

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

# Untersuchungen zur Überwindung der Gleichgewichtslimitierung von Transaminase-katalysierten Reaktionen

## Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Marco Cornelius, geb. Tänzler, geb. am 26.08.1988 in

Neubrandenburg

Götz, 26.09.2024

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2014 bis Mai 2017 am Institut für Chemie der Universität Rostock am Lehrstuhl für Analytische und Technische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Kragl angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Kragl
  2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Liese
- Jahr der Einreichung: 2024  
Jahr der Verteidigung: 2025

## **Danksagung**

Eigentlich reicht eine Danksagung nicht aus, weil diese Arbeit mehr als einmal geschrieben wurde. Zwischen der ersten Rohfassung und der finalen Version liegen 7 Jahre, was aber bestens zu Rostock passt. 7 Türme, 7 Tore, 7 Jahre für die Fertigstellung. Ich bedanke mich deshalb bei Prof. Kragl nicht nur dafür, dass er mich in seinem Arbeitskreis aufnahm und mir die Möglichkeit gegeben hat dort zu forschen, sondern auch und vor allem dafür, dass er mich Jahre später auch noch unterstützt hat diese Arbeit zu beenden. Ein Danke auch an alle ehemaligen Mitarbeitenden des Arbeitskreises, den KollegInnen im Labor, den Betreuern und den Nachbarn im Büro. Sie alle haben dazu beigetragen, dass die 3 Jahre im Labor auch durchaus unterhaltsam waren. Natürlich wäre ich nie so weit gekommen ohne die Unterstützung meiner Familie. Meine Mutter Silvi, mein Vater Mario und meine Großeltern Uwe und Rosi, die immer hinter mir stehen, egal in welche Richtung es weiter geht. Das Gleiche gilt auch für den in der Zwischenzeit neu hinzugekommen Teil der Familie. Meinen Schwiegereltern Jana, Stephan und Frank, sowie meiner Schwägerin Madeleine. Der größte Dank gilt meiner Frau Norina, die mir in den schwierigen Phasen mit Verständnis beistand und immer wieder bewusst gemacht hat, wofür ich diese Arbeit anfertige und dass es die Mühen wert sind. Danke.

## ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Götz, 26.09.2024

*M. Cornelius*  
.....

Marco Cornelius

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Überwindung der Gleichgewichtslimitierung von Transaminase katalysierten Reaktionen an zwei Beispielen betrachtet. Als Teil der Reaktionsoptimierung werden verschiedene Aminendonoren eingesetzt und die Auswirkungen unterschiedlicher Substrat- und Donorkonzentrationen betrachtet. Nach einer erfolgreichen Maßstabsvergrößerung liegt der Fokus in der Aufarbeitung und Isolierung des Produktes aus einer Mischung verschiedener Amine. Für das erste Beispiel (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin konnte mit einem der getesteten Trennverfahren eine vollständige Isolierung erreicht werden. Aus den aufkommenden Problemen bei der Aufarbeitung wurde das Konzept der selektiven Kristallisation entwickelt und beim zweiten Aminprodukt (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin angewandt. Durch den Zusatz einer Carbonsäure kann selektiv das Produktamin aus einer Mischung entfernt werden selbst dann, wenn das Donoramin ebenfalls zur Salzbildung mit der Säure neigt.

## Summary

In this work, a concept of overcoming the limitations of transaminase catalyzed reactions was tested for two different reactions. Part of the optimization process is the testing of different amine donors and a variation of substrate and donor concentrations. After a successful scale up the main focus was the downstream and isolation of the product. A complete isolation of (*R*)-1-(3-pyridyl)ethyl amine could be accomplished after testing a variety of separation methods. As a result of these problems occurred during the downstream processing the selective crystallization concept was developed. This was used for the second amine product (*S*)-1-(3-methoxy phenyl)ethyl amine. The product could be separated by the addition of a carbon acid, even though the acid did crystallize with both amines.

## **Inhalt**

Verzeichnis der Abbildungen.....	VIII
Verzeichnis der Tabellen.....	IX
Verzeichnis der Schemata .....	X
Verzeichnis der Abkürzungen.....	XI
Verwendete Größen und Maßeinheiten.....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Grundlagen von Biotransformationen.....	1
1.2 Industrielle Verwendung von Enzymen.....	2
2 Zielsetzung .....	4
2.1 Überwindung der Gleichgewichtslimitierung bei Transaminase-katalysierten Reaktionen	4
2.2 Entwicklung neuer Kristallisationskonzepte für das Downstream processing von Transaminase-katalysierten Reaktionen.....	5
3 Theoretische Grundlagen .....	6
3.1 Biokatalyse.....	6
3.2 Transaminasen.....	10
3.2.1 Grundlagen.....	10
3.2.2 Reaktionsmechanismus .....	15
3.2.3 Gleichgewichtslage bei TA-katalysierten Reaktionen .....	16
3.3 Gleichgewichtsverschiebungen.....	17
3.3.1 katalytische Systeme .....	18
3.3.2 nicht-katalytische Systeme.....	19
3.4 Selektive Kristallisation .....	21
3.4.1 Phasendiagramme.....	23
3.4.2 Selektive Kristallisation in ternären Systemen.....	25
4 Material und Methoden .....	28
4.1 Bestimmung der Enzymaktivität.....	28
4.2 Versuchsvorbereitung.....	30
4.3 Herstellung der Salze .....	32
4.4 Analyse und Charakterisierung .....	32

4.5 Aufarbeitungsmethoden .....	34
5 Ergebnisse und Diskussion.....	36
5.1 Verschiebung der Gleichgewichtslage durch einen Überschuss an Donoramin.....	36
5.2 Isolierung von (R)-1-(3-Pyridyl)ethylamin .....	45
5.3 Selektive Kristallisation zur Darstellung von chiralen Aminen.....	48
5.3.1 Charakterisierung verschiedener Aminsalze .....	54
5.3.2 Selektive Kristallisation aus einer Aminmischung .....	59
5.3.3 ISPC mit 3,3-Diphenylpropionsäure .....	67
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	74
7 Literaturverzeichnis.....	77
8 Anhang .....	81

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Sättigungsbereiche einer Lösung	23
Abb. 2. Binäre flüssig/fest Phasendiagramme, links: einfaches eutektisches System, rechts: Bildung von Mischkristallen	24
Abb. 3. Ternäres Phasendiagramm eines Systems ohne Reaktion	26
Abb. 4. Ternäres Phasendiagramm eines Systems mit Doppelsalz Bildung	26
Abb. 5. Ternäres Phasendiagramm eines Systems mit Bildung von Mischkristallen	27
Abb. 6. Umsätze mit unterschiedlichen Aminendonoren für die Reaktion 1	37
Abb. 7. Zeitverlauf des Umsatzes von 3-Acetylpyridin mit verschiedenen Aminendonoren; schwarz: 1-Phenylethylamin, rot: <i>sec</i> -Butylamin	39
Abb. 8. Zeitverlauf des Umsatzes von 3-Methoxyacetophenons	42
Abb. 9. Umsätze von 3-Methoxyacetophenon mit 250 mM, 500 mM und 1 M IPA	44
Abb. 10. Gaschromatogramm des Produkts nach mehrmaligem Destillieren	47
Abb. 11. Vergleich der NMR-Spektren	48
Abb. 12. Fällungstest auf Mikrotiterplatte	54
Abb. 13. Binäres fest-flüssig Phasendiagramm der Aminalsalze von 25CNA	58
Abb. 14. Versuchsaufbau für Kristallisationsuntersuchungen	61
Abb. 15. oben: einsetzende Kristallisation; unten: vollständige Fällung	66
Abb. 16. Umsätze mit ISPC; oben: bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen; unten: ohne ISPC und mit ISPC	68
Abb. 17. Vergleich der Zeitverläufe des Umsatzes von 3-Methoxyacetophenons mit der reinen Säure und dem Donorsalz	71
Abb. 18. Vergleich der Umsätze von 3-Methoxyacetophenon mit ISPC und Überschuss an Donoramin	73

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1. Gruppierung von Transaminasen	11
Tab. 2. Unterteilung von Kristallisationsarten nach äußeren Bedingungen	22
Tab. 3. Zusammensetzung der Messlösung für das Assay	29
Tab. 4. Umsätze des Donorscreenings für die Reaktion 1	37
Tab. 5. Umsätze von 3-Acetylpyridin zu ( <i>R</i> )-1-(3-Pyridyl)ethylamin bei höheren Substratkonzentrationen	40
Tab. 6. Umsätze von 3-Acetylpyridin zu ( <i>R</i> )-1-(3-Pyridyl)ethylamin bei höheren Donorkonzentrationen	41
Tab. 7. chemische Eigenschaften der Edukte und Produkte	45
Tab. 8. Fällungsverhalten verschiedener Carbonsäuren mit unterschiedlichen Aminen	50
Tab. 9. Löslichkeit hergestellten Salze in dest. Wasser	55
Tab. 10. Schmelzpunkte der Salze	57
Tab. 11. selektive Kristallisationsversuche mit 25CNA	59
Tab. 12. selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA	62
Tab. 13. selektive Kristallisationsversuche mit 25CNA und Impfkristall	64
Tab. 14. selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA und Impfkristall	64
Tab. 15. selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA und verschiedenen Flussraten	64
Tab. 16. selektive Kristallisationsversuche bei verschiedenen Flussraten	65
Tab. 17. Umsätze der Reaktion von 3-Methoxyacetophenon zu( <i>S</i> )-1-(3-Methoxyphenyl)ethylaminmit 3DPPA	69
Tab. 18. Umsätze der Reaktion von 3-Methoxyacetophenon zu ( <i>S</i> )-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin mit 3DPPA und verringerter IPA Konzentration	72
Tab. 19. getestete Säuren	81

## Verzeichnis der Schemata

Schema 1. Schematische Darstellung einer Transaminase-katalysierten Reaktion	10
Schema 2. Synthesestrategien zur Herstellung von chiralen Aminen	11
Schema 3. 1) kinetische Racematspaltung; 2) Asymmetrische Synthese	12
Schema 4. Synthese von Sitagliptin ausgehend vom Prositagliptin	14
Schema 5. Reaktionsmechanismus des Pyridoxyl-5-Phosphaats	15
Schema 6. Verschiedene Methoden der ISPR bei TA-katalysierten Reaktionen	17
Schema 7. LDH/GDH Enzymkaskade zur Verschiebung der Gleichgewichtslage	19
Schema 8. Verbrauch von Xylylendiamin und anschließende Reaktion	20
Schema 9. Transaminase katalysierte Reaktion von 3-Acetylpyridin zu (R)-1-(3-Pyridyl)ethylamin(oben) und 3-Methoxyacetophenon zu (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin(unten)	36
Schema 10. Konzept der <i>in situ</i> Produkt Kristallisation (ISPC)	49

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>25CNA</b>	2-Chlor-5-nitrobenzoesäure
<b>ber.</b>	berechnet	<b>43CNA</b>	4-Chlor-3-nitrobenzoesäure
<b>theo.</b>	theoretisch	<b>3DPPA</b>	3,3-Diphenylpropionsäure
$\delta$	Chemische Verschiebung (NMR)	<b>SpATA</b>	<i>Silicibacter pomeroyi</i> Amintransaminase
<b>DSC</b>	<i>Differential Scanning Calometry</i> (Dynamische Differenzkalorimetrie)	<b>MvATA</b>	<i>Mycobacterium vanbaaleni</i> Amintransaminase
<b>MHz</b>	Megahertz	<b>PLP</b>	Pyridoxal-5-phosphat
<b>Schmp.</b>	Schmelzpunkt	<i>o</i>	<i>ortho</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle	<i>m</i>	<i>meta</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<i>p</i>	<i>para</i>
<b>IPA</b>	Isopropylamin	<b>ppm</b>	<i>parts per million</i>
<b><i>t</i>-BME</b>	<i>tert</i> -Butylmethylether		
<b>1-PEA</b>	1-Phenylethylamin		
<b>1-PyEA</b>	1-Pyridylethylamin		

## Verwendete Größen und Maßeinheiten

Größe	Symbol	Bezeichnung	Umrechnung in SI-Einheit
Frequenz	MHz	Megahertz	1 MHz = $10^6 \text{ s}^{-1}$
	Hz	Hertz	1 Hz = $1 \text{ s}^{-1}$
Temperatur	°C	Grad Celsius	$x^\circ\text{C} = (x + 273.15) \text{ K}$
Volumen	ml	Milliliter	1 ml = $1 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ m}^3$
Wärmemenge	kJ	Kilojoule	1 kJ = $10^3 \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$
Zeit	h	Stunde	1 h = 3600 s
	min	Minute	1 min = 60 s
Konzentration	mM	Millimol	1 mM = $10^{-3} \text{ M} = 10^{-3} \text{ mol/L}$

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen von Biotransformationen

Der Einsatz von Enzymen in Produkten des alltäglichen Lebens reicht zurück bis in die Antike. Bei der Herstellung von Brot, Käse und alkoholischen Getränken spielen Enzyme, damals wie heute, eine entscheidende Rolle. Einer der ältesten Hinweise auf Enzyme findet sich im „Codex of Hammurapi“, einer babylonischen Schrift aus dem 18. Jahrhundert v. Chr. im Zusammenhang mit der Herstellung von Wein. Generell waren Fermentationsprozesse gängig in der Antike. Neben Babylon fanden sich diesbezüglich auch Hinweise in Schriften aus Rom, Griechenland, Ägypten, China und Indien.<sup>1</sup> Für die Produktion von Käse nutzte man z.B. den Milchsäurebakterien der Echten Feige. Das darin enthaltene Ficin (Cysteinprotease) sorgte für die Gerinnung von Milch. Ein weiteres Beispiel ist die Umwandlung von Alkohol zu Essig durch die Zugabe von Essigsäurebakterien (Acetobacteraceae). Natürlich wussten die Menschen in der Antike nicht, dass Enzyme für diese Prozesse verantwortlich waren, aber sie machten sich deren Anwendung zu nutze. Einer der bekanntesten Anwendungen und auch eine der wichtigsten, ist die Hefe beim Brot backen.

Die Möglichkeiten von Enzymen waren also schon in der früheren Menschheitsgeschichte bekannt und weit verbreitet. Allerdings begannen erst im 18. und 19. Jahrhundert die ersten systematischen Untersuchungen zur Reaktionsweise von Enzymen. Der französische Wissenschaftler René-Antoine Ferchault de Réaumur (1683 – 1757) stellte fest, dass die Zersetzung von Fleisch eher ein chemischer als ein physikalischer Vorgang ist. Er beobachtete ebenfalls die spezifische Wirkung von Enzymen, da zwar Fleisch verdaut und Knochen enthärtet aber Pflanzen zum Teil gar nicht beeinträchtigt werden. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus und der spezifischen Wirkungsweise von enzymatischen Reaktionen lieferten die Überlegungen von Emil Fischer (dt. Chemiker; 1852 – 1919). Das von ihm vorgeschlagene „Schlüssel-Schloss“ Konzept beschreibt den stereochemischen Zusammenhang zwischen Enzym und Substrat.<sup>2</sup> Demnach ist die sterische Ausrichtung des Enzyms so spezifisch, dass es nur mit einem Substrat „passt“ und wechselwirkt, genauso wie ein Schlüssel nur ein bestimmtes Schloss öffnen kann. Dieses Konzept geht von einer starren dreidimensionalen Struktur im Protein aus, die von den Substraten exakt ausgefüllt werden. Im Jahr 1958 passte Daniel E. Koshland das Modell an, indem er nicht mehr von einer starren Struktur ausging. Das „induced fit“ Modell geht davon aus, dass das aktive Zentrum des Enzyms nicht von Beginn an vollständig an das Substrat passt, sondern seine Konformation

ändert, um die Bindung zu verbessern, das heißt, das aktive Zentrum ist nicht starr.<sup>3</sup> Die Änderung der räumlichen Ausrichtung wird durch das Substrat ausgelöst und so die katalytischen Gruppen in die richtige stereoselektive Ausrichtung gebracht.

Am Ende des 19. und am Anfang des 20. Jahrhunderts folgten weitere Erkenntnisse, bezüglich der Wirkungsweise von Enzymen. So gelang Gabriel Bertrand (franz. Biochemiker, 1867 – 1962) 1897 die partielle Aufreinigung von Laccase (EC 1.10.3.2) aus Pflanzensaft.<sup>1</sup> Der britische Biochemiker Adrian John Brown (1852 – 1919) stellte fest, dass Saccharose, unabhängig von der Konzentration, immer mit der gleichen Rate von Hefe umgesetzt wird. Unterstützt von den Arbeiten Emil Fischers, leitete er daraus die Existenz eines Enzym-Substrat Komplexes ab. Aus diesen Zusammenhängen leitete Victor Henri (dt.-franz. Physiochemiker und Psychologe, 1872 – 1940) 1902 eine Formel ab, welche 10 Jahre später von Leonor Michaelis (1875 – 1949) und Maud Menten (1879 – 1960) verfeinert wurde und heute als Michaelis-Menten-Kinetik bekannt ist.<sup>1</sup> Ein weiterer Meilenstein war die erste Röntgenkristallographie von Urease. Sie ermöglichte ein erstes räumliches Bild eines Enzyms und wurde 1926 von James Sumner publiziert.<sup>1</sup>

## **1.2 Industrielle Verwendung von Enzymen**

Enzymatische Umsetzungen sind heutzutage ein fester Bestandteil der Industrie. Dies basiert auf 4 grundlegenden technologischen Fortschritten.<sup>4</sup>

- Die Gewinnung der Enzyme aus den Mikroorganismen in großen Maßstäben. Prinzipiell funktioniert die Proteinaufarbeitung im großen Maßstab genauso wie im Labor, jedoch sind einige Techniken nicht ohne weiteres in den industriellen Maßstab übertragbar oder die entstehenden Kosten übersteigen die des fertigen Produkts.<sup>5</sup>
- Die Herstellung von immobilisierten Enzymen im Großmaßstab. Bei der Immobilisierung von Enzymen, werden diese in oder auf einer Matrix fest fixiert, mit dem Ziel bestimmte Eigenschaften wie die Stabilität oder die Verträglichkeit gegenüber Lösemitteln zu steigern.<sup>6</sup> Obwohl bereits 1916 zum ersten Mal Invertase auf Kohle immobilisiert wurde, gelang eine größere Produktion an immobilisiertem Enzym erst in den 60er Jahren.<sup>7</sup>
- Die Nutzung von Enzymen für hydrophobe Substrate. Die allgemeine Annahme war, dass Biokatalysatoren nicht für die organische Synthese in nicht-wässrigen Lösemitteln eingesetzt werden können. Dies resultierte u.a. aus den Untersuchungen mit Cholesterol Oxidase zur Herstellung von

Cholestenon.<sup>8</sup> Untersuchungen von Klibanov aus dem Jahr 1986 zeigten jedoch, dass es durchaus Enzyme gibt, welche auch in unpolaren Lösemitteln Aktivität zeigen.<sup>9</sup>

- Die industrielle Herstellung von rekombinaten Proteinen.

Ein häufiges Problem stellt die Wirtschaftlichkeit bei der Verwendung von aus der Natur isolierten Enzyme dar. Um Eigenschaften wie die Stabilität, Aktivität und Reinheit zu verbessern, werden Biokatalysatoren modifiziert. Eine Möglichkeit ist die direkte Evolution, bei der die Mikroorganismen mutiert und die daraus entstehenden Varianten anschließend selektiert werden.<sup>10</sup> Bei der Hybridisierung erfolgt die Modifizierung der zellulären Genetik durch Übertragung von anderen Enzymstämmen. Die dritte Möglichkeit ist die rekombinante DNS-Technologie. Dabei wird die genetische Information eines Stamms *in vitro* modifiziert und kann anschließend in den gleichen oder einen anderen Stamm eingesetzt werden.

Dank dieser maßgeblichen Entwicklungen finden sich heutzutage Biokatalysatoren in industriellen Prozessen mit Maßstäben von bis zu mehreren tausend Tonnen pro Jahr (t/a) wieder und haben teilweise die bestehenden chemischen Prozesse ersetzt. So wird die Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicilliansäure mit Penicillin-Amidase aus *E. coli* im 50000 t/a Maßstab durchgeführt (Stand 2014).<sup>11</sup> Weitere Beispiele sind die Hydrolyse von Stärke zu *D*-Maltose und *D*-Glucose durch  $\alpha$ -Amylase (> 100000 t/a; 2014) oder die Racematspaltung von sekundären Amiden durch Lipase aus *Burkholderia cepacia* (10000 t/a; 2014).<sup>11</sup> Die Einsatzgebiete beschränken sich dabei längst nicht mehr auf die Lebensmittelindustrie. Enzyme als Verarbeitungsmittel finden sich in Waschmittel, Papier, Textil, Lederbehandlung, Arzneimittel und Pharmazeutika, Silage und Tierfutter. Die Gründe für die Nutzung von Enzymen sind u.a. eine höhere Produktqualität, bessere Nutzung der Rohstoffe, verminderte Prozesskosten sowie die Verminderung von Arbeits- und Umweltbelastung.<sup>11</sup> Dies hat zur Folge, dass der Marktanteil derartiger Anwendungen stetig wächst. Im Jahr 2014 lag der Marktanteil von enzymatisch gewonnenen Rohstoffen im Bereich Waschmittel (Proteasen, Lipasen, Cellulasen) bei 26 % (vom Gesamtmarkt), beim Stärke-Abbau ( $\alpha$ -Amylase) waren es 16 %, bei Mehl und Backwaren (z.B.  $\alpha$ -Amylase, Protease) 8 % und bei Tierfutter und Silagen (Phytase, Cellulase) 22 %.<sup>11</sup> All diese Zahlen zeigen deutlich, dass Enzyme und ihre Reaktionen ein fester Bestandteil der Industrie und in unserem alltäglichen Leben sind.

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Überwindung der Gleichgewichtslimitierung bei Transaminase-katalysierten Reaktionen

Die Dissertation ist im Rahmen des Verbundprojektes „*BIOKATALYSE2021: P42: Etablierung biokatalytischer Prozesse zur Herstellung von chiralen Aminen – Teilprojekt B*“ angefertigt worden. Das Gesamtziel des Projektes P42 war es, die biokatalytische Produktion neuartiger, wirtschaftlich interessanter, chiraler Amine zu etablieren, für die bislang weder eine effiziente chemische oder biokatalytische Synthese beschrieben wurde. Dazu sollte in enger Zusammenarbeit mit dem Projektpartner *Enzymicals AG* das Portfolio der kommerziell verfügbaren Amine um neuartige chirale Amine erweitert werden. Im speziellen Fokus stand der Einsatz von neuen (*R*)-selektiven Amintransaminasen (*R*-ATAs) zur Herstellung von optisch aktiven (*R*)-Aminen, die erst im Jahr 2010 identifiziert wurden.<sup>12</sup> Diese Amine waren bisher einer asymmetrischen, biokatalytischen Synthese nicht zugänglich, so dass weder Referenzsubstanzen noch eine Analytik zur Bestimmung der optischen Reinheit für diese Substanzen zur Verfügung standen. Die Prozessetablierung (*R*)-selektiver Transaminasen zur Herstellung von optisch aktiven Aminen durch eine asymmetrische Transaminierung sollte anhand von 5 Prototypen vollzogen werden. Der Schwerpunkt lag bei der Verschiebung der Gleichgewichtslage der Reaktionen in Richtung des gewünschten Produkts. Zusätzliche Themen waren die Bereitstellung von analytischen Verfahren zur Prozesskontrolle, die chemischen Synthese entsprechender Referenzsubstanzen, die Ermittlung relevanter Produkteigenschaften, die Erarbeitung von Aufarbeitungsmethoden, die Optimierung sowie die Maßstabsvergrößerung des Prozesses.

Die genannten Ziele wurden im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch am Beispiel des 3-Acetylpyridins durchgeführt, welches mit Hilfe der (*R*)-selektiven Transaminase *MvATA* (*Mycobacterium vanbaalenii*) zum (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin umgesetzt wird. Dieses Produktamin ist ein potenzieller Baustein für weitere pharmazeutisch aktive Verbindungen und war bisher nicht auf direktem Wege biokatalytisch zugänglich. Das größte Hindernis stellte dabei die Überwindung der Gleichgewichtslimitierung dar. Entsprechend lag der Fokus auf der Identifizierung des am geeignetsten Amin donors, sowie dem Finden der günstigsten Reaktionsbedingungen und der Isolierung des Produkts.

## **2.2 Entwicklung neuer Kristallisationskonzepte für das Downstream processing von Transaminase-katalysierten Reaktionen**

Basierend auf den Erfahrungen aus dem ersten Teil der Dissertation wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, Produkte aus TA-katalysierten Reaktion zu isolieren. Da die Reaktionslösung aus 4 Substanzen (Donor, Cofaktor, Coprodukt und Produkt), die sich chemisch sehr ähnlich sein können, und dem Biokatalysator besteht, war ihre Auftrennung deutlich erschwert. Chromatographische (Säulenchromatographie) und thermische (Extraktion und Destillation) Trennverfahren waren nur bedingt erfolgreich und gingen mit einem deutlichen Ausbeuteverlust einher. Basierend auf dem Konzept der *in situ* Produkt Kristallisation (eng.: *in situ* product crystallisation; ISPC), welches von Prof. Dr. Jan von Langermann auf TA-katalysierte Reaktionen übertragen wurde, wurde versucht das Reaktionsgemisch mit Hilfe einer selektiven Kristallisation aufzuarbeiten. Dafür wurden organische Carbonsäuren gesucht, die selektiv das Produkt aus der Lösung kristallisieren. Zum einem erfolgt dadurch eine Trennung der Aminmischung und zum anderen kann auch ein Effekt auf die Lage des chemischen Gleichgewichts erwartet werden. Der Fokus lag aber primär in der Isolierung des gewünschtenamins aus der Lösung, als auf dem *in situ* Einsatz. Das Ziel war es ein System zu entwickeln, indem das Produktamin selektiv aus der Reaktionslösung entfernt werden kann, ohne dabei das Donoramin zu beeinflussen bzw. ohne, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Fällungsmittel und dem Donor kommt und gleichzeitig mit dem Enzym kompatibel ist. Diese Untersuchungen wurden exemplarisch am 3-Methoxyacetophenon durchgeführt.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Biokatalyse

Unter Biokatalyse wird der Einsatz von Enzymen und Mikroben innerhalb von synthetischen Anwendungen verstanden. Die Enzyme werden dabei nicht notwendigerweise für die Umsetzung natürlicher Ausgangsstoffe, sondern häufig für spezifische Anwendungen mit nicht in der Natur vorkommenden Reaktanden verwendet.<sup>4,13-17</sup>

Die Enzyme sind dabei in der Lage die Umsatzraten einer Reaktion bis zu einem Faktor von  $10^{19}$  zu beschleunigen.<sup>18</sup> Sie nehmen aber keinen Einfluss auf die Lage des chemischen Gleichgewichts, sondern senken nur die Aktivierungsenergie, indem sie den Übergangszustand einer Reaktion stabilisieren. Die Stabilisierung erfolgt dabei durch die selektive Bindung des Übergangszustandes einer bestimmten Reaktion durch elektrostatische und sterische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Solvatations-Effekte.<sup>19,20</sup> Computersimulationen haben gezeigt, dass elektrostatische Wechselwirkungen hauptverantwortlich für die Reduzierung der Aktivierungsenergie sind und nicht die sterischen Wechselwirkungen.<sup>21,22</sup> Dennoch ist es eine Kombination aus beiden Effekten, die für Anordnung von Substrat, Cofactor und katalytischen Zentrum verantwortlich ist.

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Enzymen ist ihre hohe Selektivität, wobei sich diese nicht nur auf die Bindungsart oder funktionelle Gruppe beschränkt, sondern oft auch eine hohe Regio- und Stereoselektivität vorliegt (s. (*R*)- und (*S*)-Transaminasen). Trotzdem beschränkt sich der Anwendungsbereich nicht nur auf ein Substrat oder eine kleine Substratgruppe. In den letzten 20 Jahren sind vermehrt Beispiele bekannt geworden bei denen ein Enzym verschiedenste Substrate umsetzt oder unterschiedliche Bindungen spaltet.<sup>23-25</sup> Zum Beispiel gibt es Pyruvat Decarboxylasen, welche normalerweise Pyruvat in Acetaldehyd und Kohlenstoffdioxid umwandeln, die Acetaldehyd mit einem anderen Aldehyd in einer Acyloin-Kondensation verbinden.<sup>26</sup>

#### Enzymklassen und Nomenklatur

Zur genaueren Beschreibung und einheitlicher Kennzeichnung werden alle Enzyme mit einer EC-Nummer (engl. *enzyme commission number*) versehen. Die Nomenklatur erfolgt durch die *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB)<sup>27</sup>, die jedem Enzym eine aus 4 Zahlen bestehende EC-Nummer zuordnet.<sup>28</sup> Die erste Zahl zeigt die Hauptklasse an, welche die katalysierte Reaktion spezifiziert. Diese wird in Unterklassen aufgeteilt, je önach

Art des Substrats, der übertragenen funktionellen Gruppe oder an der Reaktion beteiligte spezifische Bindung. Die Unterklassen werden durch die zweite Zahl gekennzeichnet. Die 3. Zahl ist eine weitere Unterteilung der Unterklassen bezüglich der Substrate oder Co-Substrate, die die Herkunft der Unter-Unterklasse beschreibt. Die 4. Stelle der EC-Nummer ist schließlich eine fortlaufende Seriennummer. Bei der Anwendung der Nomenklatur wird auch die Richtung der katalysierten Reaktion beachtet. Diese sollte bei der Beschreibung für alle Enzyme einer Klasse die gleiche sein.

