

## Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese

Benedikt Baumer



# **Immobilisierte Enzyme und Kofaktor- Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Benedikt Baumer**  
aus Hilden

Düsseldorf, Juli 2023

aus dem Institut für Bioorganische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka  
Institut für Bioorganische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
im Forschungszentrum Jülich
2. Prof. Dr. Thomas J. J. Müller  
Institut für Organische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2024

# **Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Benedikt Baumer**

aus Hilden

Düsseldorf, Februar 2024

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der  
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten  
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Prof. Dr. Thomas J.J. Müller

Tag der mdl. Prüfung: 19.02.2024

Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2024

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
im Forschungszentrum Jülich, Band 48

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2024)

ISBN 978-3-95806-783-7

**Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.** Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

# VERÖFFENTLICHUNGEN

Einige Abschnitte dieser Arbeit wurden bereits auf verschiedene Weisen veröffentlicht. Zudem enthält sie Ergebnisse von Abschluss- und Praktikumsarbeiten.

## Publikationen & Eigenanteil

B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, 362, 2894–2901; »Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP(H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1002/adsc.202000058<sup>[1]</sup>

Die oben genannte Publikation enthält folgende Eigenanteile: Das Konzept zur kontinuierlichen Kofaktor-Regenerierung wurde eigenständig entwickelt. Dazu zählt sowohl die Zusammenstellung der benötigten Geräte als auch die Planung der benötigten Experimente. Die Bereitstellung des HaloTag™-LbADH-Plasmids erfolgte durch Johannes Döbber und die folgende Enzymexpression wurde durch Bea Paschold durchgeführt. Anschließend erfolgte die selbstständige Synthese der Startmaterialien (sofern benötigt) und racemischen Standards sowie die Durchführung der Experimente im Fluss. Die entsprechende Analytik und Auswertung der chemischen Ergebnisse wurde von mir durchgeführt mit Ausnahme der Methodenentwicklung für die Analyse durch die GC-Chromatographie und HPLC - dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Birgit Henßen. Das Manuskript wurde zusammen mit Thomas Classen verfasst und die *Supporting Information* wurden von mir verfasst (mit Ausnahme der Abbildungen 1 und 2). Die zugehörige Literaturrecherche wurde ebenfalls in Eigenregie durchgeführt. Das Cover zu dieser Publikation wurde von Thomas Classen angefertigt.

G. Ölçücü, B. Baumer, K. Küsters, K. Möllenhoff, M. Oldiges, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2022**, 11, 1881–1896; »Catalytically-Active Inclusion Bodies – Benchmarking and Application in Flow Chemistry«. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00035<sup>[2]</sup>

Der Eigenanteil der oben genannten Publikation betrifft das Kapitel ab „*Flow Chemistry Application of Best-Performing RADH CatIBs*“. Die Planung der benötigten Experimente zur Anwendung der *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) in der Flusssynthese wurde in Eigenregie durchgeführt. Der dafür benötigte Enzymreaktor inkl. der Methode zur Fixierung der CatIBs in einer Glassäule wurde selbstständig entwickelt. Die Applikation der CatIBs in der Batchsynthese und im Enzymreaktor im Fluss wurde von mir durchgeführt und der Einsatz sowohl im einfachen Fluss als auch in der

kontinuierlichen Flusssynthese erfolgte basierend auf den in Publikation 1 (siehe oben) entwickelten Systemen. Die Synthese racemischer Standards sowie die benötigte Analytik und Auswertung der chemischen Ergebnisse erfolgte selbstständig mit Ausnahme der Methodenentwicklung für die GC-Chromatographie. Diese wurde zusammen mit Birgit Henßen durchgeführt. Das Manuskript zur Applikation der CatIBs im Batch und im Fluss wurde von mir verfasst inkl. Schema 1–3 , Abbildung 7 und experimentellem Teil. Für die *Supporting Information* wurden die Abbildungen S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12 und die Tabellen S7, S8, S9, S10, S11 und S12 mit den dazugehörigen Reaktionsvorschriften und der Analytik von mir bereitgestellt.

### **Konferenzteilnahmen und Vorträge**

B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, »Immobilised enzymes and their cofactor regeneration: Application under continuous flow conditions in organic synthesis«. **Poster** präsentiert und **Poster-Pitch** gehalten auf dem GDCh Wissenschaftsforum 2021, online, Deutschland.

B. Baumer, G. Ölçücü, T. Classen, M. Pohl, U. Krauss, J. Pietruszka, »Applying enzymes under continuous flow conditions using different immobilization strategies and continuous cofactor regeneration«. **Poster** präsentiert auf dem CKB Final Symposium 2021, Düsseldorf, Deutschland.

B. Baumer, T. Friedrichs, J. Pietruszka, »Biocatalysis and cofactor regeneration under continuous flow conditions«. **Vortrag** gehalten und **Poster** präsentiert auf dem 23. JCF-Frühjahrsymposium 2021, online, Deutschland.

## **Abschluss- und Praktikumsarbeiten**

Stella M. Pauls, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2018**; »Chemie im Fluss - auf dem Weg zum Einsatz von immobilisierten Biokatalysatoren«. [3]

Lisa M. Böhmer, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2020**; »Studien zur Immobilisierung von Alkoholdehydrogenasen und deren Anwendung in der Durchfluss-Synthese«. [4]

Marisa Bickmann, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2021**; »Studien zur Enreduktase YqjM in der Flow-Chemie«. [5]

Diana-A. Amariei unterstützte die Arbeit durch ein dreimonatiges Praktikum im Rahmen des Erasmus-Programms. Norman Hoster (2018) und Hannes Thomaschik (2018) trugen durch das Praktikumsmodul Naturstoffsynthese Ergebnisse bei und Niklas Kiel unterstützte im Rahmen eines Praktikums des Biologie Bachelor PLUS Studiengangs. Die Arbeiten wurden unter Anleitung des Autors durchgeführt und sind an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Abstract .....	XV
Kurzzusammenfassung .....	XVII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Motivation.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Flusssynthese .....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Grundlagen der Flusschemie.....	22
2.1.2 Beispiele der Flusschemie in der organischen Synthese .....	27
<b>2.2 Immobilisierung von Enzymen.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Immobilisierungsstrategien .....	31
2.2.2 HaloTag™-System.....	38
2.2.2.1 DhaA und Mutante - Mechanismen im Vergleich.....	38
2.2.2.2 HaloTag™-Ligand .....	40
<b>2.3 Enzyme .....</b>	<b>42</b>
2.3.1 Alkoholdehydrogenasen.....	42
2.3.1.1 Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i> (LbADH) .....	43
2.3.1.2 Alkoholdehydrogenase aus <i>Ralstonia species</i> (RADH).....	47
2.3.2 Phosphitdehydrogenase (PhosDH).....	50
2.3.3 <i>Candida antarctica</i> Lipase B (CalB).....	53
<b>2.4 Kofaktor-Regenerierung in der Durchflusssynthese.....</b>	<b>60</b>
2.4.1 Kofaktor-Regenerierung im einfachen Durchfluss .....	60
2.4.2 Kofaktor-Regenerierung mit immobilisiertem o. gefangenem Kofaktor....	66
2.4.3 Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf .....	68
<b>3 Eigene Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Kofaktor-Regenerierung in der Flusssynthese .....</b>	<b>71</b>
3.1.1 Einleitung.....	71
3.1.2 Einfacher Durchfluss.....	71
3.1.2.1 Aufbau des Systems .....	72
3.1.2.2 Einsatz des einfachen Durchflusssystemes .....	73
3.1.3 Geschlossenes System.....	80
3.1.3.1 Aufbau des Systems „geschlossener Kreislauf“ .....	81
3.1.3.2 Anwendung des geschlossenen Systems.....	83
3.1.4 Konsekutivreaktion mit der Lipase CalB (Novozym 435).....	101
3.1.4.1 Vinylacetat Konzentrationscreening.....	102
3.1.4.2 Geschlossenes System mit konsekutiver Acetylierung.....	105
3.1.5 Modellsystem HaloTag™-LbADH und PhosDH.....	109
3.1.6 Morita-Baylis-Hillmann und das geschlossene System .....	113
3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick .....	115
<b>3.2 Catalytically active inclusion bodies (CatIBs).....</b>	<b>120</b>
3.2.1 Einleitung.....	120

3.2.2	Kenntnisstand .....	120
3.2.3	Zielsetzung.....	122
3.2.4	Immobilisierung.....	123
3.2.5	RADH-CatIBs im einfachen Durchfluss .....	126
3.2.6	RADH-CatIBs und HaloTag™-LbADH im kombinierten System.....	128
3.2.7	Batch-Synthese.....	133
3.2.8	Einfacher Durchfluss .....	135
3.2.9	RADH-CatIB im geschlossenen System .....	137
3.2.10	Zusammenfassung und Ausblick .....	139
<b>3.3</b>	<b>Old Yellow Enzymes und YqjM .....</b>	<b>143</b>
3.3.1	Einleitung .....	143
3.3.2	YqjM in der Durchflusssynthese .....	146
3.3.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	151
<b>3.4</b>	<b>Technische Zusammenfassung .....</b>	<b>157</b>
3.4.1	Realer Flussaufbau.....	157
3.4.2	Hergestellte (Enzym-)Reaktoren.....	158
3.4.3	System- und Fehleranalyse.....	160
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>162</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Angaben.....</b>	<b>162</b>
4.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	162
4.1.2	Kleinteile der Durchflussschemie.....	162
<b>4.2</b>	<b>Analytik, Geräte und Software .....</b>	<b>162</b>
4.2.1	Durchflussschemie.....	162
4.2.2	Präparative Säulen-/Flashchromatographie .....	163
4.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC).....	163
4.2.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	163
4.2.5	Infrarotspektroskopie (IR) .....	164
4.2.6	Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) .....	164
4.2.7	Gaschromatographie (GC).....	164
4.2.8	Bestimmung des spezifischen Drehwertes $[\alpha]$ .....	164
<b>4.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>165</b>
AAV 1:	Allgemeine Vorschrift zum Enzymaufschluss .....	165
AAV 2:	Aktivitätsassay HaloTag™-LbADH .....	165
AAV 3:	Allgemeine Vorschrift für die Immobilisierung mit HaloTag™.....	165
AAV 4:	Allgemeine Synthese der racemischen Standards.....	166
AAV 5:	Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss .....	167
AAV 6:	Allgemeine Vorschrift für das Screening und die Synthese im geschlossenen Kreislauf.....	168
AAV 7:	Vorschrift für Substratwechsel im geschlossenen Kreislauf.....	170
AAV 8:	Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss mit der Lipase CalB (Novozym 435).....	171
AAV 9:	Geschlossener Kreislauf mit Lipase CalB (Novozym 435).....	172
AAV 10:	Vorschrift für Screening im einfachen Durchfluss (RADH-CatIBs).....	173
AAV 11:	Allgemeine Vorschrift für Screening und Synthese im geschlossenen Kreislauf (RADH-CatIBs) .....	174
AAV 12:	Allgemeine Vorschrift für das Packen/Befüllen einer CatIB-Säule.....	175
AAV 13:	Allgemeine Vorschrift für CatIBs und HaloTag™-LbADH (kombiniertes System) im geschlossenen Kreislauf.....	175

