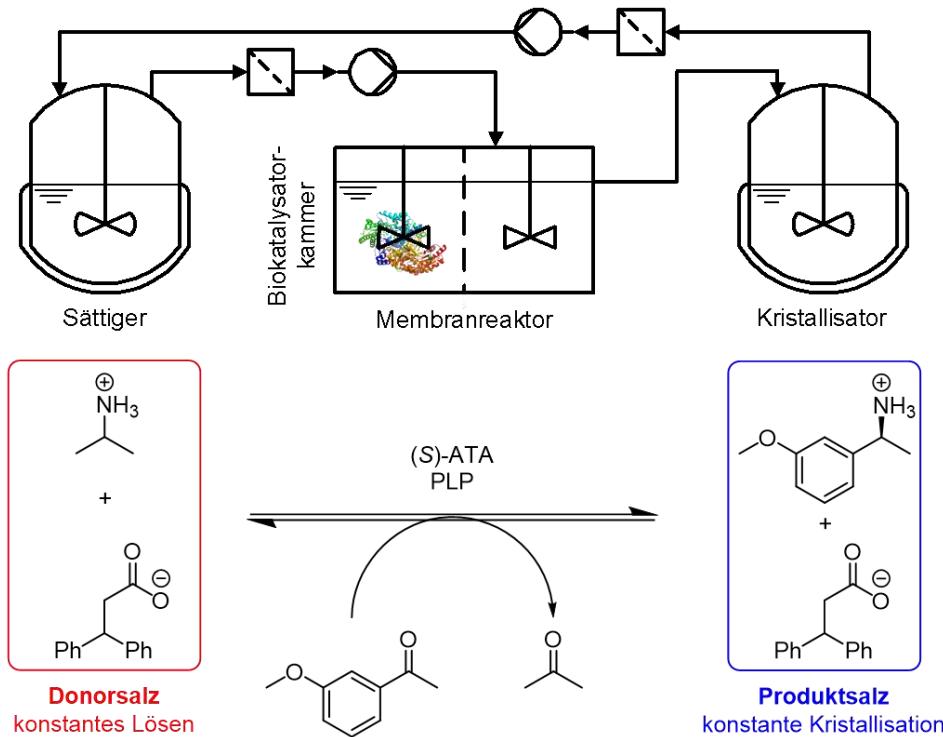


ABBILDUNG 27: REAKTIONSSCHEMA DER KONTINUIERLICHEN TRANSAMINASE-KATALYSIERTEN REAKTION MIT KONSTANTEM LÖSEN DES DONORSALZES (LINKS) UND PRODUKTSALZKRISTALLISATION (RECHTS) IN GETRENNNTEN GEFÄßen.

Um die Produktivität dieses Reaktorsystems zu überprüfen, wurde die in Abbildung 27 gezeigte Reaktion durchgeführt. Die zu Beginn konstant bleibenden Produktkonzentrationen in der Enzymkammer (Abbildung 28) belegen die erfolgreiche Funktionsweise des Reaktorsystems. Innerhalb von 33 h wurde 1 g Produktsalz gebildet, was einer Produktivität von 1,2 g/(L·d) entspricht.

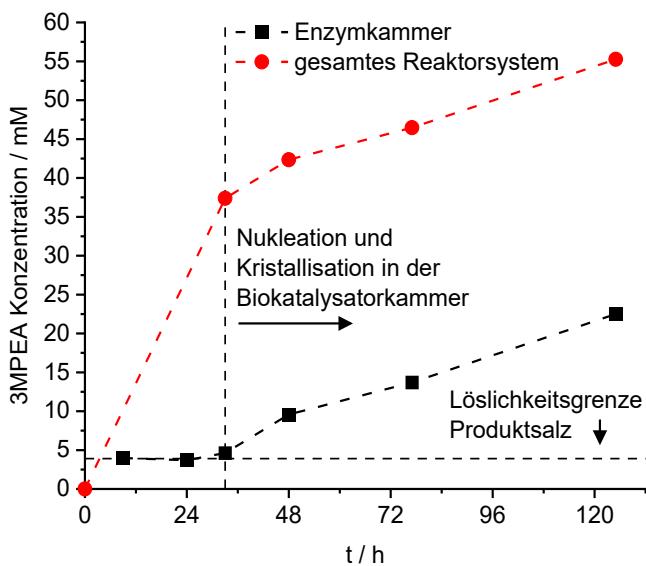


ABBILDUNG 28: 3MPEA-KONZENTRATIONSVERLAUF IN DER ENZYMKAMMER UND DEM GESAMTEN REAKTORSYSTEM.
REAKTIONSBEDINGUNGEN: 30°C, 25 mM HEPES-PUFFER PH 7,5, 100 mM 3MAP, 125 mM IPA-3DPPA 100 mM IPA, 12 U/ML LYOPHILISIERTE GANZE ZELLEN UND 1 G 3MPEA-3DPPA ALS IMPFKRISTALLE IM KRISTALLISATOR.

Nach 33 h wurde schließlich eine unerwünschte Kristallisation des Produktamins in der Enzymkammer beobachtet. Diese führte dazu, dass das entstehende Produktamin ab diesem Zeitpunkt nur noch dort kristallisiert und nicht mehr im Kristallisator. Dies kann durch eine unzureichende Durchmischung der Enzymkammer oder ein Verstopfen der PVDF-Membran hervorgerufen worden sein. Für eine vollständig kontinuierliche Fahrweise müsste zusätzlich noch das Nebenprodukt Aceton aktiv entfernt werden, da es sonst in der Reaktionslösung akkumuliert wird und so die Rückreaktion begünstigt. Grundsätzlich kann dies, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, durch Inertgas Austragen werden. Dies ist aber im großen Maßstab nicht ohne Weiteres möglich, da andere Substanzen wie Wasser oder das Substrat mit ausgetragen werden können. Die zunehmende Feststoffmenge im Kristallisator hat auf das Reaktionsgleichgewicht grundsätzlich keinen Einfluss. Durch eine zu große Feststoffmenge kann es hier aber zu einer unzureichenden Durchmischung oder sogar Verklumpung kommen. Demzufolge steht weniger Oberfläche für die Kristallisation zur Verfügung. Eine regelmäßige Entnahme eines Teils der Produktsalzkristalle ist demnach für einen kontinuierlichen Prozess empfehlenswert.

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass durch den Einsatz von nicht-katalytischen Mitteln sowohl das Reaktionsgleichgewicht einer Transaminase-katalysierten Reaktion positiv beeinflusst als auch zeitgleich das Downstream-Processing deutlich erleichtert werden kann. Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, bietet die ISPC die Grundlage für ein erleichtertes Downstream-Processing, was durch ein intelligentes Reaktorkonzept genutzt werden kann.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Untersucht wurde die Entwicklung einer *in situ*-Produktkristallisation zur Gleichgewichtsverschiebung von thermodynamisch-limitierten Transaminase-katalysierten Reaktionen. Dadurch sollte auf nicht-katalytischem Weg die Produktivität gesteigert sowie die Gewinnung des biokatalytisch erzeugten Produktamins erleichtert werden.

Zu diesem Zweck wurde mittels Löslichkeitsscreening eine Carbonsäure gesucht, die mit ausgewählten Produktaminen ein schwerlösliches Ammoniumsalz bilden. Die Carbonsäure 3,3-Diphenylpropionsäure ist in der Lage ausgewählte Amine selektiv aus der Reaktionslösung auszukristallisieren, wobei das eingesetzte Donoramin Isopropylamin in Lösung verbleibt. Dadurch konnte in verschiedenen Batch-Reaktionen das Reaktionsgleichgewicht signifikant auf die Produktseite verschoben werden. Die Zugabe einer Carbonsäure stellte dabei den entscheidenden Vorteil gegenüber herkömmlichen Amintransaminase-katalysierten Reaktionen dar.

Da die Produktivität auch unter Zuhilfenahme der *in situ*-Produktkristallisation zu gering ist, wurde darauf aufbauend der Einsatz eines Donorsalzes aus Isopropylamin und 3,3-Diphenylpropionsäure untersucht. Durch die Zugabe dieses Ammoniumsalzes konnte eine automatische kontinuierliche Nachdosierung der beiden Komponenten eingeführt werden, wodurch eine halbkontinuierliche Prozessführung ermöglicht wurde. Auf diesem Weg können durch eine Eintopfsynthese verschiedene chirale Amine biokatalytisch hergestellt werden. Die Grenzen dieses Verfahrens in Bezug auf das Substratspektrum und die Produktivität sind von den eingesetzten Transaminasen und Carbonsäuren abhängig und sind je nach Anwendung zu ermitteln.

Der Nachteil dieses Donorsalz-basierten ISPC-Konzepts ist die Verunreinigung des Produktsalzes mit anderen Feststoffen wie beispielsweise der Zellmasse oder mit Donorsalz. Um diese zu vermeiden, wurde ein Membranreaktor entwickelt, der Zellen von den Salzen trennt. Eine Rezyklierung der Zellen sowie der einfache Austausch der Zellmasse bei Aktivitätsverlust wird darüber hinaus parallel gewährleistet. Dabei können eine optimierte Reaktorgeometrie oder eine alternative Immobilisierungsmethode die enzymatische Aktivität an dieser Stelle zusätzlich steigern. Um Produkt- und Donorsalz dauerhaft voneinander zu trennen wurde der Membranreaktor um zwei kontinuierlich betriebene Reaktionsgefäße erweitert. Das so entwickelte Reaktorsystem stellt einen semi-kontinuierlichen Prozess dar, aus dem das Produktamin als festes Salz abfiltriert werden kann, ohne etwaige Verunreinigungen mit Donoramin oder anderen Substanzen der Reaktionslösung.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass die *in situ*-Produktkristallisation eine sinnvolle Erweiterung von Transaminase-katalysierten Reaktionen darstellt. Sie steigert nicht nur die Produktivität, sondern erleichtert auch deutlich das Downstream-Processing. Zusätzlich ist sowohl das Konzept als auch das Reaktorsystem unabhängig von der eingesetzten Transaminase und der eingesetzten Carbonsäure, was eine hohe Flexibilität ermöglicht.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, A. Thontowi, S. Schätzle, T. Tumlirsch, M. Svedendahl Humble, H. Land, P. Berglund, U. T. Bornscheuer, M. Höhne, *Connecting Unexplored Protein Crystal Structures to Enzymatic Function*, *ChemCatChem* **2013**, 5, 150.
- [2] D. M. Needham, *A quantitative study of succinic acid in muscle: Glutamic and aspartic acids as precursors*, *Biochem. J.* **1930**, 24, 208.
- [3] A. E. Braunstein, M. G. Kitzmann, *Formation and Breakdown of Amino-acids by Intermolecular Transfer of the Amino Group*, *Nature (London, U. K.)* **1937**, 140, 503.
- [4] P. P. Cohen, *Transamination with purified enzyme preparation (Transaminase)*, *J. Biol. Chem.* **1940**, 136, 565.
- [5] K. E. Cassimjee, B. Manta, F. Himo, *A quantum chemical study of the ω -transaminase reaction mechanism*, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 8453.
- [6] a) R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6223; b) A. Jastram, F. Langschwager, U. Kragl, *Reaktoren für spezielle technisch-chemische Prozesse: Biochemische Reaktoren in Handbuch chemische Reaktoren* (Hrsg.: W. Reschetilowski), Springer Berlin Heidelberg, Berlin Springer Spektrum, **2020**, S. 961–999.
- [7] T. Gerthsen, *Chemie für den Maschinenbau. Bd 1: Anorganische Chemie für Werkstoffe und Verfahren*, KIT Scientific Publishing, **2007**.
- [8] W. J. Moore, W. Paterno, *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, 2010. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, **1990**.
- [9] W. Borchardt-Ott, H. Sowa, *Kristallographie. Eine Einführung für Studierende der Naturwissenschaften*, 9. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.
- [10] J. W. Mullin, *Crystallization*, 4. Aufl., Elsevier professional, Amsterdam, **2001**.
- [11] H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern, *Binary and ternary phase diagrams of two enantiomers in solvent systems*, *Thermochim. Acta* **2002**, 382, 129.
- [12] G. Hofmann, *Kristallisation in der industriellen Praxis*, Wiley, **2004**.
- [13] J. Gänsch, N. Huskova, K. Kerst, E. Temmel, H. Lorenz, M. Mangold, G. Janiga, A. Seidel-Morgenstern, *Continuous enantioselective crystallization of chiral compounds in coupled fluidized beds*, *Chem. Eng. J.* **2021**, 422, 129627.
- [14] A. Behr, D. W. Agar, J. Jörissen, *Einführung in die Technische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [15] 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.
- [16] H. L. Le Chatelier, *Sur un énoncé générale des lois des équilibres chimiques*, *C. R. Acad. Sci.* **1884**, 786.
- [17] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 102. Aufl., de Gruyter, Berlin, **2007**.
- [18] a) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Chiral amine synthesis using omega-transaminases: an amine donor that displaces equilibria and enables high-throughput screening*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10714; b) A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green, E. O'Reilly, *A New Generation of Smart Amine Donors for Transaminase-Mediated Biotransformations*, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 12692.
- [19] R. C. Simon, N. Richter, E. Bustos, W. Kroutil, *Recent Developments of Cascade Reactions Involving ω -Transaminases*, *ACS Catal.* **2014**, 4, 129.
-

- [20] V. Leskovac, S. Trivić, D. Pericin, *The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae**, *FEMS Yeast Res.* **2002**, 2, 481.
- [21] a) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing ω -Transaminases*, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 2761; b) M. Höhne, S. Kühl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Efficient asymmetric synthesis of Chiral amines by combining transaminase and pyruvate decarboxylase*, *ChemBioChem* **2008**, 9, 363.
- [22] D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Formal asymmetric biocatalytic reductive amination*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9337.
- [23] T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Menyes, M. Pohl, D. Rother, *Efficient 2-step biocatalytic strategies for the synthesis of all nor(pseudo)ephedrine isomers*, *Green Chem.* **2014**, 16, 3341.
- [24] a) B.-K. Cho, J.-H. Seo, T.-W. Kang, B.-G. Kim, *Asymmetric synthesis of L-homophenylalanine by equilibrium-shift using recombinant aromatic L-amino acid transaminase*, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 83, 226; b) B.-K. Cho, J.-H. Seo, J. Kim, C.-S. Lee, B.-G. Kim, *Asymmetric Synthesis of Unnatural L-Amino Acids Usind Thermophilic Aromatic L-Amino Acid Transaminase*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2006**, 11, 299; c) S. Hanzawa, S. Oe, K. Tokuhisa, K. Kawano, T. Konayashi, T. Kudo, H. Kakisani, *Chemo-enzymatic synthesis of 3-(2-naphthyl)-L-alanine by an aminotransferase from the extreme thermophile, *Thermococcus profundus**, *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, 581; d) K. Würges, U. Mackfeld, M. Pohl, S. Lütz, S. Wilhelm, W. Wiechert, T. Kubitzki, *An Efficient Route to Both Enantiomers of allo-Threonine by Simultaneous Amino Acid Racemase-Catalyzed Isomerization of Threonine and Crystallization*, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2431; e) K. Würges, K. Petrussevska-Seebach, M. P. Elsner, S. Lutz, *Enzyme-assisted physicochemical enantioseparation processes-Part III: Overcoming yield limitations by dynamic kinetic resolution of asparagine via preferential crystallization and enzymatic racemization*, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 104, 1235; f) L. G. Encarnación-Gómez, A. S. Bommarius, R. W. Rousseau, *Reactive crystallization of selected enantiomers*, *Chem. Eng. Sci.* **2015**, 122, 416.
- [25] a) H. G. Kulla, *Enzymatic Hydroxylations in Industrial Application*, *CHIMIA* **1991**, 81; b) T. Yamane, R. Tanaka, *Highly accumulative production of L(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae**, *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, 115, 90; c) Y. Wang, Di Cai, C. Chen, Z. Wang, P. Qin, T. Tan, *Efficient magnesium lactate production with in situ product removal by crystallization*, *Bioresour. Technol.* **2015**, 198, 658; d) M.-T. Gao, M. Hirata, E. Toorisaka, T. Hano, *Development of a fermentation process for production of calcium-L-lactate*, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2009**, 48, 464.
- [26] a) M. Furui, N. Sakata, O. Otsuki, T. Tosa, *A Bioreactor-Crystallizer for L-Malic Acid Production*, *Biocatal. Biotransform.* **1988**, 2, 69; b) J. Bao, K. Koumatsu, K. Furumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, K. Nakao, *Optimal operation of an integrated bioreaction-crystallization process for continuous production of calcium gluconate using external loop airlift columns*, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, 56, 6165; c) K. Xu, P. Xu, *Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based in situ product removal*, *Bioresour. Technol.* **2014**, 163, 33.
- [27] a) M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de Vroom, H. M. Moody, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in "aqueous solution-precipitate" systems. High substrate concentration and supersaturation effect*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 509; b) M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de
-

- Vroom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *Highly efficient synthesis of ampicillin in an "aqueous solution-precipitate" system: repetitive addition of substrates in a semicontinuous process*, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73, 426; c) M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de Vroom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: a new approach to optimization*, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 78, 589; d) A. L. O. Ferreira, R. L. C. Giordano, R. C. Giordano, *Nonconventional Reactor for Enzymatic Synthesis of Semi-Synthetic β -Lactam Antibiotics*, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, 46, 7695; e) L. G. Encarnación-Gómez, A. S. Bommarius, R. W. Rousseau, *Reactive crystallization of β -lactam antibiotics*, *React. Chem. Eng.* **2016**, 1, 321; f) M. A. McDonald, A. S. Bommarius, R. W. Rousseau, *Enzymatic reactive crystallization for improving ampicillin synthesis*, *Chem. Eng. Sci.* **2017**, 165, 81.
- [28] a) J. Urbanus, C. P. M. Roelands, J. Mazurek, D. Verdoes, J. H. ter Horst, *Electrochemically induced co-crystallization for product removal*, *CrystEngComm* **2011**, 13, 2817; b) J. Urbanus, R.J.M. Bisselink, K. Nijkamp, J. H. ter Horst, D. Verdoes, C.P.M. Roelands, *Integrated product removal of slightly water-soluble carboxylates from fermentation by electrochemically induced crystallization*, *J. Membr. Sci.* **2010**, 363, 36.
- [29] T. Nasrollahnejad, J. Urbanus, J. H. ter Horst, D. Verdoes, C. P.M. Roelands, *Electrochemically Induced Crystallization as a Sustainable Method for Product Recovery of Building Block Chemicals: Techno-Economic Evaluation of Fumaric Acid Separation*, *Ind. Biotechnol.* **2012**, 8, 133.
- [30] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice.*, Oxford University Press: New York **1998**, 160pp.
- [31] R. A. Sheldon, *The E Factor: fifteen years on*, *Green Chem.* **2007**, 9, 1273.
- [32] B. M. Trost, *The atom economy--a search for synthetic efficiency*, *Science (New York, N.Y.)* **1991**, 254, 1471.
- [33] D. Hülsewede, M. Tänzler, P. Süß, A. Mildner, U. Menyes, J. von Langermann, *Development of an in situ-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions*, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 18, 2130.
- [34] a) J. von Langermann, D. Hülsewede, M. Tänzler, U. Menyes, P. Süß, *METHOD FOR PREPARING AMINES FROM CARBONYL COMPOUNDS BY TRANSAMINASE REACTION UNDER SALT PRECIPITATION*, EP3486324 (B1), **2017**; b) J. von Langermann, D. Hülsewede, M. Tänzler, U. Menyes, P. Süß, *METHOD FOR PREPARING AMINES FROM CARBONYL COMPOUNDS BY TRANSAMINASE REACTION UNDER SALT PRECIPITATION*, WO2019096973 (A1), **2018**.
- [35] D. Hülsewede, J.-N. Dohm, J. von Langermann, *Donor Amine Salt-Based Continuous in situ- Product Crystallization in Amine Transaminase-Catalyzed Reactions*, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 2727.
- [36] a) Enz, Albert, Basel, CH, *Phenylcarbamate for the inhibition of acetylcholinesterase*, DE 3805744 (C2), **1988**; b) M. R. Farlow, J. L. Cummings, *Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease*, *Am. J. Med.* **2007**, 120, 388; c) M. Emre, *Rivastigmine in Parkinson's Disease Dementia*, *CNS Drugs* **2006**, 20, 748; d) M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chemoenzymatic asymmetric total synthesis of (S)-Rivastigmine using omega-transaminases*, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5500.

- [37] D. Hülsewede, J. Neuburger, J. von Langermann, *Application of In Situ Product Crystallisation in the Amine Transaminase from *Silicibacter pomeroyi*-Catalysed Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine in Applied biocatalysis. The chemist's enzyme toolbox* (Hrsg.: J. Whittall, P. Sutton), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2021, S. 173–178.
- [38] D. Hülsewede, E. Temmel, P. Kumm, J. von Langermann, *Concept Study for an Integrated Reactor-Crystallizer Process for the Continuous Biocatalytic Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine*, *Crystals* 2020, 10, 345.

1. PUBLIKATION

VI. 1. PUBLIKATION

Dennis Hülsewede, Marco Tänzler, Philipp Süss, Andrea Mildner, Ulf Menyes, und Jan von Langermann

Development of an in situ-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions

Communication *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2130–2133

DOI: 10.1002/ejoc.201800323

Abstract: The synthesis of enantiopure amines via amine transaminases involves several challenges including unfavorable reaction equilibria and product inhibition. Described here is a non-catalytic approach to overcome such problems by using an in situ-product crystallization (ISPC) to selectively remove a targeted product amine from an amine transaminase-catalyzed reaction. The continuous removal of the product amine from its reaction solution as a barely soluble salt effectively yields a displacement of the reaction equilibrium towards the products and facilitates a simple downstream processing approach via filtration. The targeted product amine is eventually obtained from the salt, while the counterion compound can be easily recycled.

Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Das Grundkonzept wurde von Marco Tänzler und Jan von Langermann erstellt. Die Screening-Versuche wurden von Andrea Mildner durchgeführt. Philipp Süss und Ulf Menyes haben die mikrobiellen Arbeiten durchgeführt. Die Hauptexperimente der Arbeit wurden von Dennis Hülsewede und Marco Tänzler konzeptioniert und von Dennis Hülsewede durchgeführt sowie ausgewertet. Das Manuskript wurde von Dennis Hülsewede verfasst und von Jan von Langermann überarbeitet.

Equilibrium Studies

Development of an *in situ*-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions

Dennis Hülsewede,^[a] Marco Tänzler,^[a] Philipp Süss,^[b] Andrea Mildner,^[a,c] Ulf Menyes,^[b] and Jan von Langermann^{*[a]}

Abstract: The synthesis of enantiopure amines via amine transaminases involves several challenges including unfavorable reaction equilibria and product inhibition. Described here is a non-catalytic approach to overcome such problems by using an *in situ*-product crystallization (ISPC) to selectively remove a targeted product amine from an amine transaminase-catalyzed reaction. The continuous removal of the product amine from

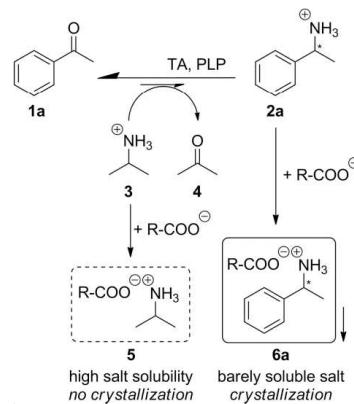
its reaction solution as a barely soluble salt effectively yields a displacement of the reaction equilibrium towards the products and facilitates a simple downstream processing approach via filtration. The targeted product amine is eventually obtained from the salt, while the counterion compound can be easily recycled.

Introduction

Biotransformation became a powerful technique over the past decades for the synthesis of valuable compounds on laboratory and industrial scale.^[1–7] Herein pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent transaminases (TAs) and especially amine transaminases (ATAs) have gained in recent years a significant impact on the synthesis of optically pure amines, which are valuable building blocks for various agrochemicals and active pharmaceutical ingredients, e.g. sitagliptin.^[8–14] These enzymes catalyze the deamination of a primary amine (amine donor) with a simultaneous amination of an aldehyde or ketone (amine acceptor). The transamination-reaction can be carried out as a kinetic resolution of a racemic amine or an asymmetric synthesis from the respective prochiral ketone.^[15] Due to a maximum yield of 100 % the asymmetric synthesis is in theory preferred, especially if a catalyst with high enantioselectivity is used.^[16] Unfortunately, thermodynamic limitations and certain product inhibitions tend to limit the applicability of transaminases in asymmetric synthesis, which needs to be overcome for synthetic purposes.^[17–21] Aside using an uneconomic excess of amine donor, complex (co)product removal techniques are currently considered, e.g. enzymatic cascades, membrane processes and non-catalytic side reactions.^[22–30] Such techniques

unfortunately increase the overall complexity of biocatalytic reaction systems, require additional or tailor-made co-substrates, and generate further by-products.^[31–34]

With this study we present a novel crystallization-based approach for the direct removal of a desired product amine from an amine transaminase-catalyzed reaction (Scheme 1).



Scheme 1. Combination of an *in situ*-product crystallization (ISPC) with an amine transaminase-catalyzed reaction to yield a barely soluble 1-phenylethylamine salt.