Da Enzyme mit derselben EC- und CAS-Nummer (engl. *Chemical abstracts service*) aber unterschiedlicher biologischer Herkunft komplett anders reagieren können, muss zur kompletten Identifizierung auch die Herkunft genannt werden.

EC (i).(ii).(iii).(iiii)

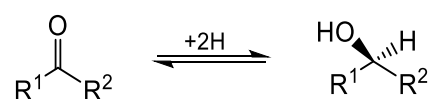
- (i) Enzymklasse; beschreibt die Art der katalysierten Reaktion
- (ii) Unterklasse; weist auf den Substrattyp hin, die Art der übertragenen Gruppe oder die Art der Bindung die an der Reaktion beteiligt ist
- (iii) Unter-Unterklasse; beschreibt die Art des Substrats oder Co-Substrats
- (iiii) willkürliche Seriennummer

Bsp: EC 3.5.1.14 (Aminoacylase; industrielle Herstellung von L-Methionin)

- 3 Hydrolase
- 5 C-N Bindung hydrolysiert
- 1 Substrat ist ein lineares Amid
- 14 Seriennummer zur vollen Beschreibung

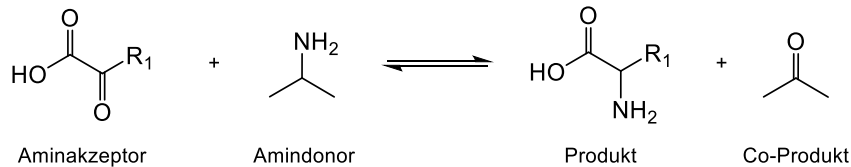
### EC 1 Oxidoreduktasen

Die Enzyme dieser Klasse katalysieren je nach Reaktionsrichtung Oxidationen oder Reduktionen, d.h. sie sind an der Übertragung von Elektronen beteiligt und werden entsprechend anhand der Elektronendonatoren unterteilt. Generell sind alle Oxidoreduktasen Cofaktor abhängig, welche in der Redoxreaktion das Gegenstück zu der eigentlichen Oxidation oder Reduktion bilden. Die häufigsten Cofaktoren sind NADH/NAD<sup>+</sup>, NADPH/NADP<sup>+</sup>, FADH/FAD<sup>+</sup>, ATP/ADP.<sup>29-31</sup> Zu den wichtigsten Vertretern gehören die Oxidasen, Alkohol-Dehydrogenase, L-Lactat-Dehydrogenase, Glucose-6-Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase



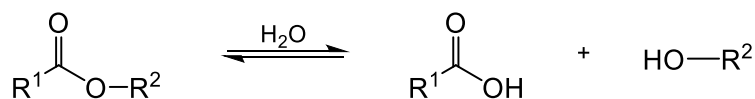
## EC 2 Transferasen

Transferasen sind an der Übertragung funktioneller Gruppen von einem Molekül (Donor) auf ein anderes Molekül (Akzeptor) beteiligt und sind in der Natur am häufigsten vertreten. Sie weisen eine hohe Regio- und Stereoselektivität auf und werden abhängig von der übertragenen Funktionellen-Gruppe unterteilt. Wichtige Vertreter sind die Transketolase (C-C Kupplung), Glycosyltransferase (Aufbau von Oligosacchariden), Transaminase (Racematspaltung und asymmetrische Synthese) und Kinase (Einführung von Phosphatgruppen).



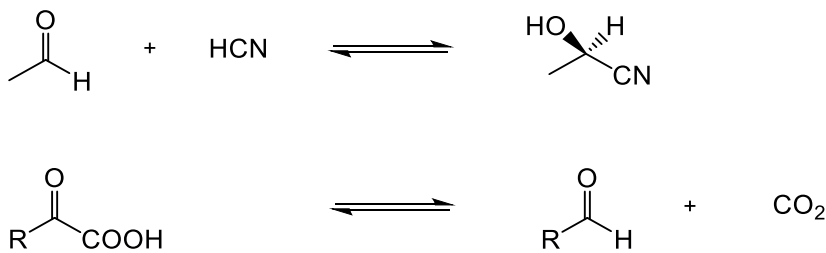
## EC 3 Hydrolasen

Hydrolasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von C-O, C-N, C-C, P-O und anderen Bindungen. Der Reaktionsverlauf ist meist irreversibel, weshalb sie in der Natur häufig in Abbauprozessen zu finden sind. Diese Enzymklasse enthält viele wichtige Stoffwechsellzyme wie Lipasen und Esterasen, Phosphatasen, Nukleasen, Amylasen und Peptidasen. Von allen Enzymklassen spielen die Hydrolasen für die Industrie die wichtigste Rolle, was vor allem dadurch deutlich wird, dass ca. 80 % aller in der Industrie angewandten Enzyme *Hydrolasen* sind.<sup>32</sup> Zu den wichtigsten Anwendungen gehört die Hydrolyse von Polysacchariden (Glycosidase), Nitrilen oder die Veresterung von Fettsäuren bzw. Spaltung von Estern.



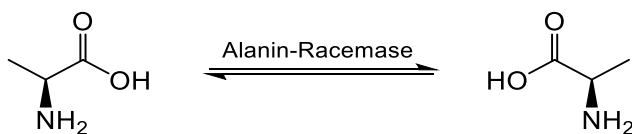
## EC 4 Lyasen

Lyasen katalysieren die nicht-hydrolytische Bindungsspaltung/-bildung. Das Resultat sind häufig ungesättigte Produkte mit Doppelbindungen. In der Industrie wird oft die Rückreaktion, die Addition eines Moleküls an ein ungesättigtes Substrat, verwendet, wobei ein chirales Zentrum entstehen kann. Ein Beispiel hierfür ist die Hydroxynitril Lyase, bei der aus einem Aldehyd und einem Cyanid ein chirales Hydroxynitril entsteht. Die Reaktionen sind in der Regel Gleichgewichts-kontrolliert und dies wird genutzt, um durch hohe Substratkonzentrationen die Umsätze zu steigern.<sup>4</sup>



## EC 5 Isomerasen

Isomerasen katalysieren strukturelle Änderungen innerhalb eines Moleküls. Die entstehenden Produkte besitzen zwar die gleiche Summenformel aber weisen unterschiedliche Konfiguration und/oder Konstitution auf. Sie sind beispielsweise beteiligt an Isomerisierungen (z.B. cis-trans), Racematbildung (Racemisierung) und Tautomerisierungen. Das wohl wichtigste Beispiel ist die Glukose-6-phosphat-Isomerase, welche die Glykolyse von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat ermöglicht, wodurch alle Lebewesen die Energie von Kohlenhydraten nutzen können.



## EC 6 Ligasen

Ligasen, auch Synthetasen genannt, katalysieren die Bindungsbildung zwischen zwei Substratmolekülen unter Energieverbrauch (ATP-Spaltung). Sie haben eine wichtige Rolle in der Natur da sie an der nicht-ribosomalen Peptidsynthese und an der Reparatur von DNA-Fragmenten beteiligt sind.<sup>33</sup> Ein wichtiger Vertreter ist die Amino-tRNA-Synthetase, welche die Proteinbiosynthese katalysiert.



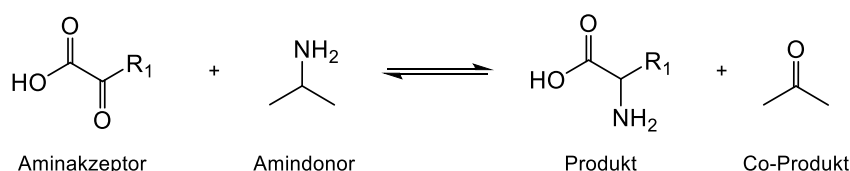
## EC 7 Translokasen

Translokasen ermöglichen den Transport von Ionen oder Molekülen über eine Membran oder eine Trennung innerhalb einer Membran. Es wird also keine Reaktion katalysiert, sondern ein Ortswechsel. Die Unterklasse bezeichnet die übertragene Komponente und deutet auf den Prozess, der die treibende Kraft für die Translokation darstellt.<sup>34</sup>

## 3.2 Transaminasen

### 3.2.1 Grundlagen

Die Transaminasen gehören zu der Enzymklasse der Transferasen und werden mit der die EC-Nummer 2.6.1.xxx bezeichnet.<sup>35</sup> Die Enzyme katalysieren die Übertragung einer Amin-Funktion zwischen zwei Molekülen, bei der ein primäres Amin deaminiert (Amindonor) und gleichzeitig ein Keton oder Aldehyd aminiert (Aminakzeptor) wird.<sup>36-43</sup>



**Schema 1:** Schematische Darstellung einer Transaminase-katalysierten Reaktion

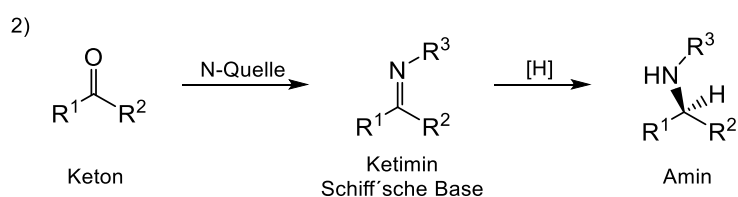
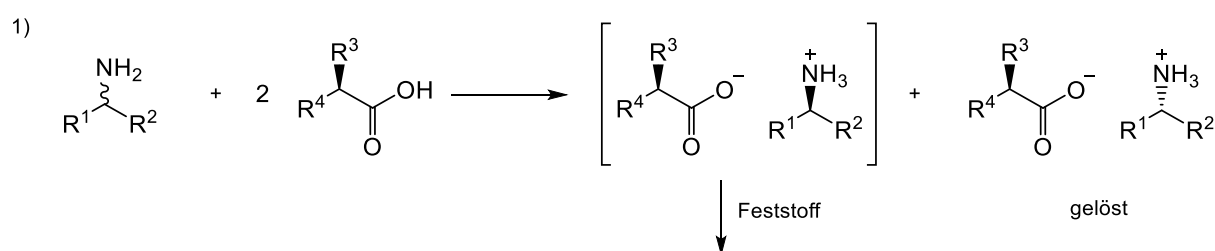
Anhand der Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur lassen sich die Transaminasen in 4 Gruppen unterteilen, wovon besonders die Enzyme der Gruppe 2 herausstechen (Tabelle 1). Die als  $\omega$ -Transaminasen bezeichneten Enzyme der Gruppe 2 können theoretisch jede Keto- oder Aldehyd-Funktion aminieren und jedes primäre-Amin deaminieren, deshalb werden sie häufig auch als Amin-Transaminasen bezeichnet.<sup>44</sup> Im Gegensatz dazu stehen die Transaminasen der Gruppen 1, 3 und 4, welche auf  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Ketosäuren beschränkt sind und deshalb  $\alpha$ -Transaminasen genannt werden. Transaminasen werden für die Herstellung von optisch reinen chiralen Aminen verwendet. Diese sind wichtige Bausteine für die chemische Synthese, insbesondere für pharmazeutisch aktive Substanzen und Agrochemikalien sind sie in ihrer enantiomerenreinen Form von großer Wichtigkeit, da sie ausschlaggebend für die biologische Aktivität der Verbindungen sind.<sup>45,46</sup>

Synthetisiert werden chirale Amine meist durch die asymmetrische Hydrierung einer Schiffbase.<sup>47,48</sup> Andere klassische Ansätze sind die Kristallisation von diastereomeren Salzen, die enantioselektive Reduktion von Iminen mittels Übergangsmetallkatalysatoren oder die chromatographische Trennung. Die Nachteile dieser Verfahren sind harsche

Reaktionsbedingungen, große Mengen Produktionsabfall, der Einsatz toxischer Substanzen, sowie eine oftmals unzureichende Stereoselektivität.<sup>39</sup>

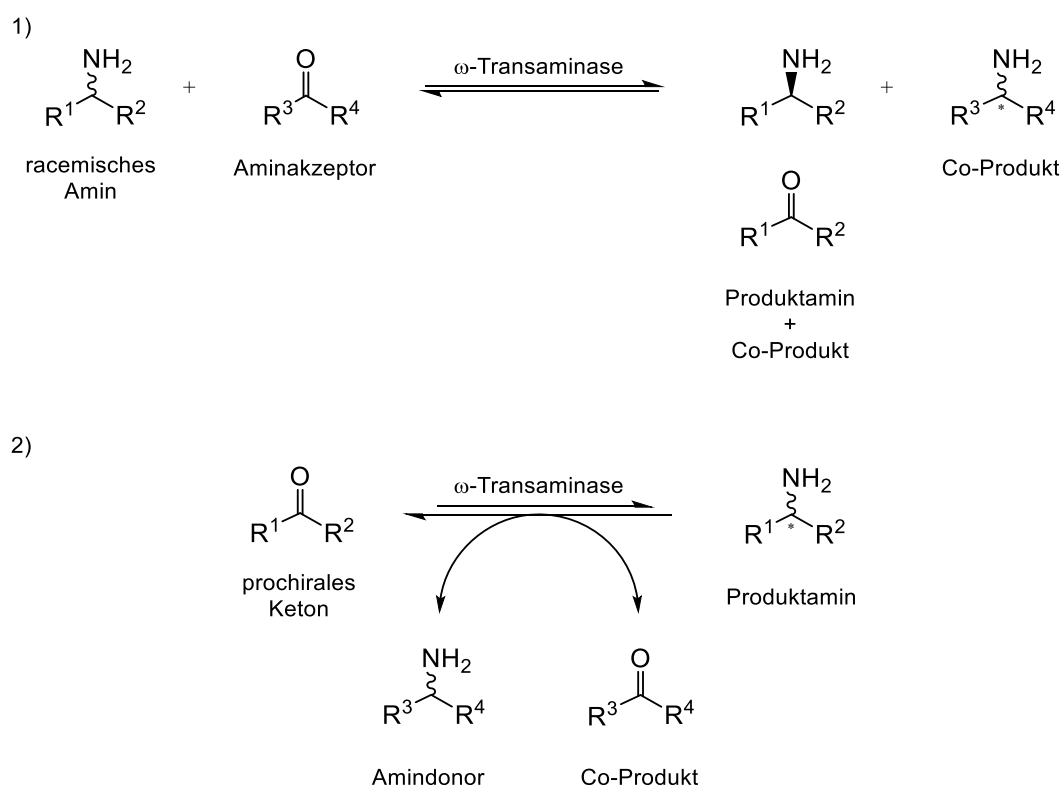
**Tabelle 1:** Gruppierung von Transaminasen

Untergruppe	Enzym	EC Nr.
<b>I</b>	AspAT	2.6.1.1
	AlaAT	2.6.1.2
	TyrAT	2.6.1.5
	HisAT	2.6.1.9
	PheAT	2.6.1.58
<b>II</b>	AcornAT	2.6.1.11
	OrnAT	2.6.1.13
	$\omega$ -AaAT	2.6.1.18
	GaBaAT	2.6.1.19
	DapaAT	2.6.1.62
<b>III</b>	D-AlaAT	2.6.1.21
	BcaaAT	2.6.1.42
<b>IV</b>	SerAT	2.6.1.51
	PSerAT	2.6.1.52



**Schema 2:** Synthesestrategien zur Herstellung von chiralen Aminen

Da immer nur eines der beiden Enantiomere umgesetzt wird, ist der Umsatz stets auf 50 % limitiert. Nur durch den Einsatz eines weiteren Katalysators, der das andere Enantiomer wieder racemisiert, kann dieses Limit überwunden werden.<sup>49</sup> Einfacher und effizienter ist die asymmetrische Synthese, da auf diese Weise das gewünschte Produkt in nur einem Schritt aus dem prochiralen Keton oder Aldehyd erhalten werden kann und dabei einen theoretischen Umsatz von 100 % ermöglichen könnte.<sup>38,50</sup>

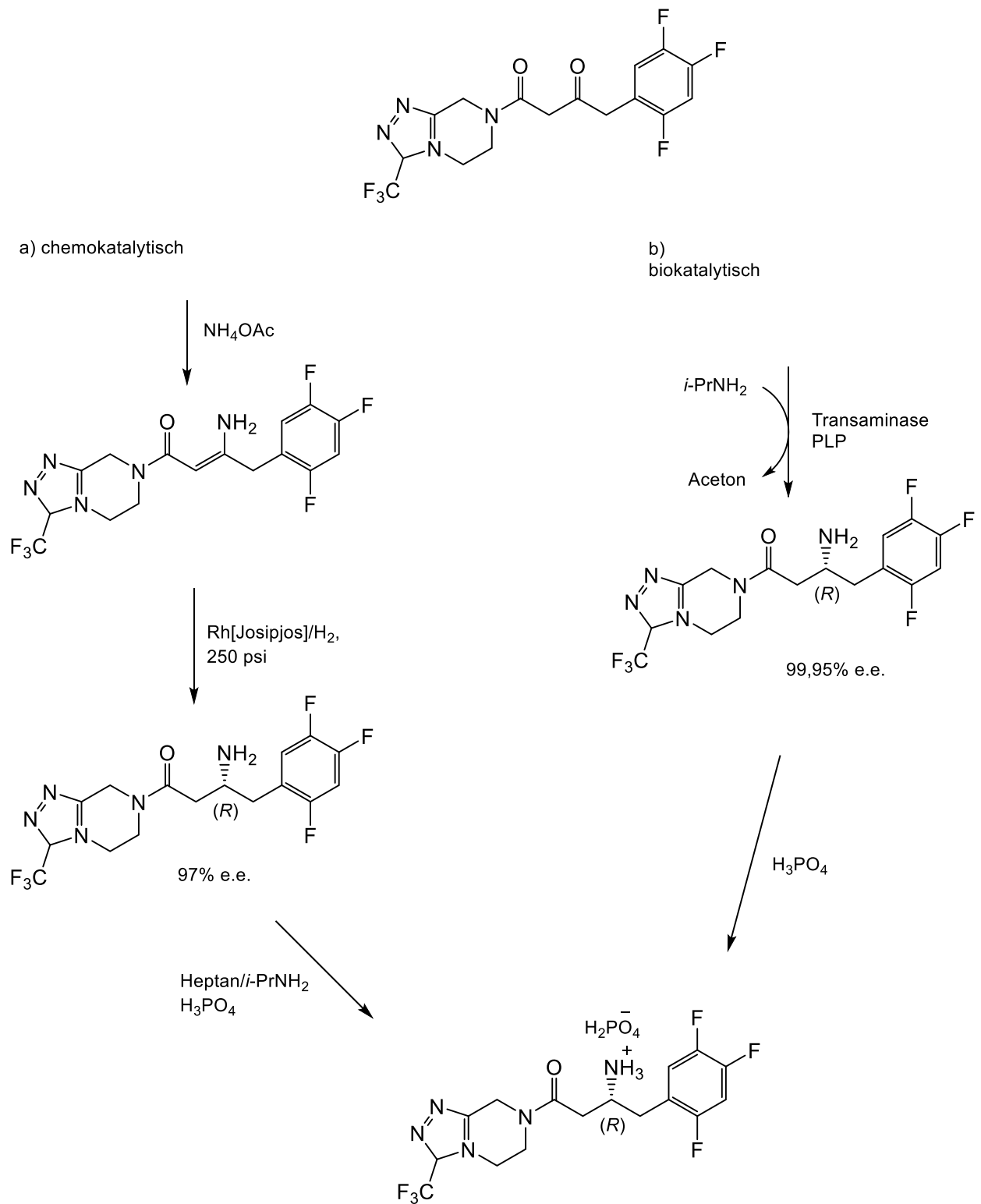


**Schema 3:** 1) kinetische Racematspaltung; 2) Asymmetrische Synthese

Schon in den 90er Jahren war die asymmetrische Synthese ein zentrales Thema in der Biotransformation,<sup>50-54</sup> dabei wurden viele Beispiele veröffentlicht wie aus prochiralen Ketonen und Keto-Säuren chirale Alkohole und Aminosäuren synthetisiert wurden.<sup>55-58</sup> Die Edukte wurden dabei durch Oxidoreduktasen beziehungsweise  $\alpha$ -Transaminasen enantioselektiv reduziert. Die Gewinnung chiraler Amine durch enantioselektive Aminierung ist jedoch nicht sehr häufig publiziert. Eine geringe Stabilität in organischen Lösemitteln, sowie die Abhängigkeit von pH-Werten und Temperaturen und die Möglichkeit der Produkt- und oder Substratinhibierung stellen einige Hürden dar, um effiziente biokatalytische Prozesse zu entwickeln.<sup>4,17</sup> Die Vorteile der biokatalytischen Reaktion sind allerdings so groß, dass sie in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewann und heute ein wichtiger Bestandteil in der Synthese von chemischen Produkten ist.

Für die asymmetrische Synthese von chiralen Aminen spielen besonders die  $\omega$ -Transaminasen eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Transaminasen, welche auf  $\alpha$ -Keto- oder  $\alpha$ -Aminosäuren beschränkt sind, können sie theoretisch jedes Amin oder Keton umsetzen.<sup>46,49,59</sup> Das Thema gewann an zusätzlicher Relevanz durch die Identifizierung von (*R*)-selektiven Transaminasen durch Iwasaki et al.<sup>60</sup> Waren die (*R*)-Amine vorher nur über die kinetische Racematspaltung zugänglich, konnten sie nun direkt durch asymmetrische Synthese hergestellt werden. Ein wichtigen Beitrag dazu lieferten Höhne et al. 2010, die mit einem *in silico* Ansatz 17 neue (*R*)-selektiven Transaminasen entdeckten.<sup>12</sup> Aber nicht nur die Entdeckung neuer Biokatalysatoren, sondern auch die Erweiterung des Substratspektrums durch Protein-Engineering steigerten das Interesse an  $\omega$ -Transaminasen.<sup>13,40</sup> Biokatalysatoren können mittels gerichteter Evolution genau an die Umsetzung des gewünschten Ausgangsstoffes angepasst werden.

Eines der wichtigsten Beispiele für die Anwendung von  $\omega$ -Transaminasen ist die Synthese des Antidiabetikums Sitagliptin. Savile et al. gelang es durch eine Kombination aus *in silico* Verfahren und Mutation ein Homolog der kommerziell erhältlichen ATA-117 (aus *Arthobacter sp.*) zu entwickeln, welches Aktivität für das Prositagliptin-Keton zeigt.<sup>61</sup> Nach weiterer gezielter Evolution konnte die Anwendbarkeit weiter vergrößert werden und es war möglich, das Sitagliptin nun auch biokatalytisch zu erhalten, statt wie bisher eine Enamin-Hydrierung unter großem Druck und unter Einsatz eines Rhodium-Katalysators durchzuführen.<sup>62</sup> Jedoch leidet diese Verfahren vor allem unter der unzureichenden Stereoselektivität (97 % ee),<sup>61</sup> sowie des zusätzlichen Ausbeuteverlusts durch die notwendige Entfernung des toxischen Übergangsmetallkatalysators durch Umkristallisation. Neben der erfolgreichen Entwicklung eines Enzyms, welches das Prositagliptin in enantiomerenreines Sitagliptin umsetzt, mussten Savile et al. auch einen Reaktionsprozess entwickeln, der eine praktische Anwendung ermöglicht. Hindernisse wie die schlechte Löslichkeit des Eduktketons in Wasser (<1 g/L) und die für Transaminasen typische schlechte Lage des chemischen Gleichgewichts galt es zu überwinden. Die Löslichkeit konnte durch die Zugabe eines Co-Solvents (Dimethylsulfoxid) und die Steigerung der Reaktionstemperatur auf 45°C verbessert werden. Um das Gleichgewicht zu Gunsten des Produktes zu verschieben erfolgte der Einsatz großer Mengen Donoramins (1 M Isopropylamin). Die daraus resultierenden Reaktionsbedingungen von 200 g/L Keton (250 mM), 1 M *i*-PrNH<sub>2</sub>, >25 % DMSO, T = 45°C und pH 8,5 über 24 h sind für den Biokatalysator recht harsch, was zur Folge hatte, dass das Enzym nicht nur an das Substrat, sondern auch an die Reaktionsbedingungen angepasst werden musste.



**Schema 4:** Synthese von Sitagliptin ausgehend vom Prositagliptin<sup>61</sup>

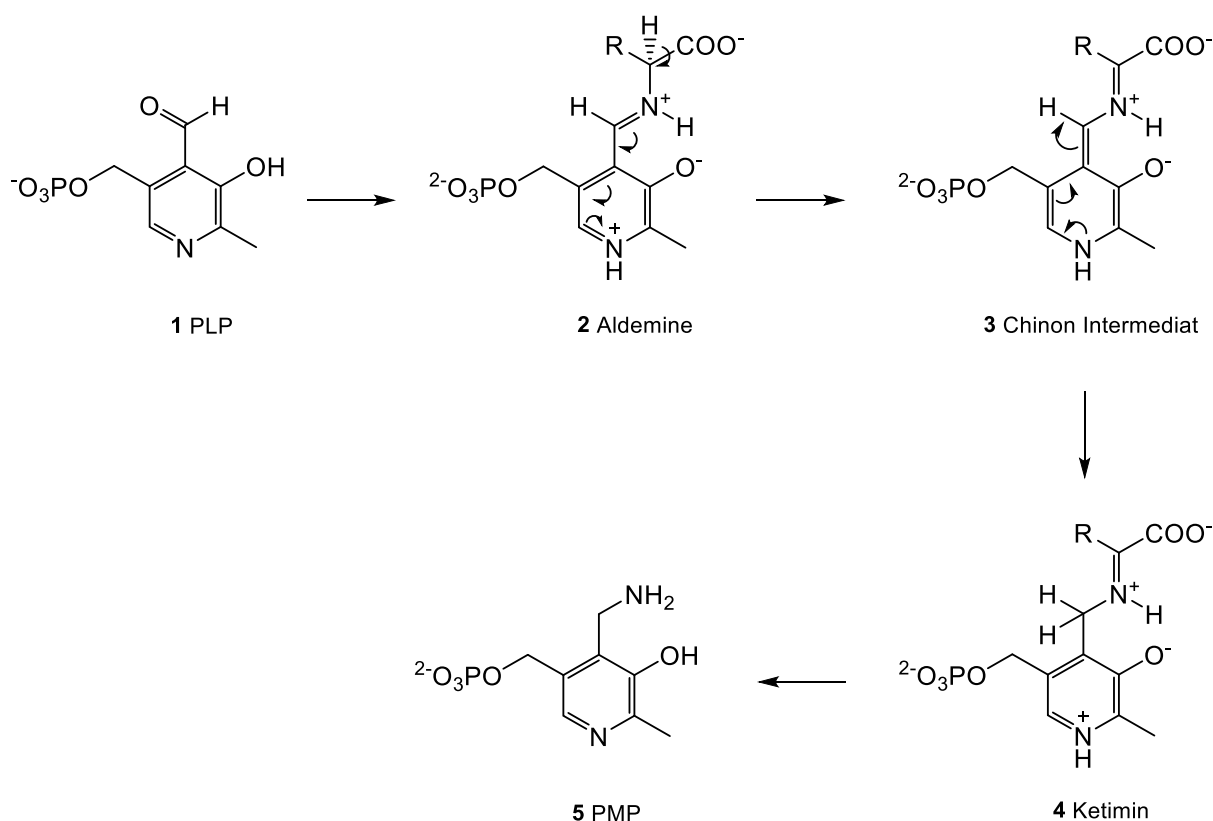
Letztendlich gelang es ein System zu entwickeln, welches Sitagliptin in 92 % Ausbeute mit >99,9 % ee lieferte (Schema 4). Im direkten Vergleich zur Rhodium-katalysierten Reaktion konnte der Umsatz um 10-13 % gesteigert werden. Die Produktivität (kg/L pro Tag) stieg sogar um 53 %, wobei die Abfallmenge um 19 % reduziert werden konnte.<sup>61</sup>

Dieses Beispiel zeigt deutlich die Vorteile und das Potential von Biokatalysatoren und biokatalytischen Prozessen. Gleichzeitig werden aber auch die Hindernisse und Anforderungen, die ein solcher Prozess mit sich bringt, deutlich. Diese sind oftmals sehr speziell und für jeden Biokatalysator und Prozess neu zu überwinden.

Neben den Transaminasen finden auch andere Biokatalysatoren wie Monoaminoxidasen, Amindehydrogenasen und Iminreduktasen Anwendung in der Herstellung von chiralen Aminen.<sup>36,40</sup>

### 3.2.2 Reaktionsmechanismus

Alle Transaminasen benötigen Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) als Cofaktor. PLP dient in der Reaktion als intermediärer Aminakzeptor, welcher die zu übertragende Amin-Gruppe aufnimmt und schließlich an den eigentlichen Akzeptor abgibt.