<b>4.4</b>	<b>Synthesen und Analytik .....</b>	<b>177</b>
4.4.1	<i>rac</i> -3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-ol ( <i>rac</i> -85).....	177
4.4.2	<i>rac</i> -7-Hydroxynon-8-ensäureethylester ( <i>rac</i> -84).....	177
4.4.3	<i>rac</i> -4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester ( <i>rac</i> -82).....	178
4.4.4	<i>rac</i> -2-Chlor-1-phenylethan-1-ol ( <i>rac</i> -97).....	178
4.4.5	3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25a).....	179
4.4.6	7-Oxonon-8-ensäureethylester (83).....	180
4.4.7	( <i>R</i> )-Phenylethan-1-ol (17).....	181
4.4.8	( <i>R</i> )-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	182
4.4.9	( <i>S</i> )-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (84).....	183
4.4.10	( <i>S</i> )-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (82).....	184
4.4.11	( <i>R</i> )-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (93).....	185
4.4.12	HaloTag™-YqjM - Testversuche.....	188
<b>5</b>	<b>Anhänge .....</b>	<b>190</b>
<b>5.1</b>	<b>NMR-Spektren.....</b>	<b>190</b>
5.1.1	3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25b).....	190
5.1.2	7-Oxonon-8-ensäureethylester (83).....	191
5.1.3	( <i>R</i> )-Phenylethan-1-ol (17).....	192
5.1.4	( <i>R</i> )-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	193
5.1.5	( <i>S</i> )-7-Hydroxonon-8-ensäureethylester (84).....	194
5.1.6	( <i>S</i> )-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester (82).....	195
5.1.7	( <i>R</i> )-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97).....	196
<b>5.2</b>	<b>GC-/HPLC-Chromatogramme.....</b>	<b>197</b>
5.2.1	( <i>R</i> )-Phenylethan-1-ol (17).....	197
5.2.2	( <i>R</i> )-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85).....	198
5.2.3	( <i>S</i> )-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (84).....	199
5.2.4	( <i>S</i> )-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (82).....	200
5.2.5	( <i>R</i> )-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97).....	201
5.2.6	Cyclohexanon (98).....	202
5.2.7	Cyclohexanol (99).....	202
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>203</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>227</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>231</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6-APA	<i>6-aminopenicillanic acid</i> , dt. 6-Aminopenicillansäure
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ADH	Alkoholdehydrogenase
AMP-KG	Aminopropyl-Kieselgel
API	<i>active pharmaceutical ingredient</i> , dt. aktiver pharmazeutischer Wirkstoff
Äq.	chemisches Äquivalent
Arg	Arginin
arom.	aromatisch
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Bm	<i>Bacillus megaterium</i>
Bn	Benzyl
BPR	<i>back pressure regulator</i> , dt. Gegendruckregler
Bz	Benzoyl
c	Konzentration in mol L <sup>-1</sup>
CalB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
CatIBs	<i>catalytically active inclusion bodies</i>
CLE	<i>cross-linked enzymes</i> , dt. vernetzte Enzyme
CLEA	<i>cross-linked enzyme aggregates</i> , dt. vernetzte Enzymaggregate
CLEC	<i>cross-linked enzyme crystals</i> , dt. vernetzte Enzymkristalle
CMP	<i>cross membrane pressure</i> ; Membrandruck (hier der FLLEX)
d	Dublett (NMR)
D.V.	Diastereomerenverhältnis
DC	Dünnschichtchromatographie
δ	chemische Verschiebung in ppm
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DhaA	Haloalkan Dehalogenase
DIPE	Diisopropylether
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMDEOS	Dimethyldiethoxysilan
DMA	Dimethylacetamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure
DPPA	Diphenylazidophosphat
EC	<i>enzyme commission number</i> , dt. Enzymklassifikation
ee	<i>enantiomeric excess</i> , dt. Enantiomerenüberschuss
EtOAc	Essigsäureethylester

## Abkürzungsverzeichnis

FLLEX	<i>Flow Liquid Liquid Extraction</i>
FMN	Flavinmononucleotid
FR	Flussrate
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucose-1-dehydrogenase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GMO	<i>genetically modified organisms</i> , dt. genetisch modifizierte Organismen
h	Heptett (NMR)
HFCS	<i>high fructose corn syrup</i> , dt. stark fructosehaltiger Maissirup
His	Histidin
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , dt. hochauflösende Massenspektrometrie
ID	Innendurchmesser
Ile	Isoleucin
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR) in Hz
kDa	Kilodalton ( $\text{kg mol}^{-1}$ )
KG	Kieselgel
Kow	Gleichgewichtskonstante Octanol/Wasser
KP <sub><i>i</i></sub>	Kaliumphosphatpuffer, <i>i</i> für <i>inorganic</i>
L	Leucin
$\lambda$	Wellenlänge in nm
LbADH	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i>
Leu	Leucin
LkADH	ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i>
Lys	Lysin
m	Multipllett (NMR)
M	Molarität in $\text{mol L}^{-1}$
<i>M</i>	molare Masse in $\text{g mol}^{-1}$
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
MBH	Morita-Baylis-Hillmann
MCPS	<i>methyl-accepting chemotaxis proteins</i> , dt. Methyl-akzeptierende Chemotaxis-Proteine
MDR	<i>middle chain dehydrogenases/reductases</i> , dt. mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
Met	Methionin
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
n.b.	nicht bestimmt
NAD(P)H	Nicotinamadenindinukleotid; P für Phosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> ; dt. Kernspinresonanzspektroskopie
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl in $\text{cm}^{-1}$
OYE	<i>old yellow enzyme</i> , dt. altes gelbes Enzym

PE	Petroleumether
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pj</i> BAL	Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phe	Phenylalanin
PhosDH	Phosphitdehydrogenase aus <i>Pseudomonas stutzeri</i> WM88
PLP	Pyridoxalphosphat
PPL	Lipase aus <i>Porcine pancreas</i>
<i>Pse</i> FDH	Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas species</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
q	Quartett (NMR)
<i>RADH</i>	ADH aus <i>Ralstonia species</i>
<i>Re</i>	Reynoldszahl
<i>R<sub>f</sub></i>	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , dt. Ribonukleinsäure
<i>Rr</i> DHL	Haloalkan Dehalogenase aus <i>Rhodococcus rhodochrous</i>
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute in g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
s	Singulett (NMR)
sc	<i>supercritical</i> , dt. superkritisch
SD	Standardabweichung
<i>SDR</i>	<i>short chain dehydrogenases/reductases</i> , dt. kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
Ser	Serin
t	Triplett (NMR)
Thr	Threonin
TEA	Triethanolamin
TEOS	Tetraethoxysilan
ThDP	Thiamindiphosphat
TMR	Tetramethylrhodamin
<i>t<sub>R</sub></i>	Retentionszeit in min
Trp	Tryptophan
<i>TTN</i>	<i>total turnover number</i> , dt. Gesamtumsatzzahl
Tyr	Tyrosin
U	Units
UV/VIS	Photonenabsorptions-spektroskopie (200 nm < λ < 800 nm)
Val	Valin



## ABSTRACT

In order to accomplish more sustainable and efficient enzyme-catalysed syntheses in flow set-ups, a strategy for cofactor regeneration is required. The strategy should cover the following: On the one hand the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) must only be added once to the system, and on the other hand it can be used substoichiometrically. Within the scope of the present work, such a closed-loop system was developed through the support of a phase separation system (FLLEX). The system already known from Döbber *et al.* consisting of HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH and 2-propanol as cosubstrate served as starting point and could be developed into a continuous recycling of the cofactor allowing for the application of substoichiometric amounts. Hereafter, four ketones could be reduced to the corresponding alcohols with space-time yields of up to 117 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and total conversion numbers for NADPH >12,000 mol/mol. Moreover, a substrate switch was performed with only a single cofactor-containing solution, highlighting the flexibility of the system.

Implementation of the established system in an enzymatic domino reaction with lipase B from *Candida antarctica* (CalB) was also successfully executed. Here, the organic output after the FLLEX-system was directly processed without additional capturing or concentrating. While the use of drying columns upstream of CalB proved important to remove any moisture from the system, a large excess of acetylation substrate was still necessary to achieve complete turnovers.

It is particularly noteworthy, that in the above-described mode catalytically active inclusion bodies, or CatIBs, could be used as an alternative strategy for enzyme immobilization. Alcoholdehydrogenase RADH, which exhibits complementary enantioselectivity to LbADH, was used as model enzyme. Physical fixation of the CatIBs containing RADH in a column with silica gel eliminated initial washout and pressure problems. Because of their low activity relative to LbADH, RADH (in CatIBs) had to be used in a two-enzyme system together with HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH. Both enzymes were separated from each other physically allowing LbADH to be responsible for cofactor regeneration, while RADH was employed for the asymmetric reduction of ketones. In this complex system, either good conversions or good ee's could be obtained, while using the cofactor in stoichiometric amounts.

## *Abstract*

Since RADH (in CatIBs) exhibited low activities with 2-propanol, cyclohexanol was used as alternative cosubstrate in the established closed-loop cofactor regeneration system. Under these conditions, a space-time yield of  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and a total turnover number for NADP(H) of 374 mol/mol were obtained over 120 h again using the formerly described closed system. It is particularly noteworthy that this system was able to run for an additional 160 h, with the conversion decreasing to 78%, only.

In addition, the ene-reductase YqjM with a HaloTag™ immobilization strategy could be used in the simple flow-through synthesis. Two different substrates were employed, which could be reduced in good to very good conversions using stoichiometric amounts of cofactor. Implementation into the above mentioned two-enzyme system to enable cofactor regeneration did work as a proof of concept, while good conversions are still to be achieved.

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Um enzymkatalysierte Synthesen im Fluss nachhaltiger und effizienter zu gestalten, benötigt es eine Strategie zur Kofaktor-Regenerierung. Mithilfe dieser Strategie soll der Kofaktor Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) einerseits nur einmal dem System zugeben und andererseits lediglich substöchiometrisch eingesetzt werden müssen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein solches geschlossenes System mit Hilfe eines Phasenseparationssystems (FLLEX) entwickelt werden. Das bereits durch Döbber *et al.* bekannte System bestehend aus HaloTag™-LbADH und 2-Propanol als Kosubstrat diente hierbei als Startpunkt und konnte dahingehend erweitert werden, dass eine permanente Rückführung des Kofaktors und folglich der Einsatz von substöchiometrischen Mengen möglich war. Auf diese Weise konnten vier Ketone zu den entsprechenden Alkoholen mit Raum-Zeit-Ausbeuten bis zu  $117 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und Gesamtumsatzzahlen für NADPH  $>12.000 \text{ mol/mol}$  umgesetzt werden. Außerdem konnte ein Substratwechsel mit nur einer einzigen kofaktorhaltigen Lösung durchgeführt werden, was die Flexibilität des Systems hervorhebt.

Die Implementierung des Systems in eine enzymatische Dominoreaktion mit der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurde die organische Phase nach Separation durch die FLLEX ohne zusätzliches Auffangen und Konzentrieren direkt weiterverarbeitet. Als wichtig stellte sich hier der Einsatz von Trockensäulen vor der CalB-Reaktion heraus, um vorhandene Feuchtigkeit aus dem System zu entfernen. Dennoch benötigte es zeitgleich einen großen Überschuss einer Acetylquelle, um vollständige Umsätze erzielen zu können.

Besonders hervorzuheben ist zudem, dass in dem oben beschriebenen Modul *catalytically active inclusion bodies*, kurz CatIBs, zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden konnten. Die Alkoholdehydrogenase RADH, die eine komplementäre Enantioselektivität zur LbADH aufweist, wurde als Modellenzym verwendet. Die physikalische Fixierung der RADH-haltigen CatIBs in einer Kieselgel-Säule beseitigte anfängliches Auswaschen und auftretende Druckprobleme. Aufgrund der im Verhältnis zur LbADH geringen Aktivität wurde die RADH (in CatIBs) in einem Zwei-Enzym-System zusammen mit der HaloTag™-LbADH verwendet. Beide Enzyme lagen separiert voneinander vor, sodass die LbADH für die Kofaktor-Regenerierung zuständig war, während die RADH für die asymmetrische Reduktion von Ketonen eingesetzt wurde. In diesem komplexen System

## *Kurzzusammenfassung*

konnten entweder gute Umsätze oder gute Enantiomerenüberschüsse unter stöchiometrischem Einsatz des Kofaktors erzielt werden.