Results and Discussion

The product amine **2** is herein selectively crystallized from solution as a barely soluble amine salt **6**, while all other reactants, especially the applied donor amine **3**, remain in solution. This

[a] Institute of Chemistry, Biocatalysis Group, University of Rostock
Albert-Einstein-Straße 3A, 18059 Rostock, Germany
E-mail: jan.langermann@uni-rostock.de
www.langermann.chemie.uni-rostock.de

[b] Enzymicals AG
Walther-Rathenau-Straße 49a, 17489 Greifswald, Germany

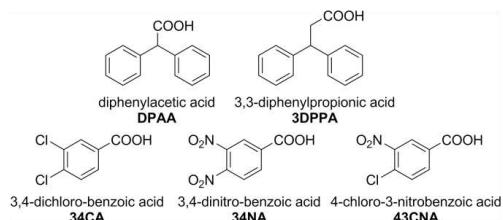
[c] Institute for Chemical and Thermal Process Engineering,
Braunschweig University of Technology
Franz-Liszt-Straße 35a, 38106 Braunschweig, Germany

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800323>.

in situ-product crystallization (ISPC) continuously removes the desired product amine from solution and thus yields an equilibrium displacement towards the products.^[35–37] The counterion (here shown as a carboxylate) is added directly to the reaction solution and can be isolated for reuse from the formed solid salt. A stoichiometric use of the carboxylate in comparison to all applied amines is not required (see below).

Firstly, the main requirement of this concept is the choice of a specific counterion, which generates a barely soluble salt with the target amine for its crystallization, while the donor amine salt is not crystallized. Unfortunately, most commonly used amine salts, especially amine halide salts, show very high solubility in aqueous solutions, and thus are not applicable for such an ISPC concept. Moreover, simple and reliable predictive approaches for amine salt solubilities are not available. Second, the used transaminase has to tolerate the required concentration of the chosen counterion. Third, the formed salt has to be stable under process conditions and should be easily recovered from the reaction mixture (filtration).

Consequently, commercially readily available aliphatic, aromatic and heteroaromatic carboxylic acids were selected and screened as their respective carboxylate salts towards common amines from an amine transaminase-catalyzed reaction. 1-Phenylethylamine and substituted derivatives **2a–f** served as model product amines, and were compared with typical donor amines such as isopropylamine **3**, racemic 2-butylamine, DL-alanine and L-alanine (see Supporting Information for further details). Here the salt of the product amine needs to exhibit a significant lower solubility than its donor amine salt counterpart since the donor amine is still applied with an excess. This straight-forward screening approach resulted in two benzyl-benzene-based acids and three benzoic acid derivatives that matched the above-mentioned criteria (as the respective carboxylate ions at pH 7.5) (Scheme 2). Noteworthy, all three benzoic acid derivatives show a 3,4-substitution pattern, which seems to be beneficial for the crystallization of enantiopure 1-phenylethylamine.



Scheme 2. Investigated carboxylic acids for an in situ-product crystallization of amines from an amine transaminase-catalyzed reaction.

For example, the isopropylamine salt of 4-chloro-3-nitrobenzoic acid (**43CNA**) **5** shows a very high solubility of 993 mmol L⁻¹, whereas the 1-phenylethylamine salt of **43CNA** **6a** is considerably less soluble with 22 mmol L⁻¹. As given by LE CHATELIER's principle, the solubility of such amine salts can be further reduced if an over-stoichiometric amount of carboxylate is added to the mother liquor, which pushes the equilib-

rium from the dissociated forms in solution towards its non-dissociated solid salt form (precipitated).

The applicability of the three best acids was tested with 7 exemplary amine transaminases from *Aspergillus fumigatus* (*AfATA*), *Gibberella zeae* (*GzATA*), *Neosartorya fischeri* (*NfATA*), *Aspergillus oryzae* (*AoATA*), *Aspergillus terreus* (*AtATA*), *Mycobacterium vanbaalenii* (*MvATA*) and *Silicibacter pomeroyi* (*SpATA*) (Figure 1).

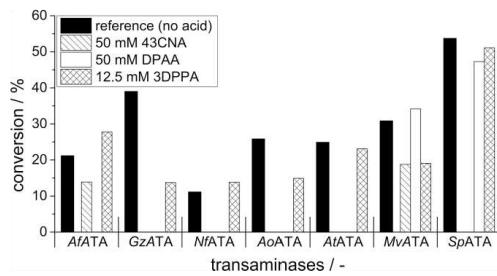


Figure 1. Effects of 43CNA, DPAA and 3DPPA on selected amine transaminases. Conditions: 200 mM phosphate buffer pH 7.5, 10 mM acetophenone 1, 500 mM (43CNA and DPAA) or 250 mM (3DPPA) isopropylamine, 5 mg mL⁻¹ lyophilized cell extract, 30 °C, 22 h; the obtained concentrations of **2** were intentionally held below the solubility limit of product salt **6** to prevent an undesired in situ-product crystallization; 43CNA was chosen as a representative of the identified benzoic acid derivatives.

The results show that almost all investigated amine transaminases are already strongly inhibited by 50 mM of the more soluble acids 43CNA and DPAA. Herein *MvATA* and *SpATA* were identified as the most stable enzymes. A noticeable exception from these results is the acid 3DPPA, which is only sparingly soluble in buffered solutions. This effectively limits the carboxylate concentration in an aqueous solution to a maximum of ≤ 25 mM, depending on temperature and pH. The excess of solid 3DPPA remains suspended in the reaction mixture. Such a low 3DPPA-concentration also does not significantly inhibit the investigated ATAs. Fortunately, the investigated 3DPPA-salts exhibit the lowest solubility of product amine salt **6**, which fits perfectly into the above mentioned ISPC-requirements (Table S3 and S4, supporting information). Consequently, 3DPPA was identified as the most valuable acid for the application in a crystallization-based in situ-product removal (ISPR) of amine **2** from an amine transaminase-catalyzed reaction.

The use of 3DPPA in combination with an exemplary *SpATA*-catalyzed conversion of 100 mM acetophenone **1a** to (S)-1-phenylethylamine **2a** shows clearly the synthetic advantage of an acid-based ISPC (Figure 2). The classical reaction approach with a low donor amine concentration of only 250 mM isopropylamine yields a non-sufficient conversion of 19 %. A simple addition of 1.25 equiv. solid 3DPPA improved the overall conversion directly to ca. 75 %, regardless of the use as a whole cell biocatalyst or partially purified cell extract.

The majority of product **2** is afterward present as solid salt **6**, which can be almost quantitatively recovered by filtration after cooling the reaction mixture to 0 °C. Thus this ISPC-concept with 3DPPA translates to a more atom-efficient synthesis

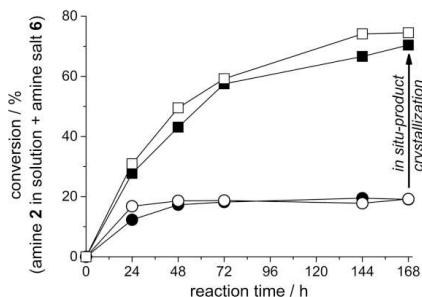


Figure 2. Time progression curves for a SpATA-catalyzed synthesis of (S)-1-phenylethyl-amine with and without in situ-product crystallization (ISPC): □: whole cells or ■-cell extract with 125 mM 3DPPA; ▲: whole cells or ● cell extract without 3DPPA. Conditions: 200 mM phosphate buffer pH 7.5, 100 mM acetophenone, 250 mM isopropylamine, 15 mg mL⁻¹ lyophilized cell extract or whole cells, 30 °C.

since less donor amine is required and a simplified downstream processing-approach is facilitated (see below). Noteworthy, the low solubility of 3DPPA does not limit the crystallization of product amine salt since the constant removal of 3DPPA from aqueous solution is continuously compensated back to its original solubility limit by a simultaneous dissolution of 3DPPA (from excess solid).

The shown ISPC-concept with acid 3DPPA was also successfully used for the SpATA-catalyzed conversion of 100 mM of selected acetophenone derivatives **1b-g** and five non-aromatic substrates **1h-l** (Table 1). As expected, for all substrates low conversions were obtained without ISPC due to the low, but still over-stoichiometric, use of 250 mM isopropylamine. A simple addition of 3DPPA increases product formation significantly for

Table 1. ISPC-supported SpATA-catalyzed synthesis of chiral amines.

substrate	R ¹	x	conversion	conversion	ee(S) [%] ^[a]
			reference [%]	ISPC [%]	
1a	Ph	0	19	75	> 99.5
1b	m-F-Ph	0	21	69	> 99.5
1c	p-F-Ph	0	11	61	> 99.5
1d	m-Cl-Ph	0	8	46	> 99.5
1e	p-Cl-Ph	0	8	65	> 99.5
1f	m-MeO-Ph	0	10	37	> 99.5
1g	p-MeO-Ph	0	4	8	> 99.5
1h	Cy	0	0	8	n.d.
1i	Me	2	61	53	n.d.
1j	Me	3	37	72	> 99.5
1k	Me	4	20	78	98.7
1l	iPr	1	36	96	n.d.

[a] Values are given for the ISPC-supported reaction; Conditions: 200 mM phosphate buffer pH 7.5, 100 mM substrate, 250 mM isopropylamine, 15 mg mL⁻¹ lyophilized whole cells, 30 °C; 125 mM 3DPPA for ISPC; n.d. – not determined.

almost all investigated substrates. Improvements range between 2 and 8.1-fold with yields of up to 96 % for **1l**, while the products are selectively crystallized as its 3DPPA-salts. Noteworthy, the obtained high enantiomeric excesses of the product amines are solely based on the high enantioselectivity of the applied enzyme and are not affected by the crystallization of the respective amine salt.^[38] The remaining mother liquor, including excess isopropylamine, can be directly reused for a further increase of atom efficiency of the transaminase-catalyzed reaction. Even higher donor amine concentrations will yield a further increase in conversion, but include the risk of an undesired crystallization of donor amine salt, which eventually yields a decrease in product formation. A noticeable entry is also the conversion of 2-pentanone **1i**, which represents the lower limit of the shown concept. Herein the respective product amine salt is too similar to its donor amine salt and thus both salts crystallize simultaneously, lowering the apparent conversion.

Isolation of product amine **2** is easily realized by dissolving product salt **6** in an aqueous solution at high pH, followed by extraction with MTBE and a subsequent solvent evaporation. Alternatively, the respective hydrochloride salt can be directly crystallized from the ether phase by a careful addition of HCl. In addition, the spent acid 3DPPA can also be precipitated from the remaining aqueous phase by acidification with concentrated HCl, due to its low solubility at low pH.

Conclusion

Summarizing, the presented in situ-product crystallization of an amine from an amine transaminase-catalyzed reaction by addition of a selected acid/carboxylate presents a powerful synthetic alternative to the use of tailor-made donor amines and complex cascade reaction systems. The main advantages of this ISPC are a more atom-efficient use of donor amines and a simplified downstream processing-approach by filtration. The targeted product amine can be afterwards extracted from its salt and the applied 3DPPA acid easily recycled.

Experimental Section

General Semi-preparative Procedure for the Amine Transaminase-Catalyzed Synthesis of 2a-m in Combination with an in situ-product Crystallization: To 25 mL of 200 mM phosphate buffer pH 7.5 532 µL isopropylamine (\triangleq 250 mM) and 707 mg of 3DPPA (\triangleq 125 mM) were given and the resulting suspension adjusted to pH 7.5 with aqueous H₃PO₄ solution. Afterwards PLP, substrate (\triangleq 100 mM) and biocatalyst were added and the resulting mixture shaken at 200 rpm. After completion of the reaction the resulting mixture was filtered to obtain the formed product amine salt. (This solid will also contain the remaining biocatalyst and excess 3DPPA.) Afterwards the solid fraction was washed with 10 mL of MTBE to remove remaining substrate and parts of excess 3DPPA. The solid was then given into 5 mL of water, 0.5 mL of conc. NaOH was added to increase pH and formed product **2** extracted with 5 mL of MTBE. After phase separation the product was obtained as its hydrochloride by a slow addition of HCl to the ether phase. 3DPPA can be precipitated from the remaining aqueous solution by adding conc. HCl, e.g. for recycling (isolated yield 71 %).

General Reaction Control Procedure: Samples (500 µL) were taken periodically and thoroughly mixed by a vortex mixer with 50 µL conc. NaOH to quench the reaction and increase pH. Afterwards 500 µL MTBE were added, mixed again by a vortex mixer and centrifuged (2 min, 3000 rpm) to improve phase separation. 200 µL were taken from the organic layer, combined with 50 µL of a 25 mM *n*-decane solution in MTBE (internal standard) and subsequently analyzed by gas chromatography (column: CP-Chirasil-Dex CB; 25 m, 0.25 mm, 0.25 µm by Agilent, USA). Enantiomeric excesses of the obtained amines were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Chiralcel OD-H column with a *n*-heptane/ethanol eluent (see also supporting information).

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Udo Kragl for his ongoing support and fruitful discussions, Jennifer Kuziola and Jan-Niklas Dohm for their help with the acid screening procedure, Dr. Dirk Michalik for his assistance with NMR measurements and Dr. Christine Fischer and Eleonora Gerova-Martin from the analytical department of Leibniz Institute for Catalysis, Rostock for measuring the enantiomeric excesses of amine samples. Funding by German Federal Ministry of Education and Research (BMBF - Bundesministerium für Bildung und Forschung; project number: 031A123) and German Research Foundation (DFG - Deutsche Forschungsgemeinschaft; LA 4183/1-1) is gratefully acknowledged.

Keywords: Biocatalysis · Amine synthesis · Product removal · Crystallization · Chirality

- [1] T. Narancic, R. Davis, J. Nikodinovic-Runic, K. E. O'Connor, *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 943–954.
- [2] J. M. Choi, S. S. Han, H. S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443–1454.
- [3] M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- [4] D. Munoz Solano, P. Hoyos, M. J. Hernaiz, A. R. Alcántara, J. M. Sánchez-Montero, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196–207.
- [5] C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605.
- [6] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [7] R. Wohlgemuth, *New Biotechnol.* **2009**, *25*, 204–213.
- [8] I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263–8284.
- [9] M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6965–6982.
- [10] H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180–192.

- [11] W. Kroutil, E. M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopal, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Sirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751–759.
- [12] M. S. Malik, E. S. Park, J. S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163–1171.
- [13] S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007–3047.
- [14] A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1974–1976; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2018.
- [15] D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284–300.
- [16] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332.
- [17] R. J. Meier, M. T. Gundersen, J. M. Woodley, M. Schürmann, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2594–2597.
- [18] P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Kröhne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652–660.
- [19] M. T. Gundersen, R. Abu, M. Schürmann, J. M. Woodley, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 567–570.
- [20] M. D. Truppo, J. David Rozzell, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234–237.
- [21] M. T. Gundersen, P. Tufvesson, E. J. Rackham, R. C. Lloyd, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 602–608.
- [22] S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2553–2559.
- [23] Y. Satyawali, E. Ehimen, L. Cauwenberghs, M. Maesen, P. Vandezande, W. Dejonghe, *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 97–104.
- [24] S. Heintz, T. Börner, R. H. Ringborg, G. Rehn, C. Grey, M. Nordblad, U. Krühne, K. V. Gernaey, P. Adlercreutz, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 600–609.
- [25] G. Rehn, B. Ayres, P. Adlercreutz, C. Grey, *J. Mol. Catal. B* **2016**, *123*, 1–7.
- [26] A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green, E. O'Reilly, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692–12695.
- [27] T. Börner, G. Rehn, C. Grey, P. Adlercreutz, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 793–799.
- [28] A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714–10717; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10890.
- [29] K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5569–5571.
- [30] G. Rehn, P. Adlercreutz, C. Grey, *J. Biotechnol.* **2014**, *179*, 50–55.
- [31] R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143.
- [32] Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 930–943.
- [33] J. Lima-Ramos, P. Tufvesson, J. M. Woodley, *Green Process Synth.* **2014**, *3*, 195–213.
- [34] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479–1493.
- [35] M. Bechtold, S. Panke, *Chimia* **2009**, *63*, 345–348.
- [36] E. M. Buque-Taboada, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, L. A. M. Van Der Wielen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 1–12.
- [37] B. K. Cho, J. H. Seo, T. W. Kang, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 226–234.
- [38] F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, A. Thontowi, S. Schätzle, T. Tumlirsch, M. Svedendahl Humble, H. Land, P. Berglund, U. T. Bornscheuer, M. Höhne, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 150–153.

Received: February 23, 2018

VII. 2. PUBLIKATION

Jan von Langermann, Dennis Hülsewede, Marco Tänzler, Ulf Menyes, Philipp Süss

METHOD FOR PREPARING AMINES FROM CARBONYL COMPOUNDS BY
TRANSAMINASE REACTION UNDER SALT PRECIPITATION

EP-Patent: EP 3486324 B1 (eingereicht am 17.11.2017 und erteilt am 10.06.2020)

WO-Patent: WO 2019096973 A1 (eingereicht am 16.11.2018)

Abstract: The present invention relates to a method for preparing an amino salt compound comprising: i) providing a carbonyl compound; ii) reacting the carbonyl compound provided according to (i) in the presence of a transaminase with ii-a) at least one primary amine; and ii-b) at least one carboxylic acid; thereby obtaining a mixture comprising an at least partially crystallized amino salt compound comprising a cation and a carboxylate anion based on the at least one carboxylic acid added according to (ii-b). The invention also relates to an amino salt compound obtained or obtainable by the method and to the amino salt compound per se. Furthermore, the invention relates to a composition comprising a) an amine of general formula (IIa); and b) at least one carboxylic acid of general formula (III).

Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Die Patentschrift wurde, basierend auf der ersten Publikation von einer Patentanwaltskanzlei verfasst. Jan von Langermann, Dennis Hülsewede, Marco Tänzler, Ulf Menyes und Philipp Süss haben beim Erstellen zugearbeitet.

2. PUBLIKATION



EP 3 486 324 B1

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication and mention
of the grant of the patent:
10.06.2020 Bulletin 2020/24

(51) Int Cl.:
C12P 13/00 (2006.01)

(21) Application number: **17202282.4**

(22) Date of filing: **17.11.2017**

(54) METHOD FOR PREPARING AMINES FROM CARBONYL COMPOUNDS BY TRANSAMINASE REACTION UNDER SALT PRECIPITATION

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON AMINEN AUS CARBONYLVERBINDUNGEN DURCH TRANSAMINASEREAKTION UNTER SALZFÄLLUNG

PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'AMINES À PARTIR DE COMPOSÉS CARBONYLES PAR RÉACTION DE TRANSAMINASE SOUS UNE PRÉCIPITATION DE SELS

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR

(43) Date of publication of application:
22.05.2019 Bulletin 2019/21

(73) Proprietors:
• Enzymicals AG
17489 Greifswald (DE)
• Universität Rostock
18055 Rostock (DE)

(72) Inventors:
• von Langermann, Jan
18059 Rostock (DE)
• Hülsewede, Dennis
18057 Rostock (DE)
• Tänzler, Marco
14473 Potsdam (DE)
• Menyes, Ulf
17509 Neu Boltenhagen (DE)
• Süss, Philipp
17491 Greifswald (DE)

(74) Representative: Altmann Stössel Dick
Patentanwälte PartG mbB
Dudenstrasse 46
68167 Mannheim (DE)

(56) References cited:
WO-A1-2011/026556

- DATABASE UniParc [Online] 14 April 2017 (2017-04-14), N.N.: "Mycobacterium bacteremicum", XP002780153, Database accession no. UPI0009F6A547
- BUQUE-TABOADA ET AL: "In situ product recovery (ISPR) by crystallization: basic principles, design, and potential applications in whole-cell biocatalysis", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 71, 2006, pages 1-12, XP019422047,
- HEINTZ ET AL: "Development of in situ product removal strategies in biocatalysis applying scaled-down unit operations", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 114, 12 October 2016 (2016-10-12), pages 600-609, XP002780154,
- HÜLSEWEDE ET AL: "Development of an in situ-product crystallization (ISPC)-concept to shift the reaction equilibria of selected amine transaminase-catalyzed reactions", EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY 10.1002/EJOC.201800323, March 2018 (2018-03), pages 1-5, XP002780145,
- VON LANGERMANN: "Equilibrium displacement by in situ-product crystallisation (ISPC) in transaminase-catalysed reactions", AMINE BIOCATE 3.0, Manchester, December 2017 Conference presentation, December 2018 (2018-12), pages 1-3, XP002780155, Retrieved from the Internet:
URL:https://aminebiocat3.com/wp-content/uploads/Amine_Biocat_3-0_Agenda.pdf [retrieved on 2018-04-17]

Note: Within nine months of the publication of the mention of the grant of the European patent in the European Patent Bulletin, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to that patent, in accordance with the Implementing Regulations. Notice of opposition shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

EP 3 486 324 B1

Printed by Jouve, 75001 PARIS (FR)

VIII. 3. PUBLIKATION

Dennis Hülsewede, Jan-Niklas Dohm, und Jan von Langermann

Donor Amine Salt-Based Continuous in situ-Product Crystallization in Amine Transaminase-Catalyzed Reactions

Update *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 2727– 2733

DOI: 10.1002/adsc.201900217

Abstract: The unfavorable reaction equilibrium of transaminase-catalyzed reactions is a major challenge for the efficient biocatalytic synthesis of chiral amines. In this study the synthetic utilization of a salt-based, continuous in situ-product crystallization is described to overcome the thermodynamic limit in amine transaminase-reactions using only the commonly used amine donor isopropylamine. The simultaneous dissolution of isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (donor salt) in combination with the crystallization of the product salt facilitates a thermodynamic shift of the continuous amine transaminase-catalyzed reaction. The main process necessity is a lower product salt solubility in comparison to the applied donor salt. This concept facilitates a stoichiometric use of isopropylamine in combination with a significantly lowered concentration of the amines in solution.

Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Das Grundkonzept wurde von Dennis Hülsewede und Jan von Langermann erstellt. Dennis Hülsewede und Jan-Niklas Dohm haben die Experimente konzeptioniert, durchgeführt und ausgewertet. Das Manuskript wurde von Dennis Hülsewede verfasst und von Jan von Langermann überarbeitet.



Donor Amine Salt-Based Continuous *in situ*-Product Crystallization in Amine Transaminase-Catalyzed Reactions

Dennis Hülsewede,^a Jan-Niklas Dohm,^a and Jan von Langermann^{a,*}

^a University of Rostock, Institute of Chemistry, Biocatalytic Synthesis Group, Albert-Einstein-Str. 3 A, 18059 Rostock, Germany
 Fax: (+49)-(0)381-498-6452
 Tel.: (+49)-(0)381-498-6456
 E-mail: jan.langermann@uni-rostock.de

Manuscript received: April 12, 2019; Revised manuscript received: April 11, 2019; Version of record online: May 13, 2019

 Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/adsc.201900217>

Abstract: The unfavorable reaction equilibrium of transaminase-catalyzed reactions is a major challenge for the efficient biocatalytic synthesis of chiral amines. In this study the synthetic utilization of a salt-based, continuous *in situ*-product crystallization is described to overcome the thermodynamic limit in amine transaminase-reactions using only the commonly used amine donor isopropylamine. The simultaneous dissolution of isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (donor salt) in combination with the crystallization of the product salt facilitates a thermodynamic shift of the continuous amine transaminase-catalyzed reaction. The main process necessity is a lower product salt solubility in comparison to the applied donor salt. This concept facilitates a stoichiometric use of isopropylamine in combination with a significantly lowered concentration of the amines in solution.

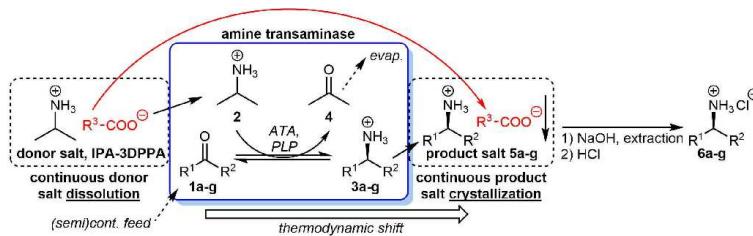
Keywords: biocatalysis; *in situ*-product removal; crystallization; amine; salts

Transaminases (TAs) (E.C. 2.6.1.X) catalyze the selective transfer of an amino group from an amine donor to an amine acceptor using pyridoxal-5'-phosphate (PLP) as a cofactor.^[1,2] The ability of transaminases to synthesize optically pure amines/amino acids is a major advantage over conventional (transition) metal-catalyzed options and thus a powerful tool for industrial applications.^[3] Herein the synthesis of chiral amines can be achieved either by kinetic resolution of a racemic amine mixture or asymmetric synthesis from prochiral carbonyl substrates using donor amines, e.g. alanine or isopropylamine.^[4] The direct asymmetric synthesis of

amines is typically preferred due to the theoretical maximum yield of 100%.^[5]

However, a major challenge is often the unfavorable reaction equilibrium of transaminase-catalyzed reactions towards the desired products.^[6] A conventional solution for this drawback is the use of significant excesses of the chosen amine donor, but maintaining the quaternary and tertiary protein structure under such non-physiological conditions (incl. high product concentration) becomes easily a significant problem.^[2] Alternatively, selective (bio)catalytic cascades can be used to remove by-products from the reaction equilibrium, which similarly pushes the reaction equilibrium towards the product side.^[7] A well-known example is the use of the donor amine alanine in combination with a lactate dehydrogenase and a glucose dehydrogenase.^[8] Here the byproduct pyruvate is reduced to lactate, while the desired equilibrium shift is eventually achieved by the glucose dehydrogenase-based cofactor regeneration system. Unfortunately, these cascade options require additional substrates and even entire biocatalytic systems, which itself may cause secondary issues with the transaminase-catalyzed reaction itself and will always lower overall atom efficiency of the entire process and increase costs.