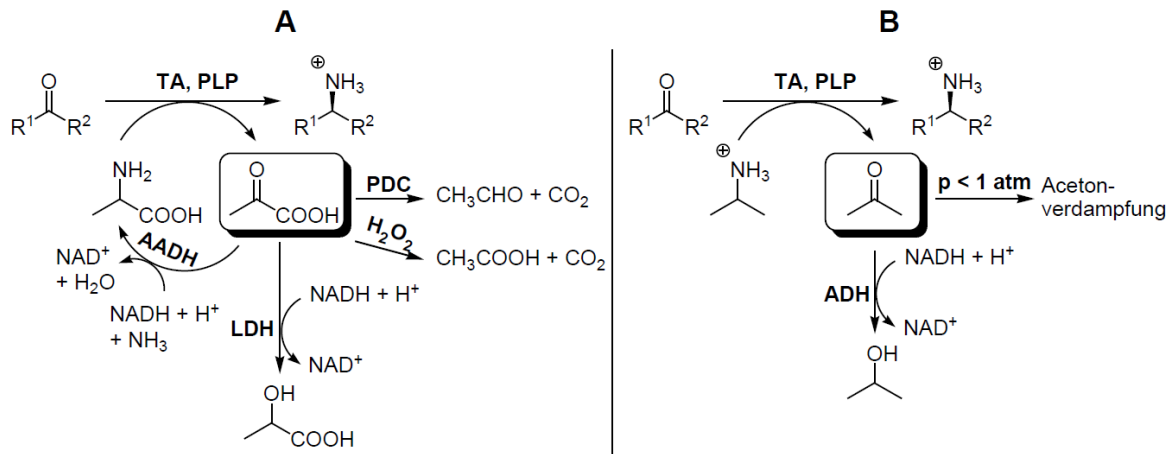
**Schema 5:** Reaktionsmechanismus des Pyridoxyl-5-Phosphats

Das PLP bildet zu Beginn eine Schiffbase mit dem Lysin im Enzym. Die C=N Bindung der Schiffbase wird vom Donoramin angegriffen, was zu einer Imin Bildung zwischen dem PLP

und dem Donor führt. Dabei wird die Schiffbase durch die Hydroxy-Gruppe in *ortho* Position über eine Wasserstoffbindung stabilisiert. Ein weiteres Lysin entfernt den Wasserstoff am Aminkohlenstoff, der durch die Imin Bildung ein saures Zentrum gebildet hat. Durch die Entfernung des Protons tritt eine Isomerisierung ein, welche durch das Proton der Base aus dem ersten Schritt gequenched wird. Das neu gebildete Imin wird hydrolysiert, wobei das Co-Produkt Keton frei wird und der Enzym-PMP Komplex entsteht. Über den umgekehrten Weg gelangt die Aminfunktion nun an das Substrat Keton, was zur Bildung des Produkts führt.<sup>63,64</sup>

### **3.2.3 Gleichgewichtslage bei TA-katalysierten Reaktionen**

Ein großer limitierender Faktor bei Transaminase-katalysierten Reaktionen ist die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts. Oftmals ist die Rückreaktion thermodynamisch begünstigt, was niedrige Umsätze zur Folge hat. Deswegen sind spezifische Strategien notwendig, um das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu verschieben, wobei die Wahl des Amin donors oftmals mit der Methode zur Gleichgewichtsverschiebung verknüpft ist. Die am häufigsten angewandte und einfachste Methode ist ein Überschuss an Donoramin. Je nach thermodynamischer Stabilität des Substrates kann der Einsatz eines 10-fach bis 25-fachen Überschusses zu guten Umsätzen führen. Problematisch ist jedoch, dass Inhibierungen durch entweder den Donor selbst oder das entstehende Co-Produkt eintreten können. Ein Beispiel hierfür ist Alanin, das entstehende Co-Produkt Pyruvat ist ein starker Inhibitor für die meisten Enzyme und muss daher aus der Reaktionslösung entfernt werden. Durch die Verwendung anderer Amine (z.B. Isopropylamin, 1-Aminotetralin, 1-Phenyletylamin u.a.) kann die Bildung von Pyruvat natürlich vermieden werden, jedoch akzeptieren nicht alle Enzyme jedes Amin als Donor bzw. werden mit unterschiedlichen Aminen verschiedene Umsätze bei ein und derselben Reaktion erzielt.<sup>65</sup> Ein weiterer Faktor ist die Verfügbarkeit des Substrats. Viele enzymatische Reaktionen finden in wässrigen Medien statt aber nicht immer sind die Substrate wasserlöslich. Auch Faktoren wie die Wahl des Lösungsmittels oder die Temperatur haben einen Einfluss, da diese direkt die Löslichkeit beeinflussen.



**Schema 6:** Verschieden Methoden der ISPR bei TA-katalysierten Reaktionen

### 3.3 Gleichgewichtsverschiebungen

Wie bereits erwähnt ist der Einsatz eines Überschusses an Donorammin eine technisch einfache Möglichkeit, die Lage des chemischen Gleichgewichts bei TA-katalysierten Reaktionen zu beeinflussen. Dennoch ist die Methode nicht beliebig für jedes System anwendbar. Ausschlaggebend ist die Größe der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}$ , die in Abhängigkeit des verwendeten Donoramins variiert. Durch die Bestimmung von  $K_{eq}$  kann also der geeignetste Donor für die gewünschte Reaktion identifiziert werden. Tufvesson et al. betrachteten die Reaktion eines pro-chiralen Ketons mit einem Amindonor unter der Bildung eines chiralen Amins und des Co-Produkts und bestimmten die relativen Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}$  für die drei gängigen Amindonoren  $\alpha$ -Methylbenzylamin (MBA), 2-Propylamin (IPA) und Alanin (Ala) in Bezug auf die Reaktion, in der Aceton zu IPA umgesetzt wird. Die Gleichgewichtskonstante für diese Reaktion wurde mit  $K_{eq} = 1$  festgesetzt und die Werte für die anderen beiden Amine ins Verhältnis gesetzt. Für MBA ist  $K_{eq} = 30$ , das heißt das Gleichgewicht liegt auf Seiten der Produkte. Bei Ala verhält es sich genau entgegengesetzt und mit  $K_{eq} = 10^{-3}$  ist es eher auf Seiten der Substrate.<sup>66</sup> Allgemein ist für Substanzen mit ähnlicher Struktur (aliphatische Amine) ein ähnlicher Wert für  $K_{eq}$  zu erwarten, wohingegen für Umwandlungen von Ketonen mit einem Phenylring in  $\alpha$ -Position  $K_{eq}$  eher im Bereich 0.5 bis 2 liegt, je nach Substituenten am Ring.<sup>67,68</sup> Weitere Faktoren, die die Ausbeute beeinflussen, sind das Verhältnis Amindonor zu Akzeptor und ob das Produkt/Co-Produkt aus dem System entfernt werden kann. Wird MBA als Donor eingesetzt, kann es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit schwierig werden, eine geeignete Methode zu finden, welche selektiv MBA abtrennt, ohne zeitgleich das Produkt zu entfernen. Außerdem kann es bei höheren

Substratkonzentrationen dazukommen, dass ein bspw. 10-facher Überschuss an Donor technisch gar nicht umgesetzt werden kann, da die Löslichkeitsgrenze erreicht wird. Die Reaktion mit IPA ist zwar thermodynamisch nicht so begünstigt wie die mit MBA, aber Aceton als Co-Produkt kann leicht durch verminderten Druck entfernt werden (s. Schema 6 B). Von den drei untersuchten Aminen weist Ala die kleinste Gleichgewichtskonstante auf und kann somit als schwächster Donor im betrachteten System angesehen werden. Zusätzlich ist das Co-Produkt Pyruvat ein bekannter Inhibitor bei TA-katalysierten Reaktionen, wodurch eine *in-situ* Produktentfernung (engl. *In-situ* product removal, ISPR) gebraucht wird (siehe Kapitel 3.3.1).<sup>69</sup> Dabei wird das (Co-)Produkt aus der Reaktion entfernt kurz nachdem es hergestellt wurde und somit der inhibierende Effekt minimiert. Da es sich um Gleichgewichtsreaktionen handelt, wird dadurch die Lage in Richtung der Produkte verschoben und die Ausbeute kann gesteigert werden. Durch die Verknüpfung der Reaktion mit dem ersten Schritt der Aufarbeitung können theoretisch zwei Probleme auf einmal gelöst werden.<sup>70-72</sup> Weitere zusätzliche Effekte sind

- a) die Überwindung inhibierender oder toxischer Wirkung des Produkts, um eine kontinuierliche Bildung zu ermöglichen,
- b) Minimierung von Verlusten durch Abbau oder unkontrollierter Freisetzung und
- c) Verringerung der Aufarbeitungsschritte.<sup>72</sup>

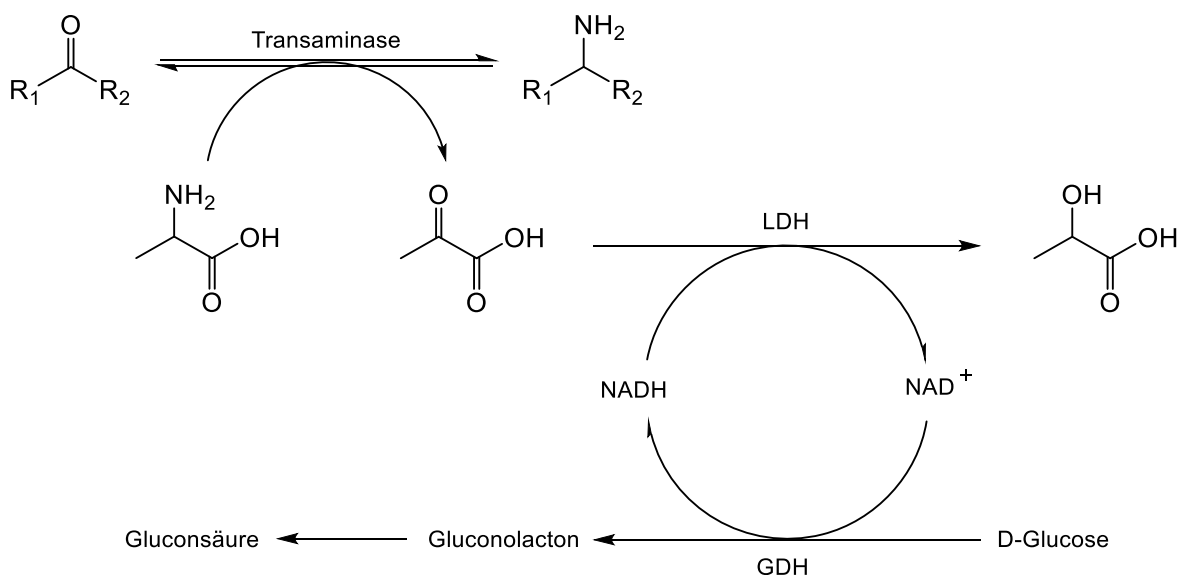
Die Abtrennung kann zum Beispiel durch eine on-line Chromatographie erfolgen.<sup>73</sup> Das Reaktionsmedium wird durch eine Chromatographiesäule geführt, das Produkt abgetrennt und das restliche Medium samt unverbrauchten Edukt wieder dem Reaktor zugeführt. Die Abtrennung erfolgt somit kurz nach der Bildung des Produkts.

Seit den frühen 1980er Jahren werden verschiedenste Techniken des ISPR untersucht. Angetrieben die Produktivität der Ethanolfermentation in Hinblick auf die Ethanolproduktion in der petrochemischen Industrie zu steigern, wurde zum Beispiel das BIOSTIL-Verfahren entwickelt.<sup>74</sup> Dabei wird die Flüchtigkeit und Hydrophobie des Lösemittels ausgenutzt, indem es in einem externen Kreislauf mittels Destillationskolonne abgetrennt wird. Grundsätzlich müssen die Methoden immer spezifisch auf das System, unter Berücksichtigung aller Komponenten und Reaktionsbedingungen, angepasst werden.

### **3.3.1 katalytische Systeme**

Wie in Kapitel 3.3. erwähnt, sind Reaktionen mit Alanin thermodynamisch nicht begünstigt und das Gleichgewicht liegt stark auf Seiten der Edukte. Außerdem kommt es durch Pyruvat zu einer Co-Produktinhibierung, was den Einsatz eines ISPR-Systems sinnvoll macht. Ein gut beschriebenes Beispiel ist die LDH-GDH-Kaskade, durch die Pyruvat als inhibierende

Komponente entfernt wird. Das System enthält neben Alanin als Donor und der Transaminase noch ein weiteres Protein, die Lactatdehydrogenase (LDH).<sup>53</sup> Die LDH reduziert, unter Verbrauch des Cofaktors NADH (Nikotinamid Adenindinukleotid), das Pyruvat zu L-Lactat welches nicht weiter inhibierend wirkt. Da NADH sehr teuer ist, wird zusätzlich noch eine Glucosedehydrogenase (GDH) verwendet um das verbrauchte NAD<sup>+</sup> zu regenerieren. Die GDH reduziert das NAD<sup>+</sup> wieder zu NADH unter dem Verbrauch von D-Glucose (Schema 6 A & 7).<sup>75</sup> Die GDH macht durch die Spaltung des Gluconolactons die Regenerierungsreaktion irreversibel. Mit dieser Methode können sehr hohe Umsätze erzielt werden, allerdings wird das Reaktionssystem durch drei verschiedenen Enzyme stark verkompliziert, da jedes Enzym sein eigenes Aktivitätsmaximum bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen aufweist. Außerdem ist der Einsatz von 3 Biokatalysatoren und deren Cofaktoren mit gesteigerten Kosten verbunden und diese Methode ist bisher auf System beschränkt die Alanin als Donor akzeptieren.



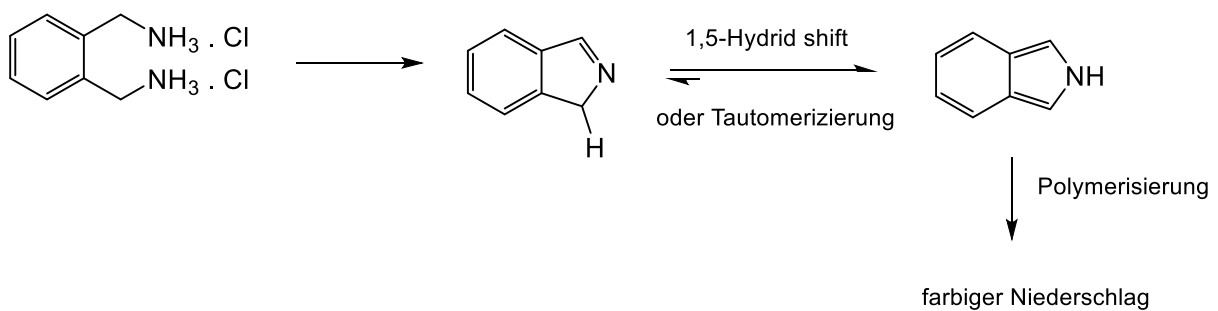
**Schema 7:** LDH/GDH Enzymkaskade zur Verschiebung der Gleichgewichtslage

### 3.3.2 nicht-katalytische Systeme

Neben den chemischen gibt es auch physikalische Methoden, um das Co-Produkt zu entfernen. In Kapitel 3.3.1 wurden mit dem BIOSTIL-Verfahren und der on-line Chromatographie bereits Methoden vorgestellt. Eine weitere wäre das Entfernen einer Komponente durch verminderten Druck. Wird zum Beispiel Isopropylamin als Donor eingesetzt, kann das entstehende Aceton durch eine Reduzierung des Drucks verdampft werden. Einen anderen Ansatz wählten Rehn et al., indem sie einen Reaktor entwickelten bei dem das Produkt durch im Gegenstrom fließende Flüssigkeiten, die durch eine Membran getrennt sind, direkt extrahiert wird.<sup>76</sup> Ausgenutzt wird hierbei der unterschiedliche Protonierungsgrad der Amine bei verschiedenen pH-Werten. In der

basischen wässrigen Phase liegen die Amine in ihrer neutralen Form vor, in der sie durch eine Membran in eine organische Phase aufgenommen werden. Durch eine weitere Membran gelangen die Moleküle in eine weitere wässrige Phase, die einen sauren pH hat. Die Amine werden durch den geringen pH-Wert protoniert und sind dadurch nicht in der Lage wieder in die organische Phase überzugehen. Wird der pH-Wert der wässrigen Phase exakt auf die zu trennenden Komponenten eingestellt, so kann selektiv eine Komponente entfernt werden.

Eine andere Möglichkeit der Gleichgewichtsverschiebung ist der Einsatz von sogenannten „smarten Amindonoren“. <sup>77,78</sup> Die Co-Produkte werden zwar chemisch entfernt aber nicht durch den Einsatz zusätzlicher Enzyme oder anderer Komponenten. Ein Beispiel für derartige „Smarte Amindonoren“ ist Xylylendiamin, welches nach der Abgabe der Amin-Gruppe weiter reagiert und sich durch Tautomerisierung umlagert und ausfällt. Auf diese Weise entfernt sie sich selbstständig aus dem Reaktionssystem (Schema 8).



**Schema 8:** Verbrauch von Xylylendiamin und anschließende Reaktion

Die *in-situ* Produkt Kristallisation ist im Prinzip eine selektive Kristallisation, die sofort nach der Produktbildung im Reaktor einsetzt. Es kommt zu einer Salzbildung des Produkts mit einem ausgewählten Gegenion, dabei kann das Gegenion als zusätzliche Komponente im Reaktionsmedium gelöst sein oder in Form eines Salzes mit dem Amindonor in das System gebracht werden. <sup>79</sup> Der Einsatz des Donors in Salzform bietet den Vorteil, dass überschüssiges Salz ungelöst im Reaktor verbleibt und somit keine inhibierenden Effekte auf das Enzym hat. Die Konzentration wird allein durch die Löslichkeit bestimmt und ist während der Reaktion kontinuierlich auf dem gleichen Niveau. Somit kommt es auch nicht zu einer Verschiebung des pH-Werts und es bedarf keiner hohen Konzentrationen an Pufferlösungen. Ein weiterer Vorteil ist die gesteigerte Löslichkeit in wässrigen Medien gegenüber dem freien Amin und somit einer besseren Verfügbarkeit. Die Voraussetzung für diesen Ansatz ist, dass das Produktsalz eine geringere Löslichkeit aufweist als das Donorsalz und damit bevorzugt ausfällt. Zusätzlich muss die Löslichkeit auch unter der des freien Produktamins liegen, denn die Differenz bildet die treibende Kraft hinter der ISPC. Je eher die Kristallisation einsetzt und Produkt aus der

Reaktionslösung entfernt wird, desto größer wird der Effekt auf die Gleichgewichtslage der Reaktion in Richtung der Produkte.<sup>79</sup>

### 3.4 Selektive Kristallisation

Die Kristallisation gehört, wie die Destillation, die Rektifikation, die Ad- und Absorption und die Extraktion, zu den thermischen Trennverfahren. Diese beruhen auf der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen zwei Phasen. Kommt es zu einer Überschreitung des Gleichgewichts, setzt der Vorgang der Kristallisation ein, wobei ein Festkörper mit Gitterstruktur aufgebaut wird.<sup>80</sup> Zunächst beginnt die Keimbildung und anschließend das Kristallwachstum am Keim. Als Keime werden winzige Kristallindividuen der gleichen Substanz bezeichnet, die durch Übersättigung oder Unterkühlung einer Lösung oder Schmelze entstehen (primäre Keimbildung).<sup>80</sup> Innerhalb einer Lösung oder Schmelze kommt es zu mehreren Keimbildungen. Wird das Gleichgewicht aber nur langsam überschritten kann gezielt nur eine initiiert werden (Züchtung von Einkristallen). Der Vorgang der Kristallisation hängt also vom Grad der Gleichgewichtsüberschreitung ab.<sup>80</sup> Keime können aber auch von außen vorgelegt werden (Impfkristalle) oder durch Abrieb anderer Kristalle entstehen (sekundäre Keimbildung). Generell gibt es mehrere Gesichtspunkte, an denen man die Kristallisation unterscheiden kann. Ist nur eine Komponente kristallisierbar spricht man von einer einfachen Kristallisation. Sind mindestens zwei Komponenten kristallisierbar handelt es sich um eine fraktionierte Kristallisation. Eine weitere Einteilung kann anhand der eingesetzten Hilfsmittel, wie Lösungsmittel, Trägergas oder Additive, erfolgen. Die wohl gängigste Einteilung orientiert sich an den äußeren Bedingungen (Tabelle 2). Zuletzt kann noch unterschieden werden, ob aus einer festen, flüssigen oder gasförmigen Mutterphase kristallisiert wird.<sup>80-82</sup> Gemein haben aber alle Kristallisationsarten, dass während der Kristallisation Wärme (Kristallisationswärme) frei wird. Der Betrag dieser Energie ist dabei genauso groß wie die für das Schmelzen benötigte Energie.

$$Q_{\text{Kristallisation}} = -Q_{\text{Schmelzen}}$$

**Tabelle 2:** Unterteilung von Kristallisationsarten nach äußeren Bedingungen<sup>80-82</sup>

Kristallisationsart	Prinzip
Kühlungskristallisation	Abkühlen der Lösung, Schmelze, Gasphase
Verdampfungskristallisation	Entfernen des Lösungsmittels
Vakuumbkristallisation	Abkühlen und Verdampfen
Druckkristallisation	hoher Druck
Fällungskristallisation	Verdrängen des gelösten Stoffes durch Zugabe einer weiteren Komponente; Reaktion des gelösten Stoffes mit einem weiteren Reaktanden zu einem weniger löslichen Produkt

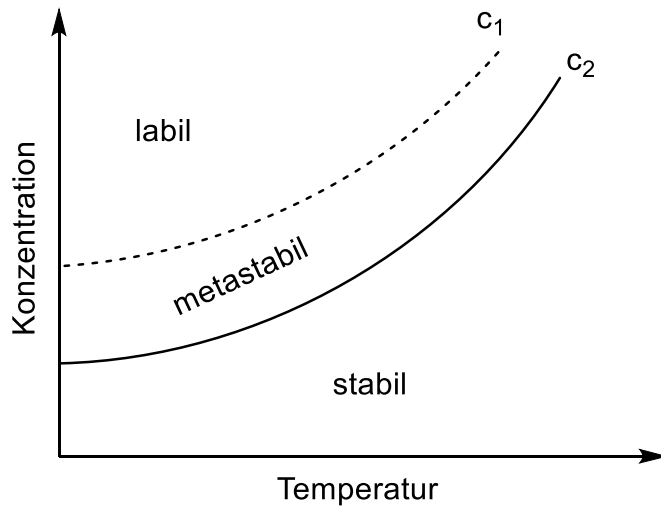
Die Temperatur des Stoffes ändert sich dabei nicht, sondern nur sein Aggregatzustand (latente Wärme). Die freiwerdende Energie wird in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben, was einen Temperaturanstieg zur Folge hat (fühlbare Wärme).

In der Chemie findet die Kristallisation ihre Anwendung hauptsächlich in der Darstellung von reinen Stoffen aus Lösungen, Schmelzen oder aus Gasphasen und der Aufkonzentrierung oder Reinigung von Lösungen.<sup>81,82</sup>

### **Metastabile Breite („Ostwald-Miers-Bereich“)**

Wie im vorherigen Abschnitt besprochen ist die Keimbildung oder das Kristallwachstum die Antwort des Systems auf eine Überschreitung des Löslichkeitsgleichgewichts. Jedoch führt nicht jede Überschreitung (z.B. Übersättigung) sofort zu einer Keimbildung. Die Kristallisation ist vom Grad der Gleichgewichtsüberschreitung abhängig oder im Falle von Lösungen vom Grad der Übersättigung. Das heißt, auch wenn das System eigentlich übersättigt ist, tritt nicht sofort eine Keimbildung ein, sondern erst wenn ein gewisser Punkt überschritten ist. Dieser Bereich zwischen der stabilen Untersättigung und der labilen Übersättigung wird metastabil genannt (Abb. 1).<sup>83</sup> Innerhalb des metastabilen Bereichs (auch „Ostwald-Miers-Bereich“<sup>84</sup>) tritt keine Keimbildung ein, aber bereits vorhandenen Kristalle wachsen (Impfkristalle). Dies ist von Bedeutung, um möglichst große Kristalle zu erhalten. Im labilen Gebiet hingegen kommt es zur spontanen Keimbildung was feine Kristalle zur Folge hat. Unterhalb der Sättigungslinie (stabiler Bereich) ist die Lösung untersättigt und es tritt keine Kristallisation ein. Sollten Kristalle von außen hinzugefügt werden, so lösen sie sich auf.<sup>80,81,85</sup> Die Breite des metastabilen Bereichs ist dabei stark abhängig vom betrachteten System und von experimentellen

Parametern, wie der Abkühlungsgeschwindigkeit.<sup>81</sup> Wässrige Lösungen von Salzen weisen einen schmalen metastabilen Bereich von wenigen Kelvin auf, wohingegen organische Systeme eher einen Kristallisationsbereich von 10 K aufweisen.<sup>81</sup>



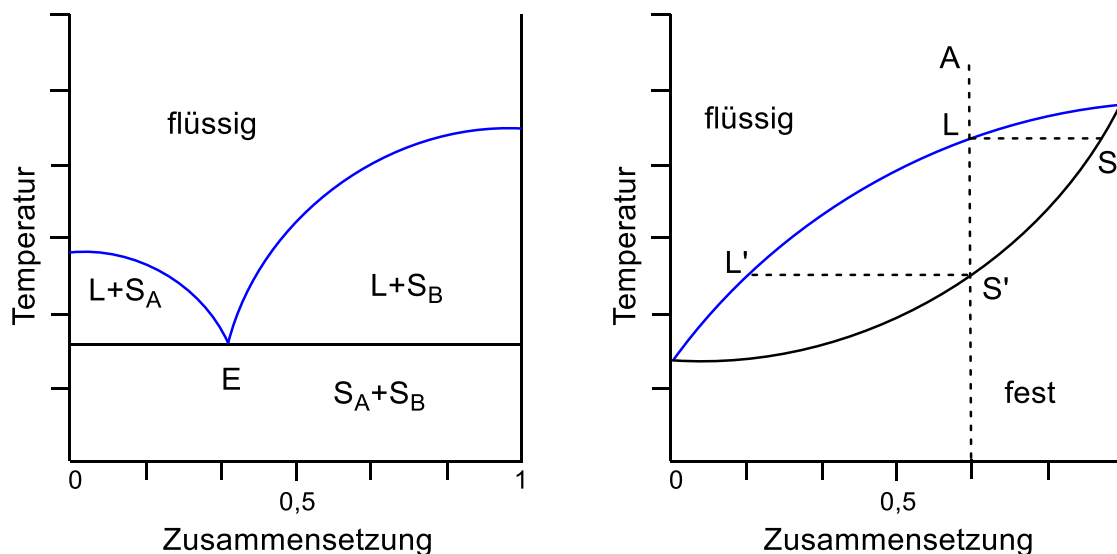
**Abbildung 1:** Sättigungsbereiche einer Lösung

### 3.4.1 Phasendiagramme

Um zwei Stoffe per Kristallisation effektiv voneinander trennen zu können, ist es wichtig das binäre Schmelzdiagramm und das ternäre Löslichkeits-Phasendiagramms zu kennen. Aus diesen Phasendiagrammen kann abgelesen werden, ob es sich um ein eutektisches (griech. „leicht schmelzbar“) System oder eines, das Mischkristalle bildet, handelt. Besonders für die selektive Kristallisation eines Stoffes ist die Kenntnis über das Phasenverhalten der Mischung von großer Bedeutung. Aus den Diagrammen kann der Bereich abgelesen werden, in dem nur die gewünschte Komponente auskristallisiert werden kann.<sup>86</sup>

In Abbildung 2 sind zwei binäre fest/flüssig-Schmelzdiagramme zu sehen. Auf der linken Seite ist ein einfaches eutektisches System abgebildet und auf der rechten Seite eins, bei dem es zur Bildung von Mischkristallen kommt. Oberhalb der blauen Linie (Liquiduslinie) befindet sich die flüssige Phase (L). Fällt die Temperatur unter die Liquiduslinie bilden sich Kristalle und das System befindet sich in einen Zweiphasengebiet (L+S). Die flüssige und die feste Phase befinden sich dabei im Gleichgewicht. Sinkt die Temperatur weiter und unterschreitet die schwarze Linie (Soliduslinie) kristallisiert alles aus und es liegt nur noch die feste Phase (S) vor. Der Unterschied zwischen beiden Systemen liegt darin, welche Komponenten auskristallisieren.

Weist das System ein eutektisches Verhalten auf, kann sofort selektiv eine Komponente kristallisiert werden. Liegt die Zusammensetzung einer Mischung beim Abkühlen rechts von  $E$ , dann kristallisiert nur Komponente B aus sobald die Liquiduslinie unterschritten wurde. Liegt die Zusammensetzung links von  $E$  entsteht zuerst festes A. Nur die eutektische Mischung erstarrt bei einer definierten Temperatur, ohne dass eine Komponente vorher ausfällt. Das Eutektikum stellt dabei die Zusammensetzung mit der niedrigsten Schmelztemperatur, die für die betreffende Mischung auftreten kann, dar.<sup>87</sup> Unterhalb der Isotherme durch  $E$  gehen beide Komponenten in die feste Phase über.