Da die RADH (in CatIBs) eine geringe Aktivität mit 2-Propanol aufwies, wurde Cyclohexanol als alternatives Kosubstrat in dem etablierten geschlossenen Kofaktor-Regenerierungssystem verwendet. Unter diesen Bedingungen gelang es, mit dem oben erwähnten geschlossenen System über 120 h eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und eine Gesamtumsatzzahl für NADP(H) von 374 mol/mol zu erzielen. Besonders ist hier hervorzuheben, dass das System weitere 160 h mit Umsatzeinbußen auf 78 % stabil gefahren werden konnte.

Abschließend konnte ebenfalls die Enreduktase YqjM mit HaloTag™-Immobilisierungsstrategie in der Durchflusssynthese eingesetzt werden. Zwei verschiedene Substrate wurden eingesetzt und diese konnten unter Verwendung stöchiometrischer Mengen an Kofaktor in guten bis sehr guten Umsätzen reduziert werden. Die Implementierung in das erwähnte Zwei-Enzym-System, um eine Kofaktor-Regenerierung zu ermöglichen, funktionierte in einer Machbarkeitsstudie, wobei gute Umsätze noch zu erzielen sind.

# 1 EINLEITUNG

*“I can’t see a way through,” said the boy.  
 “Can you see your next step?”  
 „Yes.“  
 “Just take that,” said the horse.*

Charlie Mackesy

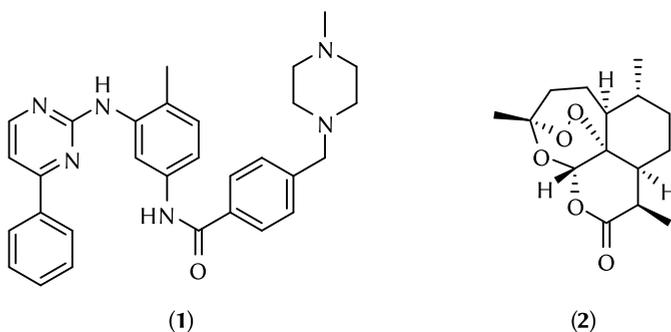
## 1.1 Motivation

Die Industrie und insbesondere die chemische Industrie entwickelt sich stetig weiter und die dahinterstehende Strategie ist mehr unter dem Schlagwort Chemie 4.0 bekannt.<sup>[6]</sup> Dabei geht es grundlegend um wissenschaftliche und technologische Innovationen, die die Chemie durch den Einsatz disruptiver Methoden wie künstlicher Intelligenz, Digitalisierung und Prozessintensivierung grüner und nachhaltiger machen sollen. Eine Möglichkeit für chemische Synthesen, um eben dieses Ziel erreichen zu können, ist der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren und die effiziente Verwendung dieser in der Flusschemie.<sup>[7]</sup> Dabei können solche Enzyme einige Vorteile mit sich bringen: Sie können aus erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden, Reaktionen unter milden Bedingungen katalysieren und bieten durch ihr spezifisches aktives Zentrum hohe Selektivitäten.<sup>[8-10]</sup> So können enzymkatalysierte Prozesse umweltfreundlicher und nachhaltiger gestaltet werden; folglich liegt es nahe, dass sie auch in technischen und industriellen Anwendungen zum Einsatz kommen sollten.<sup>[11, 12]</sup> Aber wie auch jegliche Art von anderen Katalysatoren bringen Enzyme auch Nachteile mit sich:<sup>[13]</sup> Die Isolierung von Enzymen ist aufwendig und teuer, sie lassen sich oft nicht wiederverwenden und sind nicht sehr stabil gegenüber von ihrem natürlichen Milieu abweichenden Reaktionsbedingungen, wie pH, Temperatur oder der Einsatz organischer Lösungsmittel.<sup>[8, 14-18]</sup> Eine Möglichkeit, diese Probleme strategisch anzugehen und um Enzyme für den Fluss nutzbar zu machen, ist die Immobilisierung.<sup>[9, 19, 20]</sup> Dabei werden Enzyme zum Beispiel auf einer Festphase fixiert, was besonders ihre Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen und ihre Langzeitstabilität verbessern kann.<sup>[21]</sup> Solche immobilisierten Enzyme finden bereits in der Industrie beispielsweise in der Ampicillin Synthese ihre Anwendung. Dabei kommt eine immobilisierte Penicillin-Acylase zum Einsatz, welche die Spaltung von Penicillin G zur 6-Aminopenicillansäure (auch bekannt als 6-APA für engl: *6-aminopenicillanic acid*) katalysiert.<sup>[22]</sup> So werden jährlich rund

## Einleitung

7500 Tonnen der Säure, dem Ampicillin-Vorläufer, hergestellt.<sup>[23, 24]</sup> Ein weiteres bekanntes Beispiel ist der Einsatz der immobilisierten Glucose Isomerase für die Produktion von HFCS (engl. *high fructose corn syrup*), der als Süßungsmittel in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird. Es werden jährlich rund zehn Millionen Tonnen des Sirups enzymatisch hergestellt und es handelt sich bei dem Prozess um jenen, mit dem am meisten Produkt mit immobilisierten Enzymen hergestellt wird.<sup>[25]</sup>

Die Immobilisierung ermöglicht auch den Einsatz von Enzymen in der Flusschemie. Obwohl Prozesse im Fluss in der Petrochemie seit mehr als 100 Jahren bekannt sind, haben sie sich in der (Bio-)Chemie erst in der letzten Dekade zu einem nützlichen Werkzeug für die organische Synthese entwickelt.<sup>[26, 27]</sup> Dies beweist auch die Anzahl an Publikationen: wo in den Jahren 2006–2008 nur eine Handvoll verzeichnet werden konnten, waren es im Jahr 2019 bereits über 110 Publikationen.<sup>[28]</sup> Der Großteil ist hier zwar akademischen Ursprungs, jedoch findet die Durchflusssynthese auch immer mehr industrielle Anwendung für die Synthese von Feinchemikalien, Duftstoffen und Pharmazeutika.<sup>[26, 28-30]</sup> Hervorzuheben sind zum Beispiel der Wirkstoff Imatinib (**1**) des Leukämiemedikaments Glivec® (Novartis) oder das Antimalariapräparat Artemisinin (**2**), die vollständig im Fluss zugänglich gemacht wurden (**Abbildung 1**).<sup>[31-33]</sup>



**Abbildung 1.** Strukturformeln von Imatinib (**1**) und Artemisinin (**2**).

Besonders im Feld der Biokatalyse hat die Durchflusschemie in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Der Einsatz von Enzymen in eben diesem Modus ist konzeptionell einfach: Das Enzym wird in einem Reaktor immobilisiert, Substrate werden anschließend durch diesen gepumpt und idealerweise werden sie vollständig zum Produkt umgewandelt, sodass keine zusätzliche Isolierung notwendig wird.<sup>[1]</sup> Allerdings gestaltet sich dies oftmals als Herausforderung, besonders wenn neuartige Immobilisierungstechniken zum Einsatz kommen und Enzyme verwendet werden sollen, die teure Kofaktoren, wie z.B. NAD(P)H benötigen.

## 1.2 Zielsetzung

Aus der genannten Motivation heraus ergibt sich zuallererst die Notwendigkeit eines Systems, welches die Kofaktor-Regenerierung im Fluss ermöglicht. Obwohl bereits viele herausragende Arbeiten zu diesem Thema in der Literatur vorhanden sind, stellt dies in der kontinuierlichen Flusssynthese noch immer eine Aufgabe dar.<sup>[34, 35]</sup> Dennoch ist eine Lösung notwendig, um enzymatische Synthesen in diesem Modus zukünftig effizienter und wirtschaftlicher durchführen zu können. Mit der Entwicklung eines eigenständigen Moduls soll diese Thematik in der ersten Phase der vorliegenden Arbeit adressiert und ein solches System etabliert werden. Eine entscheidende Voraussetzung ist die einmalige Zugabe des Kofaktors, der das System anschließend nicht mehr verlässt, was durch eine Phasenseparationstechnik ermöglicht werden soll. Als Modellenzym kommt die durch Döbber *et al.* entwickelte HaloTag™-LbADH zum Einsatz, die die enantioselektive asymmetrische Reduktion von prochiralen Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen katalysiert.<sup>[36]</sup> Um die Modularität und Flexibilität zu unterstreichen, soll das etablierte System im nächsten Schritt in einer Machbarkeitsstudie sowohl in eine enzymatische als auch organokatalytische Tandemreaktion integriert werden.

Eine weitere Herausforderung, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden soll, ist der Einsatz von katalytisch aktiven Einschlusskörpern (engl. für *catalytically active inclusion bodies*, im Folgenden als CatIBs abgekürzt) in dem entwickelten Modul. Dabei muss zudem eine geeignete Methode gefunden werden, dieses Bionanomaterial in einem Reaktor zu fixieren, ohne ein Rauswaschen zu begünstigen und gleichzeitig Druckprobleme zu vermeiden. Als Modellenzym soll die Alkoholdehydrogenase aus *Ralstonia species* (RADH) verwendet werden, deren besonderes Merkmal ist, Substrate mit zwei großen Substituenten umzusetzen. Zusätzlich soll hierbei generell ein Zwei-Enzym-System entwickelt werden, welches als Basis für die spätere Ausweitung der Anwendung auf die Enreduktase YqjM unter kontinuierlichen Bedingungen dienen soll. So soll die Grundlage für eine Reaktionskaskade geschaffen werden, die bereits von Classen *et al.* im Batch durchgeführt wurde.<sup>[37]</sup>

Während aller genannten Arbeiten sollen verschiedene Flussetups etabliert werden, um dabei ein tiefgreifendes Verständnis für die Komplexität der verschiedenen Enzym- und Flusssysteme zu erlangen. So soll zukünftig die Möglichkeit gegeben sein, Systeme gezielt je nach Anwendungszweck einsetzen zu können.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

*Ein Element des Erfolges, egal in welchem Beruf, ist die Lust am Handwerk.*

Irène Joliot Curie

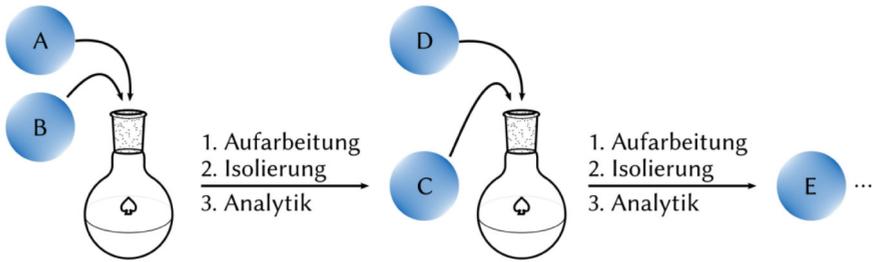
### 2.1 Flusssynthese

#### 2.1.1 Grundlagen der Flusschemie

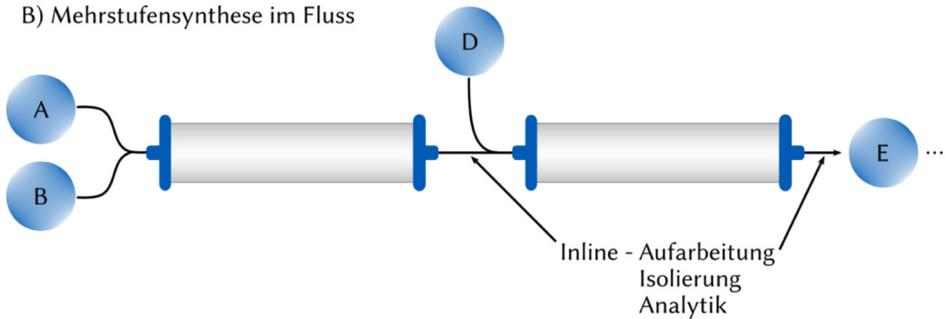
In der Batchchemie werden Reaktionen seit Justus Liebig in gewöhnlichem Equipment aus Glas durchgeführt.<sup>[38, 39]</sup> Synthesen laufen dabei stufenweise ab: Substrate A und B reagieren miteinander, das erhaltene Reaktionsgemisch wird aufgearbeitet und schließlich das Produkt C isoliert und analysiert. Anschließend reagiert dieses Produkt C mit einem weiteren Substrat D zum Endprodukt E, welches ebenfalls aus der Reaktionslösung isoliert werden muss (**Abbildung 2.A**). Alle Schritte werden hierbei separiert voneinander durchgeführt und der Vorteil liegt besonders darin, dass keine Substanzen mehr vorhanden sind, die die nächste Reaktionsstufe stören könnten.<sup>[29]</sup> Allerdings ist der Modus zeitaufwendig und produziert zusätzlich sehr viel Abfall, was es hinsichtlich Chemie 4.0 zu vermeiden gilt.<sup>[40]</sup>