A powerful alternative is the use of membrane-assisted *in situ*-product removal (ISPR)-techniques, which target the removal of the product amine from its reaction solution.^[9,10] Rehn *et al.* introduced an approach involving a supported liquid membrane (SLM) with undecane, which used an alkaline reactor phase and an acidic stripping phase for product isolation. The presented system achieved an impressive final product concentration of 1 mol/L, but the limited lifetime of the SLM was identified as a potential issue for industrial applications. Interestingly, the authors similarly propose the application of a continuous process,



Scheme 1. Schematic representation of the continuous donor salt-dissolution and product salt-crystallization within an amine transaminase-catalyzed reaction system. R^1 = aliphatic/aromatic, $R^2 = CH_3$, $R^3 = CH_2-CH(Ph)_2$.

which includes a continuous harvesting of the product from the reaction solution.^[10]

A further synthetic approach is the use of tailor-made amine donors, which undergo spontaneous secondary reactions after deamination and thus shift the reaction equilibrium, e.g. via dimerization and oxidation.^[11] Although this represents a valuable approach, a varying amount of amine byproducts is always obtained, which have to be removed and discarded as waste.

As an alternative we've recently introduced the use of *in situ*-product crystallization (ISPC) of the product salt to shift the transaminase reaction equilibrium.^[12,13] The apparent equilibrium shift is obtained by salt formation of the product with a specifically chosen counter-ion, which eventually crystallizes from solu-

continuous fed batch-type ISPC-process, which requires the presence of the *donor salt* isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (IPA-3DPPA) (Figure 1).

This represents a strong contrast to our earlier study, which aimed at specifically avoiding the presence of this unwanted donor salt since it reduces the purity of the crystallized product amine salt. The main purpose of this donor salt in the process concept is a continuous feed of isopropylamine (IPA, donor amine) and the required counter-ion 3,3-diphenylpropionate (3DPPA, for product amine crystallization) (Scheme 1). This is achieved by the continuous dissolution of the donor salt throughout the entire enzymatic process, which constantly feeds equimolar amounts of both reactants into the aqueous solution. The donor salt exhibits a moderate solubility in the aqueous solution, while any excess of solid IPA-3DPPA remains suspended in the aqueous reaction mixture without a direct, potentially harmful interaction with the amine transaminase reaction system (Figure 2). The application of this salt solves the low solubility issue of 3,3-diphenylpropionic acid, which is a main limiting parameter for the subsequent product salt formation. In addition, the undesired pH-shift by the acid is circumvented avoiding high buffer concentrations to compensate this effect.

During the continuous fed-batch process product salt crystallization occurs continuously in parallel and eventually enriches as the second suspended solid phase. In the shown concept, the mother liquor is recycled throughout the process, in contrast to discarding it as waste. The continuous process also does not require a significant excess of the donor amine to push the reaction equilibrium towards the product side.

Throughout the entire synthesis process both concentrations of donor and product amine remain constant in a steady state equilibrium with the suspended solid salts, which is only controlled by their respective solubilities. The amount of undissolved and thus suspended donor and product salts will instead change continuously due to the constant dissolution and *in situ*-product crystallization. These

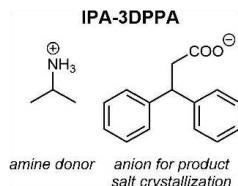


Figure 1. Chemical structure of the applied donor salt isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (IPA-3DPPA).

tion. Product salt isolation is then easily achieved by a simple filtration step. However, a noticeable limitation of the presented technique is still the inability to reach full or even very high conversions since a residual solubility of the product salt is unavoidable. In addition, a 2.5-fold excess of the donor amine is still required to push the reaction to the product side.

With this study we aim to expand the recently introduced ISPC-methodology to achieve full conversion in amine transaminase-catalyzed reactions with only a stoichiometric amount of the donor amine isopropylamine. We propose the application of a

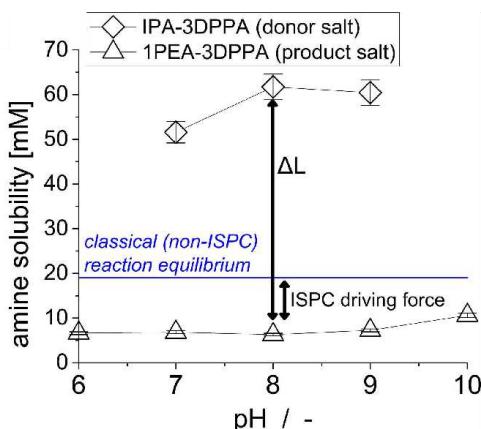


Figure 2. pH-dependency of salt solubilities; exemplary product salt: (S)-1-phenyl ethyl ammonium 3,3-diphenylpropionate (1PEA-3DPPA, **5a**). Conditions of non-ISPC-based batch reaction equilibrium: 100 mM acetophenone, 250 mM iso-propylamine, 30 °C, 100 mM phosphate buffer pH 7.5.

interactions can be considered as two pH-dependent secondary equilibria, which will overlap with the amine transaminase-catalyzed reaction. As shown in Figure 2, the solubility of the product salt **5a** is significantly lower than the donor salt IPA-3DPPA over a broad pH range, indicated by the solubility difference ΔL ($\Delta L = L_{\text{donor salt}} - L_{\text{product salt}}$). Importantly, product salt solubility has to be below the original amine transaminase-based product concentration in solution (indicated by blue line) to force product salt crystallization, which represents the driving force of the apparent reaction equilibrium shift. If both salt solubilities are too similar the purity of the product salt will be affected. With the herein applied amine transaminase from *Silicibacter pomeroyi* (*SpATA*) the combined optimal pH for this ISPC-system was found to be at 7.5 (Figure 3).

Relatively strong reductions of enzymatic activity are visible below pH 6.5 and above pH 8. This relatively narrow window is mostly determined by the pH-optimum of the applied enzyme, but also influenced by the pH-dependent solubility behavior of both salts. Slight differences were found between the common HEPES and phosphate buffer systems. It should be noted that the presence of the applied buffer salts also increases the solubilities of both salts, based on the uncommon ion-effect, basically lowering the performance of the ISPC-based reaction system. The buffer capacity was therefore limited to 25 mM throughout this study to prevent any negative effects. Even with the lowest buffer capacity no pH shift was

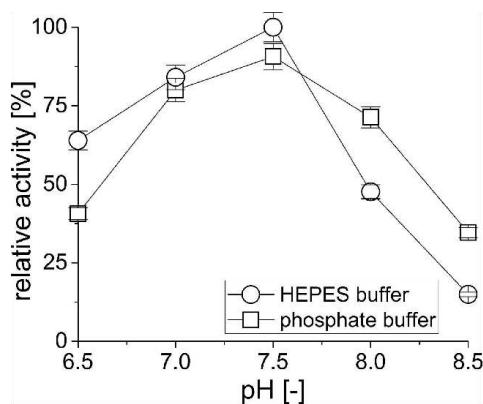


Figure 3. pH-dependency of the ISPC-based *SpATA*-catalyzed reaction; 30 °C, 100 mM acetophenone, 125 mM IPA-3DPPA, 125 mM IPA, 200 mM buffer, 0.5 U/mL *SpATA*, 2 mM PLP, t = 22 h. Relative activity is normalized to pH 7.5 = 100%.

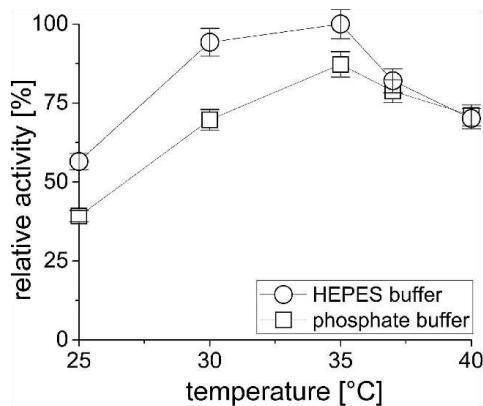


Figure 4. Temperature-dependency of the ISPC-based *SpATA*-catalyzed reaction; 100 mM acetophenone, 125 mM IPA-3DPPA, 125 mM IPA, 25 mM buffer pH 7.5, 0.5 U/mL *SpATA*, 2 mM PLP, t = 22 h. Relative activity is normalized to 35 °C = 100%.

observed in this study. In addition, a similar effect is also present for reaction temperature, whereas an optimum of 35 °C was found (Figure 4). Herein the temperature range overlaps with the increasing salt solubility at higher temperatures. Consequently, the choice of buffer salts and pH has a significant effect on the ISPC-process and in this study HEPES-buffer was found to be the best choice (Figure 5).

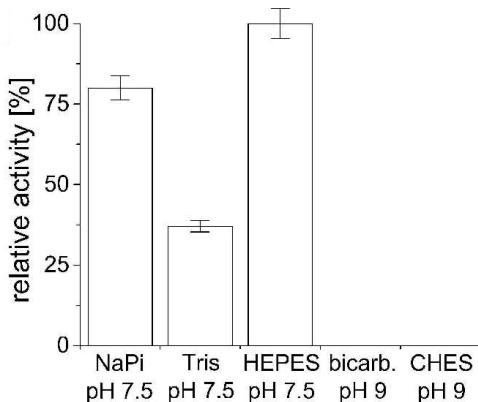


Figure 5. Effect of the applied buffer system on the ISPC-based *SpATA*-catalyzed reaction; 30 °C, 100 mM acetophenone, 125 mM IPA-3DPPA, 125 mM IPA, 25 mM buffer pH 7.5, 0.5 U/mL *SpATA*, 2 mM PLP, t = 22 h

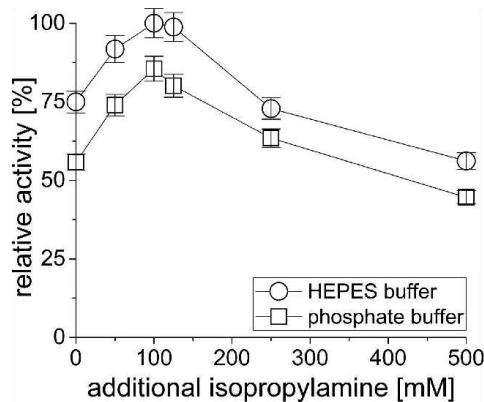


Figure 6. Effect of additional isopropylamine on the ISPC-based *SpATA*-catalyzed reaction; 30 °C, 100 mM acetophenone, 125 mM IPA-3DPPA, 25 mM buffer pH 7.5, 0.5 U/mL *SpATA*, t = 22 h.

Phosphate and TRIS buffer showed moderate to strong reductions of enzyme activity, which is mostly based on the (conventional) effect of different buffer salts towards the enzyme itself. CHES and bicarbonate buffer systems are clearly not applicable due to their high pH.

A further improvement of the ISPC-process was achieved by the use of additional isopropylamine in the reaction mixture. This strategy is based on the relatively high K_m -value of isopropylamine for many amine transaminases, which is hardly reached by the solubility limit of the applied donor salt IPA-3DPPA alone. A maximum of process performance was found using an additional concentration of 100 mM isopropylamine (Figure 6).

Even higher isopropylamine concentration yield an increasing reduction of enzymatic activity based on LE CHATELIERS principle, or in this case the so-called common ion-effect, since the additional amount of isopropylamine results in a re-crystallization of IPA-3DPPA. This effectively lowers the concentration of 3DPPA in solution, which itself gradually reduces crystallization of the product salt from solution. However, higher IPA-concentrations are not required by design since a high conversion towards the product amine (within the aqueous solution) is not required by the applied ISPC-process (see also Figure 2).

With the shown optimizations the presented donor amine salt-based ISPC-process was eventually performed continuously for substrate **1b** at improved reaction conditions (Figure 7). Substrate concentration and the solid donor amine content were periodically re-adjusted to their original values (100 mM **1b** and

125 IPA-3DPPA) after each cycle to ensure identical process conditions throughout the entire reaction time. After 120 h an additional 3 U/mL *SpATA* (+25%) were added to compensate for losses of enzymatic activity.

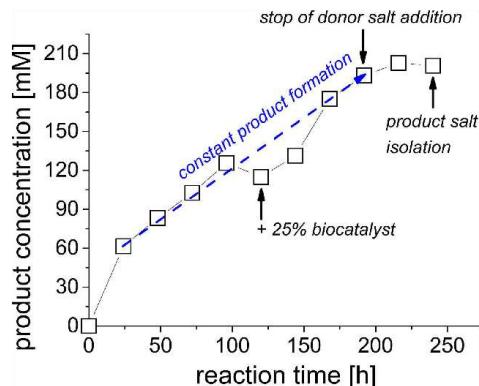


Figure 7. Preparative continuous ISPC-process for the synthesis of (*S*)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine 3,3-diphenylpropionate (*S*)-**5b**. Conditions: 25 mM HEPES buffer pH 7.5, 100 mM 3-methoxyacetophenone **1b** (re-adjusted every 24 h), 125 mM IPA-3DPPA (re-adjusted every 24 h), 100 mM additional IPA, 30 °C, 12 U/mL *SpATA*, 5 mL PLP, 1 h partial acetone removal every 24 h, the blue line presents a guide for the continuous product salt formation.

This fed batch process allowed a constant product formation beyond the original thermodynamic equilibrium, as highlighted by the blue line in Figure 2. After an initial fast increase in product formation, which is similar to conventional batch reactions, the space-time yield remained constant at ca. 4 g/(l d), due to the continuous *in situ*-product removal. Noteworthy, the presented ISPC-process can be further optimized by increasing the amount of applied biocatalyst, which was not the aim of this study. The reaction byproduct acetone was periodically evaporated to avoid accumulation in the reaction solution. A major advantage of the shown ISPC-concept is that the formed acetone content does not have to be fully removed to facilitate a full conversion in solution.^[14] A partial acetone removal is still sufficient since pure product formation is achieved in the crystallized solid phase (solid product salt), while in solution an incomplete reaction is present (see also Scheme 1). Significant losses of 3-methoxyacetophenone due to unwanted evaporation were not observed, but this will become more substantial with other, more volatile substrates.

Based on IPA-consumption, solely through IPA-3DPPA addition, an impressive isolated yield of 91.5% of **5b** was achieved (see also Supplementary information), which is significantly higher than a conventional batch process without any ISPC (only 19%, see also Figure 2) and close to the proposed full conversion. The additional excess of 125 mM IPA (± 1.25 equiv.) remains also constant throughout the entire reaction in solution (not consumed) and is thus fully recycled after every cycle. The shown process was eventually stopped by ceasing the addition of solid donor salt into the reaction suspension after the 8th cycle. Subsequently all remaining solid donor salt is removed due to the ongoing conversion, which only left the desired solid product salt as a single solid phase. The pure product salt is then easily filtered off and subjected to further downstream-processing. Crystalline purity was checked by X-ray powder diffraction, XRPD to ensure the absence of IPA-3DPPA (see Supplementary information).

Noteworthy, the process can in theory be continued indefinitely, but will be eventually limited by the amount of formed solid product salt. This issue can be easily solved by periodic filtration steps to reduce the amount of its solid phase. In this case donor salt addition has to be stopped temporarily as described above to allow solid product salt as the only solid phase. After filtration of the product salt new donor salt and substrate can be re-applied to the remaining mother liquor to resume the presented continues ISPC process.

In summary, the presented alternative application of a solid donor amine salt IPA-3DPPA as a continuous ISPC-process facilitates three significant advances over a conventional amine donor usage. First, a

constant isopropylamine and 3DPPA concentration is achieved throughout the entire reaction time, which is solely based on the solubility limit of the donor salt IPA-3DPPA. A constant addition and control of two separate IPA- and 3DPPA streams into the ISPC-process is not required. Any removal of IPA-3DPPA by the biocatalytic reaction and *in situ*-crystallization is autonomously compensated by the dissolution of excess solid donor salt. Second, the use of this continuously operated design requires in theory only 1 mol donor amine for the synthesis of 1 mol product amine, which represents a lower E-factor (environmental factor) and a huge improvement over the conventional use of isopropylamine excesses. Moreover, the presented continuous ISPC-process closes the gap to tailor-made donor amines or complex biocatalytic cascades to overcome the unfavorable reaction equilibrium. Third, the combined amine concentration of donor and product amine remains significantly lower in solution, which is beneficial to ensure high catalyst activity and stability. The majority of both amines are only present as suspended solid salts.

The presented process can be further improved by a direct separation of both salts in divided reaction vessels, which will allow a direct continuous production of the product salt in pure form.

Experimental Section

Chemicals

All chemicals were obtained from Acros, TCI Chemicals, Aldrich, Alfa Aesar and ABCR and used as received. Deionized water was used throughout this study.

Enzymes

E. coli BL21(DE3) strains, containing the amine transaminase gene from *Silicibacter pomeroyi* were precultivated in LB-Media (5 g/L yeast extract, 10 g/L tryptone, and 10 g/L NaCl), with 0.1 mg/ml ampicillin as antibiotics at 37 °C and 180 rpm overnight. The preculture was transferred the next day to 500 mL of LB-medium, with 0.1 mg/ml ampicillin and shaken at 37 °C. After an OD₆₀₀ ≥ 0.6 was reached, 0.5 mM IPTG was added to the culture broth and shaken at 20 °C and 160 rpm for 12 h. The obtained cells were subsequently harvested by centrifugation, washed with phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and lyophilized. Activity was tested via the amine transaminase assay, as described below. Typically, 0.2-0.3 U/mg were obtained.

Amine Transaminase Activity Assay

Catalytic activity was measured at a wave length of 245 nm using the spectrophotometer Specord 200 from Analytik Jena (Jena, Germany) and the extinction coefficient of acetophenone: 11.852 (mM cm)⁻¹. Composition of the assay: 250 µL buffer solution, 250 µL 10 mM (S)-1-phenylethylamine in buffer solution, 250 µL 10 mM sodium pyruvate in buffer solution and

250 µL biocatalyst sample with suspended cells in buffer solution with 0.1 mM pyridoxal phosphate. All measurements were measured against a reference solution, whereas the biocatalyst solution was replaced with 200 µL buffer solution and 50 µL of 10 mM pyridoxal phosphate in buffer solution. Buffer solution: 50 mM phosphate buffer pH 8 with 0.25% DMSO.

General Reaction Procedure

A typical reaction mixture was prepared with 125 mM IPA-3DPPA and 125 mM IPA in 5 mL 25 mM HEPES buffer pH 7.5 and adjusting the pH with conc. H_3PO_4 . Afterwards 2 mM PLP, 100 mM substrate and 0.5 U/ml lyophilized cells were added and the resulting mixture shaken horizontally at 150 rpm at 30 °C. Samples (1 mL) were taken directly from the suspension and analyzed as described below. During continuous reactions (20 mL reaction volume, see also Supplementary information), samples were taken and analyzed to determine and eventually re-adjust the substrate and IPA-3DPPA concentration to their original values. If required, full consumption of IPA-3DPPA was achieved (control via x-ray powder diffraction, XRPD) by stopping the addition of solid IPA-3DPPA. The remaining solid (mostly product salt) was filtered off, washed with 10 mL MTBE and dried.

Sampling

Samples (500 µL) were taken periodically and thoroughly mixed by a vortex mixer with 50 µL conc. NaOH to quench the reaction and increase pH. Afterwards 500 µL MTBE were added, mixed again by a vortex mixer and the solution was centrifuged (2 min, 3000 rpm) to improve phase separation. 200 µL were taken from the organic layer, combined with 50 µL of a 25 mM n-decane solution in MTBE (internal standard) and subsequently analyzed by gas chromatography.

Chromatography

Conversion was measured with a Trace 1310 gas chromatograph by Thermo Scientific (Dreieich, Germany), equipped with a 1300 flame ionization detector and a Agilent Capillary HP-5 19091 J-433 (0.25 mm × 30 m × 0.25 µm). n-Decane was used as internal standard in all measurements. Temperatures of injector and detector were set to 250 °C. Enantiomeric excesses of the obtained amines were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as described earlier.^[12]

Solubility Measurements

Solubility data were measured with 10 mL 100 mM phosphate buffer and an excess of the respective solid salt to create a stable suspension. The resulting mixture was shaken at 300 rpm and 30 °C for 7 days and the pH re-adjusted daily, if required. Afterwards the resulting mixture was filtered to obtain a saturated crystal-free solution. For IPEA-3DPPA solubility a 500 µl sample was drawn and analyzed via GC as mentioned above. For IPA-3DPPA analysis a sample was diluted (typically 20×), the absorbance of 3DPPA at 249 nm measured and compared against a calibration curve of 3DPPA in 100 mM

phosphate buffer at the identical pH (3DPPA-concentration range: 3–0.5 mM, 1 cm cuvette path length).

XRPD

Solid samples were measured via x-ray powder diffraction (XRPD) to discriminate the solid composition of donor salt and/or product salt. Powder x-ray diffraction data were collected on a Stoe Stadi-P with germanium-monochromatised Cu-K α -radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) in horizontal transmission/Debye-Scherrer geometry. The x-rays were detected with a position-sensitive detector in the 2 Θ range from 5 to 100°. The 40 kV high voltage and 40 mA current were generated by a Seifert high voltage generator (ID 3003). The equipment was controlled and the raw data were handled with the software STOE WinPOW (version 2.25, 2009). The position of the 2Theta and ω -circle were adjusted with the (111)-reflex of crystalline silicon (2Theta=28.44°). All samples were measured as flat preparation in poly acetate foils with minimum amount of silicone-based grease. The sample was spinned around its center during the measurement and the ω -circle was spinned as well with $\frac{1}{2}$ 2Theta.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Dr. Udo Kragl for his ongoing support, Dr. Dirk Michalik for his assistance with NMR measurements and Prof. M. Köckerling and Niels Ole Giltzau for their assistance with XRPD-measurements. Funding by German Federal Ministry of Education and Research (BMBF-Bundesministerium für Bildung und Forschung; project number: 031 A123) and German Research Foundation (DFG-Deutsche Forschungsgemeinschaft; LA 4183/1-1) is gratefully acknowledged.

References

- [1] a) A. Gomm, E. O'Reilly, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 106–112; b) S.-M. Dold, C. Syldatk, J. Rudat in *Green biocatalysis* (Ed.: R. N. Patel), John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2016**; c) F. Steffen-Munsberg, *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 566–604; d) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, 2, 993–1001; e) P. K. Mehta, T. I. Hale, P. Christen, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 549–561; f) M. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, 8, 254;
- [2] F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, 19, 333–360.
- [3] a) E. E. Ferrandi, D. Monti, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 34, 13; b) A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1974–1976; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2018–2020; c) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 349–367; d) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 94, 1163–1171;
- [4] M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 6965–6982.
- [5] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 324–332.

3. PUBLIKATION

UPDATES

asc.wiley-vch.de



- [6] a) M. T. Gundersen, R. Abu, M. Schürmann, J. M. Woodley, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 567–570; b) M. Voges, R. Abu, M. T. Gundersen, C. Held, J. M. Woodley, G. Sadowski, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 976–986; c) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479–1493; d) P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652–660; e) Y. Satyawali, E. Ehimen, L. Cauwenberghs, M. Maesen, P. Vandendaele, W. Dejonghe, *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 97–104;
- [7] a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51; b) K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46*, 5569–5571; c) R. C. Simon, N. Richter, E. Bustos, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143;
- [8] D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761–2766.
- [9] a) G. Rehn, P. Adlercreutz, C. Grey, *J. Biotechnol.* **2014**, *179*, 50–55; b) T. Börner, G. Rehn, C. Grey, P. Adlercreutz, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 793–799;
- [10] G. Rehn, B. Ayres, P. Adlercreutz, C. Grey, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2016**, *123*, 1–7.
- [11] a) J. L. Galman, I. Slabu, N. J. Weise, C. Iglesias, F. Parmeggiani, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Green Chem.* **2017**, *19*, 361–366; b) A. Gomm, W. Lewis, A. P. Green, E. O'Reilly, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692–12695; c) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714–10717; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10890–10893; d) S. E. Payer, J. H. Schrittweiser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2553–2559;
- [12] D. Hülssewede, M. Tänzler, P. Süss, A. Mildner, U. Menyes, J. von Langermann, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *18*, 2130–2133.
- [13] D. Hülssewede, L.-E. Meyer, J. von Langermann, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4871–4884.
- [14] P. Tufvesson, C. Bach, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *III*, 309–319.

IX. 4. PUBLIKATION

Dennis Hülsewede*, Lars-Erik Meyer*, Dr. Jan von Langermann

*Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

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

Minireview *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 4871 - 4884

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.