**Abbildung 2:** Binäre flüssig/fest Phasendiagramme, links: einfaches eutektisches System, rechts: Bildung von Mischkristallen

Im nicht eutektischen System kommt es zur Bildung von Mischkristallen, d.h. beide Komponenten kristallisieren aus. Die Zusammensetzung kann aus dem Schnittpunkt der Isotherme mit der Soliduslinie abgelesen werden. Wird eine homogene Flüssigkeit (dargestellt durch den Punkt  $A$ ) abgekühlt, beginnt sie am Punkt  $L$  zu kristallisieren. Die Zusammensetzung der Kristalle wird durch  $S$  beschrieben. Fällt die Temperatur weiter werden immer mehr Kristalle gebildet, deren Zusammensetzung sich entlang der Kurve  $SS'$  ändert. Die Zusammensetzung der flüssigen Phase ändert sich analog entlang der Kurve  $LL'$ . Fällt die Temperatur weiter, bis sie die Soliduslinie unterschreitet, liegen homogene Mischkristalle vor.<sup>87</sup> Um die reinen Komponenten zu erhalten muss eine mehrstufige fraktionierte Kristallisation angewandt werden.<sup>81,82</sup>

Der Verlauf der Liquiduslinien lässt sich für ein einfaches eutektisches System auch mit Hilfe der Schröder-van-Laar Gleichung berechnen.

$$\ln x = \frac{\Delta H_{fus,S}}{R} \left( \frac{1}{T_{fus,S}} - \frac{1}{T_{fus}} \right)$$

$$T_{fus} = \left( \frac{1}{T_{fus,S}} - (\ln x * \frac{R}{\Delta H_{fus,S}}) \right)^{-1}$$

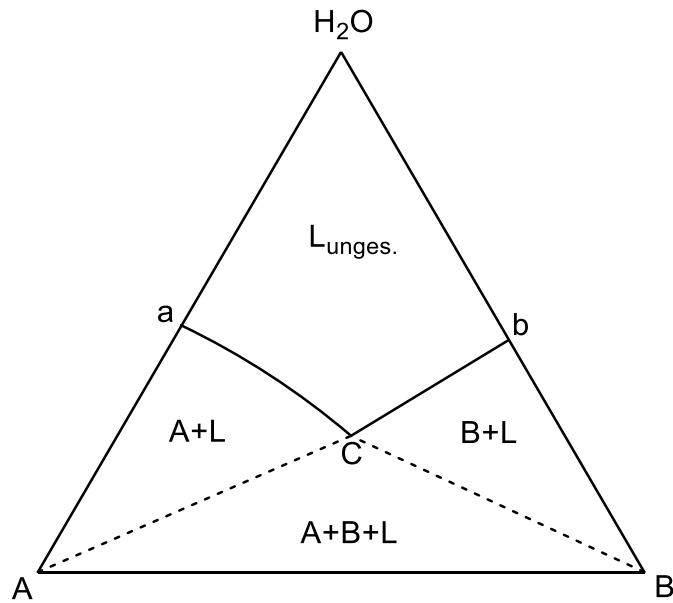
Unter Einbeziehung des Schmelzpunktes ( $T_{fus,S}$ ) und der Schmelzenthalpie ( $\Delta H_{fus,S}$ ) der reinen Komponente und der universellen Gaskonstante  $R$  kann für jede Zusammensetzung  $x$  (Molenbruch) die Schmelztemperatur berechnet werden.<sup>88</sup> Der Schnittpunkt beider berechneter Linien (für jede Komponente eine) stellt das Eutektikum dar.

Ternäre Mischungen werden in einem Dreieck dargestellt. Sind die drei Komponenten unabhängig voneinander, so sind alle Seiten des Dreiecks gleichlang, wobei jede Spitze einer reinen Komponente entspricht. Jeder Punkt auf einer der Seiten steht für ein binäres System AB, AC oder BC (s. Abb. 3). Jeder Punkt in der Mitte des Diagramms stellt ein ternäres System dar.<sup>87</sup> Ein Beispiel für ein solches System wäre ein Löslichkeitsdiagramm von zwei Salzen in Wasser. Und auch dieses Beispiel ist nicht so trivial, da es mehrere Möglichkeiten gibt, wie sich die einzelnen Komponenten miteinander verhalten. Im Folgenden sind drei Beispiele dargestellt und erklärt.

### 3.4.2 Selektive Kristallisation in ternären Systemen

#### Keine Reaktion

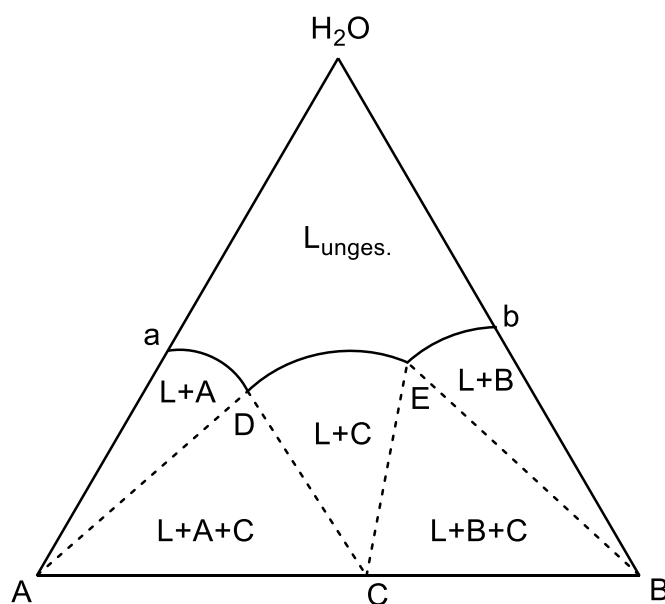
Zwischen den beiden Salzen kommt es zu keiner chemischen Reaktion und keines der Salze bildet ein Hydrat. Dies stellt die einfachste Form eines ternären Phasendiagramms dar (Abb. 3). Die Punkte  $A$  und  $B$  stellen die reinen Feststoffe dar und die obere Spitze des Dreiecks das Lösemittel Wasser. Die Punkte  $a$  und  $b$  sind die jeweiligen Löslichkeiten der einzelnen Komponenten in Wasser. Die Kurve  $aC$  zeigt die Zusammensetzung der gesättigten ternären Lösung im Gleichgewicht mit  $A$ . Analog stellt die Kurve  $bC$  die Zusammensetzung im Gleichgewicht mit  $B$  dar. Das Gebiet über  $aCb$  entspricht der homogenen ungesättigten Lösung. Am Punkt  $C$  ist die Lösung in Bezug auf beide Komponenten gesättigt. Unter der Annahme einer konstanten Temperatur wird dieser Punkt auch als Eutektikum bezeichnet.<sup>87</sup>



**Abbildung 3:** Ternäres Phasendiagramm eines Systems ohne Reaktion

### Bildung eines Doppelsalzes

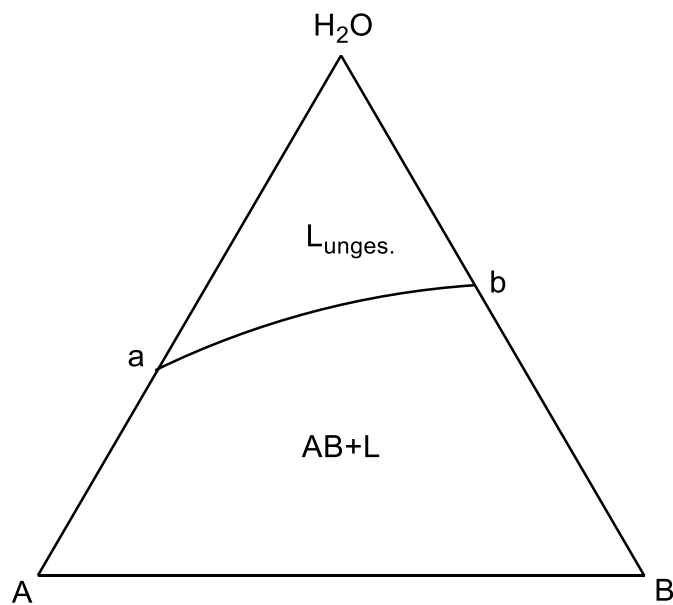
In diesem Fall kommt es zur Bildung eines Doppelsalzes. Die gelösten Bestandteile  $A$  und  $B$  kombinieren sich in festen Verhältnissen zum Doppelsalz  $C$  (Abb.4). Die Zusammensetzung von  $C$  kann auf der Seite  $AB$  abgelesen werden. Die Punkte  $a$  und  $b$  stellen wieder die Löslichkeit von  $A$  bzw.  $B$  in Wasser dar. Die Kurven  $aD$  bzw.  $bE$  beschreiben die ternäre Lösung, gesättigt mit Salz  $A$  ( $aD$ ) respektive Salz  $B$  ( $bE$ ). Das Gleiche gilt für die Kurve  $DE$ , nur ist die ternäre Lösung mit dem Doppelsalz  $C$  gesättigt.



**Abbildung 4:** Ternäres Phasendiagramm eines Systems mit Doppelsalz Bildung

### Bildung von Mischkristallen

Besitzen die beiden Salze eines ternären Systems ein gemeinsames Ion, kommt es häufig zur Bildung von Mischkristallen. Die Punkte  $a$  und  $b$  entsprechen erneut den einzelnen Löslichkeiten von  $A$  und  $B$ . Die Kurve  $ab$  stellt die Gleichgewichts-Löslichkeiten von Mischungen der Bestandteile  $A$  und  $B$  dar (Abb. 5). Das Gebiet  $abW$  beschreibt die ungesättigte Lösung. Der Bereich unterhalb von  $ab$ , also der Bereich  $AabB$ , repräsentiert die festen Mischkristalle  $AB$  im Gleichgewicht mit gesättigten Lösungen der Salze  $A$  und  $B$ .



**Abbildung 5:** Ternäres Phasendiagramm eines Systems mit Bildung von Mischkristallen

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Bestimmung der Enzymaktivität

#### *Via Assay*

Zur Bestimmung der Aktivität der verwendeten Transaminasen wird ein photometrischer Assay verwendet. In einer Testreaktion wird S-(-)- $\alpha$ -Methylbenzylamin zu Acetophenon umgesetzt. Als Aminempfänger dient Pyruvat und es entsteht L-Alanin als Co-Produkt. Der Verlauf der Reaktion wird mittels Absorption des entstehenden Acetophenons bei einer Wellenlänge von 245 nm an einem Photometer verfolgt.

Für die Durchführung des Assays werden mehrere Lösungen benötigt. Als Pufferlösung wird ein Phosphatpuffer (pH 8, 50 mM) verwendet. Dazu werden 0,126 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 3,4175 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 500 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert gegebenenfalls mit NaOH oder HCl eingestellt. Abschließend erfolgt die Zugabe von 1250  $\mu\text{L}$  DMSO. Als Substrat dient eine 10 mM S-(-)- $\alpha$ -Methylbenzylamin-Lösung. Diese wird erhalten, indem 12,75  $\mu\text{L}$  des Amins in 10 mL Puffer gelöst werden. Für die Lösung des Aminakzeptors werden 0,0088 g Pyruvat in 10 mL Puffer gelöst (10 mM). Die 1 mM Cofactor-Lösung wird hergestellt durch das Lösen von 0,0049 g Pyridoxalphosphat (PLP) in 20 mL Pufferlösung. Die Enzymlösung sollte jeweils frisch angesetzt und auf Eis gelagert werden. Dazu löst man 0,5 mg Enzym in 1800  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer und 200  $\mu\text{L}$  PLP-Lösung. Die resultierende Enzymlösung enthält 0,1 mM PLP. Bevor die Enzymaktivität gemessen werden kann, muss, falls nicht anderweitig vorhanden, der Extinktionskoeffizient von Acetophenon bestimmt werden. Dazu werden unter Ausnutzung des Lambert-Beerschen Gesetzes verschiedene Konzentrationen von Acetophenon bei der Wellenlänge von 245 nm vermessen. Aus dem Anstieg der Absorption kann der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  nach Gleichung (1) berechnet werden.

$$\varepsilon = \frac{\Delta E}{\Delta c * d}$$

Vor jeder Messung muss zunächst eine Referenzprobe vermessen werden. Die genaue Zusammensetzung ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Während die Referenz vermessen wird, wird die Messlösung angesetzt (Tab. 3). Dabei ist zu beachten, dass die Enzymlösung erst zum Schluss dazu gegeben wird. Sobald alle Lösungen in die Küvette gefüllt wurden, beginnt die Reaktion und die Messung wird gestartet. Die Messung erfolgt über 60 s bei 245 nm. Der lineare Teil des Anstiegs kann dann genutzt werden, um die Aktivität zu berechnen.

$$A \left[ \frac{U}{mg} \right] = \frac{\Delta E [min^{-1}] \cdot V [mL]}{\epsilon_{Acetophenon, 245 \text{ nm}} [(mM \cdot cm)^{-1}] \cdot d [cm] \cdot V_{Enzym} [mL] \cdot c_{Enzym} \left[ \frac{mg}{mL} \right]}$$

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wurde im Vorfeld bestimmt,  $d$  ist die Schichtdicke der Küvette und beträgt 1 cm, das Volumen der Messlösung beträgt 1 mL, das Volumen der Enzymlösung 0,25 mL und die Konzentration 0,25 mg/mL. Setzt man nun den gemessenen Anstieg  $\Delta E$  ein erhält man die Aktivität des eingesetzten Enzyms. Auf diese Weise wurden sämtliche Aktivitäten der verwendeten Enzyme bestimmt.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Messlösungen für das Assay

Lösung	Probenmenge [ $\mu\text{L}$ ]	Referenzvolumen [ $\mu\text{L}$ ]
50 mM Phosphatpuffer pH 8	250	450
10 mM S(-)- $\alpha$ -Methylbenzylamin-Lösung	250	250
10 mM Pyruvatlösung	250	250
10 mM PLP-Lösung	-	50
Enzymlösung (0,25 mg/mL)	250	-

#### *Via Testreaktion in Anwesenheit einer Carbonsäure*

In diesem Falle wird nicht direkt die Aktivität bestimmt, sondern der Einfluss der Carbonsäure auf den Umsatz einer Testreaktion. Es ist bekannt, dass die Enzyme in der Lage sind die Reaktion von Acetophenon zu (S)-1-PEA zu katalysieren. Es wird der Umsatz mit und ohne Säure bestimmt und die Ergebnisse verglichen, um den Einfluss der Säure auf das Enzym zu untersuchen. Die Reaktionen verliefen parallel in 2 mL Eppendorf Vials. Verwendet wird ein Natrium-Phosphat-Puffer mit pH-Wert 7,5 in dem sich 10 mM Acetophenon und 500 mM Isopropylamin befinden. Vom jeweiligen Enzym waren 5 mg/mL enthalten und die Konzentration des Cofactors PLP betrug 2 mM. Für die Reaktionen mit 2-Chlor-5-Nitrobenzoesäure und 4-Chlor-3-Nitrobenzoesäure wird vorher die Säure im NaP-Puffer gelöst und der pH-Wert wieder auf 7,5 eingestellt. Dies muss mehrmals geschehen, da die Säure nur langsam in Lösung geht. Die Konzentration beträgt 50 mM. Beide Reaktionen werden für 22 h bei 30°C geschüttelt und anschließend der Umsatz mittels Gaschromatografie bestimmt.

## 4.2 Versuchsvorbereitung

### *Herstellung des Natriumphosphatpuffers*

Zur Herstellung des Natriumphosphatpuffers werden  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (12,12 g) sowie  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  \*  $\text{H}_2\text{O}$  (2,024 g) in 500 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wird mit gesättigter NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt.

### *Herstellen der Reaktionslösung*

a) für den Umsatz von 3-Acetylpyridin:

Als Reaktionsmedium wird ein wässriger Natriumphosphatpuffer (NaP; 200 mM) mit pH 7,5 verwendet. Der Amindonor wird im Puffer gelöst und der pH-Wert wieder auf 7,5 eingestellt. Die Reaktionstemperatur beträgt 25°C. Die Transaminase *MvATA* (*mycobacterium vanbaalenii*) wird von der Firma *Enzymicals AG* zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des Cofactors PLP (Pyridoxal-5-phosphat) beträgt 0,2 mM.

b) für den Umsatz von 3-Methoxyacetophenon ohne Carbonsäure:

Als Reaktionsmedium dient ein wässriger Natriumphosphatpuffer (NaP; 200 mM) mit pH 7,5. Der Amindonor wird im Puffer gelöst und der pH-Wert wieder auf 7,5 eingestellt. Die Reaktionstemperatur beträgt 30°C. Die Transaminase *SpATA* (*Silicibacter pomeroyi*) wird von der Firma *Enzymicals AG* zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des Cofactors PLP beträgt 0,2 mM.

c) für den Umsatz von 3-Methoxyacetophenon mit verschiedenen Carbonsäuren:

Als Reaktionsmedium dient ein wässriger Natriumphosphatpuffer (NaP; 200 mM) mit pH 7,5. Der Amindonor und die Carbonsäure werden im Puffer gelöst und der pH-Wert wieder auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wird für mindestens eine Stunde stehen gelassen und der pH-Wert erneut eingestellt. Die Reaktionstemperatur beträgt 30°C. Die Transaminase *SpATA* (*Silicibacter pomeroyi*) wird von der Firma *Enzymicals AG* zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des Cofactors PLP beträgt 0,2 mM.

### *Aufarbeitung der Reaktionslösung*

Nach Ablauf der Reaktionszeit wird gesättigte NaOH zur Reaktionslösung dazugegeben, um die Reaktion zu quenchen. Anschließend wird mit einem organischen Lösungsmittel

(Ethylacetat, *t*-BME) extrahiert. Bei den ersten Extraktionsversuchen wurde 3x in einem Verhältnis 1:2 extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, das Lösungsmittel am Abdampfblock oder dem Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand anschließend in einer geringen Menge organischen Lösungsmittel wieder aufgenommen. Um den Substanzverlust bei geringen Mengen niedrig zu halten, wird im weiteren Verlauf der Arbeit dazu übergegangen nur noch einmal im Verhältnis 1:1 zu extrahieren. Fehler durch unvollständiges Extrahieren werden durch Wiederfindungsraten korrigiert.

#### *Bestimmung der Wiederfindungsrate*

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten werden Lösungen mit bekannten Konzentrationen analog zu der Reaktionslösung aufgearbeitet und extrahiert. Anschließend wird mittels Gaschromatografie die Konzentration in der organischen Phase bestimmt und ins Verhältnis mit der ursprünglichen Konzentration gesetzt. Die so bestimmte Wiederfindungsrate wird bei jeder Umsatzbestimmung als Korrekturfaktor einbezogen.

#### *Modellreaktion*

In einem 200 mL Reaktor mit Rührer werden 120 mL NaP-Puffer pH 7,5 vorgelegt. In dieser Lösung befinden sich (*S*)-1-PEA und Isopropylamin in definierter Konzentration (Tabellen 9 und 10). Über eine Spritzenpumpe werden 30 mL der Säurelösung (ebenfalls NaP-Puffer pH 7,5) mit einer Flussrate von 0,75 mL/min hinzugefügt, so dass das Gesamtvolumen 150 mL beträgt. Die Reaktionslösung wird dabei mit einem Kryostaten konstant auf 30°C temperiert und bei 200 rpm gerührt. Nach der Zugabe der Säurelösung wird das Gemisch noch 30 min gerührt und anschließend die Suspension aus dem Reaktor abgelassen. Um die Ausbeute zu bestimmen wird der Niederschlag über einen Büchnertrichter abfiltriert, mit *t*-BME gewaschen, getrocknet und abschließend gewogen. Mittels NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*-Spektroskopie) wird die Reinheit des Feststoffs bestimmt.

## 4.3 Herstellung der Salze

### *Synthese der Salze*

Die jeweilige Säure wird in *tert*-Butylmethylether (*t*-BME) gelöst und anschließend das Amin in einem 1:1 Verhältnis hinzugefügt. Die Lösung wird für ca. 24 h gerührt und der entstehende Niederschlag abfiltriert, mit *t*-BME gewaschen und getrocknet.

### *Screening der organischen Säuren*

Für jede Säure wird eine 400 mM Lösung in NaP<sub>i</sub> pH 7,5 hergestellt, welche dann im Verhältnis 1:1 mit einer 100 mM Lösung des entsprechendenamins zusammengegeben wird. Durchgeführt werden die Tests auf einer 96er Mikrotiterplatte. Die verschiedenen Säurelösungen werden auf der Mikrotiterplatte vorgegeben und anschließend die Aminlösung hinzugefügt. Die Platten blieben nach der Zugabe für 2 h bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird der Grad der Fällung optisch bestimmt.

## 4.4 Analyse und Charakterisierung

### *NMR-Spektroskopie*

**NMR:** <sup>13</sup>C-, <sup>1</sup>H-, und <sup>29</sup>Si-INEPT-NMR-Spektren werden auf einem Bruker AVANCE 250 Spektrometer, auf einem Bruker AVANCE 300 Spektrometer oder auf einem Bruker AVANCE 500 Spektrometer aufgenommen. Die NMR-Spektren werden intern auf die verwendeten deuterierten Lösungsmittel oder protischen Verunreinigungen kalibriert. <sup>13</sup>C-NMR: d<sub>6</sub>-DMSO: 39.5 ppm, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 54.0 ppm; <sup>1</sup>H-NMR: CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 5.32 ppm, d<sub>6</sub>-DMSO: 2.5 ppm.

### *Gaschromatografie (GC)*

Zur Bestimmung fast aller Umsätze, der Enantiomerreinheit und zur Reaktionsverfolgung wird die Gaschromatografie genutzt. Gemessen wird auf einem Trace 1310 von Thermo Scientific mit einem AI 1310 Autosampler. Als Säule wird eine CP ChiraSilDex CB (25m x 0,25mm x 0,25µm) von Agilent Technologies verwendet. Die genauen Temperaturprogramme und Messmethoden können dem Anhang entnommen werden. Zur Messung werden 200 µL Probe mit 50 µL einer 25 mM *n*-Decan-Lösung in ein Vial mit Inlet gefüllt. Die *n*-Decan-Lösung dient als Tracersubstanz für die interne Kalibrierung der GC und der Umsatzbestimmung. Abschließend werden die Proben in den Autosampler gestellt und

automatisch injiziert und vermessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt mit Hilfe der Xcalibur Software (Thermo).

Das Produkt 1-(3-Pyridyl)ethylamin wird nach der Extraktion und Verdünnung noch zusätzlich derivatisiert, um eine vollständige Trennung auf der Säule zu gewährleisten. Dazu werden 200  $\mu\text{L}$  der verdünnten Probe mit 400  $\mu\text{L}$  Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit am Abdampfblock entfernt und der Rückstand in 200  $\mu\text{L}$  organischen Lösungsmittel aufgenommen. Die restliche Vermessung erfolgt analog.

#### *Schmelzpunktbestimmung*

Die erste grobe Bestimmung der Schmelzpunkte wird mit einem Schmelzpunktgerät EZ Melt (Stanford Research Systems) durchgeführt.

Der Schmelzbereich wird mittels *differential scanning calorimetry* (DSC) untersucht. Dafür wird ein 823e von Mettler-Toledo verwendet. Alle Proben werden im Vorfeld getrocknet und in einen Achatmörser fein zerkleinert. Die verwendeten Temperaturprogramme sind im Anhang aufgeführt.

#### *Bestimmung der Löslichkeit*

Zur Bestimmung der Löslichkeit wird jedes Salz in 1,5 mL destilliertem Wasser gelöst, bis eine übersättigte Lösung entsteht. Diese Lösung wird mindestens einen Tag lang gerührt um eine Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten. Anschließend wird 1 mL der Lösung entnommen und das Lösungsmittel langsam bei 45°C verdampft. Der verbleibende Rückstand wird gewogen und daraus die Löslichkeit bestimmt.

#### *Bestimmung der Reinheit mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie*

Zur Bestimmung der Reinheit der ausgefällten 1-PEA-Salze wird das Signal der H-Atome am IPA als Marker genutzt. Aufgrund der 6 chemisch identischen H-Atome des Amins, wird die integrale Intensität auf 6 festgelegt. Entsprechend der Anzahl an chemisch äquivalenten H-Atomen, wurde die integrale Intensität für die 1-PEA-Salze durch 3 geteilt. Aus dem so bestimmten Verhältnis X:1 von 1-PEA-Salz zum analogen Fällungsprodukt mit dem Donoramin konnte unter Berücksichtigung der quantitativen Ausbeute die Reinheit bestimmt werden.

## 4.5 Aufarbeitungsmethoden

### *Destillation*

Das extrahierte Produktgemisch wird in einen Rundkolben gefüllt und mit einer Destillationsbrücke nach Claisen mit einem Liebigkühler verbunden. Zum Auffangen des Destillats wird eine Spinnenvorlage mit vier kleineren Rundkolben installiert. Zum Heizen wird ein Ölbad mit Siliconöl verwendet.

### *Kugelrohrdestillation*

Für die fraktionierte Destillation wird ein Kugelrohrföfen BÜCHI GKR-51 verwendet. Die Heizrate wird individuell an die jeweiligen Komponenten angepasst und manuell schrittweise erhöht. Die Anzahl an verwendeten Kugeln wird je nach Anzahl der enthaltenen Fraktionen angepasst. Durch Verschieben der Glaskugeln innerhalb des Ofens werden die einzelnen Fraktionen getrennt voneinander in den einzelnen Glaskugeln gesammelt. Die Reinheit der Fraktionen wird anschließend mittels NMR-Spektroskopie überprüft.

### *Vakuumdestillation*

Verwendet wird eine Destillationsbrücke nach Claisen an der eine Spinne mit vier Vorlagekolben angebracht ist. Die Destillationsbrücke ist über einen Schlauch mit der Vakuumpumpe verbunden. Vor Beginn der Destillation wird der gesamte Versuchsaufbau evakuiert. Um einen Siedeverzug eventuell noch vorhandener Lösungsmittelreste zu verhindern wird ein Rührfisch in das zu destillierende Amingemisch gegeben und mit einem Rührwerk gerührt. Anschließend wird die Temperatur des Ölbad langsam auf 30°C erhöht. Nachdem die erste Fraktion vollständig entfernt ist, wird die Vorlage gewechselt und die Temperatur langsam erhöht bis die nächste Fraktion anfängt zu destillieren. Bei 50°C ist die Destillation beendet. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wird anschließend mittels NMR-Spektroskopie überprüft.

### *Säulenchromatografie*

Als stationäre Phase für die Säulenchromatografie wird stets Silica Gel (Aldrich, technical grade, pore size 60 Å, 230 - 400 mesh particle size, 40 – 63 µm particle size) verwendet. Alle verwendeten Lösungsmittel (Faßware) werden im Vorfeld gereinigt. Bei der Aufreinigung von 1-(3-Pyridyl)ethylamin wird EtOAc als Laufmittel verwendet. Um die Protonierung der Amine durch die saure Silica Oberfläche zu verhindern wird 2%vv Triethylamin zur mobilen Phase

gegeben. Nachdem das restliche Edukt und Co-Produkt entfernt wurden, erfolgte die Zugabe von 5%vv Methanol (MeOH) zum Laufmittel wodurch das Produktamin besser eluiert wird. Nach dem Entfernen des Donoramins, wird der MeOH Anteil weiter erhöht (auf bis zu 50%vv). Das Eluat wird per Hand in Reagenzgläsern gesammelt und mittels Dünnschichtchromatografie die Inhalte der einzelnen Fraktionen bestimmt. Alle Fraktionen die Produkt enthalten werden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinheit wird mittels NMR-Spektroskopie überprüft.

#### *Dünnschichtchromatografie*

Die Proben werden mit einem Kapillarröhrchen auf die Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte) aufgetragen. Die Platte wird anschließend in ein Gefäß gestellt in dem sich das verwendete Laufmittel befindet.

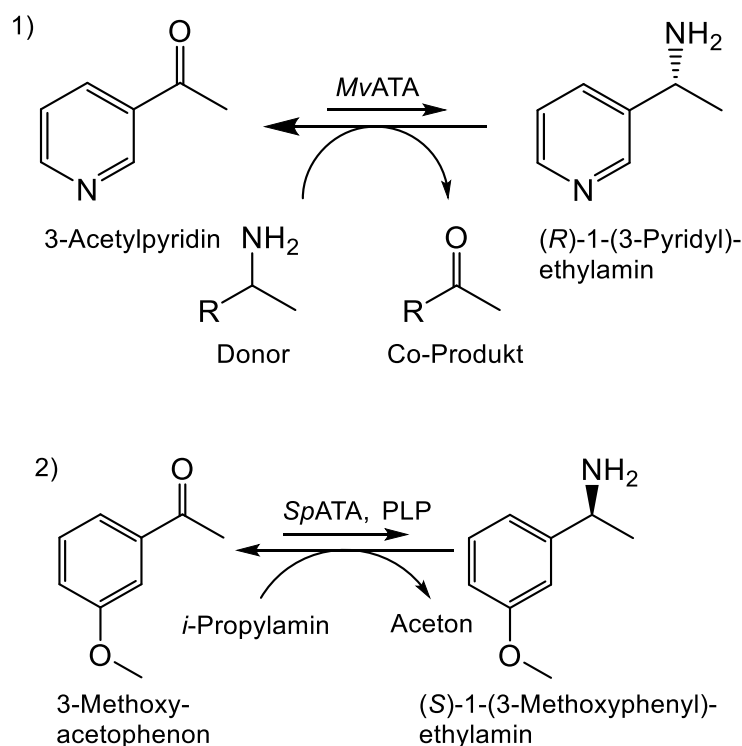
#### *Selektive Extraktion*

Um die Ketone von den Aminen zu trennen, wird der pH-Wert der Reaktionslösung mit einer Säure (z.B. Phosphorsäure) gesenkt und anschließend die Lösung mit *tert*-Butylmethylether (*t*-BME) extrahiert. Aufgrund des niedrigen pH-Werts liegen die Amine im protonierten Zustand ( $\text{NH}_3^+$ ) vor und verbleiben in der wässrigen Phase. Anschließend wird gesättigte Natriumhydroxidlösung ( $\text{NaOH}_{\text{sat}}$ ) dazugegeben wodurch die Amine in den deprotonierten Zustand ( $\text{NH}_2$ ) übergehen und mit *t*-BME extrahiert werden können.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Verschiebung der Gleichgewichtslage durch einen Überschuss an Donoramin

Um die Auswirkung der Donorkonzentration auf die Lage des chemischen Gleichgewichts zu untersuchen, werden die Umsätze von 3-Acetylpyridin zu (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin und von 3-Methoxyacetophenon zu (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin untersucht. Das erste Substrat wird mit der (*R*)-selektiven *Mv*ATA (*Mycobacterium vanbaalenii*) und das Zweite mit der (*S*)-selektiven *Sp*ATA (*Silicibacter pomeroyi*) umgesetzt.