Die Flusschemie hat ihre Wurzeln in der chemischen Verfahrenstechnik und verfolgt hingegen einen anderen Ansatz und dafür kommt ein mikrofluides System zum Einsatz, welches überwiegend aus Pumpen, Schläuchen, Mikroreaktoren und Mischstücken (z.B. T-Stücke oder Y-Stücke) besteht.<sup>[41-44]</sup> Die Kontrolle der Reaktionsparameter verläuft für gewöhnlich computergesteuert, sodass Screenings von optimalen Reaktionsbedingungen nahezu automatisiert ablaufen können.<sup>[43]</sup> Auf diese Weise können Reaktionskaskaden ohne separate Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten durchgeführt werden: Reaktanten A und B werden durch einen Reaktor gepumpt und reagieren zum Produkt C. Dieses wird nicht isoliert, sondern es wird dem System direkt ein weiterer Reaktant D zugeführt, sodass zum Schluss im Idealfall das Produkt E ohne weitere Aufarbeitung erhalten wird.<sup>[45]</sup> An jeder Stelle können zudem einerseits zusätzliche Reaktanten zugeführt werden und andererseits verschiedene *inline*-Bausteine z.B. zur Aufarbeitung, Isolierung oder Analytik implementiert werden (**Abbildung 2.B**).<sup>[38]</sup>

## A) Klassische Mehrstufensynthese im Batch



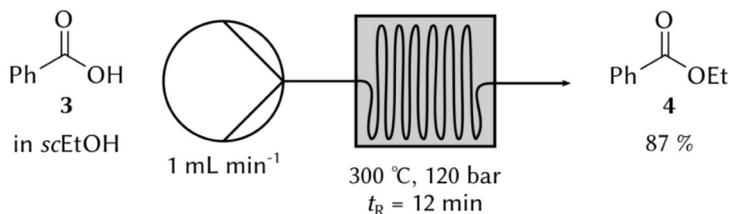
## B) Mehrstufensynthese im Fluss



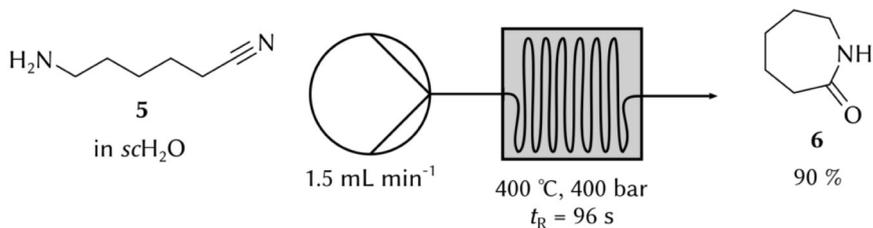
**Abbildung 2.** Schematische Darstellung einer Mehrstufensynthese im Batch (2.A) und im Fluss (2.B). Abbildung angelehnt an Webb und Jamison<sup>[40]</sup>, sowie Jiao *et al.*<sup>[29]</sup>

Generell handelt es sich bei den Flusssystemen um geschlossene Systeme, was im Gegensatz zum Batchaufbau einen erheblichen Sicherheitsaspekt bietet.<sup>[35, 46]</sup> Auf diese Weise wird der Kontakt zu gefährlichen Substanzen minimiert und durch die kleinen Reaktionsvolumina sind stark exotherme Reaktionen gezielt kontrollierbar.<sup>[42]</sup> Zudem sind sehr hohe Temperaturen und Drücke möglich, sodass auch Lösungsmittel unter superkritischen Bedingungen verwendet werden können. Dies zeigten unter anderem eindrucksvoll Kappe und Mitarbeiter<sup>[47]</sup> in der Veresterung von Benzoesäure (3) zu Benzoesäureethylester (4) mit superkritischem Ethanol (scEtOH; **Abbildung 3.A**) oder Yan *et al.*<sup>[48]</sup> in der Hydrolyse und anschließender Zyklisierung von 6-Aminocapronitril (5) zu  $\epsilon$ -Caprolactam (6) mit superkritischem Wasser (scH<sub>2</sub>O, **Abbildung 3.B**).

A)



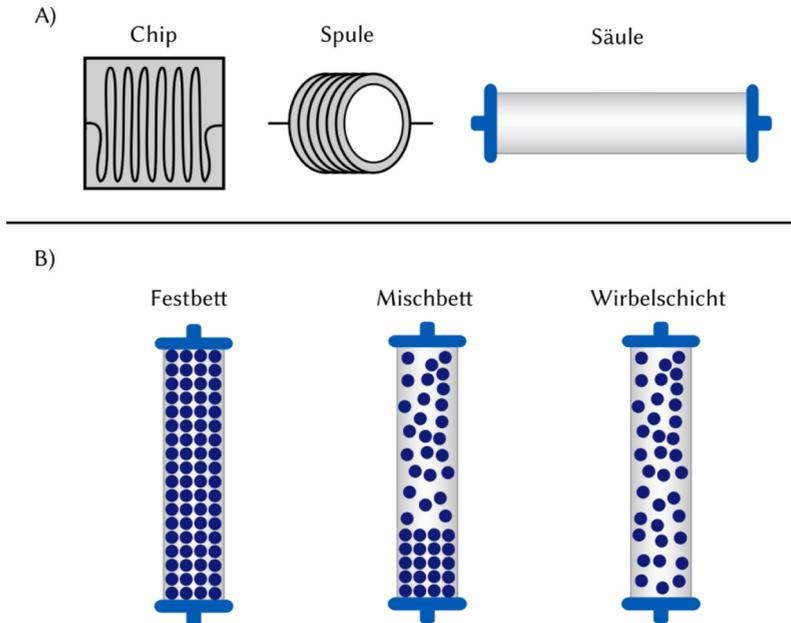
B)



**Abbildung 3.A)** Veresterung von Benzoesäure (3) zu Benzoesäureethylester (4) in superkritischem Ethanol nach Kappe und Mitarbeitern.<sup>[47]</sup> **3.B)** Hydrolyse und anschließende Zyklisierung ausgehend von 6-Aminocapronitril (5) zu ε-Caprolactam (6) in superkritischem Wasser nach Yan *et al.* Reaktoren sind nicht originalgetreu. Abbildung angelehnt an Kirschning und Mitarbeiter.<sup>[38]</sup>

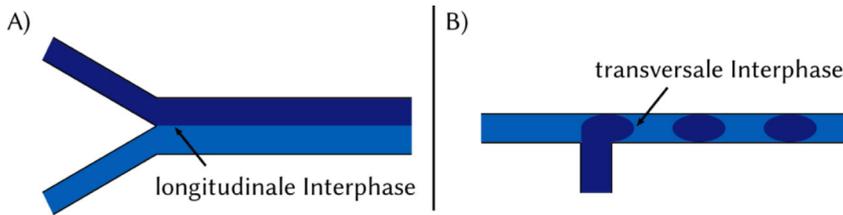
Allgemein wird angenommen, dass die Flusschemie zwar viele Reaktionen um bis zu 50 % effizienter gestalten kann,<sup>[49]</sup> allerdings wird dafür auch kostspieliges technisches Equipment benötigt, wie z.B. Pumpen und separate Geräte zur Einstellung der Temperatur, des Drucks oder *inline*-Analytik, die speziell für diesen Modus konzipiert sind. Zusätzlich werden geeignete Reaktoren benötigt, die überwiegend aus Glas oder Stahl bestehen oder mittlerweile auch mittels des 3D-Drucks hergestellt werden.<sup>[42, 50-53]</sup> Klassischerweise werden je nach Anwendungsfeld Chip-, Spulen und Säulenreaktoren verwendet (**Abbildung 4.A**).<sup>[49]</sup> Letztere sind für die heterogene (Bio-)Katalyse interessant, da Katalysatoren physikalisch fixiert werden können und durch mobile Phasen nicht aus dem System gewaschen werden, was bei Spulen- oder Chipreaktoren der Fall sein kann, sofern keine Magnetnanopartikel eingesetzt werden. Für solche Fest-Flüssig-Reaktionen kann dabei zwischen dem Festbett-, Mischbett- und Wirbelschichtreaktor unterschieden werden (**Abbildung 4.B**):<sup>[42]</sup> Bei dem Festbettreaktor handelt es sich um einen dicht gepackten Reaktor, bei dem nahezu keine Partikelbewegung möglich ist, wohingegen beim Mischreaktor eine dichte Phase (unten) und eine freibewegliche Phase (oben) vorherrschen kann. Da diese beiden Arten von Reaktoren einfach handhabbar sind, werden sie meistens eingesetzt. Der Wirbelschichtreaktor, bei dem alle Partikel frei beweglich sind, wird hingegen für

gewöhnlich kaum eingesetzt, da das System nicht ganz verstanden und das Erreichen von optimalen Bedingungen sehr zeitaufwendig ist.<sup>[42]</sup>



**Abbildung 4.A)** Schematische Darstellung verschiedener Reaktoren für die Flusssynthese. **4.B)** Verschiedene Säulenmodi für Fest-Flüssig-Reaktionen. Abbildung angelehnt an De Santis *et al.*<sup>[49]</sup> und Plutschack *et al.*<sup>[42]</sup>

Da enzymatische Reaktionen oft in wässrigem Milieu ablaufen, sollen im Folgenden noch hydrodynamische Grundlagen betrachtet werden, wenn zwei verschiedene nichtmischbare flüssige Phasen aufeinandertreffen. Unterschieden wird zwischen der laminaren Schichtenströmung mit longitudinaler Interphase (**Abbildung 5.A**) und der turbulenten Schwallströmung mit transversaler Interphase (**Abbildung 5.B**). Bei der Schichtenströmung wird keine Phase in ihrem Fluss unterbrochen, sondern es entsteht eine Interphase, an der die Reaktion stattfinden kann. Begünstigt wird dies z.B. durch niedrige Flussraten oder große Schlauchdurchmesser. In der Regel kommt es aber zur Schwallströmung, denn speziell bei der Verwendung von T-Stücken verursacht die Zufuhr der zweiten Phase (dunkelblau) einen Druckanstieg im System. Sobald dieser hoch genug ist, reißen Tropfen der zugeführten zweiten Phase ab, es kommt zu einem Druckabfall und die erste Phase wird verdrängt. Dies passiert kontinuierlich, sodass ein alternierender Fluss entsteht.<sup>[42]</sup>



**Abbildung 5.A)** Schematische Darstellung der laminaren Schichtenströmung mit longitudinaler Interphase. **5.B)** Schematische Darstellung der turbulenten Schwallströmung mit transversaler Interphase. Abbildung angelehnt an Plutschack *et al.*<sup>[42]</sup>