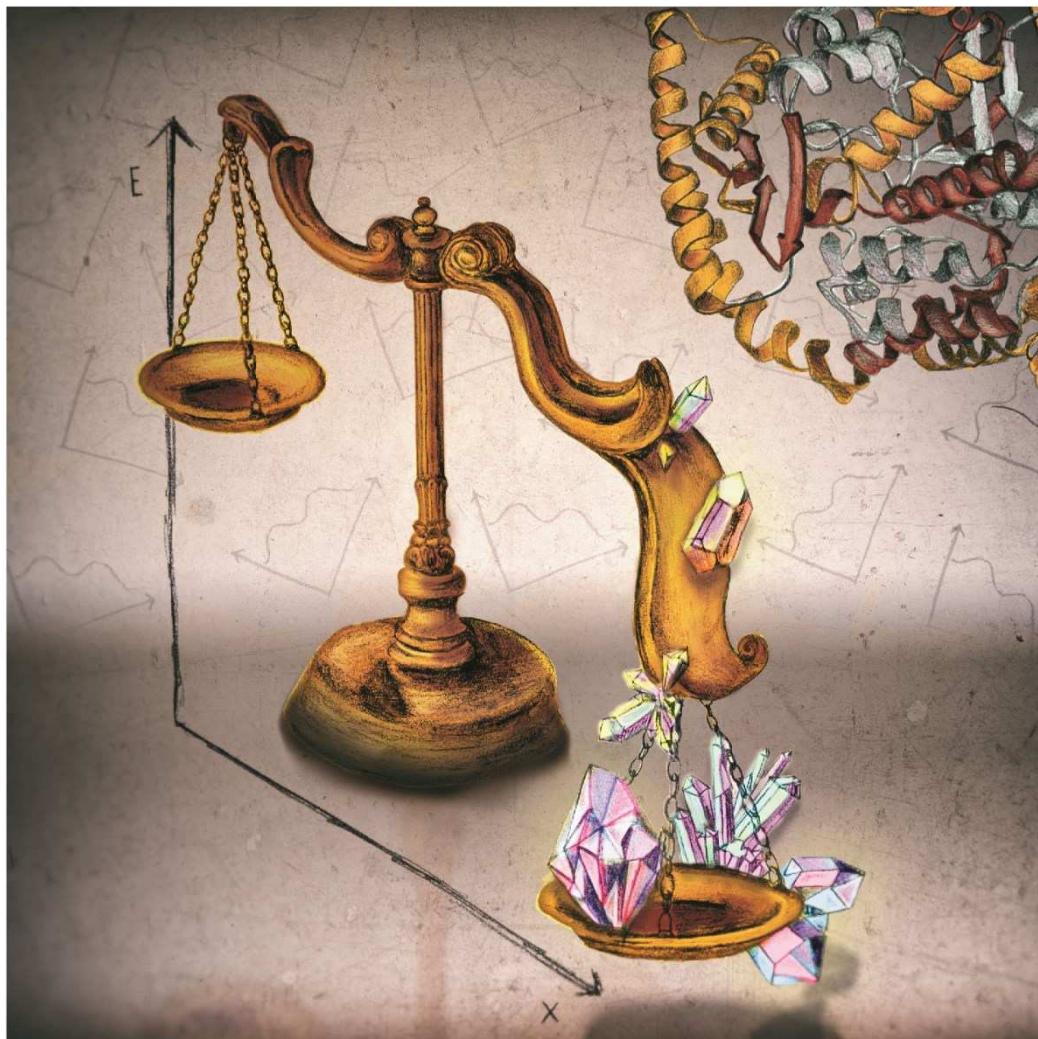
Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Das Konzept dieser Arbeit wurde von Jan von Langermann erstellt. Die Literaturrecherche wurde von Dennis Hülsewede, Lars-Erik Meyer und Jan von Langermann durchgeführt und ausgewertet. Das Manuskript wurde von Dennis Hülsewede und Lars-Erik Meyer verfasst und von Jan von Langermann überarbeitet.

■ Process Chemistry

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

Dennis Hülsewede[†], Lars-Erik Meyer[†], and Jan von Langermann*^[a]



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 perspec-

tive 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.

1. Introduction

Over recent decades, biocatalytic reactions have become a potent alternative to conventional chemical catalysts for the synthesis of a wide variety of valuable organic compounds.^[1] This has been proven multiple times on industrial and laboratory scales, and many classical synthetic processes have been (partly) replaced by enzymatic processes in some form.^[2] The development towards biocatalysis is mainly based on a generally high stereo-, regio-, and chemoselective conversion of the respective educts (or commonly termed as substrates) by the herein applied enzymes with no or only few side reactions.^[3,4] Due to significant scientific and technological advances in fermentation processes and protein engineering techniques in past decades, new and specifically improved enzymes have become available for tailor-made bioprocesses.^[5] In addition, renewable resources can often be used, toxic reagents or metals are not required, and after usage most biocatalysts are readily degraded, leading to very low or nontoxic residues. These route characteristics facilitate safe and more sustainable manufacturing processes, which satisfy 10 of the 12 principles of green chemistry, including high atom efficiency (avoiding byproducts), environmentally friendly solvents (water as preferred solvent), and low energy demand due to high activities under mild reaction conditions (near room temperature and neutral pH).^[6]

Consequently, bioprocesses are frequently considered as powerful tools towards environmentally benign synthesis pathways, whereas a careful and, most importantly, unbiased overall process evaluation should always be considered. Different techniques were developed in the past for this purpose, for example, eco-efficiency analysis; these techniques have also been extensively discussed and assessed.^[7]

2. Bioprocess Integration

Despite many positive examples, a significant number of bioprocesses still suffer from relatively low productivities, which is

the result of a variety of causes, for example, inhibition of substrate/product or low reaction rates. Herein, bioprocess integration has received much attention in recent decades as an important tool to overcome these problems, and has proven to increase product yield and process productivity in various examples.^[8,9]

2.1. Enzyme/metabolic engineering options

Protein and metabolic engineering options, which have recently gained much attention, target the engineering of the biocatalytic system itself. The majority of these studies include enzyme engineering to improve the enzymes involved towards a level for operation as isolated enzymes more effectively under the required process conditions.^[10] A recent major example is the manufacture of sitagliptin, an antidiabetic drug, which requires asymmetric hydrogenation of an enamine by using a rhodium-based catalyst at high pressure. This was substituted for a highly engineered transaminase, which enabled a biocatalytic route towards sitagliptin and eventually its phosphate salt with high activity and substrate loading.^[11]

In contrast, the direct use of microbes within whole-cell processes is a powerful alternative, but frequently cell metabolism is nonoptimal for a specific task. Thus, a modification of the relevant pathways can improve the desired bioprocess even further, but requires a careful (re-)configuration of the pathways.^[12] This may range from simple deletion or significant reduction of undesired pathways to an extremely extensive redesign of the entire cell metabolism. For example, the efficient combination of enzymatic biocatalysis and microbial cell factories were described by Prather et al., who focused on the accumulation of high concentrations of aromatic aldehydes in engineered *Escherichia coli* strains by integrating novel catalysts into the microbial host.^[13] Similarly, Bühler et al. reported the use of heterologous pathway design in various model organisms and its integration with multistep biocatalysis.^[14]

In summary, modification of the biocatalyst itself has proven its high potential to overcome certain underlying limitations of biocatalytic reaction systems. However, protein and metabolic engineering techniques cannot directly overcome given physicochemical properties, such as low solubilities of reactants within aqueous systems or undesired unfavorable thermodynamics, which prevent high conversions.

[a] D. Hülsewede,⁺ L.-E. Meyer,⁺ Dr. J. von Langermann
Biocatalytic Synthesis Group, Institute of Chemistry
University of Rostock, A-Einstein-Str. 3A, 18059 Rostock (Germany)
E-mail: jan.langermann@uni-rostock.de

[+] These authors contributed equally to this work.

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: <https://doi.org/10.1002/chem.201804970>.

2.2. Process engineering options

Aside from modification of the biocatalyst itself, non-protein-engineering-related process integration may use (in general) compartmentalization and hybrid processes for bioprocess optimizations.^[19] Further techniques, such as biocatalyst immobilization or (bio)catalytic cascade reactions, can be additionally used in these concepts to further improve the intended biocatalytic reaction (Figure 1).^[15]

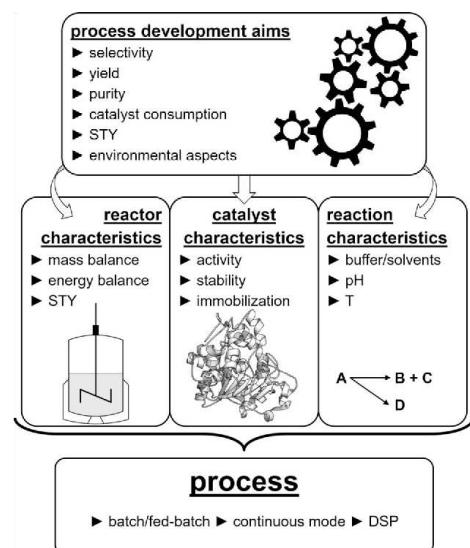


Figure 1. Process engineering options (adapted from ref. [4]). STY = space-time-yield, DSP = downstream processing.

Compartmentalization typically involves the physical separation of reaction zones in two or more specific phases, with contrary physicochemical conditions or reaction zones. Classical options typically involve simple two-phase systems with an aqueous phase containing the biocatalyst with dissolved buffer salts, cofactors, and so forth, and an unconventional, nonpolar secondary solvent, for example, organic solvent or ionic liquid, for improved reactant solubilities.^[16] Numerous examples of such unconventional reaction media were introduced in the past and used for various purposes.^[17] Different affinities of the main reactants within the applied solvent system facilitate the partition between respective phases, which can be exploited to achieve specific desired process parameters. Typically, a nonpolar product is enriched in an organic solvent, due to its high partition coefficient, and can be relatively easily obtained after phase separation and solvent evaporation.^[18]

In addition, recent developments suggest the use of more thorough compartmentalization techniques that involve stable, relatively rigid separations of reaction zones. Such approaches

include the use of polymeric membranes or polymersomes to separate biocatalysts from other catalytic reaction systems. For example, Gröger et al. introduced compartmentalized chemo-enzymatic cascade reactions, which included bio- and organocatalysis.^[19] Similarly, enzymatic reaction systems with differing reaction specifications can be used to gain higher conversions.^[20] Recently, polymersomes, which are composed of amphiphilic self-assembling molecules (similar to membrane vesicles), attracted interest for their use as nanoreactors.^[21]

In contrast, hybrid bioprocesses, also referred to as integrated bioprocesses, include the direct combination of a separation unit with a biocatalytic reaction system. Depending on the applied separation technique, this is also referred to as reactive distillation, reactive crystallization (RC), and so forth, and targets the removal of one or more reactants. Many reports on these separation techniques unfortunately do not specifically use these terms, and thus, remain hidden in the scientific literature.

Jan von Langermann studied chemistry and received his Ph.D. from the University of Rostock (Germany) in 2008. Afterwards, he moved to the Max-Planck-Institute in Magdeburg (Germany) for postdoctoral studies in the field of (enantioselective) crystallization under the guidance of Prof. Andreas Seidel-Morgenstern and Prof. Heike Lorenz. In 2012, he spent a year with a DAAD fellowship at the University of Minnesota (USA) in the research group of Prof. Romas J. Kazlauskas with a focus on enzyme engineering. In 2013, he returned to the University of Rostock and is currently a junior research group leader with a focus on integrated separation techniques to overcome synthetic limitations in biocatalytic reactions.



Dennis Hülsewedel investigated the copolymerization of propylene oxide and CO₂ under the supervision of Prof. U. Kragl at the Leibniz-Institute for Catalysis Rostock and received his B.Sc. in chemistry in 2015. In 2017, he graduated with his M.Sc. for research in the group of Jan von Langermann developing a successful application of an *in situ* product crystallization in amine transaminase-catalyzed reactions. Currently, he is a Ph.D. student in the group of Jan von Langermann with a focus on biocatalytic synthesis and *in situ* product crystallization systems.



Lars-Erik Meyer received his B.Sc. in chemistry in 2014 from the University of Rostock for work on the coordination complex chemistry of O,N-donor-substituted alkynes under the supervision of Prof. W. Seidel. He then joined the group of Jan von Langermann working on biocatalysis in unconventional thermomorphic solvent media and received his M.Sc. in 2016. He is currently a Ph.D. student and his research is focused on the process engineering of (de)carboxylase-catalyzed reactions, downstream processing, and *in situ* product removal techniques.



ature. However, the main intention for the use of such integrated processes is typically the removal of (co-)products to shift the apparent equilibrium of a thermodynamically unfavorable reaction system. The combination of both unit operations is considered to be an *in situ* product removal (ISPR) or *in situ* coproduct removal (IScPR) system.^[22,23] Due to the separation step of the chosen ISPR method, an increase in the product concentration in the product stream is facilitated. Importantly, the use of both operations in an integrated system does not result in the need to optimize both units independently, but is used to gain a significant advantage from the chosen interlink.^[9]

3. In Situ Product Crystallization (ISPC) in Biocatalysis

The use of *in situ* crystallization as a form of bioprocess intensification targets the removal of a synthesized product directly from its reaction solution in some form of a solid state. This is typically referred to as RC, reactive precipitation, or ISPC in biocatalytic reactions.^[24] The most frequent reason for such a combination of unit operations in an integrated process is to overcome an unfavorable reaction equilibrium of a (bio)chemical reaction. *In situ* crystallization effectively leads to an apparent shift of the chemical equilibrium towards the product side, which directly results in higher yields and productivities of a given (bio-)process. Notably, the crystallization of such a solid product form is fortunately a simultaneous purification of the product, since it usually crystallizes in a relatively pure form and can be easily filtered from the reaction mixture. This can be considered as a concentrated product stream, which may simplify DSP enormously. Other less frequently reported options include the crystallization of a coproduct instead of the main product and may be considered as *in situ* coproduct crystallization (IScPC). This option similarly facilitates an apparent shift of equilibrium, but afterwards requires a classical approach for product isolation from the reaction mixture. In addition, *in situ* crystallization can be applied to reduce toxic concentrations of unavoidable or undesired reactants within a solution or prevent decomposition of the product itself.

In recent decades, a selection of powerful *in situ* crystallization techniques were developed, applied for various purposes, and reported in the literature (see also below). However, aside from these developments, a vast number of reports unfortunately do not acknowledge particularly the presence of *in situ* crystallization in biocatalytic reactions. In these cases, some kind of precipitation is only vaguely mentioned, and thus, many combinations of biocatalytic reaction and ISPC remain hidden in the literature. Within such studies, the product already possesses a very low solubility and crystallization/precipitation occurs without a specific input by the corresponding operators (herein referred to as spontaneous ISPC, see below). In addition, the related crystallization-induced shift of equilibrium is often interpreted as a very high performance of the underlying biocatalytic reaction or biocatalyst itself, whereas low product solubility mainly determines the apparent equilibrium position of the overall process and not the biocatalyst itself.

Thus, herein we do not claim to provide a conclusive overview of all known ISPC reports, but systematically characterize typical physicochemical and process considerations and present selected representative examples.

A uniform definition of ISPC techniques in biocatalysis is unfortunately not used in the literature and conflicting terms were used previously. Thus, we propose a more general approach to classify ISPC to prevent unclear terms: physicochemical and process consideration for biocatalytic applications by using ISPC (see below). Guidelines for choosing applicable ISPC process options were also presented recently in detail by Urbanus et al.^[25]

3.1 Physicochemical considerations within ISPC

3.1.1. Chemical composition of the product

The first and foremost criterion is the chemical composition of the crystallized product and its corresponding relevant phase behavior, which should be considered in detail beforehand (Figure 2). Three basic options are possible:

- 1) Direct product crystallization: A preferred, but unfortunately less frequently occurring option, is the direct crystallization of a (relatively) pure product, solely based on its lower solubility in the reaction medium at a given temperature. The targeted product can be subsequently obtained through filtration during or after the reaction. Additional purification steps during DSP are only required if the target purity has not been obtained during ISPC.
- 2) Product salt crystallization: For molecules with a charged moiety, crystallization with a suitable counterion through the formation of a less soluble salt can be considered. The

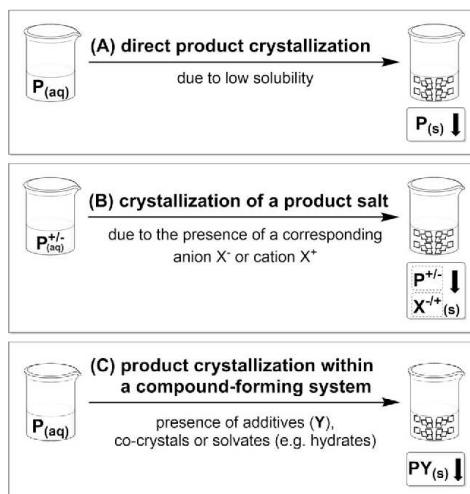


Figure 2. Chemical composition of the product crystal within ISPC techniques.

applied counterion can be present in solution, for example, from an earlier process step, or specifically added to induce crystallization during the reaction. Both options require careful selection prior to its application. Such product salt formation clearly requires at least one additional DSP step to extract the formed product from its salt.

- 3) Crystallization of a compound-forming system: Certain products yield compound-forming systems with additional chemicals and subsequently crystallize as a (non)stoichiometric mixture from their reaction solution. Such compound-forming systems include cocrystals and solvates, for example, hydrates. Similar to salt crystallization, at least one additional step is required during DSP.

3.1.2. Induction of crystallization

Product crystallization from the reaction mixture can be achieved in two ways. First, spontaneous ISPC facilitates removal of the product directly from the reaction solution without any further specific changes to the bioprocess; second, induced ISPC, through the use of specific changes to the reaction medium, forces crystallization of the product from its reaction solution (Figure 3).^[25] Potential forms of induction include reduced temperatures (typically through an external crystal-

lizer), pH changes, and the addition of certain salts to yield less soluble product salts. Of all potential crystallization options, seeding with pure product crystals is recommended to ensure sufficient crystal growth, crystal purity, and product morphology. A potential temperature-driven ISPC is exemplary shown in Figure 4 for a reaction system consisting of a simplified solvent system and the targeted product, depicted as a binary phase diagram and its related solubility diagram.^[26] The process pathway (Figure 4, path 1) represents the biocatalytic reaction pathway at a relatively low temperature T_1 , with a steadily increasing product concentration towards the solubility limit, which is shown as a liquidus curve or solubility curve. Beyond the solubility limit, within the biphasic domain, crystal growth occurs autonomously after nucleation or at present surfaces, resulting in phase separation into a solid product and its remaining product-saturated mother liquor. The product can be directly obtained from the resulting suspension through filtration. Alternatively, biocatalytic synthesis can be performed with a process pathway at a higher temperature T_2 (Figure 4, path 2), which results in an identical product concentration to that mentioned for path 1. Due to the higher temperature, the process remains within the single-phase domain below the solubility limit. Product crystallization is induced simultaneously within a secondary reactor, which operates at a lower temperature T_1 , and thus, yields product crystallization after phase sep-

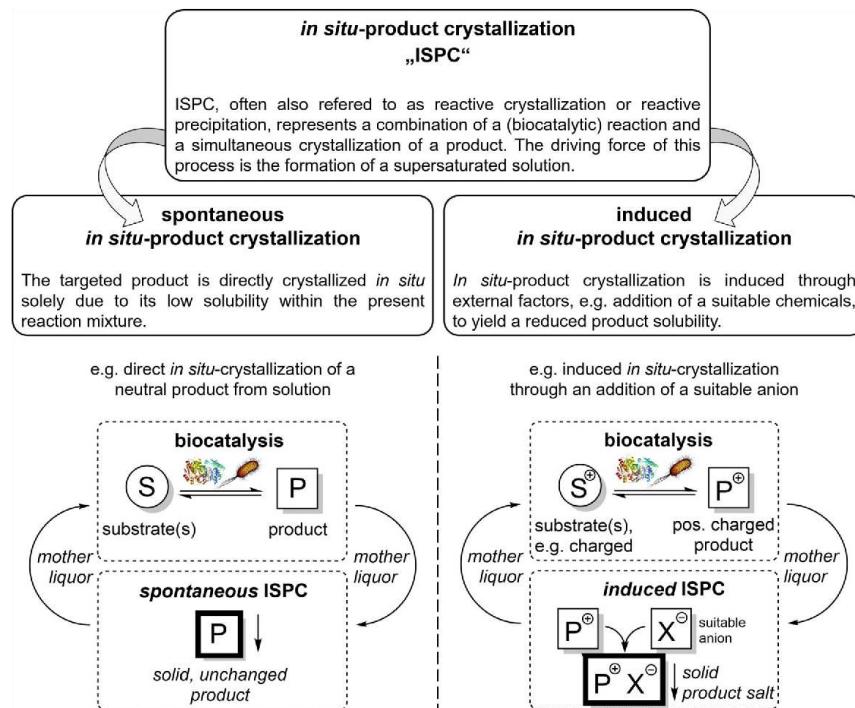


Figure 3. Differentiation of spontaneous and induced ISPC in biocatalysis.

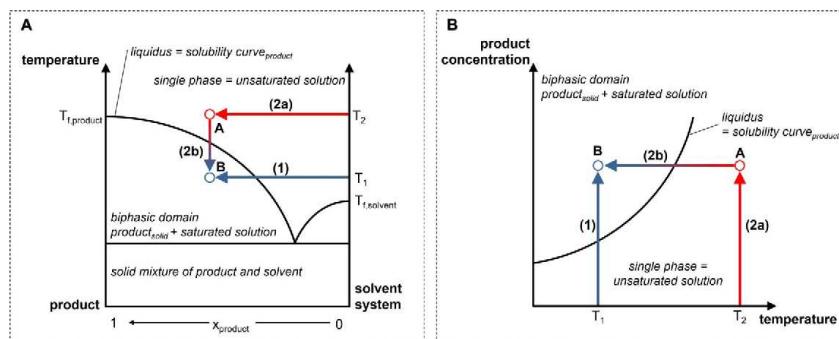


Figure 4. Representation of two potential temperature-dependent process pathways within hypothetical ISPC from a biocatalytic reaction, shown as A) simplified binary phase diagram or B) solubility diagram. Process pathways: 1) product generation and crystallization at T_1 (simultaneous), 2a) isothermal product generation at T_2 , 2b) simultaneous product crystallization at T_1 (typically within an external crystallizer).

aration into a solid product and remaining mother liquor. Notably, the complex composition of most biocatalytic reaction mixtures results in a significantly more complex phase behavior, which is typically represented in ternary, quaternary, or even more complex phase diagrams. A comprehensive overview of the relevant phase diagrams in RC processes was presented in detail by Ng et al.^[27] Thus, careful validation of the process parameters and its effect on phase behavior is typically required to facilitate efficient ISPC concepts in biocatalysis. In addition, the formation of the desired solid polymorph and crystal morphology is highly dependent on the chosen process parameters and the presence of cosolutes or impurities, which may cause inhibition of crystal growth or nucleation. However, the desired crystal morphology and purity is typically obtained by a subsequent recrystallization step during final DSP.^[28]

3.2. Process considerations within ISPC

3.2.1. Mode of operation

Process options featuring an ISPC are divided into internal and external crystallization (Figure 5).^[23,24] Internal crystallization includes product crystallization directly within the reactor, whereas external crystallization basically requires an external unit that facilitates crystallization outside the original reactor. In addition, direct and indirect contact options are available that differentiate the presence or absence of an additional separation step between biocatalytic reaction and crystallization. Importantly, for all of these options, both unit operations are always interconnected by the mother liquor. A selection of representative examples is given and discussed below in Section 4. Regardless of the chosen process option, crystal growth needs to be faster than that of the biocatalytic synthesis to ensure positive effects from an effective ISPC.

The majority of examples of biocatalytic ISPC processes are internal crystallization systems with direct contact between biocatalytic synthesis and its interconnected crystallization step. The second most common option is external crystallization with an indirect contact, for example, a filtration step be-

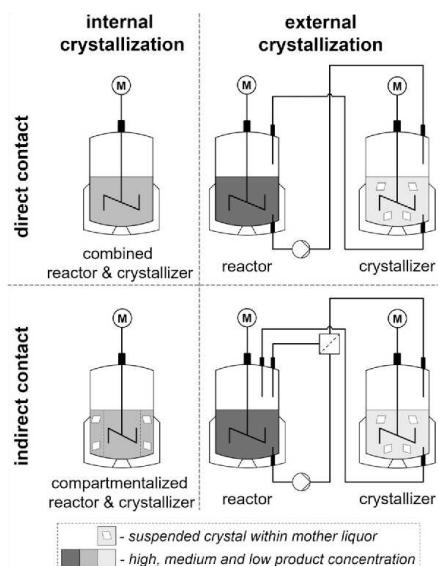


Figure 5. Representation of indirect and direct in situ crystallization in internal and external implementation.

tween both reactors, for example, to hold back the biocatalyst within the reactor. This option requires at least two vessels with (typically) a reactor and a crystallizer, which is operated at a lower temperature. The remaining options, internal crystallization with an indirect contact and external crystallization with a direct contact, are rather uncommon and often require very specific phase behavior and a compatible biocatalytic system. Moreover, indirect contact in a single internal crystallization setup requires at least compartmentalization to ensure a partition between both unit operations (see also above).

3.2.2. Biocatalyst application

The optimal choice of biocatalytic reaction system is related to several process-specific facts and is not easily determined, in general. The decision is also typically related to economic factors, which often favor the use of whole-cell biocatalysts over (partly) purified enzymatic systems. Regardless of the chosen biocatalyst preparation, impurities from biocatalyst preparation may interfere with crystal formation and growth, or even product crystal morphology and should be avoided. A simple prediction of these impurity effects is clearly not easily obtained within such a complicated process.

However, the application of whole cells, and thus, a finely dispersed solid will eventually mix with product crystals if a secondary separation technique is not introduced into the integrated bioprocess. In most cases, simple membrane filtration is sufficient to separate the cells from the growing product crystals.^[29] Moreover, whole-cell biocatalyst preparation is typically well known and easily scalable. In contrast, the use of a homogeneous enzyme solution seems to be a better choice because no additional filtration step is performed. The product crystal can be easily obtained from the enzyme solution and compound-forming behavior between small molecules and the much larger protein is unlikely. The relatively time-consuming purification procedure of a single or few selected enzymes unfortunately causes additional problems at larger scale.