**Schema 9:** Transaminase katalysierte Reaktion von1: 3-Acetylpyridin zu (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin und2: 3-Methoxyacetophenon zu (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin

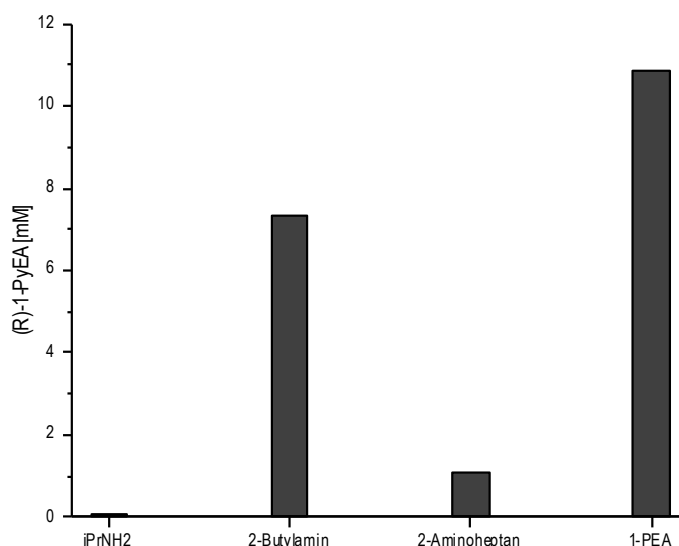
Eine häufig beschriebenen Transaminasereaktionen ist die Umsetzung von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethylamin (1-PEA).<sup>53,69,89-91</sup> Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen 3-Acetylpyridin zu Acetophenon werden die Reaktionsbedingungen der literaturbeschriebenen Beispiele nachempfunden. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur (25°C) in einem 200 mM Natriumphosphatpuffer (NaP-Puffer) mit dem pH-Wert 7,5 durchgeführt. Um den geeignetsten Aminodonor zu identifizieren, werden 20 mM 3-Acetylpyridin mit 500 mM Donoramin umgesetzt. Getestet werden  $\alpha$ -1-Phenylethylamin (1-PEA), *sec*-Butylamin (*sec*-BA), 2-

Aminoheptan (2-AH) und 2-Propylamin (Isopropylamin, IPA). Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass L-Alanin (Ala) keine Aktivität mit der eingesetzten *MvATA* aufweist und für dieses System ungeeignet ist. Die Ergebnisse des Donor Screenings für die Reaktion 1 sind in Tabelle 4 aufgeführt und in Abbildung 6 dargestellt.

**Tabelle 4:** Umsätze Donorscreening für die Reaktion 1

Aminodonor	Umsatz [%]
2-Aminoheptan	12
<i>sec</i> -Butylamin	40
Isopropylamin	0
$\alpha$ -1-Phenylethylamin	57
<i>o</i> -Xylelendiamin	-

3-Acetylpyridin (20 mM); Aminodonor (500 mM); *MvATA* (20 mg) PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 25°C



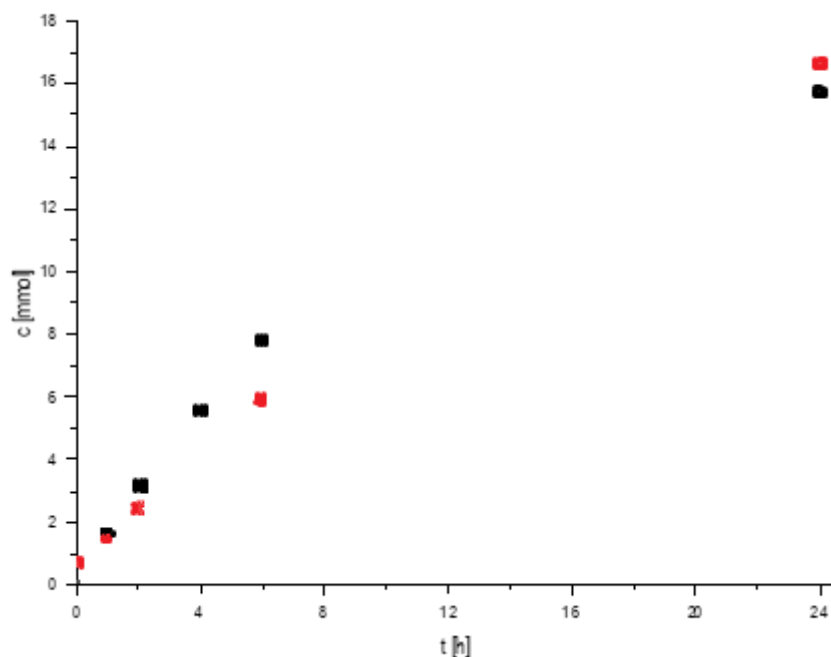
**Abbildung 6:** Umsätze mit unterschiedlichen Aminodonoren für die Reaktion 1

Mit Isopropylamin und 2-Aminoheptan lässt sich in 24 h kaum bis wenig Umsatz erreichen, sie scheiden als möglicher Donor aus, hingegen erscheint 1-PEA sehr geeignet, da bereits unter nicht optimierten Bedingungen 57% Umsatz erzielt werden. Die Ergebnisse passen sehr gut zu denen von Gunderson et al.<sup>65</sup> Diese untersuchten den Einfluss verschiedener Aminodonor und –

akzeptor Paare auf die experimentell bestimmte konzentrationsabhängige Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}^{app}$ , welche genutzt werden kann um eine Aussage über die Lage des chemischen Gleichgewichtes zu treffen. Der größte Wert wird mit 1-PEA erreicht und die Werte für Isopropylamin und Alanin waren mit  $10^{-2}$  bzw.  $10^{-5}$  wesentlich geringer (Wert für 1-PEA auf 1 normiert). In den im Rahmen dieser Arbeit betrachteten System stellt nur sec-BA eine mögliche Alternative dar und wird für den Vergleich weiter untersucht. In Tabelle 4 ist auch *o*-Xylylendiamin aufgeführt, welches erst im späteren Verlauf getestet wurde. Im Sinne der Vergleichbarkeit ist das Ergebnis hier mit aufgeführt, auch wenn das Prinzip bei diesem Donor ein anderes ist. Während die anderen Amine im Überschuss eingesetzt werden um die Gleichgewichtslage zu beeinflussen, entfernt sich *o*-Xylylendiamin nach Abgabe der Amin-Gruppe selbstständig durch Tautomerisierung aus dem System.<sup>77</sup> Durch diese *in situ* Co-Produkt Entfernung soll das Gleichgewicht ebenfalls in Richtung der Produkte verschoben werden. Es kommt zwar zur Bildung eines farbigen Niederschlags, welcher als Indiz für den Umsatz des Amins gilt, aber Produkt kann keines nachgewiesen werden.

Die Wahl des Amindonors und die Methode zur Gleichgewichtsverschiebung sind eng miteinander verknüpft. Ist die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  groß, wird also die Hinreaktion begünstigt, ist der Einsatz eines Überschusses die vielversprechendste Methode.<sup>66</sup> Dies ist für 1-PEA sowohl in der Literatur beschrieben als auch durch die einfache Testreaktion bestätigt und aus diesem Grund wird für die nachfolgenden Untersuchungen der Donor immer im Überschuss eingesetzt. Die Konzentration des Amins bleibt vorerst bei 500 mM, was bei einer Substratkonzentration von 20 mM einem 25-fachen Überschuss entspricht. Unter diesen Bedingungen werden nach 24 h 80% zu (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin (1-PyEA) umgesetzt. Interessanterweise konnte mit sec-BA der gleiche Umsatz erzielt werden, obwohl in den Vortest der Umsatz geringer war. Aus dem Zeitverlauf, dargestellt in Abbildung 7, sieht man deutlich, dass der Umsatz über die gesamte Zeit steigt. Jedoch lässt sich keine Aussage über die Gleichgewichtslage treffen, so dass unklar ist, ob die 80% Umsatz der Gleichgewichtslage entspricht oder nicht. Da die Reaktionszeit auf 24 h festgelegt wurde, kann der Gleichgewichtszustand nur mit einer größeren Menge Enzym erreicht werden.

Zwar sind Umsätze von 80% hoch aber ein 25-facher Überschuss an Donor kein technisch umsetzbares Verhältnis. Bei Substratkonzentrationen größer als 20 mM gelangt man schnell an die Löslichkeitsgrenze von 1-PEA.



**Abbildung 7:** Zeitverlauf des Umsatzes von 3-Acetylpyridin mit verschiedenen Amindonoren; schwarz: 1-Phenylethylamin, rot: *sec*-Butylamin; 20 mg *Mv*ATA; Amindonor (500 mM); PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 25°C

Deshalb wurde in den nächsten Reaktionen, bei gleichbleibender Donorkonzentration, die Substratkonzentration schrittweise erhöht, wodurch das Donor/Akzeptor-Verhältnis immer kleiner wird. Getestet wurden 1-PEA, *sec*-BA und erneut IPA, obwohl in den Vortest damit nur sehr geringe Umsätze erzielt wurden aber der günstige Preis und die strukturellen Unterschiede zum Substrat bieten potenzielle Vorteile. Wie die Ergebnisse Tabelle 4 zeigen, ist IPA aber kein geeigneter Donor für das untersuchte System. Unabhängig von der Größe des Überschusses werden nur etwa 10 mM (*R*)-1-PyEA produziert. Daraus lässt sich ableiten, dass die gewählte Methode, die Gleichgewichtslage zu beeinflussen nicht mit IPA anwendbar ist. Die experimentellen Daten bestätigen damit die Ergebnisse von Gunderson et al. und Tufvesson et al.<sup>65,66</sup>

Bestätigt wird auch 1-PEA als potentester Donor, denn bei allen Verhältnissen werden damit die höchsten Umsätze erzielt. Deutlich wird auch, dass der anfänglich gewählte 25-fache Überschuss unnötig hoch angesetzt war, da mit einem 6-fachen Überschuss die gleiche Menge Produkt entsteht wie mit einem 12,5-fachen (~ 30 mM (*R*)-1-PyEA). Interessanterweise konnte in allen Versuchen der Umsatz noch weiter gesteigert werden, wenn die Enzymmenge erhöht wird.

**Tabelle 5:** Umsatz von 3-Acetylpyridin zu (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin bei höheren Substratkonzentrationen

c(Substrat) [mM]	Amindonor	Umsatz [%]	c(Produkt) [mM]
20	1-PEA	82	16,4
	<i>sec</i> -BA	66	13,2
40	1-PEA	78	31,4
	<i>sec</i> -BA	47	18,6
80	1-PEA	44	35,4
		*97	77,4
	<i>sec</i> -BA	34	27,4
		*38	30,6
100	<i>i</i> PrNH <sub>2</sub>	*13	10,1
	1-PEA	*62	62,1
		†>99	>99,9
	<i>sec</i> -BA	*22	21,5
150		†49	49,1
	<i>i</i> PrNH <sub>2</sub>	*10	10,4
	1-PEA	*42	62,4
		†63	94,5
	<i>sec</i> -BA	†33	49,2
	<i>i</i> PrNH <sub>2</sub>	*10	14,3

20 mg ;MvATA; Amindonor (500 mM); PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 25°C

\*30 mg MvATA

†40 mg MvATA

Da der Katalysator nur die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes beeinflusst, nicht aber die Lage, kann daraus abgeleitet werden, dass die Gleichgewichtslage immer noch nicht erreicht ist. Mit einer weiteren Steigerung der Enzymmenge kann bei einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 5:1 (500 mM/100 mM) sogar ein fast vollständiger Umsatz erzielt werden. Selbst ein Verhältnis von 3:1 reicht aus, um knapp 95 mM Produkt zu erhalten, was den Schluss zulässt, dass das chemische Gleichgewicht deutlich auf Seiten der Produkte liegt. Die Tests haben auch gezeigt, dass 3-Acetylpyridin keine inhibierende Wirkung auf den

Biokatalysator hat. Unabhängig vom eingesetzten Amindonor, werden bei steigender Substratkonzentration und gleicher Enzymmenge die gleichen Umsätze erzielt. Trotzdem wird nicht noch mehr Substrat eingesetzt, da bei gleicher Reaktionszeit nur mehr Enzym zu höheren Umsätzen führt und davon wird aus Kostengründen abgesehen. Mehr Donoramino hat auch keinen Einfluss auf die erhaltene Menge Produkt, da die Tests zeigen, dass mit einem 3-fachen Überschuss die gleichen relativen Ausbeuten erzielt werden wie mit einem 6-fachen. In diesem Fall ist nicht die Lage des Gleichgewichts ausschlaggebend, sondern die Zeit, in der sie erreicht wird. Das ist auch der Grund, warum bei einem 25-fachen Überschuss kein vollständiger Umsatz beobachtet wird. Höhere Donorkonzentrationen sind nicht möglich, da es sowohl bei 1-PEA als auch *sec*-BA zur Inhibierung kommt. Die Tabelle 6 zeigt, dass es bei einer 1 M Lösung 1-PEA zu keinem Umsatz kommt und bei *sec*-BA die Umsätze stark zurückgehen.

**Tabelle 6:** Umsatz von 3-Acetylpyridin zu (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin bei höheren Donorkonzentrationen

Amindonor	c(Donor) [M]	c(3-Acetylpyridin) [mM]	Umsatz [%]
1-PEA	1	40	-
		80	-
	2	80	-
<i>sec</i> -BA	1	40	18
		80	36
	2	80	2

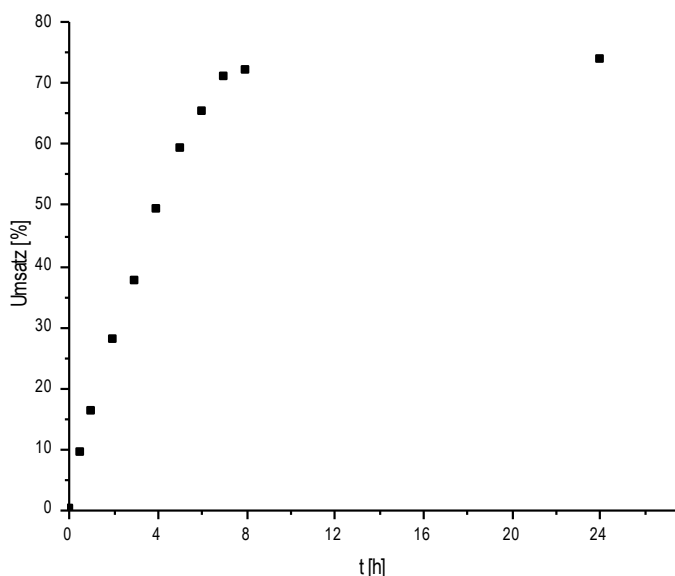
20 mg *Mv*ATA; PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 25°C

Für den Umsatz von 3-Acetylpyridin stellte sich 1-PEA als geeignetster Donor heraus. Zwar konnten mit *sec*-BA ähnliche Umsätze erzielt werden, jedoch nur bei kleineren Substratkonzentrationen, da mit steigender Substratmenge der Umsatz deutlich sank. Bezogen auf die ausgewählte Konzentration von 100 mmol/L 3-Acetylpyridin konnte mit *sec*-Butylamin nur halb so viel Produkt (49%) erzeugt werden wie mit 1-PEA (100%). Daher schied *sec*-Butylamin für die weiteren Anwendungen aus. Die Experimente bestätigten ebenfalls, dass Isopropylamin als Donor für diese Reaktion ungeeignet ist. Auch höhere Enzymkonzentrationen brachten keine Steigerung des Umsatzes. Dadurch wurde deutlich, dass es kein Problem einer zu geringen Reaktionszeit, sondern der Gleichgewichtslage war.

Aus den Ergebnissen der Versuche ergaben sich folgende Reaktionsbedingungen. Die Donorkonzentration bleibt, wie von Beginn an bei 500 mM und die maximale

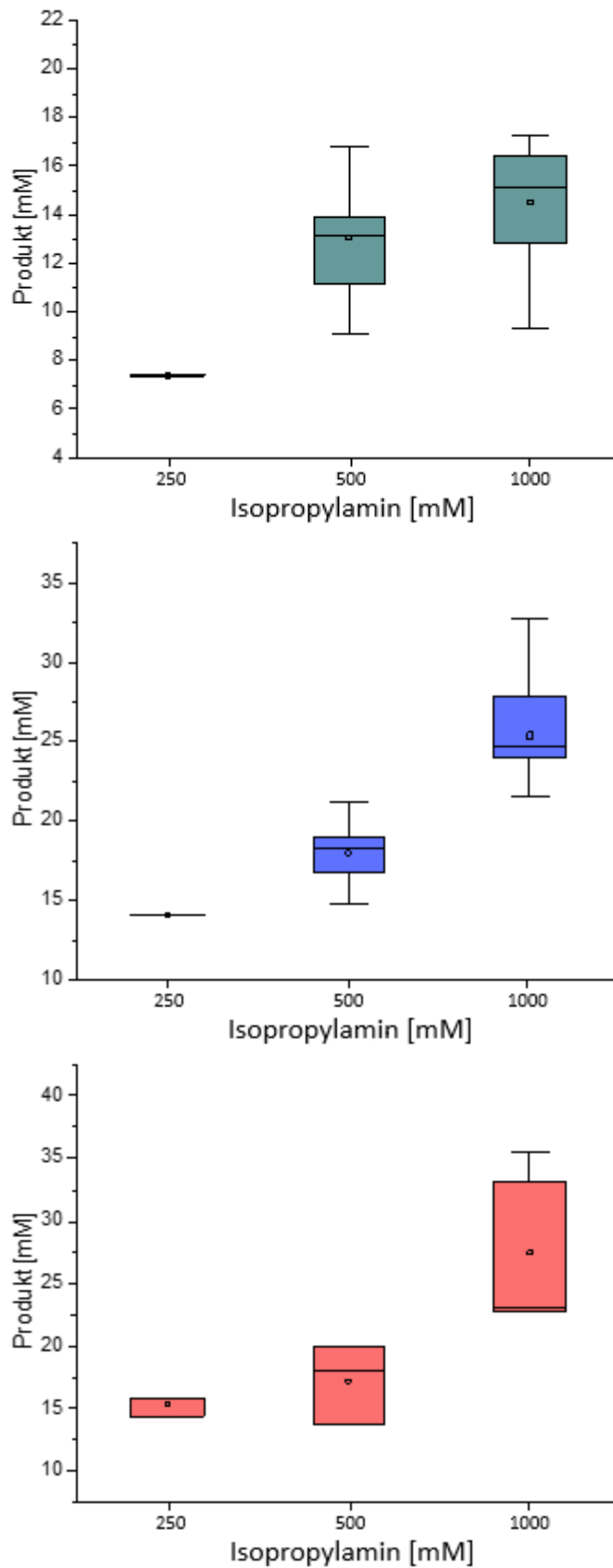
Substratkonzentration liegt bei 100 mmol/L. Unter diesen Bedingungen kann ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht werden, was den Vorteil hat, dass am Ende der Reaktion kaum noch unverbrauchtes Edukt in der Reaktionslösung vorhanden ist, welches wieder abgetrennt werden muss.

Unter den gleichen Gesichtspunkten wurde die Reaktion 2, welche den Umsatz von 3-Methoxyacetophenon zu (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin beschreibt betrachtet. (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin dient als Precursor für Rivastigmin, einem bekannten Alzheimer-Medikament und stellt somit ein potenziell interessantes Produkt dar. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu 3-Acetylpyridin kann bei dieser Reaktion IPA als Donor eingesetzt werden. Ein Vergleich mit der Reaktion 1 kann an dieser Stelle aber nur bedingt gezogen werden, da unterschiedliche Biokatalysatoren verwendet werden und diese unterschiedlich auf verschiedene Amindonoren reagieren. Dennoch unterstreicht das nochmal, dass keine pauschale Aussage darüber getroffen werden kann, welcher Donor und welche Methode zur Gleichgewichtsverschiebung für das gewählte System am besten geeignet ist. Für die Reaktion 1 lag das chemische Gleichgewicht eher auf Seiten der Edukte (Umsatz  $\sim 10\%$ ) und auch größere Mengen IPA haben darauf keinen entscheidenden Einfluss. Die Reaktion 2 erzielt mit einem 50-fachen Überschuss (1 mol/L Amin und 20 mmol/L Substrat) einen 72%igen Umsatz. Dies ist auch gleichzeitig der Gleichgewichtsumsatz, wie die Abbildung 8 zeigt ist nach ca. 8h der maximale Umsatz erreicht. Unter den gleichen Bedingungen werden 50% von 50 mM Substrat (= 25,4 mM Produkt) und 23% von 100 mM Substrat (= 23,1 mM Produkt) umgesetzt.



**Abbildung 8:** Zeitverlauf des Umsatzes von 3-Methoxyacetophenons; *i*-PrNH<sub>2</sub> (1 M); PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 30°C

Bei einem Donor/Akzeptor Verhältnis von 10:1 entsteht also genauso viel Produkt wie bei 20:1, was den Schluss zulässt, dass die Grenzen der Beeinflussung der Gleichgewichtslage erreicht sind. Eine Substratinhibierung kann, wie in Reaktion 1, ausgeschlossen werden, da sowohl 100 als auch 50 mM zu ~25 mM Produkt umgesetzt werden. Es ist auch kein zeitlicher Effekt, da Abbildung 8 deutlich zeigt, dass der Gleichgewichtszustand viel früher erreicht wird. Somit ist der Einsatz einer größeren Enzymmenge nicht ratsam. Um mögliche inhibierende Effekte des Donors auszuschließen, wurden Reaktionen mit 250 mM respektive 500 mM IPA durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 9 dargestellt und es wird deutlich, dass die Steigerung der Donorkonzentration durchaus mehr Umsatz liefert, aber der Effekt ist deutlich geringer als nach den Untersuchungen der Reaktion 1 erwartet. Werden mit einem 2,5-fachen Überschuss bereits 15 mmol/L (*S*)-1-MeOPEA erhalten, führt der Einsatz der 4-fachen Menge (10-facher Überschuss) nur zu 23 mmol/L. Da die Umsätze bei einem 5:1 Verhältnis sowohl bei einer IPA-Konzentration von 250 mM als auch 500 mM in etwa gleich sind, kann auch eine Coprodukt Inhibierung ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche Steigerung ist vermutlich nur durch eine *in situ* Produktentfernung möglich, indem das entstehende Aceton verdampft wird.<sup>66</sup>

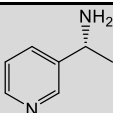
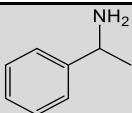
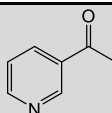
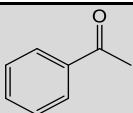


**Abbildung 9:** Umsätze von 3-Methoxyacetophenon mit IPA 250 mM, 500 mM und 1 M IPA; grün: 20 mM Substrat, blau: 50 mM Substrat, rot: 100 mM Substrat

## 5.2 Isolierung von (R)-1-(3-Pyridyl)ethylamin

Für die Isolierung des Produkts wird der Reaktionsansatz, unter Berücksichtigung der im Kapitel 5.1 festgelegten Bedingungen, auf 100 mL vergrößert. Somit ergibt sich bei einem erwarteten Umsatz von >99% knapp 1 g (R)-1-PyEA. Nach Vollendung der Reaktion liegt ein Gemisch aus ein bis zwei Ketonen (je nach Umsatz) und zwei Aminen vor, die in ihrer Struktur und in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften (Tabelle 7) Ähnlichkeiten aufweisen.

**Tabelle 7:** chemische Eigenschaften der Edukte und Produkte

	 <b>(R)-1-PyEA</b>	 <b>α-1-PEA</b>	 <b>3-Acetylpyridin</b>	 <b>Acetophenon</b>
M [g/mol]	122,17	121,18	121,14	120,15
ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	1,018	0,946	1,102	1,033
Sdp [°C]	221	187	220	202
pK <sub>B</sub>	5,19*	4,96*	-	-

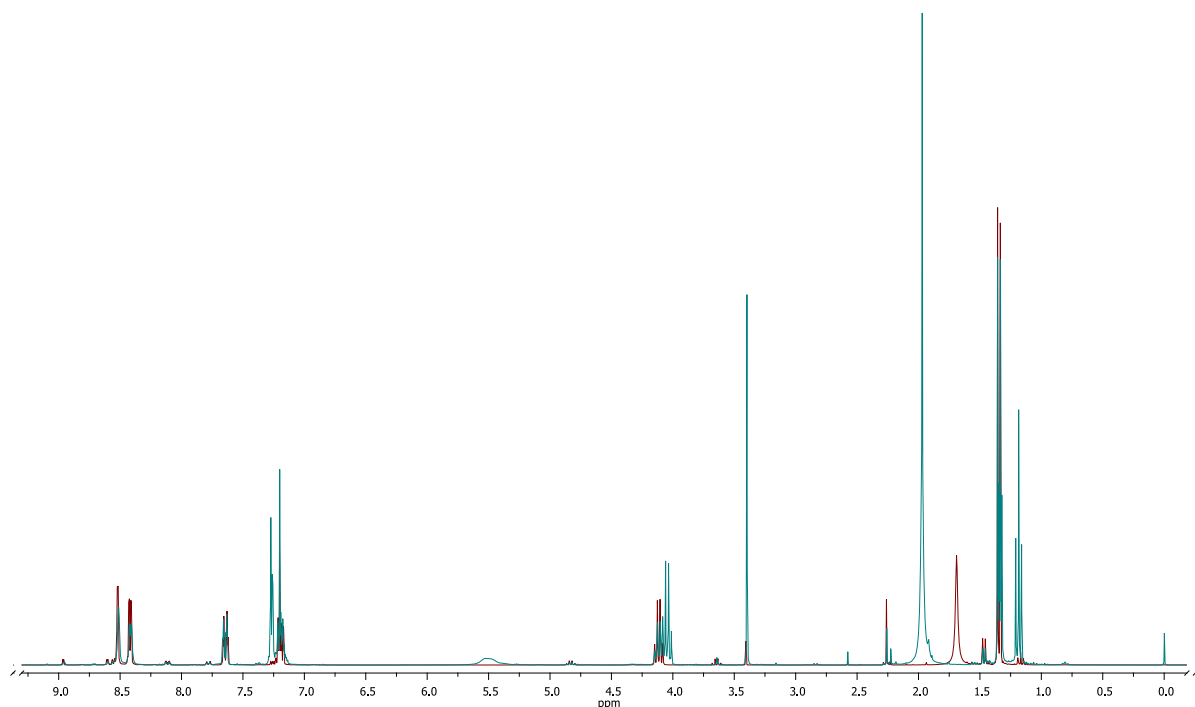
Quelle: SciFinder; \* berechnet mit Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02

Die ersten Versuche der Aufarbeitung wurden mittels flüssig-flüssig Extraktion durchgeführt. Um zunächst die Ketone von den Aminen zu trennen, wird der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe einer Säure (z.B. Phosphorsäure) gesenkt und anschließend die Lösung mit *tert*-Butylmethylether (*t*-BME) extrahiert. Durch die Säure werden die Amine protoniert und können so nicht in der organischen Phase aufgenommen werden. Nach der Extraktion der Ketone wird gesättigte NaOH (NaOH<sub>sat.</sub>) zur wässrigen Phase gegeben, um den pH-Wert wieder zu erhöhen und um erneut mit *t*-BME zu extrahieren. Da ein Überschuss an Donoramin eingesetzt wurde, befindet sich in der organischen Phase ein Gemisch aus dem Donoramin 1-PEA und dem Produktamin (R)-1-PyEA, welches anderweitig getrennt werden muss. Unter Berücksichtigung der pK<sub>B</sub>-Werte der einzelnen Aminkomponenten, kann der pH-Wert der Lösung auch so eingestellt werden, dass nur ein Amin protoniert und das andere extrahiert wird. Aufgrund der ähnlichen pK<sub>B</sub>-Werte (5,19 und 4,96) konnten aber (R)-1-PyEA und 1-PEA nicht vollständig voneinander getrennt werden. Durch die nah beieinander liegenden pK<sub>B</sub>-Werte kommt der Einsatz eines Membranreaktors, wie von Rehn et al. beschrieben, nicht in Frage, da

selbst bei richtig eingestellten pH-Werten immer Teile der anderen Substanz ebenfalls extrahiert werden.<sup>76</sup>

Auch wenn durch die Extraktion keine vollständige Trennung erreicht wird, so wird das Gemisch auf 2 Komponenten reduziert. Wie in Tabelle 7 dargestellt, liegt eine Differenz von 34°C zwischen den beiden Siedepunkten der Amine. Aufgrund dieser Differenz scheint eine Trennung mittels Destillation möglich, konnte in der Praxis jedoch nie erreicht werden. Problematisch ist vor allem, dass das Produkt die höchste Siedetemperatur besitzt und erst als letztes destilliert wird. Praktisch ist es nicht gelungen das (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin zu destillieren, sondern das Produktamin verbleibt immer im Destillationssumpf mit allen Verunreinigungen (z.B. Proteinreste, Rückstände der anderen Komponenten). Zusätzlich setzt während des Destillationsvorgangs eine bräunliche Farbveränderung ein. Die Destillation wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, nach Claissen, mit einer Kugelrohrdestille und sogar im Vakuum, um die thermische Belastung zu minimieren und etwaige Nebenreaktionen zu verhindern. Eine saubere Fraktion (*R*)-1-PyEA konnte unter keinen Bedingungen isoliert werden und stets setzt eine Verfärbung ein. Für eine genauere Untersuchung des Rückstandes wurde die Probe mittels GC/MS (Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie) vermessen. Im Massenspektrum konnte zwar ein Molekülpeak für das *R*-PyEA (122,15 m/z) gefunden werden, aber zusätzlich traten auch andere Signale mit einem höheren Masse zu Ladungsverhältnissen auf. Besonders auffällig war dort das Signal bei 222,26 m/z (Abb. 10). Hierbei könnte es sich um ein Additionsprodukt der Keto- und Aminkomponenten handeln. Das schwarze Chromatogramm zeigt das kommerziell erworbene Enantiomergemisch von 1-(3-Pyridyl)ethylamin. Die rote Linie entspricht der extrahierten organischen Phase nach der Biokatalyse mit dem deutlich sichtbaren Produktsignal bei 15,9 min. Hier ist deutlich erkennbar, dass die verwendete *Mv*ATA sehr selektiv nur das gewünschte (*R*)-Enantiomer umsetzt. In blau ist die Produktfraktion nach der Destillation zu sehen. Im Vergleich zur extrahierten Phase ist kein wesentlicher Unterschied zu sehen. Lediglich durch die Integration der Flächen unter den Kurven war erkennbar, dass eine leichte Abnahme des Produkts eintrat. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Fraktion erneut destilliert, jedoch erkennt man an der grünen Linie deutlich, dass sich das Produkt wahrscheinlich zersetzt hat, denn es ist kaum noch ein Produktsignal zu erkennen.