Das Auftreten dieser Strömungen kann mit der dimensionslosen Reynolds-Zahl ( $Re$ ) aus der Strömungsmechanik beschrieben werden. Sie wird durch die Dichte  $\rho$ , die Strömungsgeschwindigkeit (oder Flussrate)  $v$ , den Schlauchdurchmesser  $d$  und die dynamischen Viskosität  $\eta$  definiert. Bei niedrigen Werten ( $Re < 2040$ ) gilt die laminare, bei hohen Werten die turbulente Strömung als am wahrscheinlichsten (**Formel 1**).<sup>[42, 49]</sup>

$$Re = \frac{\rho * v * d}{\eta} \quad (1)$$

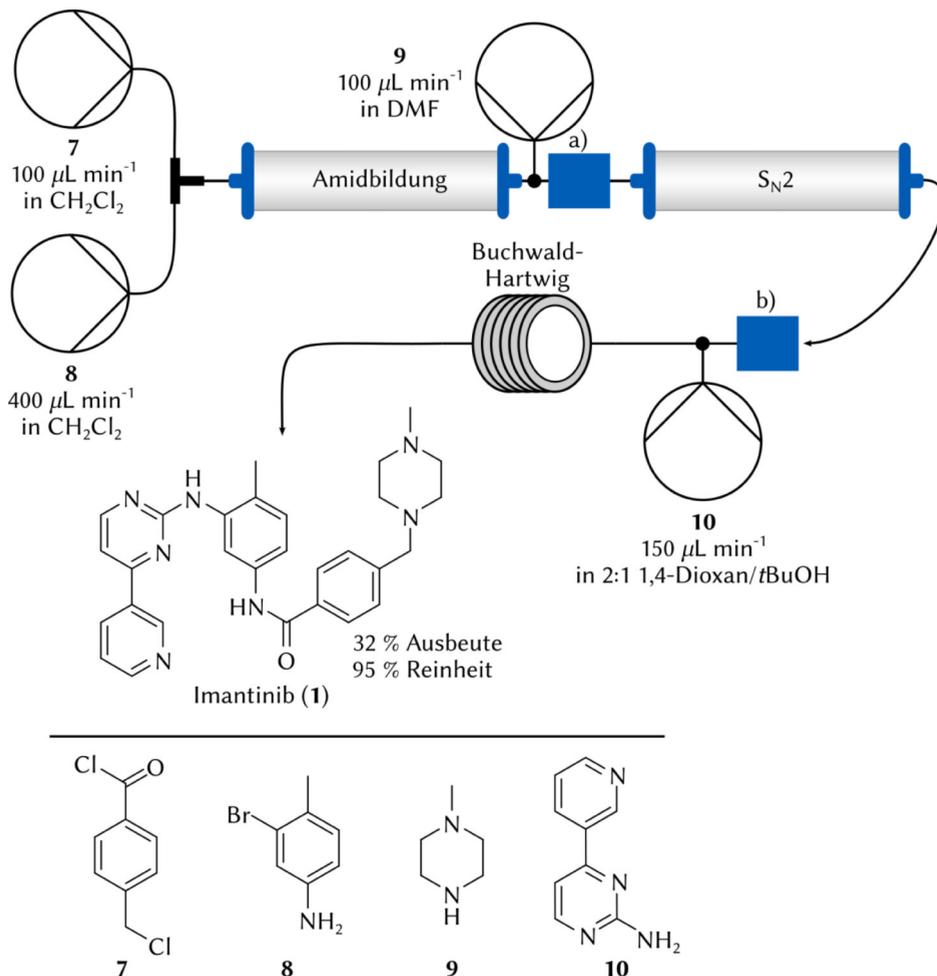
Daneben gibt es weitere bedeutende Parameter mit denen Flussreaktionen definiert werden:<sup>[42, 49, 54, 55]</sup> Der wichtigste Faktor ist die Verweilzeit  $t_R$  (auch bekannt als engl. *residence time*), die durch das Verhältnis von Flussrate zu Länge oder Volumen des Reaktors beschrieben wird und die Zeit zwischen Beginn und Ende einer Reaktion definiert. In den erwähnten Fest-Flüssig-Reaktionen entspricht dies der Differenz der Momente, an dem die mobile Phase den Katalysator z.B. in einem Festbettreaktor erreicht und abschließend verlässt. Eine exakte Bestimmung gestaltet sich jedoch oftmals aufgrund von Totvolumina, Löslichkeiten und verschiedenen Systemdrücken als schwierig. Eine Ermittlung ist beispielsweise mit Hilfe eines Farbstoffes, der durch ein UV/Vis-Spektrometer detektiert wird, oder durch den Einsatz von NaCl- oder KCl-Lösungen mit einem Leitfähigkeitsdetektor möglich.<sup>[56]</sup> Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Raum-Zeit-Ausbeute (im Folgenden auch RZA; engl. *space time yield*), die die Menge des gebildeten Produkts innerhalb der Verweilzeit beschreibt. Sie wird üblicherweise in  $g L^{-1} h^{-1}$  angegeben; durchaus wird auch die Produktivität in  $g L^{-1}$  alternativ verwendet. Abschließend ist hier noch die Stöchiometrie zu erwähnen. In Batchreaktionen ist diese gegeben durch die Konzentration der Substrate in einem bestimmten Volumen, wohingegen sie sich in der Flusschemie neben der Konzentration auch aus der Flussrate ergibt.<sup>[55]</sup> Im Hinblick auf biokatalytische Anwendungen ist unter

dem Stichpunkt der Stöchiometrie die Festphasenbeladung mit Katalysator zu erwähnen, die als Maß für die Menge des verwendeten Enzyms dient (in mg oder g oder als Enzymaktivität U).<sup>[54]</sup> All das berücksichtigend lässt sich zweifelsfrei sagen, dass der Reaktor den größten Effekt auf die Effizienz des gesamten Prozesses hat.<sup>[57]</sup>

### 2.1.2 Beispiele der Flusschemie in der organischen Synthese

Nicht nur akademischen Kontext, sondern auch in der Industrie findet die Flusschemie immer mehr Anwendung für die Synthese von Feinchemikalien, Duftstoffen und Pharmazeutika.<sup>[26, 28, 29]</sup> Die Gruppe um Steven Ley konnte so erfolgreich den Wirkstoff des Leukämiemedikaments Glivec®, Imantinib (**1**), im Fluss synthetisieren, bei dem es sich um einen durch die Novartis AG entwickelten Tyrosinkinase Inhibitor handelt.

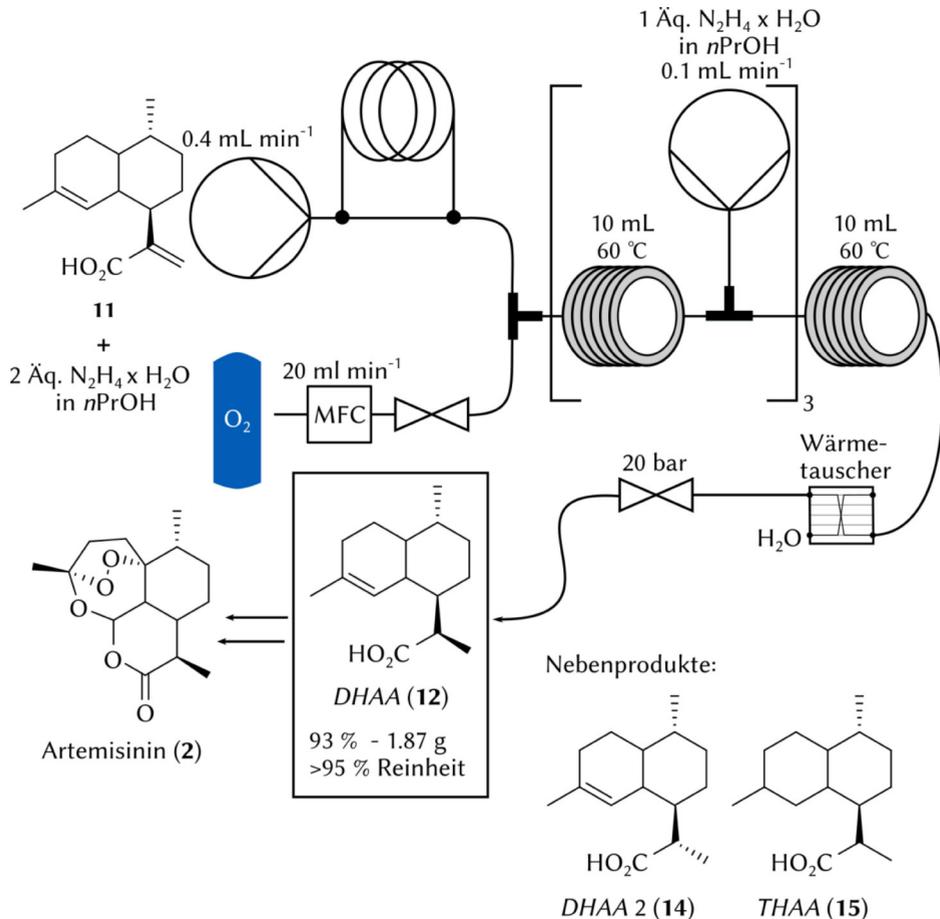
Im ersten Schritt wurden das Säurechlorid **7** und das Anilinderivat **8** unter der Verwendung von auf Polystyrol immobilisiertem DMAP zu einem Amid umgesetzt. Durch die Implementierung eines *inline*-Lösungsmittelwechsels a) musste dieses nicht isoliert werden und konnte unter Zufuhr von *N*-Methylpiperazin (**9**) in einer folgenden S<sub>N</sub>2-Reaktion abreagieren. Für die abschließende Produktisolierung kam eine *catch-and-release*-Aufarbeitung b) zum Einsatz. Bei dieser Methode wird das gewünschte Reaktionsprodukt zuerst aus der Reaktionslösung selektiv an eine Festphase gebunden und im darauffolgenden Schritt gespült, um unerwünschte Verunreinigungen zu entfernen. Das Verfahren wird schließlich durch Eluieren des Produkts finalisiert.<sup>[58]</sup> Im Rahmen der beschriebenen Reaktion wurde nach dieser Reinigung und finaler Buchwald-Hartwig-Aminierung mit Substrat **10** das Imantinib (**1**) mit einer Gesamtausbeute von 32 % und einer Reinheit >95 % erhalten. Die Autoren betonten an dieser Stelle, dass der Kontakt mit Reagenzien oder Zwischenprodukten sehr stark limitiert war und die Syntheseroute ebenfalls die Möglichkeit bietet, weitere Analoga herzustellen.<sup>[33]</sup> Das zugrundeliegende Flussschema ist vereinfacht in **Abbildung 6** gezeigt.



**Abbildung 6.** Vereinfachte Darstellung des Flusschema der Syntheseroute zum Imantinib (1). a) *inline*-Lösungsmittelwechsel, b) *catch-and-release*-Aufarbeitung.