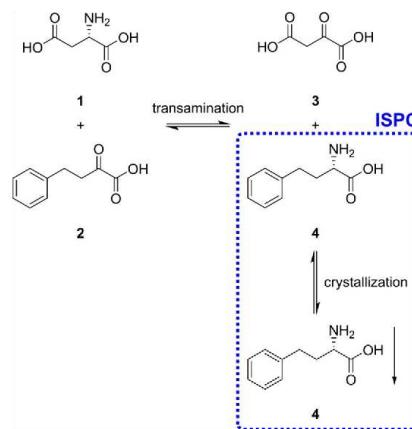
3.2.3. Economic considerations

The basis for most bioprocess integration options is still the final cost. Even if ISPC or another form of ISPR is considered to overcome a certain limitation, its integrated use will always require additional effort, which eventually translates into cost factors. For example, certain ISPC concepts may require a secondary reactor, which clearly increases overall costs in apparatus and energy consumption. Most ISPC concepts are consequently designed to overcompensate for these additional costs by the gained advantages. However, for certain process scenarios, it might be more logical to perform a classical reaction, followed by an established DSP approach.^[30] Finally, the contributions of an ISPC should also have a positive effect towards waste reduction to minimize the *E*-factor of the entire process, which eventually has economic advantages due to less waste formation per product.^[31]

4. Examples of ISPC in Biocatalysis**4.1. Internal crystallization****4.1.1. Direct crystallization of a product**

Direct crystallization of a neutral product molecule requires the careful consideration of the solubilities of all relevant reactants; the product should have the lowest value to promote *in situ* crystallization. For example, Cho et al. presented the synthesis of the unnatural amino acid L-homophenylalanine (**4**) from 2-oxo-4-phenylbutyric acid (**2**) and L-aspartate (**1**) by using recombinant *E. coli* cells harboring an aromatic L-amino acid

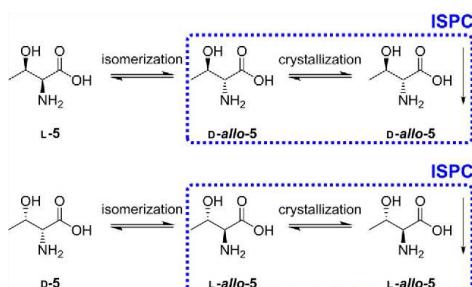
transaminase.^[32] At the selected pH of 7.2, compound **4** has a rather low solubility of <2 mmol L⁻¹, and thus, precipitates efficiently from solution (Scheme 1). Moreover, because **2** also has an inhibiting effect on the enzyme, the concentration was



Scheme 1. Asymmetric synthesis of L-homophenylalanine (**4**) by using ISPC.

maintained at about 40 mmol L⁻¹ by external substrate feeding, which eventually facilitated the synthesis of about 800 mmol L⁻¹ **4** (>99% enantiomeric excess (ee)) within about 11 h. Because solubility differences between the substrates and product are more pronounced at higher temperatures, the reaction temperature can also be raised from 37 to 60 °C to take advantage of the higher activity of the thermophilic aromatic L-amino acid transaminase. This similarly allowed the synthesis of **4** or L-phenylglycine from their corresponding α-keto acids within 10 h (>99% ee) with L-glutamate as a substrate.^[33] A similar study by Hanzawa et al. presented the use of a thermophilic aminotransferase from *Thermococcus profundus* for the synthesis of the unnatural amino acid 3-(2-naphthyl)pyruvate, which also has a relatively low solubility in water. The optically pure amino acid (>99% ee) was crystallized in a batch reactor at 70 °C with 93 % yield.^[34]

A different concept was recently applied for the crystallization of isomers of a natural amino acid. Würges et al. applied ISPC with the amino acid racemase from *Pseudomonas putida* for NBRC12996-catalyzed isomerization of threonine **5** (Scheme 2).^[35] Compound D-**5** is isomerized into L-*allo*-**5** and subsequently crystallized, whereas in another process L-**5** is similarly converted into D-*allo*-**5** and also crystallized. The main driving force of the process is again the lower solubility of the diastereomeric *allo* products, which spontaneously crystallize from the reaction solution. Both enantiomers of threonine have a solubility of 119 g L⁻¹, whereas their diastereomeric *allo* counterparts are less soluble, with a solubility of 83 g L⁻¹ (values at 30 °C in water). The authors presented the excellent performance of this reaction in repetitive batch mode over a period of 55 days. A total of 30.8 g D-*allo*-**5** and 32.4 g L-*allo*-**5**,

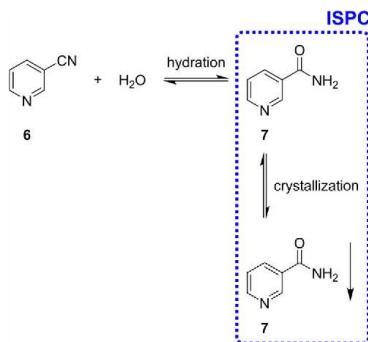


Scheme 2. Isomerization and ISPC of selected threonine isomers.

with very high diastereomeric excess values, were isolated (ca. 80% yield). A similar study included the racemization of asparagine and introduction of preferential *in situ* crystallization.^[36] This isomerization concept was extended by Encarnación-Gómez et al., who used an alternative chemoenzymatic stereo-inversion reaction, which converted the undesired enantiomers of *D*-phenylalanine and *D*-methionine back into a racemate.^[37] Here, the *D*-isomers were oxidized with a *D*-amino acid oxidase and then reduced to the racemic amino acid with ammonia borane. As a result, *L*-phenylalanine and *L*-methionine were crystallized with purities higher than 99%.

In addition to natural and non-natural amino acids, such ISPC concepts can also be applied to other compounds. A notable example is the preparation of nicotinamide (7), which can be synthesized through the hydration of 3-cyanopyridine (6) with nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Scheme 3).^[38]

Due to the low solubility of 7, precipitation from the reaction solution occurs spontaneously, with the notable advantage that a secondary reaction to the undesirable nicotinic acid is prevented due its fixation in a solid form. This type of ISPC was originally termed pseudocrystal fermentation because it involved parallel dissolution of the substrate and product precipitation.



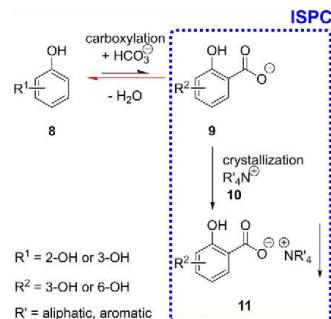
Scheme 3. Nitrile hydratase catalyzed synthesis and crystallization of nicotinamide.

At this point, it is worth mentioning that ISPC concepts can be similarly performed in fermentation processes. For example, the fermentative production of riboflavin and its subsequent crystallization was investigated by van Loon et al. in detail.^[39] They developed a process to obtain needle-shaped crystals of riboflavin from the fermentation broth. The crystals could then be separated from the biomass by simple differential centrifugation, with a purity of 96%.

4.1.2. Crystallization of salt-forming systems

Frequently, the respective solubilities of the main products are very high, and thus, not directly compatible with ISPC, especially for charged products with high polarity. A potential strategy to overcome this issue is the formation of a salt that possess a significantly lower solubility and consequently crystallizes from solution.

A representative example is the ISPC within decarboxylase-catalyzed reactions (enzymatic Kolbe–Schmitt reaction), which exhibit very unfavorable reaction equilibria towards carboxylated products. Ren et al. applied an ISPC method by using specific quaternary ammonium ions (10) to continuously remove the formed benzoic acid derivatives (9) from their biocatalytic reaction solutions (Scheme 4).^[40]

Scheme 4. Decarboxylase-catalyzed carboxylation of phenol derivatives with subsequent *in situ* crystallization.

The formation of the corresponding solid product salt (11) shifts the reaction towards the product side, which facilitates, in theory, simple reuse of the remaining mother liquor/substrate 8 solution and simplifies DSP through filtration. With this ISPC, the yields of various organic carboxylic acids were significantly increased from less than 40% to up to 97%.

A similar, but slightly more complex, ISPC concept was recently described by Hülssewede et al. for selected amine transaminase catalyzed reactions (Scheme 5).^[41] Herein, transaminase-catalyzed reactions exhibit, in comparison to decarboxylases, a similarly poor reaction equilibrium towards the synthesis of chiral product amines 15 from the corresponding prochiral ketones 12. Classically, this is solved by an excessive overstoichiometric amount of the cosubstrate isopropylamine (13), other tailor-made donor amines, or complex (bio)catalytic

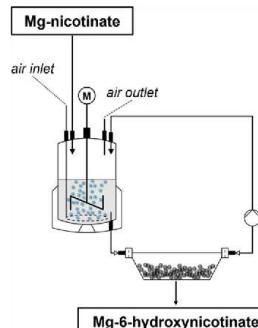
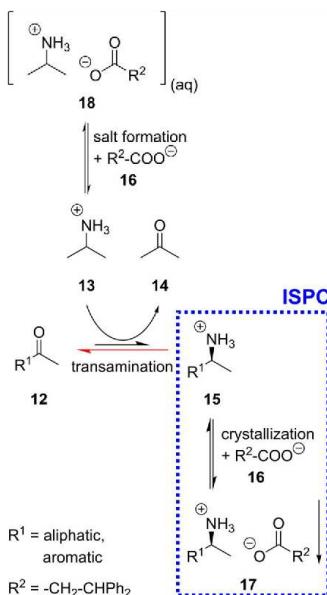


Figure 6. Production and crystallization of magnesium 6-hydroxynicotinate.

the substrate is easily fed as a salt and the pH is adjusted by the addition of nicotinic acid and MgO. Product isolation was achieved by an attached settler with a STY of $1.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, overall yield of $> 90\%$, and a purity of $> 99\%$.

Similarly, lactic acid, which is produced by the fermentation of glucose, can be crystallized as its calcium or magnesium salts through the addition of calcium carbonate or magnesium sulfate. By using this RC, high amounts of lactate can be achieved (up to 280 g L^{-1}) with a notable reduction in waste: 40% less water, 41% less inorganic salts, and 43% less yeast extract usage.^[44]

4.1.3. Crystallization of compound-forming systems

In addition to direct crystallization of a desired product or indirect crystallization as a salt, crystallization of a compound-forming system is less frequently considered. Mostly the crystallization of solvates is reported, whereas reports involving cocrystals are still rare.

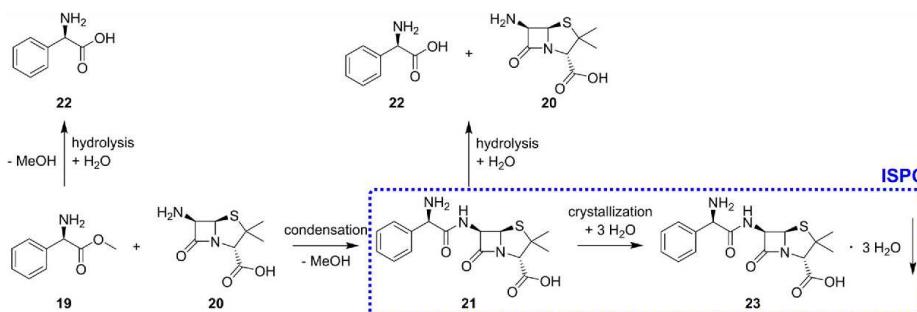
For example, a very well investigated example of an ISPC concept is the penicillin acylase catalyzed synthesis and subsequent crystallization of ampicillin trihydrate (**23**; Scheme 6). In the classical synthesis pathway, 6-aminopenicillanic acid (**20**) is acylated by the penicillin acylase with $D(-)$ -phenylglycine methyl ester (**19**) to yield ampicillin (**21**) in solution. The main disadvantages of this procedure are the unfavorable equilibrium to the β -lactam antibiotic and undesired product hydrolysis (secondary hydrolysis) by the applied penicillin acylase due to the relatively high product concentration in solution. The resulting side product, $D(-)$ -phenylglycine (**22**), represents the loss of acylating agent **19**, and thus, lower formation of the desired product **21**.

In contrast, after an initial reevaluation of the pH-dependent solubilities of the main reactants, Youshko et al. successfully introduced the ISPC concept, which allowed direct precipitation of solid **21** from solution.^[45] This effectively reduced the undesired hydrolytic side reaction of **21** in solution and facilitated an improved conversion of 93% for **20** and 60% for **19** concerning product **21**. The ISPC concept can be further optimized by repeated addition of both substrates at pH 6.3 (con-

cascade concepts to remove the coproduct from the biocatalytic reaction system to indirectly shift the reaction to the product side.^[42] All of these options improve product formation, but clearly result in additional costs, lower atom efficiency, and may require additional effort during DSP. Hulsewede et al. solved this issue by the addition of a specific carboxylic acid, 3,3'-diphenylpropionic acid **16**, which forms a sparingly soluble product salt **17** with product amine **15**. Salt precipitation from the reaction equilibrium results in the mentioned shift of the amine transaminase reaction and facilitates product isolation through simple filtration. Notably, the applied donor **13**, which also forms a salt with **16**, does not crystallize from solution under the chosen reaction conditions. A series of prochiral aliphatic and aromatic ketones were converted by using this ISPC concept and significantly higher conversions of up 96% were achieved.

Within salt-based ISPC concepts, metal ions can also be applied to facilitate crystallization of a product as a sparingly soluble salt. This concept is well known within fermentation processes for the (continuous) removal of selected carboxylic acid from fermentation broths.

For example, Kulla presented the conversion of nicotinic acid into 6-hydroxynicotinic acid by *Achromobacter xylosoxidans* LKI and subsequent crystallization as a magnesium salt (Figure 6).^[43] 6-Hydroxynicotinate is a basic building block for the production of various insecticides. Magnesium nicotinate is 100 times more soluble than its counterpart magnesium 6-hydroxynicotinate, which represents the driving force of the ISPC concept. Due to the good solubility of magnesium nicotinate,



Scheme 6. ISPC of ampicillin trihydrate from a penicillin acylase catalyzed reaction.

version of 97% for **20** and 72% for **19**^[46] or a pH gradient between 7.0 to 6.3 (conversion of 96% for **20** and 71% for **19**).^[47] To utilize the activity of penicillin acylase for a longer period of time, Ferreira et al. also investigated the use of a Taylor vortex flow reactor (VFR).^[48] Through the immobilization of penicillin acylase on an agarose gel, full enzyme activity was maintained over 200 h in a continuous process. Furthermore, the main contaminant in the obtained solid phase was side product **22**, which needed to be minimized for further DSP. To solve this issue, Encarnación-Gómez et al. developed a seeding protocol within this ISPC, which improved the crystal purity, by the careful addition of pure seeds of **23**, to > 95 wt%; this was sufficient for further DSP.^[49]

Eventually, McDonald et al. described the ISPC process in detail and determined the obtained solid within the process correctly as trihydrate **23**.^[50] They found that the main parameter was pH, since it strongly affected the solubilities of the reactants. For example, the solubility of **20** increases significantly at pH > 6, which fortunately also suppresses the undesired hydrolysis of **21**. Above pH 7, the solubility of product **21** increases significantly, which will prevent crystallization, and thus, sets the optimal operation window between pH 6 and 7. Interestingly, a slight decrease in product solubility beyond pH 8 is obtained, which results from the formation of the undesired ampicillin sodium salt. The authors finally presented an optimized process with an overall productivity peak close to pH 6.5 with a 50% increase in selectivity, in comparison with the classical homogeneous reaction system.

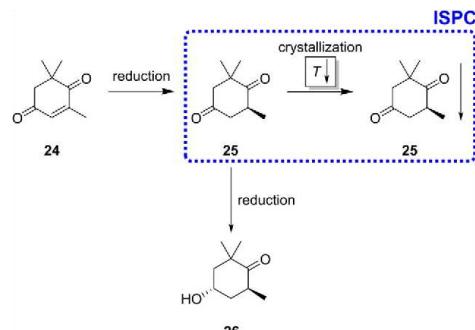
Another interesting suggestion for cocrystallization of cinnamic acid from a fermentation solution was recently investigated in detail by Urbanus et al.^[51] They identified a 1:1 cinnamic acid/3-nitrobenzamide cocrystal, investigated the phase behavior, and discussed its use near the three-phase equilibrium point for process intensification.

4.2. External crystallization

4.2.1. Direct crystallization of a product

One of the earliest examples of direct product crystallization is ISPC of 6*R*-dihydrooxoisophorone (**25**) based in the baker's

yeast catalyzed reduction of 4-oxoisophorone (**24**). Product **25** is a key intermediate in carotenoid synthesis. This reaction system was initially reported in detail by Leuenberger et al. in 1976 (Scheme 7).^[52] They observed a solubility limit of about 10 g L⁻¹, which resulted in the aforementioned continuous crystallization of **25**. This also minimizes potential product inhibition of **25** and undesired secondary reduction to (4*S*,6*R*)-acetinol (**26**). Eventually, 3.6 kg of optically pure **25** were obtained from a 200 L batch fermentation.



Scheme 7. Baker's yeast catalyzed reduction of 4-oxoisophorone (**24**) to 6*R*-dihydrooxoisophorone (**25**), including integrated ISPC.

This synthetic concept was significantly improved in several steps by Buque-Taboada et al. through an impressive process redesign, which involved a secondary reaction vessel that served as an external crystallizer (Figure 7; see also Figure 5 for process options).^[29,53]

The main purpose of this interesting setup is the separation of yeast cells from the solid product in the respective reactor/crystallizer. Biomass separation is facilitated by membrane filtration and fed back into the fermenter. The cell-free medium is cooled in the crystallizer to 5 °C to induce the crystallization of **25**. The remaining, depleted mother liquor is passed through a 0.2 µm filter to retain solid **25** and refed into the fermenter for a full cycle and continuation of the bioprocess in

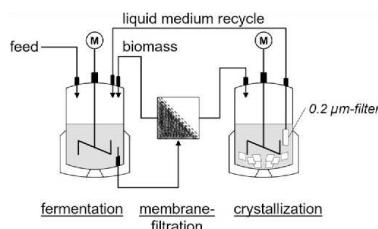


Figure 7. The use of an external crystallizer in the baker's yeast catalyzed reduction of **24** to **25**.

the fermenter. This crystallization loop increased overall productivity by 50% and selectivity towards **25** from 87 % to over 96%, in comparison to that of a classical batch process.

4.2.2. Crystallization of salt-forming systems

As mentioned above, a vast selection of biodeveloped carboxylates form sparingly soluble salts with certain metal ions, for example, calcium ions. Similarly to ISPC solutions in direct contact with the reaction system, technical solutions with an external crystallizer were developed. For example, the crystallization of L-malic acid as its calcium salt from a fumarase-catalyzed reaction was presented by Furui et al. and applied as an ISPC process with an external crystallization unit.^[54] An immobilized enzyme was used in a bioreactor at 37 °C for the synthesis of calcium L-malate from calcium L-fumarate and the enzyme-free solution was cooled in an external crystallizer at 10 °C with an excess of calcium in solution. The filtered mother liquor was subsequently returned to the bioreactor for further synthesis of L-malate. With this crystallization loop, the STY could be increased to 2.2 g L⁻¹ h⁻¹, in comparison to 1.7 g L⁻¹ h⁻¹ in a conventional column-type bioreactor.

Bao et al. presented a similar integrated bioreaction-crystallization process for the continuous production of calcium gluconate from a glucose oxidase catalyzed reaction. The authors introduced oxygen through external loop airlift columns, which were connected to a crystallization loop. It was shown that this method achieved a comparable productivity to that of the batch fermentation process. However, the advantage of the crystallization loop over batch fermentation is a reduction of waste and a vastly simplified DSP concept.^[55]

An indirect connection as a repeated fed-batch process of an ISPC concept was presented by Xu and Xu for the crystallization of calcium L-lactate based on a glucose-based fermentation process (Figure 8).^[56] The initial process was performed at 52 °C and, after glucose depletion, half of the reaction volume was transferred to the crystallizer to perform product salt crystallization (seeded crystallization) at 23 °C. Subsequently, the supernatant solution was transferred back to the original bioreactor and new fermentation medium and glucose powder were added to start the next fermentation cycle. After three consecutive fermentation-crystallization cycles, an average of 1.7 times improved productivity was achieved. Notably,

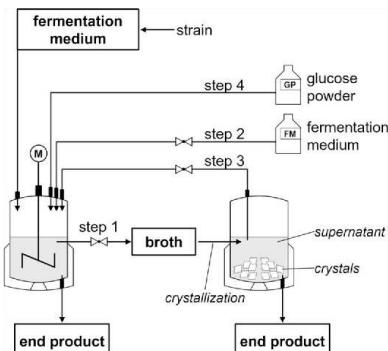


Figure 8. Discontinuous crystallization of L-lactate from a fermentation process.

this process does not technically qualify as ISPC, but the reuse of the remaining solution/mother liquor is very similar.

4.3. Crystallization of compound-forming systems

Examples of compound-forming systems in an external crystallization setup are unfortunately still rare. A noteworthy example thereof was recently introduced by Urbanus et al., and involved an electrochemically induced cocrystallization for ISPC.^[57] The main purpose of this combination is to create a very localized overlap in an electrodialysis module between the operational windows of fermentation and crystallization processes; this is not possible for the bulk phases. In the presented process, a fermentation broth is passed from a reactor through a crystallization cell, which contains the required electrodes and a cation exchange membrane (CEM; Figure 9).

Due to the included electrolysis process, a low pH is generated, which subsequently allows diffusion of protons through the membrane. The local pH shift facilitates reprotonation of the carboxylate ions, which allows the precipitation of a co-crystal with 3-nitrobenzamide (**27b-28**). Nasrollahnejad et al. continued this work with a techno-economic evaluation of the proposed process for the production of fumaric acid.^[58] They compared conventional fermentative production, production and subsequent salt regeneration, and production through electrochemically induced crystallization. The conventional method required a final pH shift to induce the crystallization of fumaric acid in the bulk phase, which produced about 1.3 tons of solid waste per ton of product. In contrast, electrochemically induced crystallization generates no solid waste by design, which is preferred. Notably, the applicability of electrochemically induced crystallization will be more cost efficient than that of the conventional method, if solid waste disposal costs increase above € 128 per ton.

Another example includes the use of penicillin acylase for the synthesis of the cephalosporins cefaclor and cefalexin; this process is similar to that of the preparation of ampicillin (see also Scheme 6).

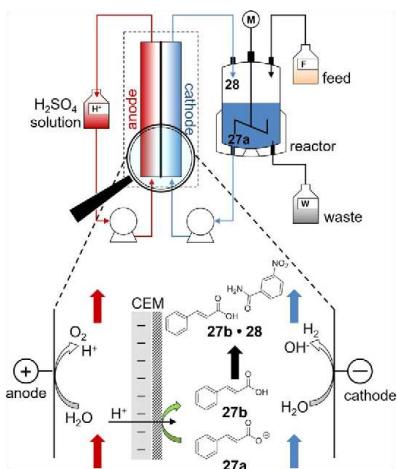


Figure 9. Electrochemically induced cocrystallization for the ISPC of cinnamic acid.

These compounds exhibit considerably higher solubility and require additional complexing agents; in this case, naphthols. The resulting sparingly soluble complex facilitates a considerably lower solubility, and thus induces, the crystallization of cefaclor and cefalexin. This can be exploited for an indirect process, wherein both reaction vessels are interconnected by peristaltic pumps. In case of cefaclor, the yield increased from 57 (without ISPC) to 80% (with ISPC).^[59]

5. Similarities between ISPC and In Situ Product Adsorption (ISPA)

The occurrence and especially growth of a solid, crystalline phase during ISPC facilitates the abovementioned advantages in bioprocess design. In this context, it is worth mentioning that almost identical behavior is present for the use of adsorption techniques as ISPA. In both cases, a solid phase is present, which eventually accumulates the desired product molecule. In the case of crystallization, new layers are additionally introduced, yielding the desired crystal growth, whereas mono- and multilayers occur during adsorption on a (typically noncrystalline) solid phase. In both cases, a solid phase is subsequently filtered off and subjected to product isolation. Consequently, adsorption may be applied in a similar way in cases that lack an applicable solubility limit for an ISPC process. A vast selection of scientific reports discuss the opportunity of using ionic exchange or nonionic adsorbent resins for DSP^[60] and for ISPR either in internal operation mode with direct^[61] contact of cells or in external operation mode with direct^[62] or indirect^[63] contact of cells. Phillips et al. have provided a comprehensive and well-written overview of in situ adsorption techniques in microbial natural product fermentations.^[64]

For example, Mirata et al. described such an example for the regioselective conversion of (*R*)-(+)limonene into (*R*)-(+)perillic acid by *Pseudomonas putida* DSM 12264 (Figure 10).^[65] The applied strain facilitates a product concentration of 18 mmol L^{-1} in batch culture operation mode, and up to

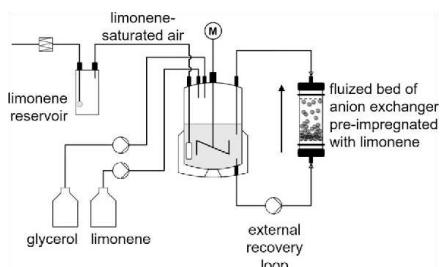


Figure 10. Synthesis and ISPA of (*R*)-(+)perillic acid.

64 mmol L^{-1} (11 g L^{-1}) through nonlimiting fed-batch conditions after 6 days. Higher concentrations were unfortunately not achieved due to strong product inhibition. The authors screened various anion-exchange resins, including the determination of the respective adsorption isotherms, and eventually applied commercially available Amberlite IRA 410 Cl. With this resin, the abovementioned product inhibition was circumvented by ISPA with a direct external adsorption process. Perillic acid was successfully recovered with 1 mol L^{-1} HCl/ethanol, with recovery rates of 99%. After recrystallization, the product was obtained with 98% purity. The overall concentration (187 mmol L^{-1} (31 g L^{-1}) after 7 days) was 2.8 times greater than that of fed-batch perillic acid production without ISPA.

6. Summary and Outlook

The application of ISPC is a powerful, but still less considered, technique for the removal of a target product directly from its reaction solution. This form of bioprocess intensification allows, among other benefits, unfavorable reaction equilibria to be overcome, toxic (co/by)product or intermediate concentrations to be reduced, or may even simplify DSP enormously through a very simple filtration step. For this purpose, specific knowledge of the respective solubilities and solid-phase behavior should be considered, especially early in (bio)process development. Unfortunately, (re-)crystallization is often only considered as a late option during final product purification.

This Minireview was designed to close this gap through the introduction of relevant physicochemical properties and their effect on corresponding process considerations within (bio)process design. The examples shown should visualize available options and present their potential for the production of valuable chemicals. We hope that this minireview will help to inspire further interdisciplinary applications of ISPC in biocatalytic reactions.