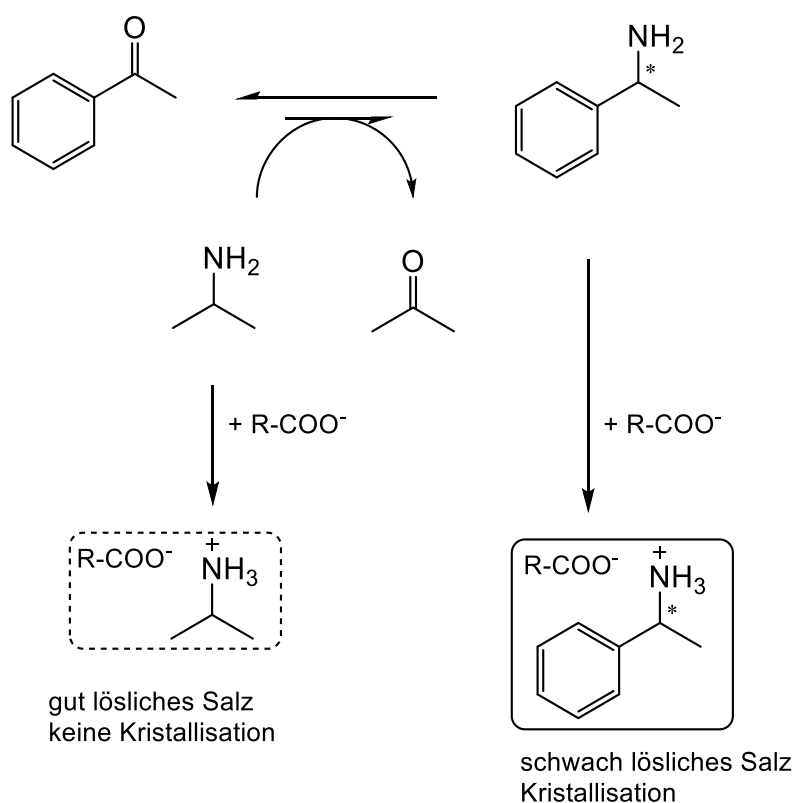
**Abbildung 11:** Vergleich der NMR-Spektren; rot: kommerzielles 1-Pyridylethylamin; blau: synthetisiertes 1-PyEA

### 5.3 Selektive Kristallisation zur Darstellung von chiralen Aminen

Die Untersuchungen aus dem Kapitel 5.1 und 5.2 zeigen, dass es bei TA-katalysierten Reaktionen nicht nur die ungünstige Gleichgewichtslage zu überwinden gilt, sondern je nach gewähltem Amindonor auch die Isolierung des Produkts aufwendig ist. Eine selektive Trennung mit thermischen oder chromatographischen Trennverfahren ist schwierig und mit deutlichen Verlusten der Ausbeute realisierbar. Eine andere Möglichkeit ist das Produkt selektiv aus der Reaktionslösung zu kristallisieren, entweder unter Ausnutzung der Chiralität oder der geringen Löslichkeit. Als Gegenion zum Amin-Kation ( $R-NH_3^+$ ) dient ein Carboxylat-Anion ( $R'-COO^-$ ), welches in Form einer organischen Carbonsäure eingeführt wird. Das Produktamin bildet mit der Säure ein schlecht lösliches Salz, fällt aus und kann einfach per Filtration abgetrennt werden. Anschließend wird das Salz in einer basischen wässrigen Lösung gelöst und das Amin extrahiert.

Man kann sogar einen Schritt weitergehen und das Fällungsmittel von Beginn an oder während der Reaktion in das System geben, so dass entstandenes Produkt direkt gefällt und aus der

Lösung entfernt wird. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben. Dieses Konzept der *in situ* Produkt Kristallisation (ISPC) ist eine Methode der *in situ* Produktentfernung und kombiniert den ersten Schritt der Aufarbeitung mit der Gleichgewichtsverschiebung. Für den Umsatz von 3-Acetylpyridin soll der Fokus aber auf der selektiven Kristallisation zur Isolierung des chiralen Amins liegen.



**Schema 10:** Konzept der *in situ* Produkt Kristallisation (ISPC)

Das Schema 10 zeigt das Konzept der ISPC, wobei die Triebkraft die möglichst geringe Löslichkeit des Produktsalzes ist. Deshalb ist es auch nicht zwingend erforderlich, dass die Carbonsäure nur mit dem Produktamin ein Salz bildet, aber die Löslichkeit sollte deutlich geringer sein als die des Salzes mit dem Donoramin, und vor allem geringer als die Löslichkeit des freien Produktamins sein, damit es zur Fällung kommt.

Da es kein zuverlässiges Konzept zur Vorhersage von Salzbildung bzw. den dazugehörigen Löslichkeiten gibt, wurden die kommerziell verfügbaren Säuren für ein Screening geeigneter Kandidaten ausgewählt. Unter den 79 getesteten Säuren befinden sich aliphatische, aromatische und heteroaromatische Carbonsäuren. Eine vollständige Übersicht über die getesteten Säuren befindet sich im Anhang. Die Amine werden in 2 Gruppen aufgeteilt, wobei die eine Gruppe die potentiellen Donoramine Isopropylamin (**1**), 1-Phenylethylamin (**2**), *sec*-Butylamin (**3**),

L,D-Alanin (**4**) und L-Alanin (**5**) darstellt. Die andere Gruppe besteht aus möglichen Produktaminen wie (*S*)-1-Phenylethylamin (**2a**), (*S*)-1-(3-Chlorphenyl)ethylamin (**2b**), (*S*)-1-(4-Chlorphenyl)ethylamin (**2c**), (*R*)-1-(3-Fluorphenyl)ethylamin (**2d**), (*R*)-1-(4-Fluorphenyl)ethylamin (**2e**), (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin (**2f**), (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)ethylamin (**2g**) und 1-(3-Pyridyl)ethylamin (**2h**). Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** Fällungsverhalten verschiedener Carbonsäuren mit unterschiedlichen Aminen

Donoramine:		Produktamine:	
Isopropylamin	<b>1</b>	( <i>S</i> )-1-Phenylthylamin	<b>2a</b>
<i>rac</i> -1-Phenylethylamin	<b>2</b>	( <i>S</i> )-1-(3-Chlorphenyl)ethylamin	<b>2b</b>
<i>sec</i> -Butylamin	<b>3</b>	( <i>S</i> )-1-(4-Chlorphenyl)ethylamin	<b>2c</b>
<i>L,D</i> -Alanin	<b>4</b>	( <i>R</i> )-1-(3-Fluorphenyl)ethylamin	<b>2d</b>
<i>L</i> -Alanin	<b>5</b>	( <i>R</i> )-1-(4-Fluorphenyl)ethylamin	<b>2e</b>
		( <i>S</i> )-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin	<b>2f</b>
		( <i>R</i> )-1-(4-Methoxyphenyl)ethylamin	<b>2g</b>
		( <i>R</i> )-1-(3-Pyridyl)ethylamine	<b>2h</b>

**Beschreibung des Farbcodes**

	keine Fällung
	wenige Kristalle
	mäßige Fällung
	starke Fällung

	Donoramine [mM]					Produktamine [mM]									
	1		2		3	4	5	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
	1000	250	1000	250	je 100			je 100							
24CNA															
25CNA															
25DHBA															
25FDCA															
26FBA															
2CA															
2DPPA															
2FCA															

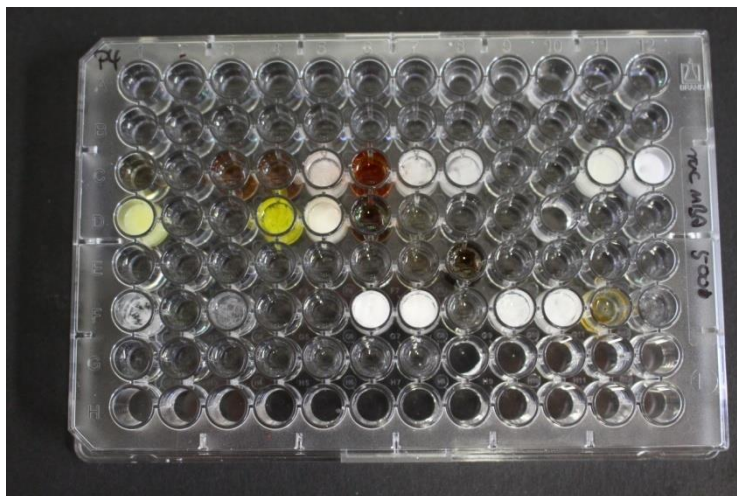
	Donoramine [mM]					Produktamine [mM]									
	1		2		3	4	5	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
	1000	250	1000	250	je 100			je 100							
2HNA															
2TPCA															
32CNA															
34CA															
34HHCAA															
34NA															
35DNOT															
35HBA															
3DPPA															
3FCA															
3NA															
42CNA															
435CNBA															
43CNA															
43HNBA															
4HBA															
AA															
ACC															
APS															
ASA															
BA															
BCA															
BPA															
BTA															
BZA															
CA															
CCA															
CHCA															
CMA															
DBDT															

	Donoramine [mM]					Produktamine [mM]									
	1		2		3	4	5	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
	1000	250	1000	250	je 100			je 100							
DCC															
DPAA	Red		Red	Red			Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	
DQA															
DTA												Red			
FA															
FCA											Green				
FCC															
GA															
GCA															
HA											Green	Green			
HXCA														Green	
INA															
IS											Green				
IVA															
LMA															
LTA															
MA															
NCC															
nNA			Green	Green			Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green		
OA			Yellow	Green											
PA															
PAA															
PCC															
PCPA	Yellow	Green	Red	Red	Green		Red	Red	Red	Red			Yellow	Red	
PFA			Green	Green							Green				
PIA															
PMA															
PPA															
RMA															
SA															

	Donoramine [mM]					Produktamine [mM]									
	1		2		3	4	5	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
	1000	250	1000	250	je 100			je 100							
SBCA															
SCA															
SCCA															
SMA															
TG															
TMPA															
TPA															
TPAA															
TPPA															
VA															
VCA															

Die Lösung für das Screening wurde der Reaktionslösung des Umsatzes von 3-Acetylpyridin nachempfunden, d.h. das Verhältnis Donor zu Akzeptor beträgt 5:1. Die Säure wird bewusst im Überschuss eingesetzt, um sicher zu gehen, dass wirklich eine Niederschlagsbildung einsetzt. In Abbildung 12 ist zu sehen, wie das Screening auf einer 96er Mikrotiterplatte durchgeführt wird. In jedes well wird die Säurelösung vorgelegt und anschließend Aminlösung hinzugefügt. Auf diese Weise wurden alle 11 Amine, unter denen sich auch (*R*)-1-PyEA und (*S*)-1-MeOPEA befand, getestet und die Tabelle 8 angefertigt. Primär lag der Fokus auf Säuren, die im besten Fall sehr gut mit den Produktaminen kristallisieren und gar nicht oder nur schlecht mit den Donoraminen. Aus den Ergebnissen der Tabelle 8 wird deutlich, dass besonders Benzoesäure-Derivate und Benzylbenzen-basierte Carbonsäuren für die Kristallisation geeignet sind. Besonders die Substitution in 3,4- und 2,5-Position scheint die Kristallbildung mit 1-PEA-Derivaten zu begünstigen, da fast alle positiven Ergebnisse von diesen beiden Typen erzielt werden. Hingegen sind die aliphatischen und heteroaromatischen Säuren für die ausgewählten Amine keine geeigneten Salzbildner. Von den angesprochenen Benzoesäuren und Benzylbenzen-basierten Carbonsäuren, wurden insgesamt 7 verschiedene Vertreter identifiziert, die genauer untersucht wurden. Bei den 7 Substanzen handelt es sich um die 5 Benzoesäure Derivate, 4-Chlor-3-Nitrobenzoesäure (43CNA), 2-Chlor-5-Nitrobenzoesäure (25CNA), 3,4-Dichlorbenzoesäure (34CA), 3,4-Dinitrobenzoesäure (34NA) und 2-Chlor-4-

Nitrobenzoesäure (24CNA), sowie die 2 Benzylbenzen-basierten Säuren Diphenyllessigsäure (DPAA) und 3,3-Diphenylpropionsäure (3DPPA).



**Abbildung 12:** Fällungstest auf Mikrotiterplatte

Aus den Ergebnissen der Testreihen kann aber nicht abgeleitet werden ob die Säuren tatsächlich für die selektive Kristallisation geeignet sind, da sie nur die relative Löslichkeit widerspiegeln. Die eigentliche Löslichkeit wird in der Reaktionslösung durch Sekundäreffekte, wie Temperatur und gleichionige Zusätze beeinflusst und kann demnach abweichen. Zur genaueren Charakterisierung wird von allen ausgewählten Säuren das Salz mit den Aminen gebildet. Besonders betrachtet wurden vor allem die Salze der Amine **1** (Donor) und **2a**, **2f** und **2g**- (Produkt). Die Amine **1** und **2f** sind das Donor/Akzeptor-Paar der Reaktion 2. Das Amin (*S*)-1-Phenylethylamin (**2a**) soll für die folgenden Untersuchungen als Produkt darstellen. Um das Konzept der selektiven Kristallisation aus einer Mischung zweier Amine zu etablieren, dient der Umsatz von Acetophenon zu (*S*)-1-Phenylethylamin (**2a**) mit Isopropylamin (**1**) als Modellreaktion.

### **5.3.1 Charakterisierung verschiedener Aminalsalze**

Alle Salze wurden aus Ether gefällt und anschließend die Löslichkeit bestimmt. Besonders auffällig sind die Werte für die Salze aus Isopropylamin und den Chlornitrobenzoesäuren (CNA). Diese liegen im Bereich von 1 M (43CNA), 2 M (24CNA) und sogar 3 M (25CNA) und erfüllen die Anforderung an das Donorsalz, eine hohe Löslichkeit aufzuweisen. Die Löslichkeit der entsprechenden Salze mit dem Produktamin, ist wie erhofft deutlich geringer. Die Löslichkeit des **2a**-25CNA-Salzes war 54-mal geringer (57,0 mmol/L) als die vom entsprechenden Donorsalz (3080,6 mmol/L) und auch mit 43CNA löste sich 46-mal so viel

Donorsalz (992,8 mmol/L) wie Produktsalz (21,7 mmol/L). Übertragen auf das Modellsystem (Mischung aus allen Komponenten in Pufferlösung aber ohne Enzym) würde es zu keiner Fällung des Donoramins kommen, da nicht mehr als 1 M IPA in der Lösung vorhanden ist, sofern keine weiteren unerwünschten Effekte hinzukommen. Die Unvorhersehbarkeit der Löslichkeiten zeigt sich deutlich bei den Salzen mit den anderen Aminen. Sieht das System für IPA und (*S*)-1-PEA noch sehr gut anwendbar aus, so trifft das beim Methoxy-substituierten **2f** nicht mehr zu. Zwar liegen auch hier die Löslichkeiten um den Faktor 25 auseinander, allerdings erweist sich die Löslichkeit des Produktsalzes mit 73,7 mmol/L als zu hoch.

**Tabelle 9:** Löslichkeit der hergestellten Salze in dest. Wasser bei RT

Amin	Säure	c(Salz) [mg/mL]	c(Salz) [mmol/L]
1-Phenylethylamin	25CNA	18,4	57,0
	24CNA	15,9	49,7
	43CNA	7,0	21,7
	DPAA	4,0	12,0
	3DPPA	2,6	7,5
Isopropylamin	25CNA	803,0	3080,6
	24CNA	477,3	1831,1
	43CNA	258,8	992,8
	DPAA	41,8	154,0
	3DPPA	12,1	42,4
( <i>S</i> )-1-(3-Methoxy-phenyl)ethylamin	24CNA	26,0	73,7
	43CNA	7,0	19,8
	34CA	7,0	20,5
	34NA	10,0	27,5
	DPAA	4,0	11,0
	3DPPA	3,6	9,5
( <i>R</i> )-1-(4-Methoxy-phenyl)ethylamin	43CNA	9,0	25,5
	34CA	10,0	29,2
	34NA	11,0	30,3
	DPAA	1,0	2,8
	3DPPA	3,3	8,7

Eine Fällung ist demnach erst möglich, wenn in der Reaktion mehr als 73,7 mmol/L Produkt vorliegen. Solch eine Produktkonzentration konnte in den Versuchen aus Kapitel 5.1 nie erreicht werden. Gleichzeitig bedeutet das auch, dass immer eine größere Menge Produktamin in Lösung bleibt und auf diese Art nicht aufgearbeitet werden kann. Bei einer Reaktion mit 100 mmol/L Edukt und einem theoretisch vollständigen Umsatz, würden trotzdem  $\frac{3}{4}$  des Produkts in Lösung bleiben, was viel zu hoch ist. Positiv zu interpretieren sind die Werte für 43CNA. Das Salz mit **2a** zeigt eine Löslichkeit auf (21,7 mmol/L) die 50x geringer ist als die des korrespondierenden IPA-Salzes (992,8 mmol/L), wodurch es für eine selektive Kristallisation geeignet scheint. Auch die Salze mit den anderen Produktaminen **2f** und **2g** zeigen eine geringe Löslichkeit (19,8 mmol/L respektive 25,5 mmol/L). Ein anderes Bild ergibt sich mit den Benzylbenzen-basierten Säuren. Die Löslichkeit der IPA-Salze mit DPAA und 3DPPA sind mit 154,0 mmol/L respektive 42,4 mmol/L wesentlich geringer. Allerdings weisen die korrespondierenden Salze mit dem Produktamin (S)-1-PEA die geringste Löslichkeit auf (12,0 mmol/L DPAA; 7,5 mmol/L 3DPPA). Der Trend setzt sich auch für das Amin **2f** fort. Das Salz mit 3DPPA besitzt die kleinste Löslichkeit aller Salz mit diesem Amin, wenn auch die Differenz zum Donorsalz nicht so groß ist. Mit 42,4 mmol/L liegt nur ein Faktor 4,5 zwischen beiden Werten. Die anderen noch getesteten Säuren 24CNA, 34CA und 34NA scheinen nicht geeignet, da entweder die Differenz der Löslichkeit zu gering ist oder die Löslichkeit des Produktsalzes zu hoch.

Das Ausbleiben einer Niederschlagsbildung im Screening ist nicht immer gleichbedeutend mit einer fehlenden Salzbildung. Oftmals ist die Löslichkeit des entsprechenden Salzes zu hoch und es bleibt in Lösung. Das bedeutet, dass es sich bei dem Trennproblem im Grunde um die Trennung zweier Salze durch selektive Kristallisation handelt.

Um zwei Stoffe möglichst effektiv zu trennen, ist die Kenntnis über das Phasenverhalten von Vorteil. Für die Bestimmung des Phasendiagramms ist wiederum die Kenntnis über die Schmelzpunkte der jeweiligen Salze notwendig. Im Folgenden werden die Salzpaare und Schmelzpunkte für die Amine IPA und (S)-1-PEA bestimmt. Die Bestimmung der Schmelzpunkte dient zum einem der genaueren Charakterisierung der Salze und zum anderen deutet die Differenz der Schmelztemperaturen zwischen zwei Salzen auf die Lage eines möglichen Eutektikums hin. Eine große Differenz ist dabei wünschenswert, weil dann meist das Eutektikum nahe an einer der beiden Komponenten liegt. Dadurch entsteht ein großer Bereich, aus dem nur eine Komponente kristallisiert werden kann. Um einen groben Richtwert für den Schmelzpunkt zu haben, werden alle Salze zuerst auf einem Schmelzpunktgerät EZ

Melt vermessen und die Schmelzbereiche optisch bestimmt. Die genaue Bestimmung erfolgt anschließend durch die *differential scanning calorimetry* (DSC).

**Tabelle 10:** Schmelzpunkte der Salze

Amin	Säure	S <sub>mp</sub> [°C]
1-Phenylethylamin	25CNA	184,7
	24CNA	204,4
	43CNA	184,0
	DPAA	164,6
Isopropylamin	25CNA	114,7
	24CNA	182,6
	43CNA	146,3
	DPAA	141,3

Ausgehend von den gemessenen Löslichkeiten werden zunächst die Salze der beiden Carbonsäuren 25CNA und 43CNA genauer charakterisiert (Tabelle 10). Die gemessenen Schmelzpunkte zeigen eine große Differenz zwischen den jeweiligen Isopropylamin- und (*S*)-1-Phenylethylaminsalzen. Die Schmelzpunkte der **2f**-Salze liegen mit 184,7°C (aus 25CNA) und 184,0°C (aus 43CNA) in einem sehr ähnlichen Bereich. Die korrespondierenden Salze mit *i*PrNH<sub>2</sub> hingegen weisen einen deutlichen Unterschied auf. Das Salz aus 25CNA besitzt mit 114,7°C sogar einen recht niedrigen Schmelzpunkt, wohingegen das 43CNA-Salz erst bei 146,3°C schmilzt. Auch wenn die Schmelzpunkte bei den 25CNA-Salzen mit einer Differenz von 70°C deutlicher auseinander liegen als bei den entsprechenden 43CNA-Salzen ( $\Delta T = 37,7^\circ\text{C}$ ), lässt sich für beide ein Eutektikum ableiten, welches stark auf Seiten der IPA-Salze liegt.

Die erstellten binären Phasendiagramme bestätigen die Annahme. Beide Phasendiagramme zeigen ein einfaches eutektisches Verhalten, bei dem das Eutektikum sehr nahe beim reinen IPA-Salz liegt. Das experimentell bestimmte Eutektikum  $x_{\text{eu}}$  für das Salzpaar der Carbonsäure 25CNA befindet sich bei ca. 108°C und einer Zusammensetzung von  $x_{\text{eu}} = 0,15$ . Es liegt damit sehr weit auf Seiten des Donoraminsalzes (IPA-25CNA) und im 2-Phasendiagramm (Abb. 13) ergibt sich ein großes Gebiet unter der Liquiduskurve aus dem theoretisch selektiv das Produktamin (*S*)-1-PEA auskristallisiert werden kann. Unterstützt werden die gemessenen

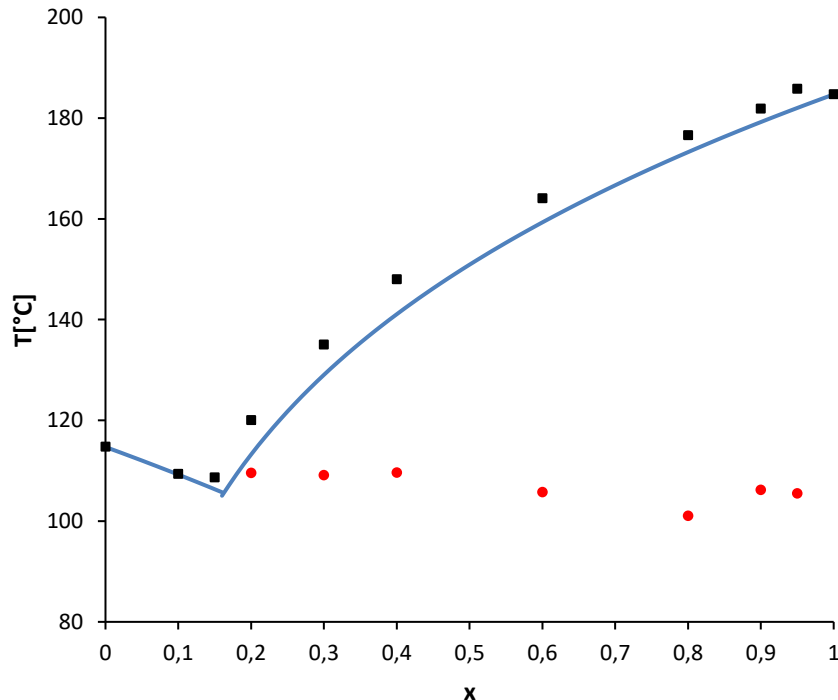
Werte zusätzlich durch die Schröder-van-Laar Gleichung, mit der die Schmelztemperatur für jede Zusammensetzung zu berechnet werden kann.

$$\ln x = \frac{\Delta H_{fus,S}}{R} \left( \frac{1}{T_{fus,S}} - \frac{1}{T_{fus}} \right)$$

$$T_{fus} = \left( \frac{1}{T_{fus,S}} - \left( \ln x * \frac{R}{\Delta H_{fus,S}} \right) \right)^{-1}$$

Trägt man die berechneten Temperaturen beider Salze in ein Diagramm ein, erhält man am Schnittpunkt das Eutektikum, wobei es sich um eine theoretische Vorhersage auf Basis vieler Vereinfachungen in der Herleitung der Gleichung handelt. Nach Schröder-van-Laar befindet sich für das System mit 25CNA das Eutektikum bei  $x_{eu} = 0,16$  und einer Temperatur von  $105,7^{\circ}\text{C}$ . Aus der Abbildung 13 kann man sehr gut erkennen, dass die Berechnungen die experimentell bestimmten Werte sehr gut unterstützen.

Für die zweite getestete Säure 43CNA ergibt sich ein ähnliches Bild. Auch hier liegt das Eutektikum sehr asymmetrisch auf Seiten des Donoraminsalzes ( $x_{eu} = 0,2$ ;  $T = 133,0^{\circ}\text{C}$ ). Dadurch entsteht auch in diesem System ein großes Phasengebiet aus dem selektiv das Produkt auskristallisiert werden kann. Somit scheinen beide Säuren (25CNA und 43CNA) gut geeignet für das Aufarbeiten einer Aminmischung durch selektive Kristallisation zu sein.



**Abbildung 13:** Binäres fest-flüssig Phasendiagramm der Aminsalze von 25CNA; iPrNH<sub>2</sub>-Salz:  $x = 0$ , 1-PEA-Salz:  $x = 1$ ; blau: berechnetes Schmelzverhalten nach Schröder-van-Laar; rot: gemessene eutektische Temperatur

### 5.3.2 Selektive Kristallisation aus einer Aminmischung

Für die selektive Kristallisation einesamins aus einer Mischung wird die Reaktionslösung den Konzentrationsverhältnissen einer realen TA-katalysierten Reaktion nachempfunden, d.h. es liegt 5-mal mehr Donoramin IPA (**1**) als Produktamin (*S*)-1-PEA (**2a**) vor. Um den Einfluss der Säurekonzentration auf die Menge an Niederschlag und die Reinheit des isolierten Produktsalzes zu untersuchen, bleibt die Konzentration der Amine während aller Versuche konstant und nur die Menge und Zuflussrate der Carbonsäure wird variiert.

Dem Gesetz von LE CHATELIER folgend, steigt die Menge an **2a**-Salz an, je mehr Carbonsäure in das System gegeben wird. Eine Erhöhung der 25CNA Konzentration von anfänglich 150 mM auf 1500 mM, führt zu einem Anstieg der Ausbeute von 31% auf 92% und das, obwohl die Löslichkeit des Produktsalzes **2a**-25CNA mit 57,0 mmol/L größer ist als die sich im System befindlichen 50 mmol/L **2a**. Durch einen überstöchiometrischen Anteil an Carbonsäure erhöht sich der gleichionige Zusatz ( $R-COO^-$ ) in der Lösung, was zu Folge hat, dass mehr Produktkation ( $R-NH_3^+$ ) in Form von **2a**-Salz aus der gesättigten Lösung ausfällt.

**Tabelle 11:** selektive Kristallisationsversuche mit 25CNA

Versuch	c(IPA) [mM]	c(1-PEA) [mM]	c(25CNA) [mM]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]
1	100	20	80	-	-
2	250	50	150	31	98
3	250	50	200	36	97
4	250	50	250	40	98
5	250	50	400	58	96
6	250	50	1500	92	95

An diesem Beispiel wird erneut deutlich, dass die bestimmten Löslichkeiten der Salze in den Modelllösungen nicht denen in einem realen System entsprechen, sondern die gemessenen Werte lediglich als Maß zur Abschätzung des realen Verhaltens dienen.