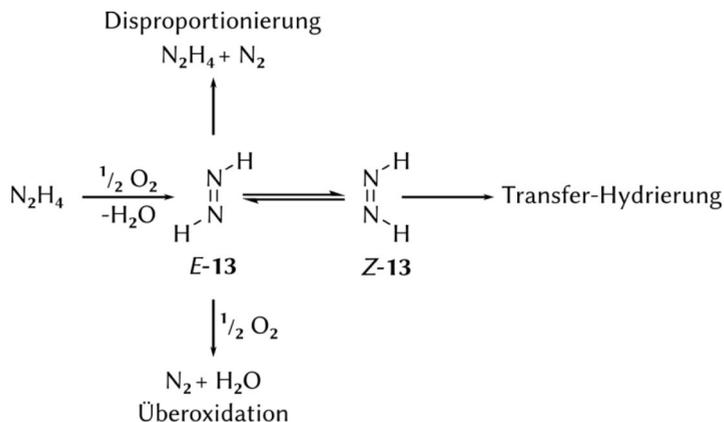
Ein weiterer wichtiger Naturstoff ist Artemisinin (2), der erstmals im Jahre 1971 in China durch Extraktion aus der Pflanze *Artemisia annua* zugänglich gemacht wurde. Der Hintergrund war eine von der Regierung unterstützte Initiative, um ein Antimalariapräparat für nordvietnamesische Truppen während des Vietnamkriegs zu finden.<sup>[59-61]</sup> Die öffentliche Kommunikation erfolgte erst einige Jahre später (1979).<sup>[59-62]</sup> In der darauffolgenden Zeit wurde Artemisinin (2) auf weitere Arten zugänglich gemacht - via Totalsynthese, synthetischer Biologie, semi-synthetisch und im Fluss.<sup>[59]</sup> Gemäß Pieber *et al.* war bis 2015 jedoch keine Umwandlung der Artemisininsäure (11) zur Dihydroartemisininsäure (12, DHAA, engl. für *dihydroartemisinic acid*) im Fluss bekannt,

sondern lediglich die Umsetzung der *DHAA* (**12**) zu Artemisinin (**2**) und folgend zu weiterer pharmazeutisch aktiver Derivate. Dem folgend entwickelten die Autoren eine effiziente zwei Phasen (gas/flüssig) Flusssynthese (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7.** Flussschema der Synthese der Dihydroartemisininsäure (**12**) ausgehend von der Artemisininsäure (**11**). Dabei stellt die *DHAA* (**12**) ein wichtiges Intermediat auf dem Weg zur Synthese des Artemisinins (**2**) dar. Die Abbildung ist angelehnt an de Souza *et al.* und Gilmore *et al.*<sup>[32, 63]</sup>

Dabei wurde unter Verwendung von Hydrazin (als Monohydrat) und Sauerstoff das reaktive Diimin *E*-**13**/*Z*-**13** *in situ* gebildet, welches anschließend die Hydrierung der endständigen Doppelbindung der Artemisininsäure (**11**) durchführte. Allerdings wurde schnell festgestellt, dass Hydrazin/Diimin **13** bereits nach 10 Min verbraucht wurde ohne vollständigen Umsatz der Startverbindung **11**. Eine Begründung lag darin, dass das Diimin **13** durch Disproportionierung zu Hydrazin und Stickstoff oder Überoxidation zu Stickstoff und  $\text{H}_2\text{O}$  dem System entzogen wurde (**Abbildung 8**).<sup>[31, 64]</sup>



**Abbildung 8.** Oxidation von Hydrazin (als Monohydrat) zu Diimin E-13/Z-13 und anschließender Disproportionierung, Überoxidation und Transfer-Hydrierung. Abbildung ist angelehnt an Pieber *et al.*<sup>[64]</sup>

Als möglicher Lösungsansatz wurde die Synthese der DHAA (12) nun im Multiinjektionsverfahren durchgeführt, um dem System kontinuierlich frisches Hydrazin zuzuführen und somit die effektive Reaktionszeit zu erhöhen. Nach erfolgreicher Optimierung stellten sich vier Hydrazinzufuhren (insg. 5 Äq., bzw. 2+1+1+1 Äq.) und eine Reaktionstemperatur von 60 °C als zielführend heraus, um die DHAA (12) mit einer Ausbeute von 80 % nach Kristallisation zu erhalten. Eine GC-MS-Analyse bestätigte zudem die hervorragende Regio- und Diastereoselektivität der Reaktion, da lediglich 1 % des Diastereomers DHAA 2 (14) und 2 % der Tetrahydroartemisininsäure (15, THAA, engl. für *tetrahydroartemisinic acid*) als Nebenprodukte erhalten wurden. In einem Langzeitexperiment konnte die Ausbeute auf 93 % erhöht werden unter der Bildung von nur 2 % der THAA (15). Als weitere Vorteile der Reaktion betonten die Autoren einerseits die einfache und kostengünstige Verfügbarkeit der Startmaterialien und andererseits, dass die Synthese gänzlich ohne die Verwendung von Katalysatoren auskommt, die gewöhnlich für Reduktionen von Olefinen eingesetzt werden und zu unerwünschten Nebenreaktionen führen können.<sup>[31]</sup>

<sup>[32]</sup> Die folgenden Schritte der Photooxidation und Umlagerung zum Artemisinin (2) konnte durch Gilmore *et al.* ebenfalls im Fluss durchgeführt werden.<sup>[32, 63, 65]</sup>

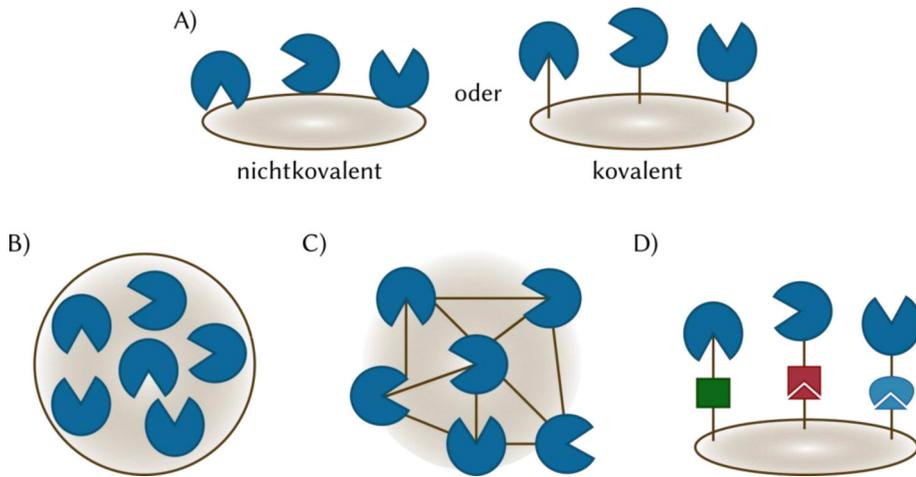
## 2.2 Immobilisierung von Enzymen

„In the broadest sense, enzyme immobilization can be understood as the attachment of enzyme molecules on different types of supports resulting in reduced or loss of mobility to the enzyme“.<sup>[15]</sup> Mit diesem Zitat erläutern Kostrov und Hartmann sehr prägnant, worum es sich bei dem Thema Immobilisierung handelt: Enzyme werden räumlich fixiert und in ihrer Bewegung limitiert. Hierdurch kann einerseits eine erhöhte Stabilität resultieren und andererseits ist es je nach Methode möglich, die Enzyme zurückzugewinnen und wiederzuverwenden.<sup>[16, 17, 66-68]</sup>

Die ersten Versuche der Immobilisierung reichen bis ins Jahr 1916 zurück, als *Nillson* und *Griffin* eine Invertase auf Kohle ohne Einbußen in der katalytischen Aktivität immobilisierten.<sup>[16, 17, 69, 70]</sup> Jedoch dauerte es bis in die 1960/1970er Jahre, bis viele heute bekannten Immobilisierungsstrategien entwickelt und der Fokus auf ein breiteres Portfolio an Enzymen gelegt wurde.<sup>[16, 69, 71]</sup> Auch industriell wurden immobilisierte Enzyme nun attraktiver und auf diese Weise konnten z.B. mit Hilfe einer L-Aminosäureacylase enantiomerenreine L-Aminosäuren aus racemischen Gemischen zugänglich gemacht werden.<sup>[69, 71]</sup> Weder in Forschung und Entwicklung noch der industriellen Anwendung hat sich allerdings bis heute eine universelle Strategie als überlegen durchgesetzt; im Gegenteil wurde eine Vielzahl an Möglichkeiten der Immobilisierung entwickelt und eine jede muss auf das eingesetzte Enzym angepasst werden, was eine sehr zeit- und kostenintensive Optimierung bedeuten kann.<sup>[72, 73]</sup>

### 2.2.1 Immobilisierungsstrategien

Die Immobilisierung von Enzymen kann grundlegend in verschiedene Kategorien unterteilt werden:<sup>[74]</sup> Bindung an ein Trägermaterial durch Physisorption (nichtkovalent) oder Chemisorption (kovalent), Einschluss in eine Polymermatrix und Vernetzung durch den Einsatz von bifunktionellen Vernetzern (z.B. Glutardialdehyd) (**Abbildung 9**).<sup>[75]</sup>



**Abbildung 9.** Darstellung verschiedener Immobilisierungsstrategien. **8.A)** Bindung *an* ein Trägermaterial durch nichtkovalente (Physisorption) oder kovalente Bindung (Chemisorption); **8.B)** Einschluss *in* eine Polymermatrix; **8.C)** Vernetzung durch den Einsatz von bifunktionellen Vernetzern (z.B. Glutaraldehyd); **8.D)** Affinitäts-Tags. Die Darstellungsweise wurde angelehnt an Zhu *et al.*<sup>[76]</sup>

Bei der Immobilisierung eines Enzyms an ein Trägermaterial durch Physisorption handelt es sich um eine einfache und kostengünstige Immobilisierungsstrategie; sie erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte, hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen (**Abbildung 9.A**).<sup>[15, 67, 77, 78]</sup> Für gewöhnlich müssen weder die Festphase noch das Enzym modifiziert werden und die natürliche Struktur des Enzyms bleibt in der Regel erhalten. Prinzipiell ist es sogar möglich Zellrohextrakte zu verwenden, wodurch eine zeitaufwendige Isolierung des Enzyms vermieden werden kann.<sup>[9]</sup> Die Immobilisierung geschieht dabei in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird das Enzym der Wahl in Puffer gelöst, anschließend eine bereits funktionalisierte Festphase (z.B. Ionentauscher) zugegeben und das Reaktionsgemisch über einen definierten Zeitraum inkubiert.<sup>[67, 79]</sup> Während im Vergleich zur Chemisorption hier auch eine Wiederverwendung der Festphase möglich ist, da (inaktives) Enzym von der Festphase entfernt werden kann, gehen mit der Methode auch Nachteile einher. Ein entscheidender Punkt ist die schwache Bindung an die Festphase, sodass es zum Lösen (auch bekannt als engl. *leaching*) des Enzyms kommen kann, was in verminderter Aktivität und Produktkontamination resultiert.<sup>[16, 67, 69]</sup> Bereits geringfügige Änderungen im pH-Wert und der Temperatur können *leaching* des Enzyms hervorrufen oder beschleunigen. Des Weiteren muss das Trägermaterial eine bestimmte Porengröße haben, damit einerseits das Enzym hineindiffundieren und nichtkovalent binden kann<sup>[69]</sup> und andererseits der Massentransfer der Edukte/Produkte gewährleistet ist.<sup>[69, 73, 80, 81]</sup>

Eine Methode das *leaching* zu minimieren ist die Immobilisierung durch Chemisorption der Enzyme an eine Festphase. Im Gegensatz zur Physisorption muss hierbei das Trägermaterial zuvor funktionalisiert werden, um eine unter physiologischen Reaktionsbedingungen irreversible Bindung herstellen zu können.<sup>[15, 82]</sup> Prominente funktionelle Gruppen auf dem Trägermaterial sind Silanole,<sup>[15]</sup> Epoxide,<sup>[79]</sup> Alkohole,<sup>[79]</sup> und Amine,<sup>[79]</sup> um Enzyme gezielt über z.B. Lysine (Amine), Cysteine (Thiole), Asparagin- und Glutaminsäuren (Carboxygruppen) zu binden.<sup>[67, 69, 82]</sup> Eine weitere Aktivierung ist zudem durch Linker wie Carbodiimide oder Glutaraldehyd möglich. Nach der Präparation der Festphase wird das zu immobilisierende Enzym dazugegeben und das Reaktionsgemisch über einen definierten Zeitraum inkubiert.<sup>[67]</sup> Generell ist die Bindungsstärke als ein Vorteil dieser Immobilisierungsmethode anzusehen, da dadurch einerseits das *leaching* des Enzyms minimiert wird, andererseits kommt es so oftmals zu einem Stabilitätsgewinn.<sup>[83]</sup> Dennoch geht diese häufiger mit einem Aktivitätsverlust einher - insbesondere wenn das Enzym konformativ eingeschränkt oder die Immobilisierung via Aminosäuren im reaktiven Zentrum erfolgt ist.<sup>[71]</sup> Zudem ist diese Methode aus den oben genannten Gründen kosten- und arbeitsintensiver als die nichtkovalente Bindung, da eine Wiederverwendung des Trägermaterials durch Entfernen des (inaktivierten) Enzyms nicht ohne weiteres möglich ist.<sup>[75]</sup>