Acknowledgements

We thank Prof. Udo Kragl (University of Rostock, Germany), Prof. Uwe Bornscheuer (University of Greifswald, Germany), and Prof. Andreas Seidel-Morgenstern (Otto von Guericke University Magdeburg, Germany) for their ongoing support and useful discussions. Funding for D.H. by the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number LA 4183/1-1), for L.E.M. by the DFG (grant number KR 2491/11-1), and for J.v.L. by the BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung; grant number: 031A123) is gratefully acknowledged. This research project is cofunded by the Leibniz Science Campus Phosphorus Research Rostock. We also thank Johanna Claus for her creative assistance with the TOC figure.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: biosynthesis · crystal growth · enzymes · in situ product removal · process intensification

- [1] a) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolt, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268; b) D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73; c) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- [2] a) R. Wohlgemuth, *New Biotechnol.* **2009**, *25*, 204–213; b) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolt, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697.
- [3] a) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer, Cham, 2018.
- [4] *Industrial Biotransformations* (Eds.: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey), Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [5] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [6] a) R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2005**, *7*, 267–278; b) R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
- [7] a) R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437–1451; b) P. D. de María, F. Hollmann, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1257.
- [8] a) Y. Satyawali, K. Vanbroekhoven, W. Dejonghe, *Biochem. Eng. J.* **2017**, *121*, 196–223; b) A. A. Kiss, J. Grievink, M. Rito-Palomares, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 349–355; c) M. Nordblad, M. D. Gomes, M. P. Meissner, H. Ramesh, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 1101–1114.
- [9] J. M. Woodley, *Comput. Chem. Eng.* **2017**, *105*, 297–307.
- [10] a) O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 345–351; b) F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253–257.
- [11] C. K. Savile, J. M. Janev, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309.
- [12] a) S. Ostergaard, L. Olson, J. Nielsen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 34–50; b) J. D. Keasling, *Science* **2010**, *330*, 1355–1358.
- [13] A. M. Kunjappu, Y. Tarasova, K. L. J. Prather, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11644–11654.
- [14] F. O. Ütkür, T. T. Tran, J. Collins, C. Brandenbusch, G. Sadowski, A. Schmid, B. Bühl, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1049–1059.
- [15] a) J. M. Sperl, V. Sieber, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2385–2396; b) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22; c) R. Abu, J. M. Woodley, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3094–3105; d) C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904; e) R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- [16] a) L.-E. Meyer, J. von Langermann, U. Kragl, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 901–910; b) R. A. Sheldon, R. M. Lau, M. J. Sorgedrager, F. van Rantwijk, K. R. Seddon, *Green Chem.* **2002**, *4*, 147–151.
- [17] P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 178–206.
- [18] a) A. C. Spieß, W. Eberhard, M. Peters, M. F. Eckstein, L. Greiner, J. Büchs, *Chem. Eng. Process.* **2008**, *47*, 1034–1041; b) M. F. Eckstein, J. Lembrecht, J. Schumacher, W. Eberhard, A. C. Spieß, M. Peters, C. Roosen, L. Greiner, W. Leitner, U. Kragl, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1597–1604; c) M. F. Eckstein, M. Peters, J. Lembrecht, A. C. Spieß, L. Greiner, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1591–1596.
- [19] a) N. Zumbrägel, H. Gröger, *Bioengineering* **2018**, *5*, 60; b) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488–4492; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4570–4574.
- [20] D. Uhrich, J. von Langermann, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2111.
- [21] L. Klermund, K. Castiglione, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 1233–1246.
- [22] a) G. J. Lye, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 395–402; b) V. Outram, C.-A. Lalander, J. G. M. Lee, E. T. Davis, A. P. Harvey, *Bioresour. Technol.* **2016**, *220*, 590–600; c) J. Fiedurek, M. Trytek, M. Skowronek, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2946–2960; d) M. Bechtold, S. Panke, *Chimia* **2009**, *63*, 345–348; e) W. van Hecke, G. Kaur, H. de Wever, *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1245–1255; f) J. M. Woodley in *Synthetic Methods for Biologically Active Molecules: Exploring the Potential of Bioreductions* (Ed.: E. Brenna), Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, pp. 263–284.
- [23] J. M. Woodley, M. Bisschops, A. J. J. Straathof, M. Ottens, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 121–123.
- [24] E. M. Buque-Taboada, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, L. A. M. van der Wieren, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 1–12.
- [25] J. Urbanus, C. P. M. Roelandts, D. Verdoes, J. H. ter Horst, *Chem. Eng. Sci.* **2012**, *77*, 18–25.
- [26] G. Coquerel, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2286–2300.
- [27] a) V. V. Kelkar, K. M. Ng, *AIChE J.* **1999**, *45*, 69–81; b) D. A. Berry, K. M. Ng, *AIChE J.* **1997**, *43*, 1737–1750.
- [28] a) J. W. Mullin, *Crystallization*, Elsevier **2001**; b) N. S. Tavare, *Industrial Crystallization: Process Simulation Analysis and Design*, Springer, Boston **1995**.
- [29] E. M. Buque-Taboada, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, L. A. M. van der Wieren, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 795–800.
- [30] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 266–274.
- [31] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2007**, *9*, 1273–1283.
- [32] B.-K. Cho, J.-H. Seo, T.-W. Kang, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 226–234.
- [33] B.-K. Cho, J.-H. Seo, J. Kim, C.-S. Lee, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2006**, *11*, 299–305.
- [34] S. Hanzawa, S. Oe, K. Tokuhisa, K. Kawano, T. Kobayashi, T. Kudo, H. Kakidani, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 589–591.
- [35] K. Würges, U. Mackfeld, M. Pohl, S. Lütz, S. Wilhelm, W. Wiechert, T. Kubitzki, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2431–2438.
- [36] K. Würges, K. Petrussevska-Seebach, M. P. Elsner, S. Lütz, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 1235–1239.
- [37] L. G. Encarnación-Gómez, A. S. Bommarius, R. W. Rousseau, *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *122*, 416–425.
- [38] T. Nagasawa, C. D. Matthew, J. Mauger, H. Yamada, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1766–1769.
- [39] A. P. G. M. van Loon, H. P. Hohmann, W. Bretzel, M. Hümbelin, M. Pfister, *Chimia* **1996**, *50*, 410–412.
- [40] J. Ren, P. Yao, S. Yu, W. Dong, Q. Chen, J. Feng, Q. Wu, D. Zhu, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 564–567.
- [41] D. Hüselwede, M. Tänzler, P. Süß, A. Mildner, U. Menyes, J. von Langermann, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2130–2133.
- [42] J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270–348.
- [43] H. G. Kulla, *Chimia* **1991**, *45*, 81–85.
- [44] a) T. Yamane, R. Tanaka, J. Biosci. Bioeng. **2013**, *115*, 90–95; b) Y. Wang, D. Cai, C. Chen, Z. Wang, P. Qin, T. Tan, *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 658–663; c) M.-T. Gao, M. Hirata, E. Toorisaka, T. Hano, *Chem. Eng. Process.* **2009**, *48*, 464–469.
- [45] M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de Vroom, H. M. Moody, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *10*, 509–515.

4. PUBLIKATION

- [46] M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de Vroom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 426–430.
- [47] M. I. Youshko, L. M. van Langen, E. de Vroom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, V. K. Svedas, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 589–593.
- [48] A. L. O. Ferreira, R. L. C. Giordano, R. C. Giordano, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 7695–7702.
- [49] L. G. Encamació-Gómez, A. S. Bommaris, R. W. Rousseau, *React. Chem. Eng.* **2016**, *1*, 321–329.
- [50] M. A. McDonald, A. S. Bommaris, R. W. Rousseau, *Chem. Eng. Sci.* **2017**, *165*, 81–88.
- [51] J. Urbanus, C. P. M. Roelands, D. Verdoes, P. J. Jansens, J. H. ter Horst, *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 1171–1179.
- [52] H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1832–1849.
- [53] E. M. Buque-Taboada, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, L. A. M. van der Wielen, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1147–1154.
- [54] M. Furui, N. Sakata, O. Otsuki, T. Tosa, *Biocatalysis* **1988**, *2*, 69–77.
- [55] J. Bao, K. Koumatsu, K. Furumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga, K. Nakao, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 6165–6170.
- [56] K. Xu, P. Xu, *Bioresour. Technol.* **2014**, *163*, 33–39.
- [57] a) J. Urbanus, C. P. M. Roelands, J. Mazurek, D. Verdoes, J. H. ter Horst, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 2817–2819; b) J. Urbanus, R. J. M. Bisselink, K. Nijkamp, J. H. ter Horst, D. Verdoes, C. P. M. Roelands, *J. Membr. Sci.* **2010**, *363*, 36–47.
- [58] T. Nasrollahnejad, J. Urbanus, J. H. ter Horst, D. Verdoes, C. P. M. Roelands, *Ind. Biotechnol.* **2012**, *8*, 133–151.
- [59] a) L. Yang, D. Wei, Y. Zhang, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2004**, *79*, 480–485; b) D. Wei, L. Yang, Q. Song, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *26*, 99–104; c) D. Li, Y. Zhang, S. Cheng, Q. Gao, D. Wei, *Food Technol. Biotechnol.* **2008**, *46*, 461–466.
- [60] L.-E. Meyer, K. Plasch, U. Kragl, J. von Langermann, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 963–970.
- [61] a) J. Mei, H. Min, Z. Lü, *Process Biochem.* **2009**, *44*, 886–890; b) D. Hua, S. Lin, Y. Li, H. Chen, Z. Zhang, Y. Du, X. Zhang, P. Xu, *Biocatal. Biotransform.* **2010**, *28*, 259–266; c) J. Bae, H. Moon, K. K. Oh, C. H. Kim, D. S. Lee, S. W. Kim, S. I. Hong, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1315–1319; d) Y.-P. Xue, Z.-Q. Liu, M. Xu, Y.-J. Wang, Y.-G. Zheng, Y.-C. Shen, *Biochem. Eng. J.* **2010**, *53*, 143–149; e) H. D. Simpson, V. Alphand, R. Furstoss, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *16*, 101–108; f) C. van den Berg, N. Wierckx, J. Vente, P. Bussmann, J. de Bont, L. van der Wielen, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 466–472; g) S.-P. Zou, E.-H. Du, Z.-C. Hu, Y.-G. Zheng, *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 937–942; h) R. R. R. Sardari, T. Dishisha, S.-H. Pyo, R. Hatti-Kaul, *J. Biotechnol.* **2014**, *192*, 223–230.
- [62] a) P. Wang, Y. Wang, Z. Su, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 974–986; b) P. Wang, Y. Wang, Y. Liu, H. Shi, Z. Su, *Bioresour. Technol.* **2012**, *104*, 652–659; c) S. Bajracharya, B. van den Burg, K. Vanbroekhoven, H. de Wever, C. J. N. Buisman, D. Pant, D. P. B. T. B. Strik, *Electrochim. Acta* **2017**, *237*, 267–275; d) M. García-García, I. Martínez-Martínez, A. Sánchez-Ferrer, F. García-Carmona, *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 187–191.
- [63] a) Z. Zhou, Z. Yao, H. Q. Wang, H. Xu, P. Wei, P. K. Ouyang, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, *16*, 611–616; b) K. Zhang, S.-T. Yang, *Biochem. Eng. J.* **2015**, *96*, 38–45; c) J. M. Monteagudo, M. Aldavero, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74*, 627–634.
- [64] T. Phillips, M. Chase, S. Wagner, C. Renzi, M. Powell, J. DeAngelo, P. Michels, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 411–425.
- [65] a) M. A. Mirata, D. Heerd, J. Schrader, *Process Biochem.* **2009**, *44*, 764–771; b) M. A. Mirata, H. Schewe, D. Holtmann, J. Schrader, *Chem. Ing. Tech.* **2010**, *82*, 101–109.

Manuscript received: October 1, 2018

Revised manuscript received: November 4, 2018

Accepted manuscript online: November 5, 2018

Version of record online: January 25, 2019

5. PUBLIKATION

X. 5. PUBLIKATION

Dennis Hülsewede, Jan Neuburger and Jan von Langermann

Application of *In Situ* Product Crystallisation in the Amine Transaminase from *Silicibacter pomeroyi*-Catalysed Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine

Buchartikel *Applied Biocatalysis* 2020, 173-178

DOI: 10.1002/9781119487043.ch4

Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Die im Buchartikel beschriebenen Konzepte und Experimente wurden von Dennis Hülsewede konzipiert und durchgeführt. Der Artikel wurde von Dennis Hülsewede und Jan Neuburger geschrieben und von Jan von Langermann überarbeitet.

3. Jin, L.Q., Peng, F., Liu, H.L. et al. (2019) *Process Biochemistry*, **85**, 60–67.
4. Shin, J.S. and Kim, B.G. (2002) *Journal of Organic Chemistry*, **67**, 2848–2853.
5. Franco, T.M.A., Favrot, L., Vergnolle, O. and Blanchard, J.S. (2017) *ACS Chemical Biology*, **12**, 1235–1244.
6. Schell, U., Wohlgemuth, R. and Ward, J.M. (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **59**, 279–285.

4.3 Application of *In Situ* Product Crystallisation in the Amine Transaminase from *Silicibacter pomeroyi*-Catalysed Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine

Dennis Hülsewede, Jan Neuburger and Jan von Langermann*

Biocatalytic Synthesis Group, Institute of Chemistry, University of Rostock, Rostock, Germany

Over the past few years, transaminases have become a powerful tool for the synthesis of chiral amines, which are valuable building blocks in the preparation of active pharmaceutical ingredients (APIs) and agrochemicals [1]. Examples include applications at both laboratory and industrial scale, such as in the synthesis of Sitagliptin [2]. The major advantage of amine transaminases (ATAs) is their ability to synthesise highly selectively optically pure amines or amino acids [3]. This can be achieved by kinetic resolution from a racemic amine mixture, which is limited by design to a maximum yield of 50%, or by the preferred asymmetric synthesis with a theoretical maximum yield of 100%. The asymmetric synthesis reaction requires a primary amine, which serves as a donor for the amination of a prochiral carbonyl compound (amine acceptor), forming the chiral product amine and the deaminated co-product [4, 5]. Commonly used donor amines are isopropylamine (IPA) and alanine [6].

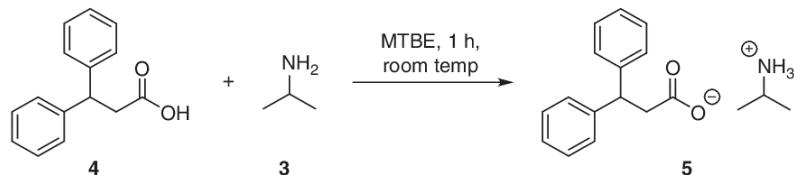
The asymmetric synthesis is unfortunately often limited by the unfavourable thermodynamic equilibrium towards the desired product amine. A conventional solution for this major limitation is the use of a significant excess of the amine donor over the amine acceptor to push the reaction to the product side [6, 7]. However, such nonphysiological conditions can cause secondary issues with the biocatalyst itself, which may easily become a significant problem in the synthesis process [5]. To circumvent this issue, (bio)catalytic cascade reactions were developed to remove the side product and thereby shift the equilibrium [8]. One of the most common examples includes the use of alanine as an amine donor, forming pyruvate as a byproduct, which is then further reduced to lactate by lactate dehydrogenase (LDH). The required regeneration of the co-factor is typically obtained with glucose dehydrogenase (GDH) and glucose as a secondary substrate [9]. In addition, a variety of tailor-made donor amines have been proposed, which include secondary reactions after deamination and result in a similar equilibrium shift [10]. The consequence of all these techniques is that the overall complexity of the transaminase-catalysed reaction is increased, involving further side products, which decreases atom efficiency and increases costs.

Alternative noncatalytic solutions for equilibrium shift include *in situ* product removal (ISPR) techniques such as supported liquid membrane (SLM) [11] and *in situ* product crystallisation (ISPC) of the product amine [12, 13], which is the technique we use here. The advantage of a crystallisation is that it provides direct removal of the product amine from

174 *Applied Biocatalysis*

the reaction solution and subsequent isolation by a simple filtration [13]. The following example shows the enzymatic transformation of 3-methoxyacetophenone (3MAP) **1** into (*S*)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine **2** using the conventional amine donor IPA and the ATAs from *Silicibacter pomeroyi*. The integrated *in situ* crystallisation is achieved with the counterion of 3,3-diphenylpropionic acid (3DPPA) **4**.

4.3.1 Procedure 1: Synthesis of IPA-3DPPA Salt (Donor Salt) **5**



Scheme 4.3 *Synthesis of IPA-3DPPA salt (donor salt) **5**.*

4.3.1.1 Materials and Equipment

- Methyl *tert*-butyl ether (MTBE)
- 3,3-Diphenylpropionic acid (3DPPA) **4** (5 g, 44.2 mmol)
- IPA **3**
- 250 mL round-bottom flask

4.3.1.2 Procedure

1. In a 250 mL round-bottom flask, 3DPPA (5 g, 22.1 mmol) was dissolved in MTBE (90 mL). IPA (1.9 mL, 22.1 mmol) was added within 2 min and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature.
2. The resulting precipitate was filtered and washed with ice-cold MTBE (ca. 20 mL) and dried overnight at room temperature (in a fume hood) and for a few hours at 60 °C until all remaining MTBE was evaporated (see Scheme 4.3).

4.3.1.3 Isolated Yield

6.3 g (>99% yield) of a white powder.

¹**H-NMR** (500.13 MHz; DMSO-d6): δ 7.31–7.08 (m, 10H, Ar H), 6.22 (s, 3H, NH_3^+), 4.47 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, CH), 3.05 (m, $J = 6.3$ Hz, 1H, CH), 2.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH₂), 1.04 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H, CH₃).

¹³**C-NMR** (125.8 MHz; DMSO-d6): δ 172.8 (CO₂), 144.7 (Ar), 127.7 (Ar), 127.2 (Ar), 125.4 (Ar), 46.9 (CH), 41.8 (CH₂), 41.6 (CH), 23.6 (CH₃).

4.3.2 Procedure 2: ISPC-Based Synthesis

of (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylammonium 3,3-Diphenylpropionate **2**

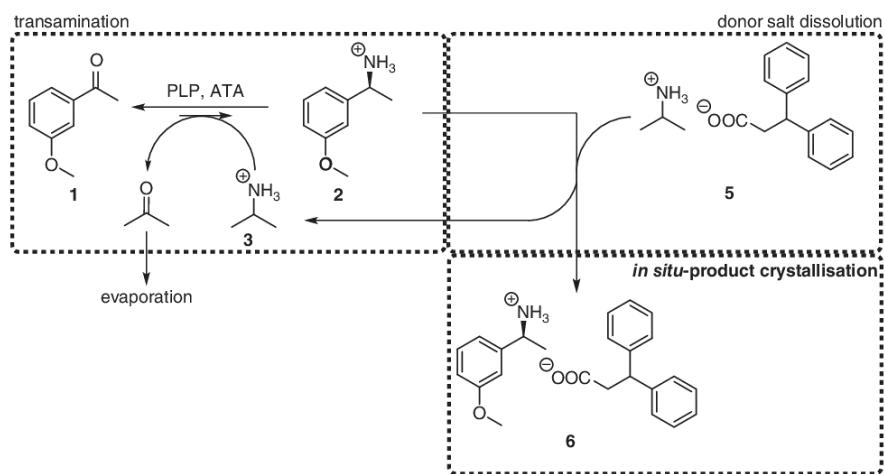
4.3.2.1 Materials and Equipment

- IPA **3**
- Isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (IPA-3DPPA) **5**

- Distilled water (dH_2O)
- Cyclopentyl methyl ether (CPME)
- conc. H_3PO_4 (>85%)
- sat. NaOH solution
- Internal standard solution: 9.7 μL n-decane in 1.99 mL CPME
- N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES)
- ATA from *Silicibacter pomeroyi* (commercially available as ECS ATA08 from Enzymicals AG)
- 3-Methoxyacetophenone (3MAP) **1**
- Pyridoxal 5'-phosphate hydrate (PLP)
- 50 mL Schlenk flask
- 1.5 mL Eppendorf tubes
- pH meter (WTW pH 320, WTW)
- Centrifuge (Mini Centrifuge C-1200, National Labnet)
- Vacuum pump (Diaphragm Pump, Vacuumbrand)
- Gas chromatograph (GC) (Trace 1310 Gas Chromatograph, Thermo Scientific)
- GC column CP-Chirasil-Dex CB; 25 m, 0.25 mm, 0.25 μm (Agilent)

4.3.2.2 Procedure

1. HEPES (119 mg, 0.5 mmol) was dissolved in dH_2O (20 mL) to obtain a 25 mM HEPES solution.
2. The HEPES solution (20 mL, 25 mM) was transferred into a 50 mL Schlenk flask. IPA (214 μL , 2.5 mmol) was added to obtain a concentration of 125 mM, and the pH was adjusted to 7.5 by adding conc. H_3PO_4 .
3. IPA-3DPPA salt (713.5 mg, 2.5 mmol) (donor salt) was added to the reaction mixture as a continuous feed of IPA and 3DPPA for the ISPC of the product amine salt. Please note that IPA-3DPPA is only partially soluble and an excess of solid donor salt will be present.
4. PLP (24.7 mg, 0.1 mmol) and ATA (240 U) were added to the resulting suspension and the reaction was started by the addition of 3-methoxyacetophenone (3MAP) **1** (275 μL , 2.0 mmol). The reaction mixture was stirred at 30 °C for 23 hr.
5. The reaction vessel was held under reduced pressure (50–100 mbar) for 1 hr to partially remove acetone.
6. A 500 μL sample was taken, quenched with a sat. NaOH solution (50 μL), mixed with CPME (500 μL) and vortexed for 30 sec. The emulsion was centrifuged to enhance phase separation. 200 μL of the organic layer was added to CPME (800 μL) and a 25 mM n-decane solution in CPME (200 μL) (internal standard) for gas chromatography analysis (see later for details).
7. Substrate adjustment after each cycle (24 hr): Based on the analysis in Step 6, the 3MAP concentration was readjusted to 100 mM and IPA-3DPPA to 125 mM. The reaction was then allowed to proceed for another 23 hr.
8. Steps 5–7 were repeated until a product amine concentration of 180–190 mM was reached. During the last two repetitions, only 3MAP was readjusted to 100 mM, to allow the consumption of all solid IPA-3DPPA. This led to the presence of only product amine salt as the remaining solid phase, which was eventually filtered off and washed with small amounts of cold water and CPME (see Scheme 4.4).



Scheme 4.4 ISPC-based conversion of 3-methoxyacetophenone **1** into (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine **2**. Equilibrium shift and product isolation result from a continuous product amine salt precipitation **6** with 3,3-diphenylpropionate, which originates from a constant dissolution of the donor amine salt isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate **5**.

4.3.2.3 Isolated Yield

1 g (92% yield, based on IPA-3DPPA consumption).

¹H-NMR (500.13 MHz; DMSO-d₆): δ 7.33–6.73 (m, 14H, Ar H), 4.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH), 4.43 (s, 3H, NH₃⁺), 4.00 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH), 3.77 (s, 3H, O-CH₃), 2.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.29 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (62.9 MHz; DMSO-d₆): δ 172.0 (CO₂), 159.0 (Ar), 149.3 (Ar), 143.9 (Ar), 128.5 (Ar), 127.7 (Ar), 127.0 (Ar), 125.5 (Ar), 117.6 (Ar), 111.5 (Ar), 111.3 (Ar), 54.6 (O-CH₃), 50.0 (CH), 46.4 (CH), 40.1 (CH₂), 25.0 (CH₃).

The free amine can be obtained by dissolution of the product salt in alkaline solution (pH > 13), extraction into CPME and evaporation of CPME.

4.3.2.4 Analytical GC Method

See Tables 4.1 and 4.2.

Table 4.1 GC method.

Temperature program (r = (°C·min ⁻¹))	Duration
90 °C – 2 r → 100 °C – 20 r → 130 °C – 2 r → 138 °C – 20 r → 160 °C	11.6 min

Table 4.2 Retention times for GC analysis.

Substance	Retention (min)
<i>n</i> -Decane (standard)	3.9
(<i>S</i>)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine (3MPEA)	8.7
3-Methoxyacetophenone (3MAP)	9.0

4.3.3 Conclusion

This procedure describes the continuous synthesis of (*S*)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine **1** beyond the initial thermodynamic equilibrium in high purity. The continuous dissolution of the donor amine salt IPA-3DPPA provides the basis for a constant crystallisation of the product amine salt.

References

- (a) Slabu, I., Galman, J.L., Lloyd, R.C. and Turner, N.J. (2017) *ACS Catalysis*, **7**, 8263–8284; (b) Fuchs, M., Farnberger, J.E. and Kroutil, W. (2015) *European Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 6965–6982; (c) Kohls, H., Steffen-Munsberg, F. and Hohne, M. (2014) *Current Opinion in Chemical Biology*, **19**, 180–192.
- (a) Savile, C.K., Janey, J.M., Mundorff, E.C. *et al.* (2010) *Science*, **329**, 305–309; (b) Narancic, T., Davis, R., Nikodinovic-Runic, J. and O' Connor, K. E. (2015) *Biotechnology Letters*, **37**, 943–954.
- (a) Ferrandi, E.E. and Monti, D. (2017) *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **34**, 13; (b) Kelly, S.A., Pohle, S., Wharry, S. *et al.* (2018) *Chemical Reviews*, **118**, 349–367; (c) Desai, A.A. (2011) *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 1974–1976.
- (a) Gomm, A. and O'Reilly, E. (2018) *Current Opinion in Chemical Biology*, **43**, 106–112; (b) Dold, S.-M., Syldatk, C. and Rudat, J. (2016) Transaminases and their applications, in *Green Biocatalysis* (ed. R.N. Patel), John Wiley and Sons, pp. 715–746.
- Guo, F. and Berglund, P. (2017) *Green Chemistry*, **19**, 333–360.
- Gundersen, M.T., Abu, R., Schürmann, M. and Woodley, J.M. (2015) *Tetrahedron: Asymmetry*, **26**, 567–570.
- (a) Voges, M., Abu, R., Gundersen, M.T. *et al.* (2017) *Organic Process Research & Development*, **21**, 976–986; (b) Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Jensen, J.S. *et al.* (2011) *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, 1479–1493; (c) Tufvesson, P., Nordblad, M., Krühne, U. *et al.* (2015) *Organic Process Research & Development*, **19**, 652–660.
- (a) Cassimjee, K.E., Branneby, C., Abedi, V. *et al.* (2010) *Chemical Communications*, **46**, 5569–5571; (b) Simon, R.C., Richter, N., Bustos, E. and Kroutil, W. (2014) *ACS Catalysis*, **4**, 129–143.
- Koszelewski, D., Lavandera, I., Clay, D. *et al.* (2008) *Advanced Synthesis & Catalysis*, **350**, 2761–2766.
- Gomm, A., Lewis, W., Green, A.P. and O'Reilly, E. (2016) *Chemistry: A European Journal*, **22**, 12 692–12 695.