Durch den Überschuss an Carboxylat-Ionen wird aber nicht nur das Produktamin aus der Lösung verdrängt, sondern auch das Donoramin, zusehen ist dies an der abnehmenden Reinheit (98% in Versuch 2 zu 95% in Versuch 6). Für die Optimierung gilt es also eine Säurekonzentration zu finden, mit der möglichst viel Produkt, aber so wenig wie möglich Donor gefällt wird. Die Versuche zeigen jedoch, dass das Konzept der selektiven Kristallisation aus

einer Mischung funktioniert. Überschüssiges IPA kann nach dem Lösen der Salze und Extrahieren der Amine durch verminderten Druck entfernt werden. Allerdings können zufriedenstellende Ausbeuten nur mit sehr hohen Säurekonzentrationen erreicht werden, was wiederum eine schlechte Atomeffizienz bedingt.

Das gleiche Konzept wird auf die zweite Carbonsäure 43CNA übertragen (Tabelle 12), nur wird dieses Mal der Überschuss an Carbonsäure geringer gehalten und überschreitet nicht ein Verhältnis von 8:1 (bezogen auf das Amin **2a**). Begründet wird das mit den Erfahrungen aus den Versuchen mit 25CNA und vor allem mit der wesentlich geringeren Löslichkeit des Produktsalzes **2a**-43CNA von 21,7 mmol/L. Diese ist geringer als die Konzentration an gelöstem **2a** und demnach sollte weniger Carbonsäure notwendig sein, um das Produkt aus der Lösung zu verdrängen. Zur Untersuchung des Kristallisationsverhaltens zwischen Produkt und Carbonsäure wurde in Versuch 10 bewusst auf die Zugabe von IPA verzichtet. Mit einem 4-fachen Überschuss 43CNA können 91% (= 45,5 mmol/L) des gelösten Amins (*S*)-1-PEA auskristallisiert werden. Bessere Ausbeuten können nur mit einem größeren und oder anderem Überschuss erzielt werden.

Für dieses System kommt der aber nicht von der Carbonsäure, sondern vom Donoramin. Durch das Einbringen von IPA, welches gut mischbar mit Wasser ist, wird das schlechter lösliche (*S*)-1-PEA aus der Lösung in Form von 43CNA-Salz gefällt. Das Prinzip ist also das Gleiche wie bei den Tests der Tabelle 11, nur das Ion, mit dem die Lösung übersättigt wird, ist ein anderes. In Hinblick auf das reale System ist es auch sinnvoller, das Donoramin im Überschuss einzusetzen, da es ohnehin schon im Überschuss vorliegt, um die Gleichgewichtslage zu beeinflussen.



**Abbildung 14:** Versuchsaufbau für Kristallisationsuntersuchungen: temperierter Reaktor mit Kryostat, Rührer, Temperaturfühler und Kanüle mit angeschlossener Pumpe

**Tabelle 12:** selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA

Versuch	c(IPA) [mM]	c(1-PEA) [mM]	c(43CNA) [mM]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]
1	250	10	200	31	98
2	250	25	25	-	-
3	250	25	50	37	99
4	250	25	100	63	99
5	250	25	150	80	99
6	250	25	200	75	94
7	250	25	200	81	99
8	1000	25	200	77	90
9	1000	25	200	90	89
10	0	50	200	91	>99
11	250	50	50	52	99
12	250	50	100	79	98
13	250	50	150	85	99
14	250	50	200	89	94
15*	250	50	200	93	99
16	500	50	200	88	98
17	1000	50	200	93	88
18	1000	50	200	91	94

\* Lösung für 16 h gerührt

Die Reaktionsbedingungen begünstigen also diese Aufarbeitungsmethode. Abgesehen von einer schlechten Atomeffizienz wäre aber auch der Einsatz von mehr Carbonsäure ebenfalls unproblematisch, da es lediglich der Isolierung des Produkts dient und keinen Einfluss auf die Reaktion hat. Es ist trotzdem günstiger einen Überschuss IPA einzusetzen, da dadurch die Reinheit des gefällten Produkts verbessert wird, zumindest bis zu einem gewissen Grad. Der gleichionige Zusatz besteht dieses Mal aus den IPA-Kationen ( $i\text{PrNH}_3^+$ ), welche das Produktamin und die Säure aus der Lösung verdrängen, zu erkennen an der Reinheit >98% bei vielen Versuchen. Ab Konzentrationen über 500 mM IPA nimmt die Reinheit aber wieder ab, da der Exzess so groß ist, dass auch IPA-Salz ausfällt. Eine bessere Methode die Ausbeute und Reinheit zu steigern, ist durch eine Verlängerung der Reaktionszeit. Im Versuch 15 der Tabelle 12 wurde nach der Zugabe der Carbonsäure die Lösung nicht nur 30 min gerührt, sondern für

insgesamt 16 h. Das Gleichgewicht hatte mehr Zeit sich einzustellen, was sich in einer höheren Ausbeute (93%) und Reinheit (99%) widerspiegelt.

Im Vergleich der beiden Carbonsäuren sind die Ausbeuten mit 43CNA größer als mit 25CNA, was aber nicht verwundert, denn die Löslichkeit von **2a**-43CNA (21,7 mmol/L) ist um mehr als 50% kleiner als bei **2a**-25CNA. Bezüglich der Reinheit des isolierten Salzes gibt es keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Carbonsäuren, denn in beiden Systemen liegt die Reinheit zwischen 94% und 98%. Im Durchschnitt findet sich bei 43CNA ein höherer Reinheitsgrad, das liegt aber wie bereits besprochen an den unterschiedlichen gleichionigen Zusätzen in beiden Systemen, insofern kann diese Eigenschaft nur bedingt diskutiert werden. Eine Möglichkeit das Reaktionssystem zu manipulieren und gezielt die Kristallisation einer Komponente auszulösen, ist die Zugabe eines Impfkristalls kurz vorm Einsetzen der Kristallisation (Abbildung 15 oben). Die Zugabe der Säure wird kurz unterbrochen und ein Kristall des gewünschten Produktsalzes hinzugegeben. Der optimale Zeitpunkt für die Zugabe ist, wenn die Lösung bereits mit dem Produktsalz übersättigt ist, aber die Kristallisation noch nicht einsetzt. Dieser Bereich, in dem sich das System befindet, wird metastabile Breite genannt. Eine wirkliche Erhöhung der Ausbeute wird auf diese Weise aber nicht erreicht, da das Löslichkeitsprodukt der Lösung durch den Impfkristall unbeeinflusst bleibt (Tabelle 13 und 14). In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss der Flussrate, mit der die Säure hinzugefügt wird, untersucht. Ein langsames Hinzufügen verhindert, dass die Säurekonzentration an der Eintropfstelle in der Reaktionslösung, kurzzeitig zu hoch wird und ebenfalls Isopropylamin ausfällt. Zudem gewährleistet eine langsamere Zugabe eine gleichmäßigere Verteilung.

Jedoch hat auch das Verringern der Flussrate von 0,75 mL/min auf 0,1 mL/min keinen nennenswerten Effekt auf das Ergebnis der Kristallisation. In der Tabelle 13 kann man sehen, dass die Ausbeuten und Reinheit bei fast allen Versuchen gleich sind. Auf dem ersten Blick scheint sich eine geringere Zugabegeschwindigkeit positiv auf die Reinheit auszuwirken, aber eine langsamere Zugabe bedeutet auch mehr Zeit für das System die Gleichgewichtslage zu erreichen. Um das zu überprüfen wird ein Versuch bei der ursprünglichen Flussrate von 0,75 mL/min durchgeführt, aber der Ansatz so lange gerührt wie bei einer Zugabe mit 0,1 mL/min und wie erwartet steigt die Reinheit auf den gleichen Wert. Um effektiv die Ausbeute und Reinheit zu erhöhen, muss das optimale Konzentrationsverhältnis aller an der Kristallisation beteiligten Komponenten gefunden und dem System ausreichend Zeit zum Erreichen des Gleichgewichtszustands gegeben werden.

**Tabelle 13:** selektive Kristallisationsversuche mit 25CNA und Impfkristall

Versuch	c( <i>i</i> PrNH <sub>2</sub> ) [mM]	c(1-PEA) [mM]	c(25CNA) [mM]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]
1	250	50	200	36	98
2	250	50	200	40	97
3	250	50	200	44	97
4	250	50	200	39	96
5	500	50	200	38	97
6	500	50	200	37	96
7	1000	50	200	38	94

**Tabelle 14:** selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA und Impfkristall

Versuch	c(IPA) [mM]	c(1-PEA) [mM]	c(43CNA) [mM]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]
1	250	50	200	86	99
2	250	50	200	86	99
3	250	50	200	87	98
4	250	50	200	87	99

**Tabelle 15:** selektive Kristallisationsversuche mit 43CNA und verschiedenen Flussraten

Versuch	c(IPA) [mM]	c(1-PEA) [mM]	c(43CNA) [mM]	Flussrate [mL/min]	Ausbeute [%]	Reinheit [%]
1	250	50	200	0.1	88	98
2	250	50	200	0.25	89	98
3	250	50	200	0.75	89	94
4	250	50	200	0.75	*93	*99

\* Lösung für 16 h gerührt

Bisher wurden nur Benzoessäure Derivate für den Einsatz zur selektiven Kristallisation betrachtet. In den Screenings und Vortests zeigten aber auch zwei Benzylbenzen-basierte Carbonsäuren, die Diphenyllessigsäure (DPAA) und 3,3-Diphenylpropionsäure (3DPPA), Potential. Besonders das Salz aus DPAA und dem Produktamin (*S*)-1-PEA wies in den Vortests eine geringe Löslichkeit (12 mmol/L) auf, wurde aber zunächst nicht weiter beachtet, da die

Löslichkeit des Isopropylaminsalzes im Vergleich zu den beiden Benzoesäurederivaten sehr gering war. Überraschenderweise können mit DPAA die besten Ergebnisse in der Modellreaktion erzielt werden. Ausbeuten von >99% werden weder mit 43CNA noch 25CNA erreicht (Tabelle 14). Die Bedenken aufgrund der geringen Löslichkeit des IPA-DPAA-Salzes (154 mmol/L) könne das Produkt nicht selektiv genug kristallisiert werden, scheinen unbegründet, denn mit einer Reinheit von 97% befindet sich der Wert im gleichen Bereich wie mit 25CNA.

**Tabelle 16:** selektive Kristallisationsversuche bei verschiedenen Flussraten

<b>Säure</b>	<b>c(IPA)</b> <b>[mM]</b>	<b>c(1-PEA)</b> <b>[mM]</b>	<b>c(Säure)</b> <b>[mM]</b>	<b>Ausbeute</b> <b>[%]</b>	<b>Reinheit</b> <b>[%]</b>
25CNA	250	50	200	36	97
43CNA	250	50	200	86	99
DPAA	250	50	200	>99	97

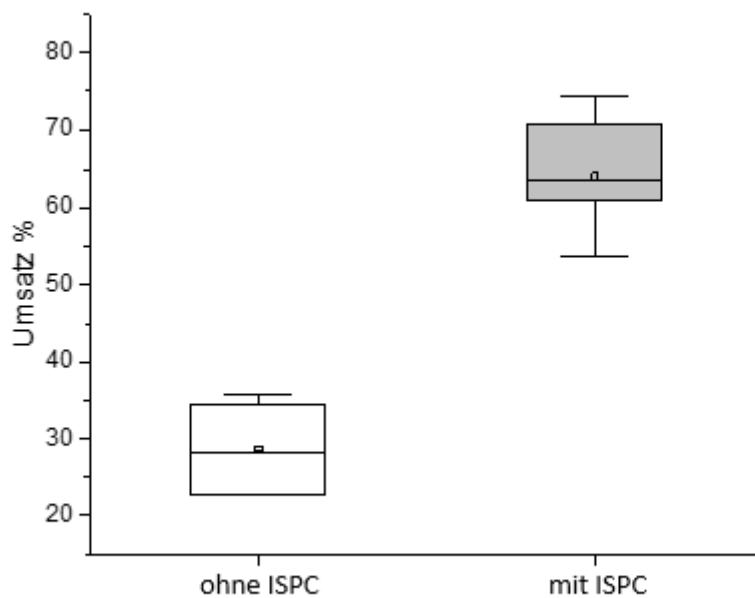
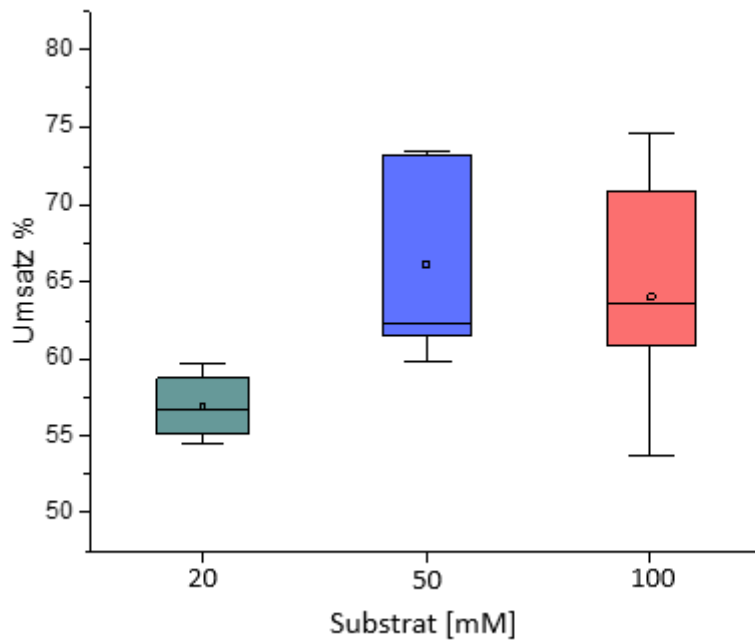


**Abbildung 15:** oben: einsetzende Kristallisation; unten: vollständige Fällung

### 5.3.3 ISPC mit 3,3-Diphenylpropionsäure

Die oben gezeigten Ergebnisse fokussieren sich ausschließlich auf die Aufarbeitung der Amine aus den jeweiligen Reaktionsmischungen. Die gezeigten hohen Ausbeuten in Verbindung mit der ebenso hohen Selektivität ermöglichen auch den Einsatz während der Reaktion, als in situ Produkt Kristallisation (ISPC). Durch das Ausfällen auch geringer Konzentrationen an Amin, wird das chemische Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben und gleichzeitig die Aminmischung aufgearbeitet. Der technische Aufwand ist zudem sehr gering, da die Carbonsäure lediglich der Reaktionslösung hinzugefügt wird. Die Untersuchung der Auswirkung der Säure auf die Enzymaktivität kann aber nicht mit dem Standardassay erfolgen, da die Benzyl-Gruppe der Säuren im UV/VIS Spektrum ebenfalls bei 245 nm absorbiert. Deswegen werden die Umsätze von Acetophenon zu (S/R)-1-Phenylethylamin mit und ohne Zusatz der Säure gemessen und verglichen (Abb. 16). Getestet werden 7 verschiedene (R)- und (S)-selektive Transaminasen (*Aspergillus fumigatus* (AfATA), *Gibberella zeae* (GzATA), *Neosartorya fischeri* (NfATA), *Aspergillus oryzae* (AoATA), *Aspergillus terreus* (AtATA), *Mycobacterium vanbaalenii* (MyATA) und *Silicibacter pomeroyi* (SpATA)). Die Benzoesäure Derivate 25CNA und 43CNA inhibieren den Umsatz mit fast allen Enzymen vollständig. Lediglich die (R)-selektive MyATA zeigt Toleranzen gegenüber den Carbonsäuren, die zwar für das Downstream-processing eingesetzt werden können, aber für die ISPC ungeeignet sind. Auch die Benzylbenzen-basierte Säure DPAA wirkt inhibierend auf 5 der 7 Biokatalysatoren, allerdings führt der Zusatz bei MyATA und SpATA nur zu einer geringen Absenkung des Umsatzes. Die strukturell ähnliche 3,3-Diphenylpropionsäure (3DPPA) hingegen hat keinen Einfluss auf das Enzym SpATA und wird deshalb für die ISPC eingesetzt. Bedingt wird das u.a. durch die geringe Löslichkeit der Säure im Puffersystem mit  $\leq 25$  mmol/L, wodurch der größte Anteil als Feststoff im Reaktionssystem verbleibt. Interessanterweise bildet 3DPPA mit dem Produktamin (S)-1-MeOPEA auch das Salz mit der geringsten Löslichkeit (9,5 mmol/L), eine Eigenschaft die perfekt in das Konzept der ISPC passt. Zwar ist die Löslichkeit des korrespondierenden IPA-Salzes (Donoramin) mit 42,4 mmol/L von allen getesteten Säuren am geringsten, aber die Ergebnisse aus Kapitel 5.3.2 haben gezeigt, dass dies kein Ausschlusskriterium für eine selektive Kristallisation ist. Zur Sicherstellung einer vollständigen Kristallisation, wurde 3DPPA im leichten Überschuss von 1.25 eq eingesetzt. Der positive Effekt von 3DPPA auf den Umsatz ist deutlich sichtbar anhand der Steigerung des Umsatzes auf über 60%, während ohne Zusatz nur 20-25% erzielt werden (Abb. 17 unten). Eine Erhöhung des Umsatzes ist auch bei höheren Substratkonzentrationen zu erkennen (Abb. 17 oben) und erst ab Substratkonzentrationen größer als 100 mM sank der Umsatz, wobei hier eher die

tatsächliche Produktkonzentration betrachtet werden sollte anstatt des prozentualen Umsatzes (Tab. 17).



**Abbildung 16:** Umsätze mit ISPC; oben: bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (grün: 20 mM, blau: 50 mM, rot: 100 mM); unten: ohne ISPC (weiß) und mit ISPC (grau).

Auffällig ist jedoch, dass die Umsätze bei kleineren Konzentrationen von 20 mM geringer sind als mit einem einfachen Überschuss an Donoramin. Damit wurde der Gleichgewichtsumsatz von 72 % bereits nach 8 h erreicht, wohingegen sich mit 3DPPA dieser erst nach 24 h einstellt und auch noch geringer ist (zwischen 55-60%).

**Tabelle 17:** Umsätze der Reaktion von 3-Methoxyacetophenon zu (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin mit 3DPPA

<b>c(Substrat)</b> <b>[mM]</b>	<b>c(Säure)</b> <b>[mM]</b>	<b>Umsatz</b> <b>[%]</b>	<b>c(Produkt)</b> <b>[mM]</b>
20	75	60	11,9
		56	11,1
		55	10,9
		*70	13,9
50	125	62	31,2
		62	30,8
		*74	37,1
		*73	36,6
		*74	36,8
100	125	61	61,4
		†43	43,1
		†41	41,2
		*71	71,1
		*75	74,6
		*33	66,2
200	220	†19	38,8
		†20	39,4
		*23	70,2
300	320	†6	18,0
		†6	17,7

\* Reaktionszeit 7 d; † isolierte Ausbeute

Erst nach einer Reaktionszeit von 7 Tagen können ähnliche Umsätze (70%) erzielt werden. Für die geringeren Umsätze nach 2 Tagen gibt es zwei Ursachen. Zum einen wird eine geringere Donorkonzentration (250 mM) eingesetzt, da die Gleichgewichtsverschiebung durch die ISPC

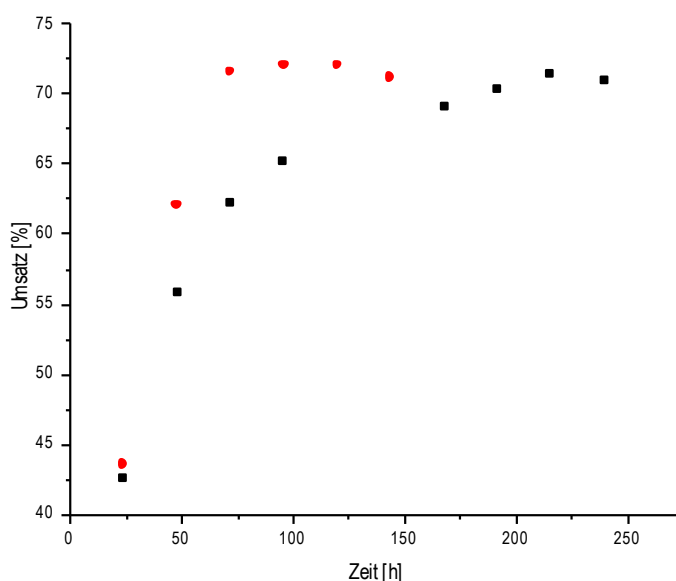
erfolgen soll und um das Auskristallisieren von IPA zu verhindern. Damit die Kristallisation einsetzen kann, müssen mindestens 9,5 mmol (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin in der Lösung vorliegen, was bei 20 mmol Substrat einem Umsatz von fast 50% entspricht. Da bei der ISPC die Isopropylaminkonzentration aber nur bei 250 mM liegt (ohne ISPC bei 1 M), sind die niedrigeren Umsätze nach 24 h zu erklären.

Zum anderen ist das Lösen der 3,3-Diphenylpropionsäure der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Theoretisch ist die Säurekonzentration die ganze Zeit konstant bei 25 mmol/L, was ausreicht, um die Kristallisation auszulösen, aber aus der Präparation der Säurelösungen ist bekannt, dass das Nachlösen fester 3DPPA nicht sofort erfolgt und somit die Konzentration nicht durchgehend hoch genug ist, um Salz zu bilden.

Während bei geringen Substratkonzentrationen der Einsatz eines Überschusses an Donoramin geeigneter ist, um die Lage des chemischen Gleichgewichts zu beeinflussen, wird der Effekt der ISPC bei Konzentrationen ab 50 mmol/L deutlich. Von 50 mM Substrat werden nach 24 h bereits 62% umgesetzt, was 31 mM (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin entspricht. Ohne ISPC aber mit einem Überschuss IPA sind es nur 25,4 mM. Beim Umsatz von 100 mM 3-Methoxyacetophenon kann der Umsatz durch ISPC sogar fast verdreifacht werden, von 23% ohne ISPC auf 61% (Abb. 16 unten).

Wie bereits erwähnt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt das Lösen der Säure und durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 7 Tage kann der Umsatz noch auf 73% gesteigert werden, was dem Gleichgewichtsumsatz entspricht (Abb. 17). Dies gilt sowohl für die Versuche mit 50 mmol/L Substrat, als auch für die mit 100 mmol/L. Das heißt, unter gleichen Bedingungen (mit Ausnahme der Eduktkonzentration) kann die Produktmenge problemlos verdoppelt werden. Eine weitere Steigerung ist unter den gegebenen Bedingungen allerdings nicht möglich, denn auch mit 200 oder 300 mM 3-Methoxyacetophenon werden nach 7 Tagen nur ca. 70 mM Produkt erhalten. Für eine weitere Steigerung wäre entweder mehr Enzym notwendig, um in gleicher Zeit mehr Edukt umzusetzen oder dem System muss mehr Zeit gegeben werden, um mehr Umsatz zu generieren. Interessanterweise scheint die Donorkonzentration, dabei keine Rolle mehr zu spielen. In allen Tests blieb die IPA-Konzentration unverändert bei 250 mmol/L, d.h. durch die Steigerung der Substratkonzentration wurde ebenfalls das Verhältnis Donor/Akzeptor von einem 2,5-fachen Überschuss (250/100) auf ein beinahe äquimolares Verhältnis (250/200) und schließlich sogar einen Mangel (250/300) reduziert. Dass trotzdem nach 7 Tagen bei allen Versuchen der gleiche Umsatz erzielt werden konnte, wies nur erneut auf das Lösen der Säure als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Zur Optimierung der Reaktionszeit müssen mehr

Carbonsäure-Anionen in Lösung sein, d.h. die Löslichkeit der Säure muss gesteigert werden. Eine kontinuierliche Zugabe bereits gelöster Säure, wie in den Versuchen aus Kapitel 5.3.2 scheidet aus, weil dadurch das Gesamtvolumen steigt und damit mehr Salz in Lösung bleibt. Aus den Fällungsversuchen ist bekannt, dass 3DPPA mit IPA ein Salz bildet, welches eine Löslichkeit von 42,4 mmol/L aufweist, die damit 5,6-mal höher ist als reines 3DPPA in dest. Wasser (7,5 mmol/L). Durch die Salzbildung mit dem Donor ist es folglich möglich, mehr gelöste Säure in das System zu bringen. Dieser Ansatz steht zunächst konträr zu den Anforderungen an die Carbonsäuren vor dem ersten Screening, denn da wurden Säuren gesucht, welche möglichst kein Salz mit dem Donor bilden. Die Experimente haben aber gezeigt, dass selbst geringe Löslichkeiten des Donorsalzes eine selektive Kristallisation des Produkts zulassen. Neben der gesteigerten Anionen-Konzentration bringt der Einsatz eines IPA-3DPPA-Salzes auch den präparativen Vorteil, den pH-Wert der Reaktionslösung nicht nachjustieren zu müssen, da sowohl das Kation als auch das Anion in der Reaktion verbraucht werden. Die erhoffte Verkürzung der Reaktionszeit kann aus Abbildung 18 abgelesen werden. Statt nach 7 Tagen wurde der Gleichgewichtsumsatz von ca. 71% nun schon nach 3 Tagen erreicht.



**Abbildung 17:** Vergleich der Zeitverläufe des Umsatzes von 3-Methoxyacetophenons mit der reinen Säure und dem Donorsalz; schwarz: 3DPPA, rot: 3DPPA-IPA-Salz  
3-Methoxyacetophen (100 mM), IPA (250 mM); PLP (2 mM); NaP pH = 7,5; t = 24 h; T = 30°C

Die wichtigste Erkenntnis aus den vorangegangenen Versuchen ist, dass ein Überschuss an Donorammin nicht zwingend notwendig ist. Die Umsätze aus der Tabelle 18 zeigen deutlich, dass mit einem 2,5-fachen Überschuss IPA genauso viel Produkt (71,5 mmol/L) erhalten wird wie

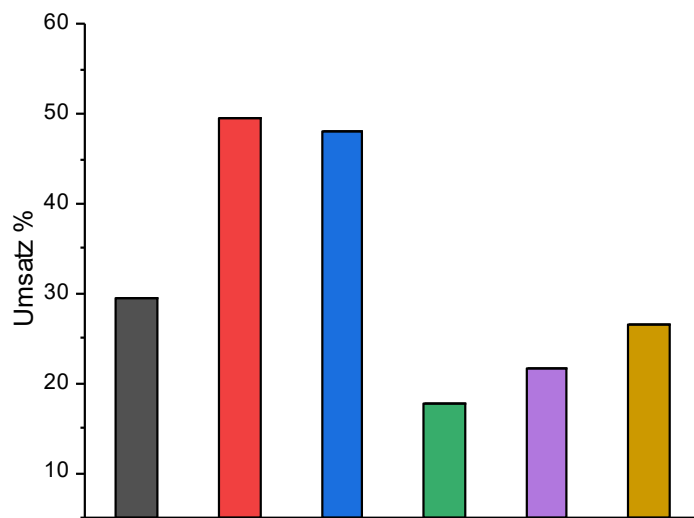
mit einem äquimolaren Zusatz (Abb. 18). Das heißt, durch den Einsatz der ISPC reicht eine äquimolare Zugabe an Donoramin, um den gleichen Umsatz zu erhalten wie durch das Verwenden des Donors im Überschuss. Gleichzeitig wird durch das Ausfällen das Produkt von der Reaktionslösung getrennt und vereinfacht die Aufarbeitung. Die selektive Kristallisation ist also nicht nur eine effektive Methode für die Aufarbeitung einer Aminmischung, sondern kann auch als Konzept der ISPR eingesetzt werden.

Um die Grenzen des Konzepts zu testen, wird abschließend gänzlich auf die Zugabe von IPA als Donor verzichtet und nur das Donorsalz eingesetzt. Effektiv stehen damit nur 42,4 mmol Isopropylamin durchgehend zur Verfügung (Rest verbleibt als Feststoff). Trotz dieses deutlichen Mangels werden nach 3 Tagen 51% des Substrats umgesetzt (Abb. 18). Mit der ISPC-Methode ist folglich ein Überschuss an Donoramin nicht mehr zwingend erforderlich. Das Ausfällen des Produktamins durch die Carbonsäure hat einen stärkeren Effekt auf die Lage des chemischen Gleichgewichts als die überschüssige Donorkonzentration. Es muss lediglich so viel Produkt entstehen, dass die Löslichkeitsgrenze des entsprechenden Salzes überschritten wird und die Kristallisation einsetzt.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig das Potential der selektiven Kristallisation, sowohl nach als auch während der Reaktion. Im Vergleich zum Einsatz des Donorüberschusses, kann 3-mal so viel (S)-1-(Methoxyphenyl)ethylamin synthetisiert werden und gleichzeitig sinkt die dafür notwendige Menge an IPA, wodurch weniger Abfall entsteht. Ebenfalls verbessert wird die Aufarbeitung des Produkts, da das Salz einfach durch Filtration aus der Reaktionslösung entfernt wird.

**Tabelle 18:** Umsätze der Reaktion von 3-Methoxyacetophenon zu (S)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin mit 3DPPA und verringerter IPA Konzentration

<b>c(IPA)</b> <b>[mM]</b>	<b>c(Substrat)</b> <b>[mM]</b>	<b>c(3DPPA-IPA</b> <b>Salz) [mM]</b>	<b>Umsatz</b> <b>[%]</b>	<b>c(Produkt)</b> <b>[mM]</b>
250	100	125	71	71,4
100	100	125	72	71,5
0	100	125	51	51,0



**Abbildung 18:** Vergleich der Umsätze von 3-Methoxyacetophenon mit ISPC und Überschuss an Donoramin

schwarz: nur Salz ohne Donor, rot: Salz und 100 mM IPA, blau: Salz und 250 mM IPA, grün: 250 mM IPA, lila: 500 mM IPA, gelb: 1 M IPA

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es für die beiden  $\omega$ -Transaminase katalysierten Reaktionen von (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin und (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin den geeignetsten Aminonor, sowie das ideale Verhältnis von Aminonor zu Aminakzeptor zu finden. Anschließend soll der Reaktionsmaßstab erhöht und das Produkt isoliert werden.