Die nächste Methode ist das Einschlussverfahren, welches nicht mit der Bindung an ein Trägermaterial zu verwechseln ist (**Abbildung 9.B**):<sup>[75, 84]</sup> Der Unterschied liegt in der Herstellung, da es sich um eine „trägerfreie Methode“ handelt; die Matrix wird in Anwesenheit des Enzyms gebildet und folglich kommt es zur physikalischen Fixierung in einer Polymermatrix oder Membran.<sup>[67, 84, 85]</sup> Dadurch wird ein hohes Maß an mechanischer Stabilität gewährleistet, das Enzym gegen äußeren Stress geschützt und die Gefahr der Denaturierung vermindert.<sup>[16, 67, 86, 87]</sup> Die Synthese gestaltet sich einfach: Im ersten Schritt wird das Enzym mit einem Monomer der Wahl gemischt und im zweiten Schritt erfolgt die Polymerisierung des Monomers in gleichzeitiger Anwesenheit des Enzyms.<sup>[67]</sup> Als Polymere kommen bevorzugt Alginate, Polyacrylamide, Sol-Gele oder Hydrogele zum Einsatz und als Membrane werden häufig Hohlfasern oder Mikrokapseln angewendet.<sup>[75, 88-94]</sup> Alternativ können auch 3D-gedruckte Matrices verwendet werden, wie Schmiege *et al.* anhand von PEG-basierten Hydrogelen gezeigt haben.<sup>[95, 96]</sup> Daraus ergibt sich ein breites Portfolio an Möglichkeiten, da sich zum Beispiel die chemische Beständigkeit, Oberflächenfunktionalität, Porengröße und Partikelgröße gezielt variieren lassen.<sup>[19, 49]</sup> Die Porengröße der Matrix ist hier ein wichtiger Faktor, denn sie

ist neben der Dichte des Polymers maßgeblich für den Massentransfer von Edukten und Produkten.<sup>[67, 92]</sup> Sind die Poren zu klein, ist der Massentransfer gehindert, was in niedrigeren Umsätzen und Ausbeuten resultiert; sind die Poren hingegen zu groß, wird das *leaching* begünstigt.<sup>[80, 89]</sup> Dem kann jedoch durch zusätzliche kovalente Anteile entgegengewirkt werden, allerdings auf Kosten der spezifischen Aktivität des Enzyms. Nichtsdestotrotz handelt es sich hierbei um ein beliebtes Verfahren, da es eine schnelle, kostengünstige und milde Methode der Immobilisierung darstellt.<sup>[80, 97]</sup> Zusätzlich bietet es eine breite Flexibilität und es ermöglicht die Wiederverwendung von Enzymen durch gezieltes Lösen aus der Polymerstruktur.<sup>[89]</sup>

Eine weitere trägerlose Alternative ist das Vernetzen von Enzymen über einen bifunktionellen Linker wie Glutaraldehyd (**Abbildung 9.C**).<sup>[98]</sup> Die Methode kann dabei in drei verschiedene Varianten unterteilt werden.<sup>[99]</sup> Die einfachste Variante sind vernetzte gelöste Enzyme (*CLEs*, engl. für *cross-linked enzymes*), die jedoch kaum Anwendung finden, da die verbleibende Aktivität, Reproduzierbarkeit, sowie die mechanische Stabilität nicht jenen der anderen folgenden Varianten entspricht. Die zweite Variante sind vernetzte Enzymkristalle (*CLECs*, engl. für *cross-linked enzyme crystals*). Die ersten Publikationen gehen auf Quioco und Richards Mitte der 1960er Jahre zurück, als so *CLECs* einer Carboxypeptidase A hergestellt wurden.<sup>[100, 101]</sup> Sie bieten einige Vorteile wie eine erhöhte Stabilität gegen Temperatur, pH und organischen Lösungsmitteln. Während sie im Vergleich zu den *CLEs* ebenfalls eine erhöhte mechanische Stabilität aufweisen, ist der entscheidende Nachteil die Herstellung, denn die Enzymkristalle gilt es zuerst durch aufwendige Kristallisation darzustellen.<sup>[102]</sup> Seit dem Jahr 2000 ist eine dritte Variante bekannt - vernetzte Enzymaggregate (*CLEAs*, engl. für *cross-linked enzyme aggregates*). Dabei werden der Enzymlösung zuerst Additive (z.B. organische Lösungsmittel oder Salze) zugegeben, die eine Aggregation des Enzyms induzieren und anschließend erfolgt die kovalente Vernetzung der Aggregate mithilfe von Linkern. Cao *et al.* haben auf diese Weise die Penicilin G Acylase erfolgreich immobilisiert und konnten eine dem freien Enzym ähnliche Aktivität feststellen.<sup>[102, 103]</sup> *CLEAs* sind stabil in organischem Lösungsmittel und bieten außerdem die Möglichkeit kombinierte Konstrukte aus mehreren Enzymen zu bilden, was ein denkbar breites Anwendungspotential eröffnet:<sup>[102]</sup> Freisetzung aromatischer Terpene in Weinen,<sup>[104]</sup> Abwasserreinigung,<sup>[105-107]</sup> simultane Verwendung von Proteasen und Lipasen (die Lipase würde als freies Enzym sonst von der Protease verdaut werden), *in situ* Herstellung von Wasserstoffperoxid<sup>[108]</sup> oder auch die gleichzeitige Verwendung einer

Enoatreduktase mit einer Kofaktor-regenerierenden GDH.<sup>[68, 109]</sup> Der limitierende Faktor beim Einsatz der *CLEAs* ist jedoch die Größe, die typischerweise unter 10  $\mu\text{m}$  beträgt, was in Festbettreaktoren zu starken Druckschwankungen führen kann.<sup>[110]</sup> Dies könnte jedoch durch den Einsatz einer zusätzlichen Festphase wie Kieselgel gelöst werden, wie Ölçücü *et al.* beim Einsatz von ebenfalls sehr kleinen CatIBs gezeigt haben.<sup>[2]</sup>

Die letzte Immobilisierungsmethode ist der Einsatz von sogenannten Affinitäts-Tags, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine entscheidende Rolle spielen (**Abbildung 9.D**). Dabei wird ein Enzym entweder chemisch<sup>[111]</sup> oder auf genetischer<sup>[112]</sup> Ebene mit einem Tag (z.B. Peptid-Tag oder Protein-Domäne) versehen, der anschließend spezifisch kovalent oder physikalisch an ein Trägermaterial bindet.<sup>[113]</sup> Die Vorteile sind einerseits eine hohe Stabilität des Enzyms und andererseits wird eine hohe Beladung ermöglicht. Auf der Kehrseite stehen allerdings hohe Kosten und die Komplexität solcher Systeme. Bekannte Vertreter sind His-Tag,<sup>[114, 115]</sup> der spezifisch an ein Metall bindet, Spytag/Spycatcher,<sup>[116]</sup> Streptavidin/Biotin<sup>[117]</sup> und der HaloTag<sup>TM</sup>,<sup>[118]</sup> der spezifisch an einen HaloTag<sup>TM</sup>-Liganden bindet. Die wichtigsten Punkte der bis hier beschriebenen Methoden werden nochmal in **Tabelle 1** zusammenfassend wiedergegeben.

**Tabelle 1.** Erläuterung verschiedener Immobilisierungstechniken.

Immobilisierungstechnik	Matrix/Trägermaterial (Beispiele)	Charakteristik, Vor- und Nachteile
<i>Physisorption</i> (nichtkovalent)	Ionentauscher	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adsorption via nicht-kovalenter Wechselwirkungen</li> <li>• Milde und kostengünstige Methode</li> <li>• Keine Modifikationen des Enzyms und Trägermaterials zwingend notwendig und eine Wiederverwendung des Trägermaterials ist möglich</li> <li>• <i>Leaching</i> resultiert in Produktkontamination und verminderter Aktivität</li> </ul>
<i>Chemisorption</i> (kovalent)	Trägermaterialien mit Silanolen <sup>[15]</sup> , Epoxiden <sup>[79]</sup> , Alkoholen <sup>[79]</sup> und Aminen <sup>[79]</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kovalente Bindung resultiert in hoher Bindungsstärke</li> <li>• Unter physiologischen Bedingungen meist irreversibel</li> <li>• Stabilitätsgewinn durch die Immobilisierung</li> <li>• <i>Leaching</i> wird minimiert</li> <li>• Aktivitätsverlust durch konformative Einschränkungen und Veränderungen des reaktiven Zentrums möglich</li> <li>• Hohe Kosten, da das Trägermaterial nicht wiederverwendbar ist</li> </ul>
<i>Einschluss in Polymer oder Membran</i>	Alginate, Polyacrylamide, Sol-Gele, Hohlfasern, Mikrokapseln, 3D-Matrizen, PEG-Hydrogele <sup>[75, 88-93, 95, 96]</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Physikalische Fixierung des Enzyms in einer Polymermatrix oder Membran</li> <li>• Schnelle, kostengünstige und trägerfreie Methode</li> <li>• Viele Modifikationen möglich – chemische Beständigkeit, Oberflächenfunktionalität, Porengröße und Partikelgröße</li> </ul>

Vernetzung

Enzym als Träger

- Schutz gegen äußeren Stress und Denaturierung des Enzyms
  - Massentransfer der Edukte/Produkte sowie *leaching* sind problematisch
- 
- Irreversible Vernetzung von Enzymen über bifunktionellen Linker
  - Unterschieden wird zwischen *cross-linked enzymes (CLEs)*, *cross-linked enzyme crystals (CLECs)* und *cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)*
  - *CLEs* besitzen keine zu *CLECs/CLEAs* vergleichbare Aktivität, Reproduzierbarkeit und mechanische Stabilität
  - *CLECs/CLEAs*: Hohe resultierende Enzymaktivität im Vergleich zum freien Enzym; hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln
  - Anzucht der *CLECs* ist zeitaufwendig; *CLEAs* können aufgrund ihrer Größe für Druckschwankungen in Flusssystemen sorgen

Affinitäts-Tags

Funktionalisierte  
Trägermaterialien, Metalle

- Reversible und irreversible Methoden
- Hohe Beladungen möglich
- Hohe Stabilität der Enzyme
- Kosten- und arbeitsintensiv, da z.B. komplexe Fusionsproteine hergestellt werden müssen