178 *Applied Biocatalysis*

11. (a) Rehn, G., Adlercreutz, P. and Grey, C. (2014) *Journal of Biotechnology*, **179**, 50–55; (b) Börner, T., Rehn, G., Grey, C. and Adlercreutz, P. (2015) *Organic Process Research & Development*, **19**, 793–799; (c) Rehn, G., Ayres, B., Adlercreutz, P. and Grey, C. (2016) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **123**, 1–7; (d) Satyawali, Y., Ehimen, E., Cauwenberghs, L. et al. (2017) *Biochemical Engineering Journal*, **117**, 97–104.
 12. (a) Hülszewede, D., Tänzler, M., Süss, P. et al. (2018) *European Journal of Organic Chemistry*, **18**, 2130–2133; (b) Hülszewede, D., Dohm, J.-N., von Langermann, J. (2019) *Advanced Synthesis & Catalysis*, **361**, 2727–2733.
 13. Hülszewede, D., Meyer, L.-E. and von Langermann, J. (2019) *Chemistry: A European Journal*, **25**, 4871–4884.

4.4 Enantioselective Synthesis of Industrially Relevant Amines Using an Immobilised ω -Transaminase

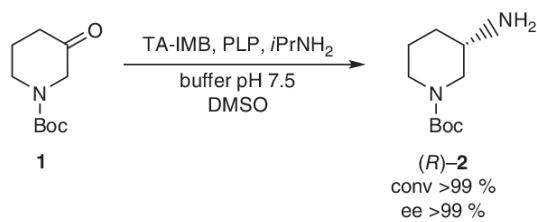
Elisabetta Parodi,¹ Oreste Piccolo² and Antonella Petri¹

¹Chemistry and Industrial Chemistry Department, University of Pisa, Pisa, Italy

²Studio di Consulenza Scientifica SCSOP, Sirtori, Italy

The use of ω -transaminases has been identified as a greener and more sustainable method for the preparation of enantiomerically pure amines, which are important precursors of biologically active compounds with different industrial applications [1–4]. Kinetic resolution of racemic amines and asymmetric synthesis starting from the corresponding carbonyl compounds are the two procedures carried out in the transamination reaction. Asymmetric synthesis is generally a preferable method as it offers the possibility of obtaining the product with almost quantitative yields. Recent studies have favoured the application of transaminases at the industrial level, so it is not surprising that they are frequently found amongst the enzymes designed for the large-scale synthesis of enantioenriched amines [1, 3]. In this context, immobilisation of transaminases has been developed in order to obtain a more stable biocatalyst and to simplify the reaction workup and purification of the product [5–7]. Successful applications of immobilised transaminases have been reported thanks to enhanced stability to temperature and in reuse experiments both in batch and in continuous-mode reactions.

We have recently reported the asymmetric transamination of the selected substrate 1-Boc-3-piperidone **1** using several commercially available immobilised transaminases (TA-IMBs), which facilitate the preparation of 3-amino-1-Boc-piperidine **2**. The reaction was carried out whilst evaluating the catalytic activity and the enantioselectivity under different experimental conditions [8].



Scheme 4.5 Synthesis of optically pure (*R*)-3-amino-1-Boc-piperidine 2.

XI. 6. PUBLIKATION

Dennis Hülsewede, Erik Temmel, Peter Kumm und Jan von Langermann

Concept Study for an Integrated Reactor-Crystallizer Process for the Continuous Biocatalytic Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine

Article *Crystals* **2020**, 10(5), 345

DOI: 10.3390/crust10050345

Abstract: An integrated biocatalysis-crystallization concept was developed for the continuous amine transaminase-catalyzed synthesis of (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine, which is a valuable intermediate for the synthesis of rivastigmine, a highly potent drug for the treatment of early stage Alzheimer's disease. The three-part vessel system developed for this purpose consists of a membrane reactor for the continuous synthesis of the product amine, a saturator vessel for the continuous supply of the amine donor isopropylammonium and the precipitating reagent 3,3-diphenylpropionate and a crystallizer in which the product amine can continuously precipitate as (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylammonium-3,3-diphenylpropionate.

Anteil der Autoren an dieser Arbeit:

Die Experimente wurden von Dennis Hülsewede konzipiert, durchgeführt und ausgewertet. Die eingesetzten Reaktoren wurden von Dennis Hülsewede konzipiert und von Erik Temmel und Peter Kumm konstruiert. Das Manuskript wurde von Dennis Hülsewede erstellt und von Jan von Langermann und Erik Temmel überarbeitet.



Article

Concept Study for an Integrated Reactor-Crystallizer Process for the Continuous Biocatalytic Synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine

Dennis Hülsewede¹, Erik Temmel², Peter Kumm¹ and Jan von Langermann^{1,*} ¹ Biocatalytic Synthesis Group, Institute of Chemistry, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3A, 18059 Rostock, Germany; dennis.huelsewede@uni-rostock.de (D.H.); peter.kumm@uni-rostock.de (P.K.)² Sulzer Chemtech Ltd., Gewerbestraße 28, 4123 Allschwil, Switzerland; temmel@mpi-magdeburg.mpg.de

* Correspondence: jan.langermann@uni-rostock.de; Tel.: +49-381-4986456

Received: 27 February 2020; Accepted: 23 April 2020; Published: 27 April 2020



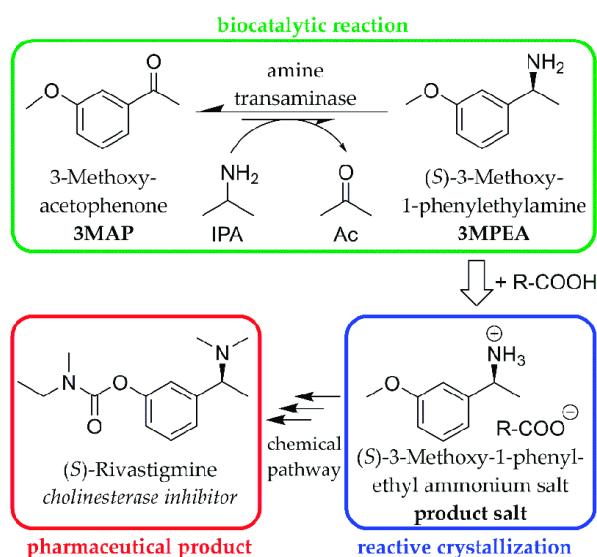
Abstract: An integrated biocatalysis-crystallization concept was developed for the continuous amine transaminase-catalyzed synthesis of (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine, which is a valuable intermediate for the synthesis of rivastigmine, a highly potent drug for the treatment of early stage Alzheimer’s disease. The three-part vessel system developed for this purpose consists of a membrane reactor for the continuous synthesis of the product amine, a saturator vessel for the continuous supply of the amine donor isopropylammonium and the precipitating reagent 3,3-diphenylpropionate and a crystallizer in which the product amine can continuously precipitate as (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylammonium-3,3-diphenylpropionate.

Keywords: amine; biocatalysis; enzyme; process intensification; crystallization; enantioselective

1. Introduction

In recent years, biocatalytic synthesis reactions have made a significant impact in the scientific community and have even replaced existing chemical pathways in industrial processes. The main advantages are often higher stereo-, regio- and chemoselectivities, while mild reaction conditions and environmentally friendly solvents such as water can be applied. The high selectivity of biocatalysts results also frequently in less or even no side reactions, which itself yields higher process and atom efficiencies. In addition, recent scientific and technological advances in enzyme engineering allow the relatively fast design and production of tailor-made biocatalysts for a specific process [1–7]. Furthermore, downstream-processing from biocatalyst-based reaction systems remains an issue and is a major economic factor in the overall process. This problem originates mostly from the presence of water-soluble proteins, buffer salts, biocatalyst-based cofactors, remaining unreacted substrates and co-substrates, which have to be removed efficiently to ensure high product purities. The purification from such complex mixtures is typically achieved by multiple extractions and further purification steps [8].

In contrast, selective crystallization techniques provide a more selective product isolation approach from complex mixtures, especially aqueous solutions and was integrated in this study directly into the biocatalytic synthesis process [9]. In the presented study this is utilized at the synthesis of (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine, which is a valuable intermediate for the synthesis of rivastigmine, a highly potent drug for the treatment of early stage Alzheimer’s disease (Scheme 1). Studies have shown that the (S)-enantiomer is more potent as the (R)-enantiomer and preferably the enantiomerically pure (S)-form should be administered to avoid complications [10–13].



Scheme 1. Investigated biocatalytic transamination reaction and the inclusion of a reactive crystallization step for the synthesis of rivastigmine; $R = -\text{CH}_2-\text{CPh}_2$.

The applied amine transaminase from *Ruegeria pomeroyi* catalyzes the transfer of the amine group from the donor amine isopropylamine (IPA) to the carbonyl compound 3-methoxyacetophenone (3MAP), forming (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine (3MPEA) and acetone (Ac) as a co-product [14,15]. The biocatalytic transformation forming 3MPEA itself is very enantioselective but suffers from an unfavorable reaction equilibrium [16]. These limitations in amine transaminase-catalyzed reactions are often overcome by classical (bio)chemical solutions to remove the co-product from the equilibrium or using specifically tailor-made donor amines to shift the reaction to the product side [17–28]. These chemically-driven options offer higher yields but require often a complex process control, additional (bio)catalytic reaction systems, additional chemicals and eventually lead to lower atom efficiencies [29]. As a crystallization-based alternative we apply our recently developed *in situ*-product crystallization approach in the amine-transaminase-catalyzed reaction [16,30]. This reactive crystallization approach removes the product amine 3MPEA from solution by forming an ammonium salt with a suitable carboxylate anion that exhibits a very low solubility. Additional chemical reactants or (bio)catalysts are not required and a simplified downstream-processing approach via filtration is possible.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

All chemicals were obtained from Acros (Fair Lawn, NJ, USA), TCI Chemicals (Tokyo, Tokyo Prefecture, Japan), Aldrich (St. Louis, MO, USA), Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) and ABCR (Karlsruhe, Baden-Württemberg, Germany) and were used as received. Deionized water was used throughout this study.

2.2. Biocatalyst

Amine transaminase from *Ruegeria pomeroyi* (as ECS-ATA08) was obtained as whole cell lyophilizate (Enzymicals AG (Greifswald, Mecklenburg-Vorpommern, Germany)) and was used as received during this study. The activity of 364 U/g was determined using the conversion of 2.5 mmol/L 1-phenylethylamine and 2.5 mmol/L pyruvate to acetophenone and alanine in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 with 0.025 mmol PLP and 0.25% (v/v) DMSO at 25 °C. One unit of enzyme activity is defined as the formation of 1 mmol acetophenone per minute, which was observed spectrophotometrically at 245 nm with $\epsilon(\text{acetophenone}) = 11.852 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$.

2.3. Donor Amine Salt Synthesis

39.6 g 3,3-diphenylpropionic acid (3DPPA) were dissolved in 500 mL methyl tert-butyl ether (MTBE) in a 1 L round flask. Then 16.0 mL isopropylamine (IPA) were added to the stirred solution with a syringe and the resulting suspension was stirred overnight. MTBE and excess IPA were evaporated afterwards with a rotary evaporator to obtain the donor salt isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (IPA-3DPPA).

2.4. Solubility Measurements

Solubilities were measured in 10 mL 50 mM phosphate buffer with an excess of the respective solid salt to obtain a saturated solution. The resulting mixture was adjusted to the desired pH value and shaken for 7 days at 160 rpm and 30 °C. The pH was re-adjusted daily with NaOH and HCl, if required. The resulting mixture was then filtered to obtain a clear, saturated solution. For pH-dependent measurements a sample was diluted (typically 20×) for the absorption measurement of 3DPPA at 249 nm and compared with a calibration curve of 3DPPA in 50 mM phosphate buffer at the same pH (3DPPA concentration range: 3–0.5 mM, 1 cm cuvette path length). For temperature dependent solubility measurements, 25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid buffer (HEPES) at pH 7.5 was used. After 7 days a 1 mL sample was taken, evaporated and the amount of salt determined gravimetrically with the subtraction of the amount of HEPES.

2.5. Reactor Setup

Two Plane flange vessels with a tempering jacket and a bottom drain valve of 250 mL (Pfaudler GmbH, Germany) were used as crystallizer and saturator. The membrane reactor consists of two Teflon chambers separated by a polyvinylidene fluoride transfer membrane (PVDF) with a cut-off of 0.2 µm (Bio-Rad Laboratories GmbH, Germany) (Figure 1). The vessels were connected with PharMed - BPT and Tygon LMT - 55 tubes (Saint - Gobain, France), tempered with the cooling bath thermostat Huber CC-K6 attached to a Pilot ONE control panel (both by Peter Huber Kältemaschinenbau AG, Germany) and stirred with overhead stirrers MICROSTAR 7.5 control. The membrane reactor was stirred with magnetic stirrers (IKA Werke, Germany). Two peristaltic pumps—Hei-FLOW Precision 01 (Heidolph Instruments, Germany)—were used to transfer the mother liquors from the saturator to the membrane reactor and from the crystallizer to the saturator. To ensure a constant filling level in the membrane reactor, an overflow was integrated from which the reaction solution can flow into the lower positioned crystallizer. In order to keep the solid salts in the saturator and the crystallizer, 11 µm filters have been placed at the inlet of the tubes.

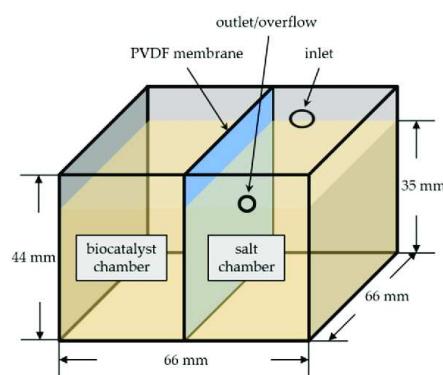


Figure 1. Design of the membrane reactor with polyvinylidene fluoride membrane (PVDF).

2.6. Membrane Reactor Procedure

In the membrane reactor, 857 μ L IPA (100 mM) and 596 mg HEPES buffer (25 mM) were added to 100 mL water and the pH was adjusted to 7.5. This solution was divided equally into both chambers of the reactor. After the addition of 2.85 g donor salt (100 mM) and 566 mg product salt (26 mg for saturation and 540 mg as seed crystals) to the salt chamber, the reactor was stirred until the dissolved salts were homogeneously distributed in both chambers. To start the reaction, 124 mg pyridoxal 5'-phosphate (PLP) (5 mM) and 1.37 mL substrate 3'-methoxyacetophenone (3MAP) (100 mM) were added to the salt chamber and 1.56 g amine transaminase (ATA) (6 U/mL) to the biocatalyst chamber. During the reaction the formed product (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine (3MPEA) can diffuse through the membrane and result in crystal growth with 3DPPA on the product salt seed crystals, while the cells containing the ATA are retained by the membrane. Every 24 h samples were taken from both chambers of the reactor and measured by gas chromatography.

2.7. Triple Vessel Procedure

5.14 mL IPA (100 mM) and 3.57 g HEPES buffer (25 mM) were added to 600 mL water and the pH was adjusted to 7.5. From this solution, 80 mL were added to each of the two chambers of the membrane reactor and the remainder divided between the saturator and the crystallizer. 10.3 g donor salt (\approx 60 mM, if it would be fully dissolved) was then added to the saturator and 1 g product salt was added to the crystallizer (159 mg for saturation and 841 mg as seed crystals) (see Figure 2). By switching on the pumps (2.5 L/h) and stirrers (200 rpm), the partially dissolved salts can be distributed throughout the system, while crystalline salt is retained by the filters in the respective vessels. To start the reaction, 741 mg PLP (5 mM) and 8.24 mL 3MAP (\approx 100 mM) were added to the saturator and 1.56 g ATA (1 U/mL) to the biocatalyst chamber of the membrane reactor. Samples were taken regularly from the biocatalyst chamber of the membrane reactor and measured by gas chromatography, to re-adjust the 3MAP concentration to the initial concentration of 100 mM, based on the observed conversion. As long as solid donor salt is still present in the saturator, it is not necessary to add additional material.

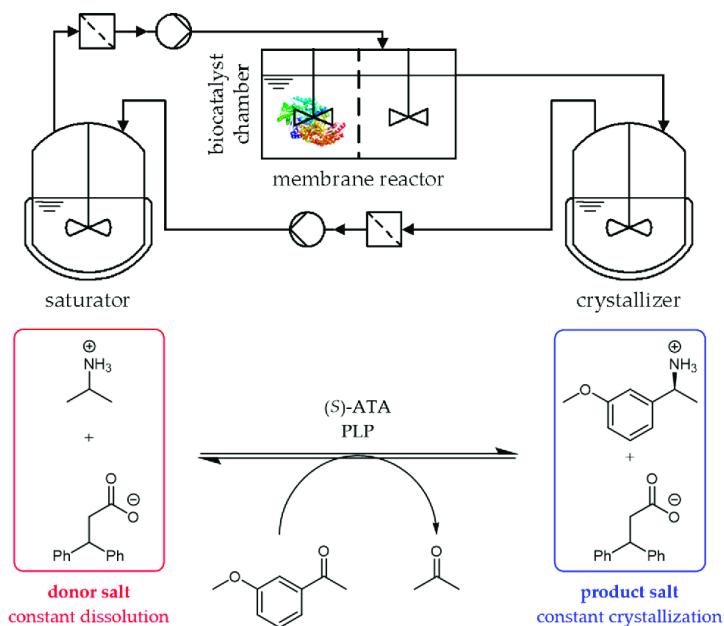


Figure 2. Reaction scheme of the continuous transaminases-catalyzed reaction with in situ donor salt dissolution (left) and product salt crystallization (right) in separated vessels.

2.8. Sampling

Samples of the suspension ($500 \mu\text{L}$) were taken periodically and $50 \mu\text{L}$ conc. NaOH was added to completely solve the undissolved salts and quench the reaction. Then $500 \mu\text{L}$ cyclopentylmethyl ether (CPME) was added to extract substrate and product, mixed by a vortex mixer and then centrifuged (2 min, 3000 rpm) to improve phase separation. From the organic layer, $200 \mu\text{L}$ was taken and was diluted with $800 \mu\text{L}$ CPME, combined with $200 \mu\text{L}$ of a 25 mM n-decane solution in CPME (internal standard) and subsequently analyzed by gas chromatography.

2.9. Chromatography

Concentration was measured with a Trace 1310 gas chromatograph by Thermo Scientific (Dreieich, Germany), equipped with a 1300 flame ionization detector and an Agilent Capillary HP-5 19091 J-433 ($0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m} \times 0.25 \mu\text{m}$). n-Decane was used as internal standard in all measurements. Temperatures of injector and detector were set to 250°C . Temperature profile started at 90°C , followed by a heating rate of 2 K/min to 100°C , 20 K/min to 130°C , 2 K/min to 138°C and 20 K/min to 160°C .

2.10. X-ray Powder Diffraction (XRPD)

Solid samples were measured via x-ray powder diffraction (XRPD) to discriminate the solid composition of donor salt and/or product salt. Powder x-ray diffraction data were collected on a Stoe Stadi-P with germanium-monochromatised Cu-K α -radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) in horizontal transmission/Debey-Scherrer geometry. The x-rays were detected with a position sensitive detector in the 2Theta range from 5 to 35° . The 40 kV high voltage and 40 mA current were generated by a Seifert high voltage generator (ID 3003). The equipment was controlled and the raw data were handled with the software STOE WinXPOW (version 2.25, 2009). The position of the 2Theta and ω -circle were

adjusted with the (111)-reflex of crystalline silicon ($2\text{Theta} = 28.44^\circ$). All samples were measured as flat preparation between two layers of poly acetate foil. The sample was spun around its center during the measurement and the ω -circle was also spun with 1/2 2Theta .

2.11. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AVANCE 250 II, AVANCE 300 III and AVANCE 500. Chemical shifts are reported in parts per million relative to the solvent peak as an internal reference. Splitting patterns are indicated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet (see Appendix A).

3. Results and Discussion

Initial studies of the integrated use of crystallization in amine transaminase-catalyzed reactions included a direct application of a carboxylic acid, which yields the crystallization of the product amine salt but specifically avoids the crystallization of the donor amine isopropylamine as its salt (donor salt) [16]. This application of this concept results in a moderate apparent shift of the reaction equilibrium towards the product side but is unfortunately often limited to batch reactions and relatively low substrate concentrations due to a continuously increasing amount of solid product salt stopping the entire reaction.

In this study we present an alternative continuous approach towards this reactive crystallization, which intentionally includes the presence of the originally undesired donor amine salt isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate. The donor amine salt dissolves continuously and thus release stoichiometric amounts of isopropylammonium and 3,3-diphenylpropionate into solution. Any excess beyond the solubility limit remains as a dispersed solid phase in the reaction mixture. This basically limits the amount of amine in solution to an absolute minimum, in contrast to conventional approaches using high excesses of isopropylamine in solution, which may cause limited enzyme stability [30,31]. Similarly, the substrate 3MAP is continuously dissolved in the solution up to its solubility limit, ensuring a constant 3MAP concentration in the aqueous solution throughout the process. Consequently, the reaction equilibrium in solution is based on the aqueous phase concentration since it is only accessible by the biocatalyst. The conversion towards the products leads to a continuous removal of the educts from the aqueous solution, which is adjusted to the original concentration due to the above mentioned solubility equilibrium. The reaction cycle is closed by the final continuous crystallization of the product amine salt, which removes in stoichiometric amounts the dissolved 3,3-diphenylpropionate anion. The only byproduct is acetone, which evaporates quite easily from solution due to its high vapor pressure at $30\text{ }^\circ\text{C}$ [30]. Applications at large scale will require additional solutions to remove acetone effectively from solution to avoid a full stop of the in situ-product crystallization and the inhibition of the biocatalyst, for example, via stripping with an inert gas.

The presence of two solid salt phases requires a separation into two vessels to avoid an undesired mixing. In this work we present a triple vessel system, which separates both solid phases and the catalyst from each other, which enables the above mentioned continuous reaction mode (Figure 2). A membrane reactor is applied to retain the biocatalyst (amine transaminase from *Ruegeria pomeroyi*) behind a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF), while the filtered mother liquor is pumped via peristaltic pumps through a crystallizer for product salt crystallization, a saturator for donor salt saturation and eventually back into the membrane reactor to close the loop. An exception is the connection between the membrane reactor and the crystallizer, which is directly fed by an overflow from the higher positioned membrane reactor.

3.1. Salt Solubilities

The solubility difference between both salts, donor salt and product salt, is the main parameter within the shown reaction mode. The donor salt must have a significantly higher solubility than the

product salt, which will only then crystallize selectively from solution. Using the 3,3-diphenylpropionate (3DPPA) as the anion results in a solubility difference of approx. 50 mM between the donor salt (IPA-3DPPA) and the product salt (3MPEA-3DPPA) (Figure 3). For the investigated biocatalytic reaction system the concentration of the donor salt remains for above pH 7 and 30 °C, at >50 mM, while the product salt is considerably less soluble at approx. 5 mM, depending on the chosen pH in solution (Figure 3A). These results are comparable with the model product amine salt 1-phenylethylammonium 3,3-diphenylpropionate in an earlier study [30]. Please note that the shown concentrations may be altered by the presence of other salts such as other buffer components, impurities and especially the additionally used isopropylamine. Changes in temperature will also affect the solubilities of these two main salts, however the observed effect is relatively small. As shown in Figure 3B at pH 7.5 no significant effect is visible and the donor salt remains strongly more soluble than the product amine salt. The choice of temperature is fortunately mostly controlled by the temperature optimum of the biocatalyst itself, which limits the choice of reaction temperature to a narrow range at 30 °C.

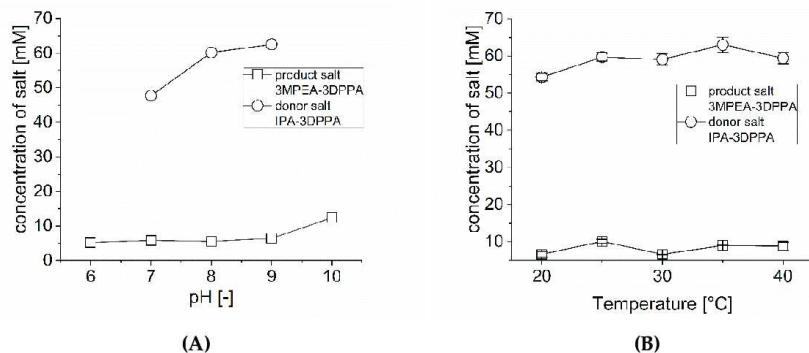


Figure 3. pH- and temperature-dependent solubility profile of the donor salt IPA-3DPPA and product salt 3MPEA-3DPPA; (A) pH dependency in 50 mM phosphate buffer at 30 °C; (B) temperature dependency in 25 mM HEPES buffer pH 7.5.