Der erste Teil dieser Dissertation widmet sich der Synthese des (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamins. 1-Phenylethylamin wird schnell als bester Donor identifiziert und es werden Umsätze bis zu >99,9% erreicht. Dabei kann die Substratkonzentration sukzessive auf 100 mM gesteigert werden, ohne dass der Umsatz abnimmt oder es zur Inhibierung des Enzyms kommt. Eine Erhöhung der Donorkonzentration auf über 500 mM ist hingegen nicht möglich, da sich das Amin nicht mehr vollständig mit dem Reaktionsmedium mischt und ebenfalls eine Inhibierung des Enzyms beobachtet wird. Ohne Probleme hingegen erfolgt die Vergrößerung des Reaktionsansatzes auf 100 mL. Die eigentliche Schwierigkeit zeigt sich bei der Produktisolierung. Weder mit der Extraktion noch der Destillation gelingt es, das Produkt sauber zu isolieren, aber durch eine chromatografische Trennung gelingt es das Produkt (*R*)-1PyEA zu erhalten.

Die Ergebnisse bei der Synthese von (*R*)-1-(3-Pyridyl)ethylamin zeigen, dass bei dem gewählten System nicht die Verschiebung der Gleichgewichtslage das größte Problem darstellt, sondern die saubere Trennung von Produktamin vom Donoramin, da beide Amine chemisch sehr ähnlich sind. Deswegen wurde ein Konzept entwickelt, mit dem das Produkt gezielt aus der Reaktionslösung isoliert werden kann. Es werden 79 verschiedene organische Carbonsäuren und 13 mögliche Produkt- und Donoramine auf ihr Fällungsverhalten getestet. Davon werden verschiedene Chlor-Nitro-substituierte Benzoesäurederivate und zwei Benzylbenzen basierte Säuren ausgewählt und die entsprechenden Salze dieser Säuren mit dem 1-Phenylethylamin und Isopropylamin hergestellt und charakterisiert, sowie die Anwendbarkeit der Carbonsäuren zur Trennung von Aminen getestet. Durch den Zusatz von 2-Chlor-5-Nitro-Benzoesäure kann das Produktamin gezielt und mit einer Reinheit von > 94% aus der Lösung kristallisiert werden. Mit 4-Chlor-3-Nitro-Benzoesäure gelingt dies sogar mit einer höheren Reinheit von > 98%. Die Menge an ausgefälltem Produkt ist dabei stark vom Verhältnis zwischen Donoramin, Produktamin und Säure abhängig wobei das ideale Verhältnis bei 5:1:4 zu liegen scheint. Auf diese Weise können 86% des Produkts aus der Lösung ausgefällt werden. Eine weitere Erkenntnis ist, dass die Ausbeuten durch längere Reaktionszeiten gesteigert werden können, was die Vermutung zulässt, dass das Lösen der Säure der geschwindigkeitsbestimmende Schritt

ist. Zur Steigerung der Löslichkeit wird das Salz aus Donoramin und Carbonsäure gebildet. Damit wird auch sichergestellt, dass die Konzentration aus Säure und Donor immer konstant in der Reaktionslösung vorliegt.

Der Zusatz einer Carbonsäure zur Aufarbeitung wird beispielhaft an der biokatalytischen Synthese von (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin angewandt. Durch die Zugabe von 3,3-Diphenylpropionsäure (3-DPPA) kann der Umsatz im Vergleich zur Reaktion ohne Säurezugabe um das 3-fache gesteigert werden. Das primäre Ziel ist zwar die Aufarbeitung und Abtrennung des Produkts, durch das *in situ* Ausfällen wird jedoch zusätzlich die Lage des chemischen Gleichgewichts beeinflusst. Zwar verlängerte sich die Reaktionszeit auf 7 Tage, jedoch kann dies durch die Verwendung des IPA-Salzes auf 3 Tage reduziert werden. Auf diese Weise gelang es auch den Umsatz bei Substratkonzentrationen von 100 mM auf 71% zu steigern. Der Effekt auf die Gleichgewichtslage ist sogar so groß, dass mit einer äquimolaren Menge Donoramin der gleiche Umsatz erzielt wird wie mit einem 2,5-fachen Überschuss ohne Zugabe der Carbonsäure. Die Carbonsäure kann also auf verschiedene Art eingesetzt werden. Entweder nach der Reaktion um eine Mischung als chemisch ähnlichen Komponenten aufzuarbeiten oder *in situ* um entstehendes Produkt sofort aus der Lösung zu entfernen und somit zusätzlich das chemische Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu verschieben.

Dieses Konzept des *in situ* Einsatzes wurde in nachfolgenden Arbeiten genauer untersucht. Als Substrat dienten 6 Aceton-Derivate und 5 nicht aromatische Substrate. In allen Fällen konnte durch den Einsatz der ISPC der Umsatz um das 2- bis 8-fache gesteigert werden. Dieses Verfahren steigert ebenfalls die Atomeffizienz, da die zurückbleibende Mutterlösung, in der immer noch ein Überschuss an Donoramin (Isopropylamin) vorliegt, wiederverwendet werden kann. Für die Isolierung des eigentlichen Produkts, wird das Produktsalz in einer basischen, wässrigen Lösung gelöst und anschließend mit Ether (z.B. MTBE) extrahiert. Durch verdampfen des organischen Lösungsmittel kann das anschließend isoliert werden oder es wird als Hydrochlorid gefällt, in dem HCl zur Etherlösung hinzugegeben wird.<sup>92</sup>

Für den Umsatz von 3-Methoxyacetophenon konnte das Konzept technisch in einem halbautomatischen, kontinuierlichen Prozess umgesetzt werden.<sup>93</sup> In einem Aufbau aus 3 Gefäßen werden die Lösungen aus Substrat und Donor in einem Reaktor durch eine Membran von der Lösung, welche den Biokatalysator enthält, getrennt. Das entstehende Produkt (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)ethylamin kann durch die Membran diffundieren und ausfällen, während das Enzym zurückgehalten wird. Über Pumpen wird aus einem 2. Gefäß kontinuierlich eine gesättigte Lösung aus Donoramin und Fällungsreagenz zur Verfügung gestellt. Das entstehende Produkt wiederum wird in ein 3. Gefäß geführt, wo es bei konstanten Bedingungen ausfällen

kann.<sup>93</sup> Durch das kontinuierliche Nachlegen an Donor und Fällungsreagenz, sowie das Abführen des Produkts sind die Konzentrationen in der Lösung fast durchgehend konstant. Auf diese Weise konnte 1 g Produkt hergestellt werden. Da durch den Prozessaufbau alle Konzentrationen mehr oder weniger konstant sind, sollte die Produktivität hauptsächlich von der eingesetzten Menge an Biokatalysator abhängig sein. Der Einfluss größerer Mengen Katalysators wurde ebenfalls untersucht.<sup>94</sup> Es stellte sich jedoch heraus, dass auch eine Verdoppelung der Enzymmenge keinen wesentlichen Einfluss auf den Umsatz hat. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist also nicht die katalytische Synthese, wodurch die Produktivität des Prozess eingeschränkt wird.<sup>94</sup> Als mögliche einflussnehmende Faktoren wurde das Nachlösen des Donorsalzes bzw. des Substrats, das Akkumulieren von Aceton, die Kristallbildung des Produktsalzes, sowie die mögliche Inhibierung durch den Cofaktor PLP betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass keiner dieser Faktoren einen großen Einfluss auf die Reaktion hat und der Prozess, sobald einmal eingestellt, stabil läuft.<sup>94</sup> Beim Planen eines solchen Prozess spielen ökonomische Fragen, wie die verfügbare Reaktionszeit und die Kosten für den Biokatalysator eine Rolle.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*; Wiley, 2004.
- (2) Fischer, E. *Ber.* **1894**, 27, 2985.
- (3) Thoma, J. A.; Koshland, D. E., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3329.
- (4) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*; Wiley-VCH, 2000.
- (5) Atkinson, T.; Scawen, M. D.; Hammond, P. M.; VCH: 1987, p 279.
- (6) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1451.
- (7) Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 1109.
- (8) Buckland, B. C.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. *Biotechnol Bioeng* **2000**, 67, 714.
- (9) Klibanov, A. M. *CHEMTECH* **1986**, 16, 354.
- (10) Arnold, F. H.; Moore, J. C. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, 58, 1.
- (11) Schmid, R. D. *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*; Wiley-VCH, 2006.
- (12) Hoehne, M.; Schaetzle, S.; Jochens, H.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 807.
- (13) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature (London, U. K.)* **2012**, 485, 185.
- (14) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*; Wiley, 2006.
- (15) Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*; Wiley, 2012.
- (16) Drauz, K.; Gröger, H.; May, O. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley, 2012.
- (17) Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. *Green Chem.* **2011**, 13, 3007.
- (18) Wolfenden, R.; Snider, M. J. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 938.
- (19) Zhong, W.; Benkovic, S. J. *Anal. Biochem.* **1998**, 255, 66.
- (20) Gandoun, R. D.; Schowen, R. L.; Editors *Transition States of Biochemical Processes*; Plenum, 1978.
- (21) Villa, J.; Warshel, A. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 7887.
- (22) Shurki, A.; Strajbl, M.; Villa, J.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4097.
- (23) O'Brien, P. J.; Herschlag, D. *Chem. Biol.* **1999**, 6, R91.
- (24) Copley, S. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 265.
- (25) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 6032.
- (26) Meyer, D.; Walter, L.; Kolter, G.; Pohl, M.; Müller, M.; Tittmann, K. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 3609.
- (27) <https://iubmb.org/>.
- (28) <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>.
- (29) Chenault, H. K.; Whitesides, G. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, 14, 147.
- (30) Fang, J.-M.; Lin, C.-H.; Bradshaw, C. W.; Wong, C.-H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1995**, 967.
- (31) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*; Tarrytown N.Y., 1994.
- (32) Wrotnowski, C. *Gen. Eng. News* **1997**, 14.
- (33) Bisswanger, H. *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*; Wiley-VCH, 2015.
- (34) [www.enzyme-database.org/cinfo.php?c=7&sc=0&ssc=](http://www.enzyme-database.org/cinfo.php?c=7&sc=0&ssc=)

- (35) <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/>.
- (36) Ghislieri, D.; Turner, N. J. *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284.
- (37) Kohls, H.; Steffen-Munsberg, F.; Hoehne, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180.
- (38) Kroutil, W.; Fischereeder, E.-M.; Fuchs, C. S.; Lechner, H.; Mutti, F. G.; Pressnitz, D.; Rajagopalan, A.; Sattler, J. H.; Simon, R. C.; Siirola, E. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751.
- (39) Malik, M. S.; Park, E.-S.; Shin, J.-S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163.
- (40) Mathew, S.; Yun, H. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993.
- (41) Rudat, J.; Brucher, B. R.; Syldatk, C. *AMB Express* **2012**, *2*, 11.
- (42) Simon, R. C.; Richter, N.; Busto, E.; Kroutil, W. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129.
- (43) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Jensen, J. S.; Al-Haque, N.; Neto, W.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479.
- (44) Yamada, H.; Kimura, T.; Tanaka, A.; Ogata, K. *Agric. Biol. Chem.* **1964**, *28*, 443.
- (45) Bea, H.-S.; Park, H.-J.; Lee, S.-H.; Yun, H. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, *47*, 5894.
- (46) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 2848.
- (47) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Stuermer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.
- (48) Nugent, T. C.; Editor *Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
- (49) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324.
- (50) Sheldon, R. A. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **1996**, *67*, 1.
- (51) Klibanov, A. M. *Accounts of Chemical Research* **1990**, *23*, 114.
- (52) Margolin, A. L. *Enzyme and Microbial Technology* **1993**, *15*, 266.
- (53) Shin, J.-S.; Kim, B.-G. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206.
- (54) Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Martinez, C. A.; Zhu, J.; Chen, G.; Kayser, M. M. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 3541.
- (55) Faber, K. *Springer* **1996**, 160.
- (56) Devaux-Basseguy, R.; Bergel, A.; Comtat, M. *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 248.
- (57) Rozzell, J. D. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: 1987; Vol. 136, p 479.
- (58) Taylor, P. P.; Pantaleone, D. P.; Senkpeil, R. F.; Fotheringham, I. G. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 412.
- (59) Yun, H.; Hwang, B.-Y.; Lee, J.-H.; Kim, B.-G. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71*, 4220.
- (60) Iwasaki, A.; Yamada, Y.; Ikenaka, Y.; Hasegawa, J. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1843.
- (61) Savile, C. K. J., Jacob M.; Mundorff, Emily C.; Moore, Jeffrey C.; Tam, Sarena; Jarvis, William R.; Colbeck, Jeffrey C.; Krebber, Anke; Fleitz, Fred J.; Brands, Jos; Devine, Paul N.; Huisman, Gjalte W.; Hughes, Gregory J. *Science* **2010**, *329*, 305.
- (62) Hansen, K. B.; Hsiao, Y.; Xu, F.; Rivera, N.; Clausen, A.; Kubryk, M.; Krska, S.; Rosner, T.; Simmons, B.; Balsells, J.; Ikemoto, N.; Sun, Y.; Spindler, F.; Malan, C.; Grabowski, E. J. J.; Armstrong, J. D. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 8798.
- (63) Cassimjee, K. E.; Manta, B.; Himo, F. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8453.
- (64) Fuchs, M.; Farnberger, J. E.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6965.



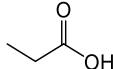
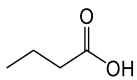
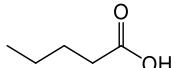
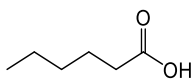
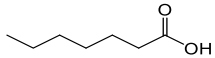
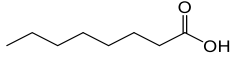
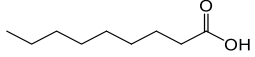
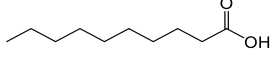
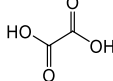
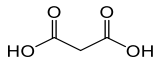
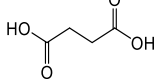
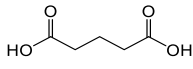
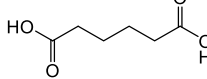
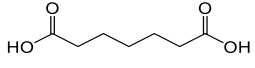
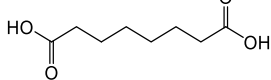
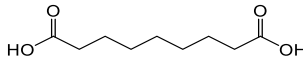
- (65) Gundersen, M. T.; Abu, R.; Schurmann, M.; Woodley, J. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 567.
- (66) Tufvesson, P.; Nordblad, M.; Krühne, U.; Schürmann, M.; Vogel, A.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J. M. *Organic Process Research & Development* **2015**, *19*, 652.
- (67) Tufvesson, P.; Bach, C.; Woodley, J. M. *Biotechnology and Bioengineering* **2014**, *111*, 309.
- (68) Tufvesson, P.; Jensen, J. S.; Kroutil, W.; Woodley, J. M. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 2159.
- (69) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Turner, N. J. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234.
- (70) Freeman, A.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D. *Bio/Technology* **1993**, *11*, 1007.
- (71) Lye, G. J.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 395.
- (72) Stark, D.; von Stockar, U. In *Process Integration in Biochemical Engineering*; von Stockar, U., van der Wielen, L. A. M., Bruggink, A., Cabral, J. M. S., Enfors, S. O., Fernandes, P., Jenne, M., Mauch, K., Prazeres, D. M. F., Reuss, M., Schmalzriedt, S., Stark, D., von Stockar, U., Straathof, A. J. J., van der Wielen, L. A. M., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003, p 149.
- (73) Bechtold, M.; Makart, S.; Heinemann, M.; Panke, S. *Journal of Biotechnology* **2006**, *124*, 146.
- (74) Ehnstroem, L. *Bioprocess Technology* **1991**, *11*, 303.
- (75) Koszelewski, D.; Lavandera, I.; Clay, D.; Rozzell, D.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761.
- (76) Rehn, G.; Adlercreutz, P.; Grey, C. *Journal of Biotechnology* **2014**, *179*, 50.
- (77) Green, A. P.; Turner, N. J.; O'Reilly, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714.
- (78) Gomm, A.; Lewis, W.; Green, A. P.; O'Reilly, E. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 12692.
- (79) Hülsewede, D.; Dohm, J.-N.; von Langermann, J. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, *361*, 2727.
- (80) Matz, G. *Kristallisation: Grundlagen und Technik*; Springer-Verlag, 1969.
- (81) Hofmann, G. *Kristallisation in der industriellen Praxis*; Wiley, 2004.
- (82) Mersmann, A.; Kind, M.; Stichlmair, J. *Thermische Verfahrenstechnik: Grundlagen und Methoden*; Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- (83) Ostwald, W. *Z. physik. Chem.* **1900**, *34*, 493.
- (84) Miers, H. A. I., F. *J. chem. Soc.* **1906**, *89*, 413.
- (85) Grassmann, P.; Widmer, F.; Sinn, H. *Einführung in die thermische Verfahrenstechnik*; De Gruyter, 1996.
- (86) Atkins, P. W.; De Paula, J. *Physikalische Chemie*; Wiley-VCH, 2013.
- (87) Mullin, J. W. In *Crystallization (Fourth Edition)*; Mullin, J. W., Ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2001, p 135.
- (88) Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S. H. *Enantiomers, racemates, and resolutions*; Wiley, 1981.
- (89) Cassimjee, K. E.; Branneby, C.; Abedi, V.; Wells, A.; Berglund, P. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, *46*, 5569.
- (90) Truppo, M. D.; Rozzell, J. D.; Moore, J. C.; Turner, N. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395.
- (91) Yun, H.; Kim, B.-G. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2008**, *72*, 3030.
- (92) Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Süß, P.; Mildner, A.; Menyes, U.; von Langermann, J. *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, *2018*, 2130.
- (93) Hülsewede, D.; Temmel, E.; Kumm, P.; von Langermann, J. Concept Study for an Integrated Reactor-Crystallizer Process for the Continuous Biocatalytic Synthesis of (S)-1-

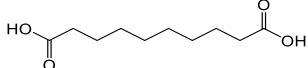
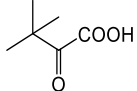
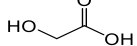
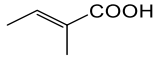
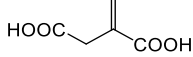
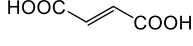
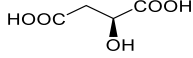
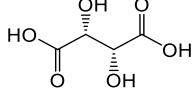
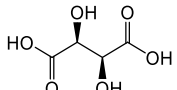
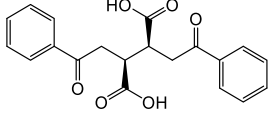

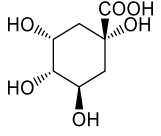

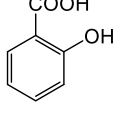
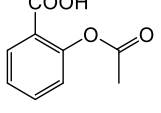
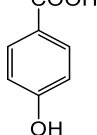
(3-Methoxyphenyl)ethylamine. *Crystals* [Online Early Access]. DOI: 10.3390/cryst10050345. Published Online: 2020.

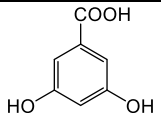
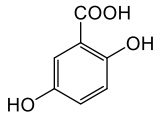
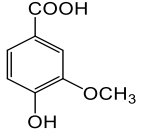
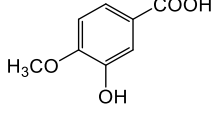
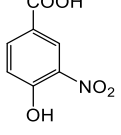
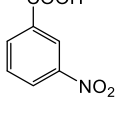
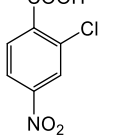
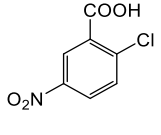
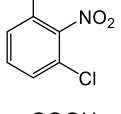
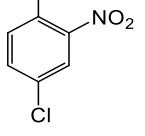
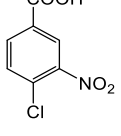
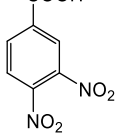
(94) Neuburger, J.; Helmholz, F.; Tiedemann, S.; Lehmann, P.; Süss, P.; Menyes, U.; von Langermann, J. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **2021**, *168*, 108578.

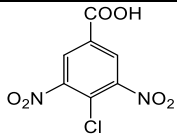
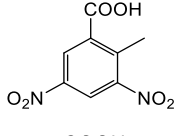
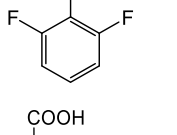
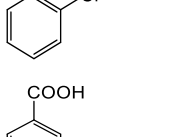
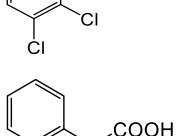
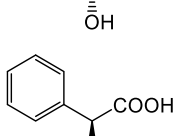
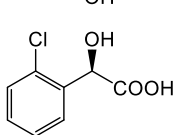
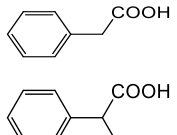
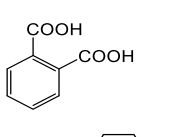
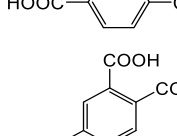
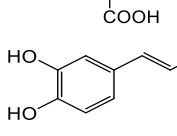
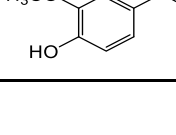


## 8 Anhang

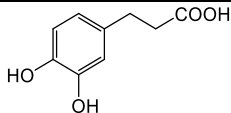
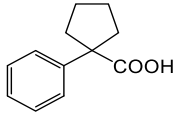
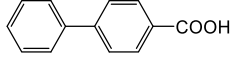
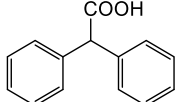
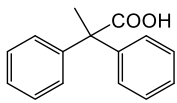
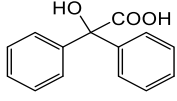
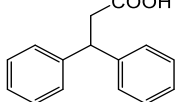
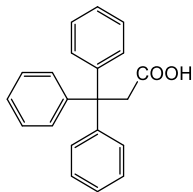
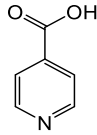
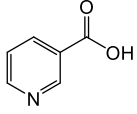
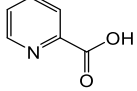
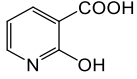
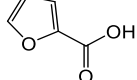
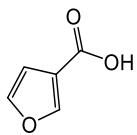
Tabelle 19: getestete Säuren

Säure	Abkürzung	Strukturformel
Formic acid	FCC	
Acetic acid	ACC	
Propionic acid	PPA	
Butyric acid	BCA	
Valeric acid	VCA	
Hexanoic acid	HXCA	
Heptanoic acid	HA	
Caprylic acid	CCA	
Nonanoic acid	nNA	
Decanoic acid	DCC	
Oxalic acid	OA	
Malonic acid	MA	
Succinic acid	SCCA	
Glutaric acid	GA	
Adipic acid	APS	
Pimelic acid	PIA	
Suberic acid	SBCA	
Azelaic acid	AA	

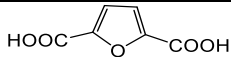
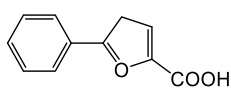
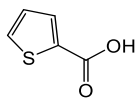
Sebacic acid	SCA	
Trimethylpyruvic acid	TMPA	
Glycolic acid	GCA	
Tiglic acid	TG	
Itaconic acid	IS	
Fumaric acid	FA	
L-Malic acid	LMA	
L-(-)-Tartaric acid	LTA	
D-(-)-Tartaric acid	DTA	
Dibenzoyl-D-tartaric acid	DBDT	
Cyclohexanecarboxylic acid	CHCA	
D-(-)-Quinic acid	DQA	
Benzoic acid	BZA	
Salicylic acid	SA	
Acetylsalicylic acid	ASA	
4-Hydroxybenzoic acid	4HBA	

3,5-Dihydroxybenzoic acid	35HBA	
2,5-Dihydroxybenzoic acid	25DHBA	
Vanillic acid	VA	
Isovanillic acid	IVA	
4-Hydroxy-3-nitrobenzoic acid	43HNBA	
3-Nitrobenzoic acid	3NA	
2-Chloro-4-nitrobenzoic acid	24CNA	
2-Chloro-5-nitrobenzoic acid	25CNA	
3-Chloro-2-nitrobenzoic acid	32CNA	
4-Chloro-2-nitrobenzoic acid	42CNA	
4-Chloro-3-nitrobenzoic acid	43CNA	
3,4-Dinitrobenzoic acid	34NA	

4-Chloro-3,5-dinitrobenzoic acid	435CNBA	
3,5-Dinitro- <i>o</i> -toluic acid	35DNOT	
2,6-Difluorobenzoic acid	26FBA	
2-Chlorobenzoic acid	2CA	
3,4-Dichloro-benzoic acid	34CA	
( <i>R</i> )-Mandelic acid	RMA	
( <i>S</i> )-Mandelic acid	SMA	
<i>R</i> -(-)-2-Chloro-mandelic acid	CMA	
Phenylacetic acid	PAA	
Phenylmalonic acid	PMA	
Phthalic acid	PA	
Terephthalic acid	TPA	
1,2,4,5-Benzene-tetracarboxylic acid	BTA	
Caffeic acid	CA	
Ferulic acid	FCA	

3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	34HHCAA	
1-Phenylcyclopentancarboxylic acid	PCPA	
4-Biphenyl-carboxylic acid	BPA	
Diphenylacetic acid	DPAA	
2,2'-Diphenyl-propionic acid	2DPPA	
Benzilic acid	BA	
3,3-Diphenyl-propionic acid	3DPPA	
3,3,3-Triphenyl-propionic acid	TPPA	
Isonicotinic acid	INA	
Nicotinic acid	NCC	
Picolinic acid	PCC	
2-Hydroxynicotinic acid	2HNA	
2-Furoic acid	2FCA	
3-Furoic acid	3FCA	

---

2,5-Furandicarboxylic acid	25FDCA	
5-Phenyl-2-furoic acid	PFA	
2-Thiophene-carboxylic acid	2TPCA	

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Marco Cornelius, geb. Tänzler  
Wohnort: Am Mühlenberg 10 in 14550 Groß Kreutz  
Geburtsdatum und –ort: 26.08.1988 in Neubrandenburg  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: deutsch

### Praxiserfahrung

Seit 15.05.2021 Executive Specialist für die BASF Services Europe GmbH im Bereich Product Safety Regional EMEA • Länderexperte Schweiz  
• seit Februar 2022 Team Specialist, fachliche Leitung

15.05.2019 – 15.05.2021 Senior Specialist für die BASF Services Europe GmbH • Referenzdatenpflege in SAP • Einstufung und Klassifizierung von Chemikalien nach GHS und CLP

01.01.2018 – 30.04.2019 wissenschaftl. Mitarbeiter / Fachbereichsleiter für den Fachbereich Vitamine am Institut Kirchhoff Berlin

01.05.2014 - 30.09.2017 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung für Analytische und Technische Chemie, Institut für Chemie, Universität Rostock  
• Arbeiten zur Beendigung der Dissertationsschrift „*Optimierung von Transaminase-katalysierten Reaktionen zur Überwindung der Gleichgewichtslimitierung*“

02.2013 - 11.2013 Studentischer Mitarbeiter der Abteilung für Analytische und Technische Chemie, Institut für Chemie, Universität Rostock  
• Synthese und Aufarbeitung chiraler Amine

### Akademischer Werdegang

04.2012 – 04.2014 Studium der Chemie an der Universität Rostock mit dem Abschluss Master of Science (M.Sc.)  
Schwerpunkt Anorganische Chemie im Fachbereich Metallorganik

Masterarbeit „Zweikernige Photoredoxkatalysatoren auf Phenanthrolin-Basis“

10.2008 – 02.2012

Studium der Chemie an der Universität Rostock mit dem Abschluss Bachelor of Science (B.Sc.)

Schwerpunkt Anorganische Chemie im Fachbereich Metallorganik

Bachelorarbeit „Koordinationschemie und Untersuchungen von Acetylendithiolatokomplexen mit labilen Co.-Liganden“

### Publikationen

2013

Seidel, W.; Dachtler, W.; Semmler, J.; Tänzler, M.; Folk, M.; Villinger, A. “Acetylene dithiolate linking up the [TpW(CO)(CN)] moiety with Ru II or PdII”, 2013; Vol. 19.

2014

Schallenberg, D.; Neubauer, A.; Erdmann, E.; Tänzler, M.; Villinger, A.; Lochbrunner, S.; Seidel, W. W. “Dinuclear Ru/Ni, Ir/Ni, and Ir/Pt Complexes with Bridging Phenanthroline-5,6-dithiolate: Synthesis, Structure, and Electrochemical and Photophysical Behavior“ *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 8859.

2018

Hülsewede, D.; Tänzler, M.; Süß, P.; Mildner, A.; Menyes, U.; von Langermann, J. “Equilibrium displacement by in situ-product crystallization (ISPC) in transaminase-catalyzed reactions” *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 2018, 2130.

### Konferenzbeiträge

2017

„Process development of the (R)-selective transamination of 3-acetylpyridine“ Poster auf dem 13. Internationalen Symposium für Biokatalyse und Biotransformation (BioTrans) in Budapest, Ungarn

Marco Cornelius