3.2. Single Membrane Reactor

The central membrane reactor is the key component within the triple vessel concept. The applied membrane primarily retains the biocatalyst (whole *E. coli* cells) in the biocatalyst chamber from the remaining solution and both solid salts, IPA-3DPPA and 3MPEA-3DPPA, in the salt chamber (Figure 4). During the reaction, IPA-3DPPA is continuously consumed as the amount of product salt increases and eventually accumulates as the only solid phase.

The dissolved reactants diffuse freely between both chambers and a relevant diffusion limitation was not observed (full equilibrium conditions can be achieved within ca. 10 min). This approach provides an alternative to classical encapsulation and immobilization approaches and thus prevents undesired deactivation or diffusion problems of the biocatalytic reaction system [32–36]. The applied PVDF transfer membrane is fully biocompatible and was described by Wachtmeister et al. in 2014 for a lyase-catalyzed reaction [37]. In addition, the use of a membrane reactor offers a simple adjustment of the biocatalytic synthesis system without interfering with the solid salt phases, including the addition or a full exchange of the biocatalyst during the reaction. In addition, the accumulation of inactivated biocatalyst in combination with an undesired mixing with the product salt is prevented, which simplifies downstream processing enormously to a simple filtration step.

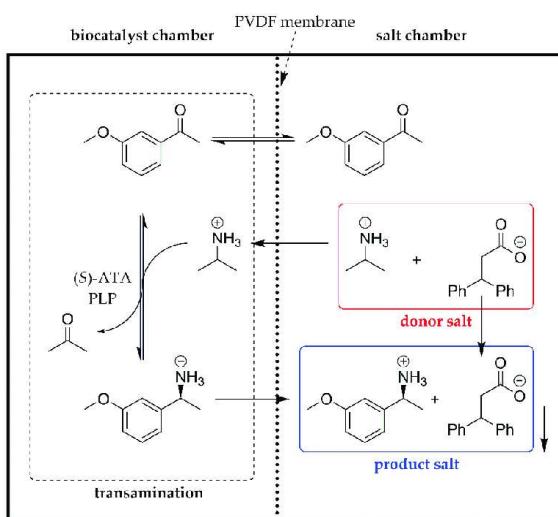


Figure 4. Reaction flow in the membrane reactor.

As shown in Figure 5, a batch experiment of the membrane reactor, without any connection to a saturator and crystallizer, allows the conversion of 55 mM 3MAP to the corresponding product amine salt 3MPEA-3DPPA. The product salt accumulates exclusively in the salt chamber, while the donor salt IPA-3DPPA is consumed in parallel in the salt chamber. A small amount of the product amine is always present in the biocatalyst chamber, which relates to the solubility limit of the product salt in solution. Eventually the reaction stops at approx. 55 mM product concentration due to an accumulation of acetone in the aqueous phase due to the absence of an active acetone removal step, which equals the equilibrium position of this biochemical reaction. Due to absence of any observable substrate and product inhibition at the chosen reaction conditions, the only rate determining step is the available catalytic activity of the biocatalyst, which leaves a lot of room for optimization. Transport through the membrane and crystal growth are always significantly faster and did not limit the overall process.

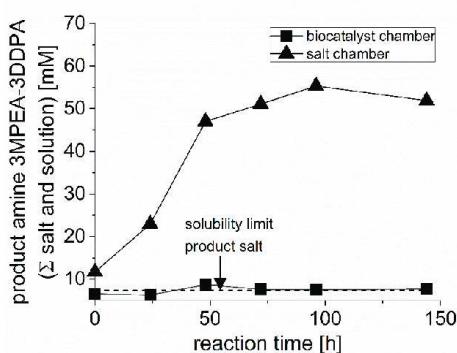


Figure 5. 3MPEA concentration curve in the chambers of the membrane reactor, 30 °C, 25 mM HEPES buffer pH 7.5, 100 mM 3MAP, 100 mM IPA-3DPPA, 100 mM additional isopropylamine and 5 mM PLP (within entire solution).

3.3. Combined Triple Vessel Concept

To permanently separate the salts from each other, the salt chamber of the membrane reactor is replaced by a flow-through chamber connected to two other vessels (see Figure 2). The donor salt is placed in the so-called saturator, which is placed directly before the membrane reactor. Here it can dissolve the donor salt continuously up to the solubility limit to keep the isopropylammonium and 3,3-diphenylpropionate concentrations in solution constant, which is later lowered by the biocatalytic reaction and the product crystallization step. The product salt is formed in the crystallizer, which is positioned after the membrane reactor and facilitates a constant crystal growth due to a slightly oversaturated product salt solution coming from the membrane reactor. Throughout the reaction donor salt is constantly consumed by dissolution in the saturator and equally product salt collected by crystal growth in the crystallizer. In the solution all concentrations are at an almost steady state except the above mentioned small oversaturation of the product salt and small undersaturation of the donor salt directly after the membrane reactor. In contrast to the single membrane reactor, an accumulation of acetone and thus limited equilibrium conversion seems not to be present here due the high surface area of the vessels and probably the applied tubing, which are permeable to acetone. In total, 1 g of biocatalytically produced product amine salt was obtained throughout the reaction. By dissolving the product salt in a basic solution, the product amine can be extracted into cyclopentylmethyl ether (CPME). By adding HCl, the hydrochloride of the product amine can be precipitated and filtered off, which was described in an earlier study [30]. The system remained fully stable over 33 h with a constant process productivity of 1.2 g/(L·d) (Figure 6). After 33 h an undesired product salt crystallization occurred in the biocatalyst chamber, which decreased overall productivity significantly. The crystal morphology between donor salt (platelets) and product salt (needles) is clearly different (Figure 7).

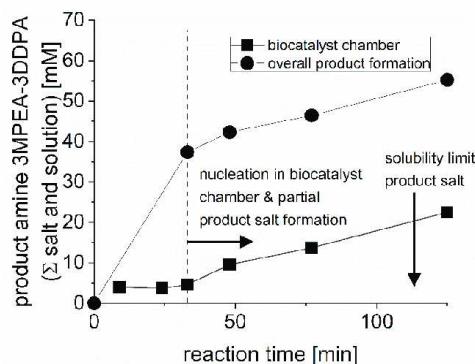


Figure 6. Product formation in the combined triple vessel concept; 30 °C, 25 mM HEPES buffer pH 7.5, 100 mM 3MAP, 60 mM IPA-3DPPA, 100 mM additional isopropylamine and 5 mM PLP (within entire solution).

The product salt was easily obtained from the reaction solution by a simple filtration and a single rinse with distilled water. The solid phase does not contain any cell or protein residue. The purity was determined by NMR with >99.5% and the enantiomeric excess was determined by high-performance liquid chromatography with >99.5%. XRPD analysis also showed that no donor salt formation occurred in the crystallizer and similarly no product salt was found in the saturator (Figure 8).

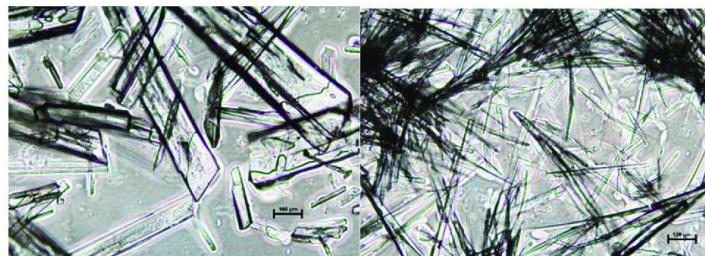


Figure 7. Crystal morphology of donor salt (left) and product salt (right).

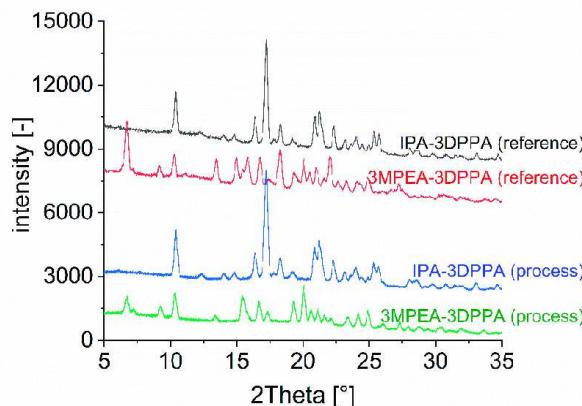


Figure 8. X-ray powder diffraction (XRPD) -analysis of donor and product salt; reference substances and samples from combined triple vessel concept.

4. Summary and Conclusions

In this study we reported the development of a continuously operated amine transaminase-catalyzed reaction, which is based on the integration of a reactive crystallization step for the in situ-removal of the product amine as a product salt. The presented concept involves the use of a membrane reactor, which retains the whole cell biocatalyst and two separate vessels for the application and collection of the donor salt (saturator) and product salt (crystallizer). The saturator provides a constant concentration of the required donor amine salt isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate simultaneous to the crystallizer that collects the product amine salt (*S*)-1-(3-methoxyphenyl)ethylammonium 3,3-diphenylpropionate.

In conclusion, the shown triple vessel concept with its central membrane reactor and final crystallizer allows to overcome the very unfavorable chemical reaction equilibrium of the amine transaminase-catalyzed reaction in a continuously operated vessel concept. A fully stoichiometric reaction was achieved, which is not obtained in classical reaction concepts using isopropylamine as donor amine. The spatial separation of biocatalyst, saturator and crystallizer allows a full control of these components, including its separate removal and recycling after usage. The shown concept achieves very high product purity by the integrated crystallization step with only very few downstream-processing steps. The application of the membrane reactor provides a localization of the biocatalyst and prevents the use of potentially harmful immobilization techniques. The herein achieved space-time-yield of 1.2 g/(L·d) is directly correlated with the applied biocatalyst activity, which will increase in parallel with higher biocatalyst loadings. Future studies will also target the optimization of the shown concept in order to improve process productivity in such a continuous reaction mode. This primarily includes

techniques to prevent the undesired nucleation by an optimized reactor design and the use of purified enzyme within the biocatalyst chamber.

Author Contributions: Conceptualization, J.v.L. and D.H.; methodology, D.H., P.K. and E.T.; formal analysis, D.H. and J.v.L.; investigation, D.H. and J.v.L.; writing—original draft preparation, D.H.; writing—review and editing, J.v.L. and E.T.; visualization, D.H. and J.v.L.; supervision, J.v.L.; project administration, J.v.L.; funding acquisition, J.v.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding by German Research Foundation (DFG, grant LA 4183/1-1), the Central Innovation Program SME of the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (ZIM, grant number 16KN07323) and the Leibniz ScienceCampus Phosphorus Research Rostock (grant CryPhos), is gratefully acknowledged.

Acknowledgments: The authors thank Hubert Bahl and Ralf-Jörg Fischer for their continuous support in microbiology, Dirk Michalik and Heike Borgwaldt for their assistance with NMR measurements, Martin Köckerling and Florian Schröder for their assistance with XRPD-measurements and Sandra Diederich and Rike Thomsen for technical and experimental support. We acknowledge financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Universität Rostock within the funding programme Open Access Publishing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviation

3DPPA	3,3-Diphenylpropionic acid
3MAP	3'-Methoxyacetophenone
3MPEA	(S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine
3MPEA-3DPPA	(S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylammonium 3,3-diphenylpropionate (product salt)
ATA	Amine transaminase
CPME	Cyclopentylmethyl ether
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
IPA	Isopropylamine
IPA-3DPPA	Isopropylammonium 3,3-diphenylpropionate (donor salt)
NMR	Nuclear magnetic resonance
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
PVDF	Polyvinylidene fluoride transfer membrane
XRPD	X-ray powder diffraction

Appendix A

Appendix A.1. NMR-Data

Appendix A.1.1. Donor Salt IPA-3DPPA

¹H-NMR (373.2 K, DMSO-d6, 500.13 MHz, δ in ppm): 7.29–7.09 (m, 10H, Ar H), 4.47 (t, J = 7.7 Hz, 1H, CH), 3.07 (m, J = 6.4 Hz, 1H, CH), 2.86 (d, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.05 (d, J = 6.4 Hz, 6H, CH₃), NH₃⁺ not given

¹³C-NMR (373.1 K, DMSO-d6, 125.76 MHz, δ in ppm): 172.8 (CO₂), 144.7 (Ar), 127.7 (Ar), 127.2 (Ar), 125.4 (Ar), 46.9 (CH), 41.9 (CH₂), 41.6 (CH), 23.2 (CH₃)

Appendix A.1.2. Product Salt 3MPEA-3DPPA

¹H-NMR (373.1 K, DMSO-d6, 500.13 MHz, δ in ppm): 7.32–6.74 (m, 14H, Ar H), 5.16 (s, 3H, NH₃⁺), 4.46 (t, J = 7.8 Hz, 1H, CH), 4.01 (q, J = 6.7 Hz, 1H, CH), 3.76 (s, 3H, O-CH₃), 2.97 (d, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.29 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-NMR (373.2 K, DMSO-d6, 125.76 MHz, δ in ppm): 172.0 (CO₂), 159.0 (Ar), 149.2 (Ar), 143.9 (Ar), 128.5 (Ar), 127.8 (Ar), 127.1 (Ar), 125.5 (Ar), 117.7 (Ar), 111.5 (Ar), 111.3 (Ar), 54.6 (O-CH₃), 50.0 (CH), 46.5 (CH), 40.1 (CH₂), 24.9 (CH₃)

References

1. Narancic, T.; Davis, R.; Nikodinovic-Runic, J.; O' Connor, K.E. Recent developments in biocatalysis beyond the laboratory. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 943–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443–1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Reetz, M.T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Munoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernaiz, M.J.; Alcantara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196–207. [[CrossRef](#)]
5. Clouthier, C.M.; Pelletier, J.N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605. [[CrossRef](#)]
6. Bornscheuer, U.T.; Huisman, G.W.; Kazlauskas, R.J.; Lutz, S.; Moore, J.C.; Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194. [[CrossRef](#)]
7. Wohlgemuth, R. The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnol.* **2009**, *25*, 204–213. [[CrossRef](#)]
8. Ni, Y.; Holtmann, D.; Hollmann, F. How Green is Biocatalysis? To Calculate is To Know. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 930–943. [[CrossRef](#)]
9. Hülsewede, D.; Meyer, L.-E.; von Langermann, J. Application of In Situ Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 4871–4884. [[CrossRef](#)]
10. Enz, A. Phenylcarbamate for the Inhibition of Acetylcholinesterase. Patent DE3805744C2, 24 February 1988.
11. Farlow, M.R.; Cummings, J.L. Effective pharmacologic management of Alzheimer’s disease. *Am. J. Med.* **2007**, *120*, 388–397. [[CrossRef](#)]
12. Emre, M. Rivastigmine in Parkinson’s Disease Dementia. *CNS Drugs* **2006**, *20*, 748–750. [[CrossRef](#)]
13. Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Kroutil, W.; Faber, K. Chemoenzymatic asymmetric total synthesis of (S)-Rivastigmine using omega-transaminases. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500–5502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Steffen-Munsberg, F.; Vickers, C.; Kohls, H.; Land, H.; Mallin, H.; Nobili, A.; Skalden, L.; van den Bergh, T.; Joosten, H.-J.; Berglund, P.; et al. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 566–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mallin, H.; Höhne, M.; Bornscheuer, U.T. Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 32–37. [[CrossRef](#)]
16. Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Süss, P.; Mildner, A.; Menyes, U.; Langermann, J. von. Development of an in situ-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *18*, 2130–2133. [[CrossRef](#)]
17. Payer, S.E.; Schrittweiser, J.H.; Kroutil, W. Vicinal Diamines as Smart Cosubstrates in the Transaminase-Catalyzed Asymmetric Amination of Ketones. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2553–2559. [[CrossRef](#)]
18. Satyawali, Y.; Ehimen, E.; Cauwenberghs, L.; Maesen, M.; Vandezande, P.; Dejonghe, W. Asymmetric synthesis of chiral amine in organic solvent and in-situ product recovery for process intensification: A case study. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 97–104. [[CrossRef](#)]
19. Heintz, S.; Börner, T.; Ringborg, R.H.; Rehn, G.; Grey, C.; Nordblad, M.; Kruhne, U.; Gernaey, K.V.; Adlercreutz, P.; Woodley, J.M. Development of in situ product removal strategies in biocatalysis applying scaled-down unit operations. *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 600–609. [[CrossRef](#)]
20. Rehn, G.; Ayres, B.; Adlercreutz, P.; Grey, C. An improved process for biocatalytic asymmetric amine synthesis by in situ product removal using a supported liquid membrane. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *123*, 1–7. [[CrossRef](#)]
21. Gomm, A.; Lewis, W.; Green, A.P.; O'Reilly, E. A New Generation of Smart Amine Donors for Transaminase-Mediated Biotransformations. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12692–12695. [[CrossRef](#)]
22. Börner, T.; Rehn, G.; Grey, C.; Adlercreutz, P. A Process Concept for High-Purity Production of Amines by Transaminase-Catalyzed Asymmetric Synthesis: Combining Enzyme Cascade and Membrane-Assisted ISPR. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 793–799. [[CrossRef](#)]
23. Green, A.P.; Turner, N.J.; O'Reilly, E. Chiral amine synthesis using omega-transaminases: An amine donor that displaces equilibria and enables high-throughput screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714–10717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cassimjee, K.E.; Branneby, C.; Abedi, V.; Wells, A.; Berglund, P. Transaminations with isopropyl amine: Equilibrium displacement with yeast alcohol dehydrogenase coupled to in situ cofactor regeneration. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5569–5571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Rehn, G.; Adlercreutz, P.; Grey, C. Supported liquid membrane as a novel tool for driving the equilibrium of omega-transaminase catalyzed asymmetric synthesis. *J. Biotechnol.* **2014**, *179*, 50–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Höhne, M.; Bornscheuer, U.T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51. [[CrossRef](#)]
27. Simon, R.C.; Richter, N.; Bustos, E.; Kroutil, W. Recent Developments of Cascade Reactions Involving ω -Transaminases. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143. [[CrossRef](#)]
28. Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. Asymmetric Synthesis of Optically Pure Pharmacologically Relevant Amines Employing ω -Transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761–2766. [[CrossRef](#)]
29. Slabu, I.; Galman, J.L.; Lloyd, R.C.; Turner, N.J. Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263–8284. [[CrossRef](#)]
30. Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J. Donor Amine Salt-Based Continuous in situ- Product Crystallization in Amine Transaminase-Catalyzed Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2727–2733. [[CrossRef](#)]
31. Meng, Q.; Capra, N.; Palacio, C.M.; Lanfranchi, E.; Otzen, M.; van Schie, L.Z.; Rozeboom, H.J.; Thunnissen, A.-M.W.H.; Wijma, H.J.; Janssen, D.B. Robust ω -Transaminases by Computational Stabilization of the Subunit Interface. *ACS Catal.* **2020**, *2915–2928*. [[CrossRef](#)]
32. Grabner, B.; Nazario, M.A.; Gundersen, M.T.; Lois, S.; Fantini, S.; Bartsch, S.; Woodley, J.M.; Gruber-Woelfler, H. Room-temperature solid phase ionic liquid (RTSPIL) coated ω -transaminases: Development and application in organic solvents. *Mol. Catal.* **2018**, *452*, 11–19. [[CrossRef](#)]
33. Miložić, N.; Lubej, M.; Lakner, M.; Žnidaršič-Plazl, P.; Plazl, I. Theoretical and experimental study of enzyme kinetics in a microreactor system with surface-immobilized biocatalyst. *Chem. Eng. J.* **2017**, *313*, 374–381. [[CrossRef](#)]
34. Rehn, G.; Grey, C.; Branneby, C.; Lindberg, L.; Adlercreutz, P. Activity and stability of different immobilized preparations of recombinant *E. coli* cells containing ω -transaminase. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 1129–1134. [[CrossRef](#)]
35. Sheldon, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307. [[CrossRef](#)]
36. Uthoff, F.; Sato, H.; Gröger, H. Formal Enantioselective Hydroamination of Non-Activated Alkenes: Transformation of Styrenes into Enantiomerically Pure 1-Phenylethylamines in Chemoenzymatic One-Pot Synthesis. *ChemCatChem* **2017**, *9*, 555–558. [[CrossRef](#)]
37. Wachtmeister, J.; Jakoblinnert, A.; Kulig, J.; Offermann, H.; Rother, D. Whole-Cell Teabag Catalysis for the Modularisation of Synthetic Enzyme Cascades in Micro-Aqueous Systems. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1051–1058. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

XII. WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF

STUDIUM UND SCHULBILDUNG

- 10/2017 – 12/2020 Promotionsstudium Chemie
- Universität Rostock, Rostock
 - Angestrebter Abschluss: *Doctor rerum naturalium*
 - Thema: Prozessentwicklung einer kontinuierlichen *in situ*-Produktkristallisation für Transaminase-katalysierte Reaktionen
- 10/2015 – 09/2017 Master Studium Chemie
- Universität Rostock, Rostock
 - Abschluss: Master of Science in Chemie
 - Thema: Einsatz einer *in situ*-Kristallisation zur Gleichgewichtsverschiebung bei Transaminase-katalysierten Reaktionen
- 10/2011 – 09/2015 Bachelor Studium Chemie
- Universität Rostock, Rostock
 - Abschluss: Bachelor of Science in Chemie
 - Thema: Optimierung der chromkatalysierten Copolymerisation von Propylenoxid und Kohlenstoffdioxid
- 08/2004 - 06/2011 Abitur
- Gymnasium Horn, Bremen
 - Abschluss: allgemeine Hochschulreife

BERUFSERFAHRUNG

10/2017 – 12/2020	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Kragl, Untergruppe von Jan von Langermann <ul style="list-style-type: none">• Universität Rostock, Rostock• Thema: Selektive <i>in situ</i> Produktkristallisation zur Gleichgewichtsverschiebung und Produktisolation bei Transaminase-katalysierten Reaktionen
04/2016 - 02/2017	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Kragl <ul style="list-style-type: none">• Universität Rostock, Rostock• Thema: Synthese von Estern, säulenchromatographische Isolierung, Katalysatorrückgewinnung, Enzymaktivitätsuntersuchungen
08/2015 - 03/2016	Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Prof. Kragl <ul style="list-style-type: none">• Leibniz-Institut für Katalyse e.V. an der Universität Rostock, Rostock• Thema: Synthese Si-haltiger Grundbausteine
03/2010	Praktikum <ul style="list-style-type: none">• Bruker Daltonik GmbH, Bremen• Schulpraktikum
06/2007	Praktikum <ul style="list-style-type: none">• Tischlerei Gröne, Bremen• Schulpraktikum

PUBLIKATIONEN

- Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Süss, P.; Mildner, A.; Menyes, U.; von Langermann, J. Development of an *in situ*-Product Crystallization (ISPC)-Concept to Shift the Reaction Equilibria of Selected Amine Transaminase-Catalyzed Reactions
European Journal of Organic Chemistry, 18, 2130-2133 (2018)
DOI: 10.1002/ejoc.201800323
- Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J. Donor amine salt-based continuous *in situ*-product crystallization in amine transaminase-catalyzed reactions
Advanced Synthesis & Catalysis, 361, 2727-2733 (2019)
DOI: 10.1002/adsc.201900217
- Hülsewede, D.¹; Meyer, L.-E.¹; von Langermann, J. (¹Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.) Application of *in situ*-Product Crystallization and Related Techniques in Biocatalytic Processes
Chemistry - A European Journal, 25, 4871-4884 (2019)
DOI: 10.1002/chem.201804970
- Hülsewede, D.; Temmel, E.; Kumm, P.; von Langermann, J. Design of an integrated reactor-crystallizer process for the continuous biocatalytic synthesis of (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamine
Crystals, 10, 345 (2020)
DOI: 10.3390/crust10050345

BUCHARTIKEL

- Hülsewede, D.; Neuburger, J.E.; von Langermann, J. Application of *in situ*-product crystallization in the amine transaminase from *Silicibacter pomeroyi*-catalyzed synthesis of (S)-1-(3-methoxyphenyl)ethylamine in J. Whittal & Peter W. Sutton (Editors) *Applied Biocatalysis: The Chemist's Enzyme Toolbox* (2020), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA
DOI: 10.1002/9781119487043.ch4

PATENT

- von Langermann, J.; Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Menyes, U.; Süss, P. Method for preparing amines from carbonyl compounds by transaminase reaction under salt precipitation
EP-Patent: EP 3486324 B1 (eingereicht am 17.11.2017 und erteilt am 10.06.2020)
WO-Patent: WO 2019096973 A1 (eingereicht am 16.11.2018)

VORTRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

- Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J.
"Verwendung eines Donoramin-Salzes für die *in situ*-Produktkristallisation aus einer Amintransaminase-katalysierten Reaktion"
Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Zerkleinern und Klassieren, Kristallisation und Grenzflächenbestimmte Systeme und Prozesse, Bamberg, Germany
12.-13.3.2019
- Hülsewede, D.; Kumm, P.; von Langermann, J.
"Application of a donor amine salt for the *in situ*-product crystallization in amine transaminase catalyzed reactions"
Amine Biocatalysis 4.0 conference, Stuttgart, Germany
17.-19.2.2020

POSTERPRÄSENTATIONEN

- Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J.
Coupled two reactor-concept for an *in situ*-product crystallization in transaminase-catalyzed reactions
8th Int. CeBiTec Research Conference, Bielefeld, Germany
9.-11.4.2018
- Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J.
Coupled two reactor-concept for an *in situ*-product crystallization in transaminase-catalyzed reactions
JungChemikerForum Rostock (JCF Rostock) Posterparty 2018, Rostock, Germany
11.4.2018
- Hülsewede, D.; Dohm, J.; von Langermann, J.
Coupled two reactor-concept for an *in situ*-product crystallization in transaminase-catalyzed reactions
9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany
26.-30.8.2018