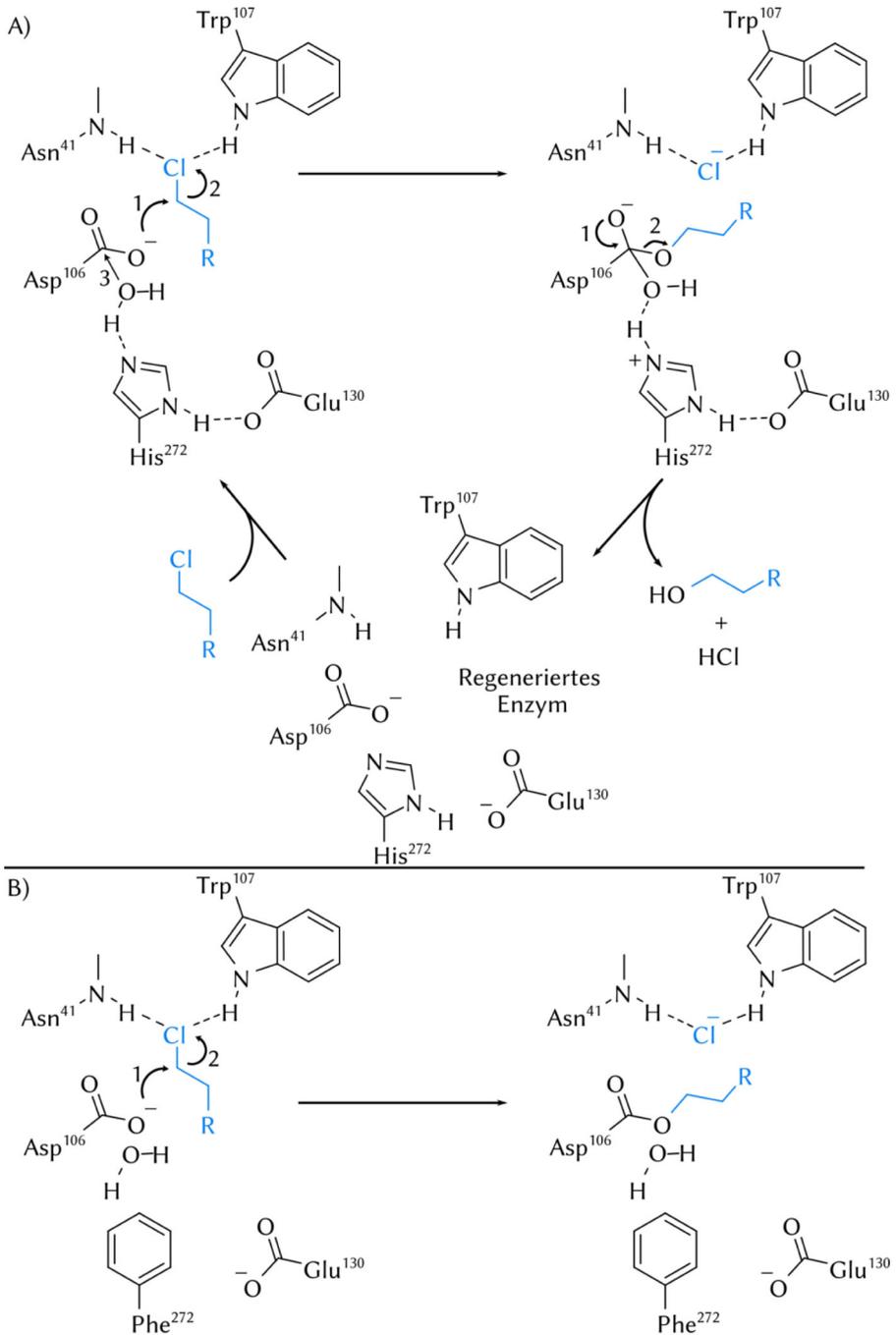
### 2.2.2 HaloTag™-System

Da der im vorherigen Kapitel erwähnte HaloTag™ eine Grundlage dieser Arbeit bildet, wird dieser näher beleuchtet. Das HaloTag™-System wurde von der Promega™ Corporation als System zur Markierung und Bildaufnahme von Säugetierzellen entwickelt.<sup>[119-122]</sup> Die Basis für dieses System wurde bereits 1999 durch Schindler *et al.* gelegt, als sie die Reaktionskinetiken in Bezug auf zahlreiche halogenierte Substrate für zwei Haloalkan Dehalogenasen aus *Xanthobacter autotrophicus* (XaDHL) und *Rhodococcus rhodochrous* (RrDHL) untersuchten.<sup>[123]</sup> Die Arbeiten von Los *et al.* im Jahr 2005 nahmen die RrDHL (oder auch DhaA) dann als Basis für die weitere Entwicklung mit dem Ziel, das Enzym soweit zu modifizieren, dass eine kovalente Bindung des Substrats erfolgt, dieses aber im Vergleich zum Wildtyp nicht wieder hydrolysiert.<sup>[119]</sup> Die detaillierte Funktion soll nun anhand der Mechanismen in Kapitel 2.2.2.1 erläutert werden.

#### 2.2.2.1 DhaA und Mutante - Mechanismen im Vergleich

Die katalytische Triade des Wildtyps besteht aus Aspartat (Asp<sup>106</sup>), Histidin (His<sup>272</sup>) und Glutamin (Glu<sup>130</sup>). Außerdem befinden sich Asparagin (Asn<sup>41</sup>) und Tryptophan (Trp<sup>107</sup>) in räumlicher Nähe und tragen zur Fixierung des Halogenalkans über das Chlorid bei.<sup>[124]</sup> Im ersten Schritt des katalytischen Zyklus greift der Sauerstoff des Asp<sup>106</sup> am  $\alpha$ -C-Atom des Halogenalkans nach S<sub>N</sub>2 an und es wird eine an das Enzym kovalent gebundene Ester-Zwischenstufe gebildet. Das benachbarte His<sup>272</sup> fungiert nun als Base und katalysiert die Hydrolyse dieser Esterverbindung, was die Freisetzung des entsprechenden Alkohols und des Chlorids aus dem katalytischen Zentrum zur Folge hat (**Abbildung 10.A**).<sup>[123-125]</sup> Abschließend wird das Enzym regeneriert.

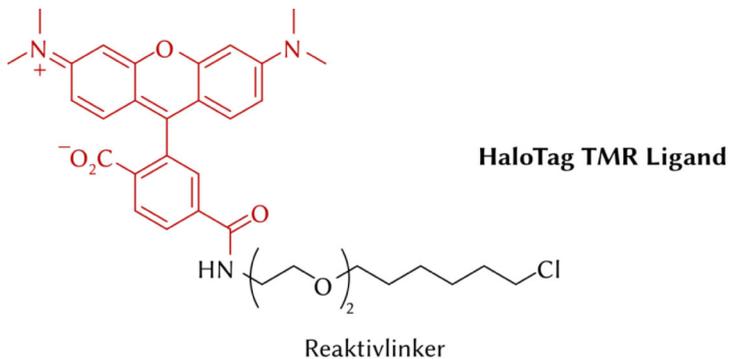
Im Falle der mutierten Variante von Los *et al.* ist His<sup>272</sup> durch Phe<sup>272</sup> ausgetauscht. Im ersten Schritt findet hier wie zuvor die Substitution statt, jedoch wird die Hydrolyse des Esters durch fehlendes His<sup>272</sup> unterbunden, sodass das Substrat kovalent im katalytischen Zentrum gebunden bleibt (**Abbildung 10.B**).<sup>[122]</sup>



**Abbildung 10.A)** Enzymatischer Katalysezyklus des Wildtyps der DhaA. **9.B)** Enzymatische Reaktion der mutierten DhaA, wobei das als Base fungierende His<sup>272</sup> durch Phe<sup>272</sup> ersetzt ist. Dadurch bleibt das Substrat kovalent gebunden in der Enzymtasche. Die Abbildung ist der Originalabbildung von Encell *et al.* nachempfunden.<sup>[121]</sup>

### 2.2.2.2 HaloTag™-Ligand

Soll nun ein HaloTag™-Enzym unter Nutzung des o.g. Mechanismus an einen Fluoreszenzmarker, eine Festphase o.Ä. gekuppelt werden, benötigt das zu kuppelnde Molekül folglich einen halogenhaltigen Rest. Diese Verbindung wird als sogenannter HaloTag™-Ligand definiert und besteht grundlegend aus zwei Teilen; einerseits aus einer Matrix/Festphase (z.B. Sepharose) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (TMR für Trimethylrhodamin) und andererseits aus einem Reaktivlinker (**Abbildung 11**).



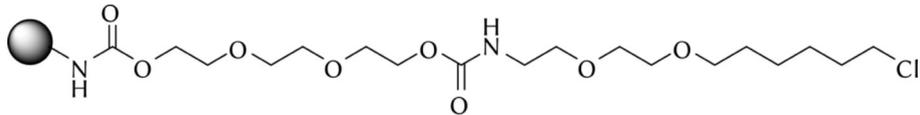
**Abbildung 11)** HaloTag™-TMR-Ligand bestehend aus Trimethylrhodamin-Fluoreszenzmarker und Reaktivlinker zur Bindung an das HaloTag™-Enzym.

Dabei sind einige Eigenschaften für den Reaktivlinker notwendig, um eine Verknüpfung des HaloTag™-Enzyms an den Liganden erfolgreich durchführen zu können:<sup>[119, 120, 122]</sup>

1. Er muss länger sein als die 15 Å der Enzymtasche.<sup>[121]</sup>
2. Er muss eine kovalente Bindung mit dem Enzym eingehen.<sup>[119, 120]</sup>
3. Er muss flexibel sein, damit er sich für den nukleophilen Angriff des Asp<sup>106</sup> ideal positionieren kann.<sup>[120]</sup>

Ein Beispiel eines 17 Å langen Reaktivlinkers besteht aus einem terminalen Chlorid, welches über sechs Kohlenstoffatome an eine flexible Diethylenglykoleinheit gebunden ist (**Abbildung 11**).<sup>[119, 120]</sup> Am gegenüber liegenden Ende besitzt der Linker eine nukleophile primäre Aminofunktionalität, wodurch die Nutzung verschiedener funktionalisierter Festphasen und Fluoreszenzmarker möglich ist. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass die Bindungsaffinität dieses Konstrukts an das HaloTag™-Protein mit  $9.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  vergleichbar hoch wie jene des TMR-Biotin-Liganden an Streptavidin mit  $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ist.<sup>[119]</sup> Dabei gilt die Bindungsaffinität von Biotin an

Streptavidin als sehr hoch für Affinitätstags.<sup>[121, 126-128]</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das HaloTag™-System für die Enzymimmobilisierung verwendet werden und dafür wurde bereits 2008 von Los *et al.* das HaloLink™-Resin entwickelt.<sup>[120]</sup> Der hier hergestellte HaloTag™-Ligand besteht aus einer Sepharose-Matrix, die über ein Zwischenfragment aus drei Ethylenglykoleinheiten an den beschriebenen Reaktivlinker geknüpft ist (**Abbildung 12**). Das zusätzliche Fragment ist notwendig, um einen räumlichen Abstand zwischen der Matrix und dem Enzym zu gewährleisten.<sup>[36, 120]</sup>



**Abbildung 12.** HaloTag™-Ligand basierend auf einer funktionalisierten Sepharose-Festphase mit verknüpftem Reaktivlinker. Kommerziell zu erwerben als HaloLink™-Resin.<sup>[120]</sup>

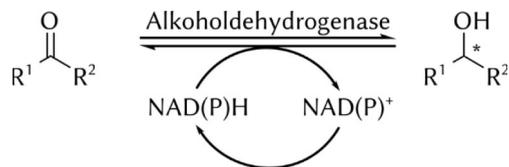
Auf der Kehrseite ist hier dennoch eine zusätzliche Hürde zu beachten. Es muss zuvor ein Fusionsprotein aus dem HaloTag™-Protein und dem gewünschten Enzym produziert werden, was mit erheblichen Aktivitätsverlusten einhergehen kann, wie Döbber *et al.* gezeigt haben.<sup>[36]</sup> Dabei wurde ein Fusionsprotein mit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (im Folgenden HaloTag™-LbADH) gebildet und es konnte in Puffer ein Verlust der spezifischen Aktivität von bis zu 70 % festgestellt werden.<sup>[36, 129]</sup> Für ein Fusionsprotein mit der Benzoylformate-Decarboxylase hingegen betrug dieser ca. 40 %.<sup>[129]</sup> Allerdings war der Verlust nicht nur auf das HaloTag™-System zurückzuführen, sondern auch auf die kovalente Immobilisierung generell, wie bereits in Kapitel 2.2.1 erläutert.<sup>[129-132]</sup> Nichtsdestotrotz bringt die Methode einige Vorteile mit sich. Die Immobilisierung funktioniert aus dem Zellrohextrakt, da das HaloTag™-Enzym selektiv, kovalent und irreversibel an terminale Chloralkane bindet (vgl. Kapitel 2.2.2.1).<sup>[129, 133]</sup> Nicht getaggte Proteine werden nicht gebunden und ausgewaschen, sodass keine weiteren aufwendigen Isolierungs- und Reinigungsschritte notwendig sind. Zudem kann die Immobilisierung im Batch- und im Flussverfahren durchgeführt werden.<sup>[1, 36, 129]</sup>

## 2.3 Enzyme

### 2.3.1 Alkoholdehydrogenasen

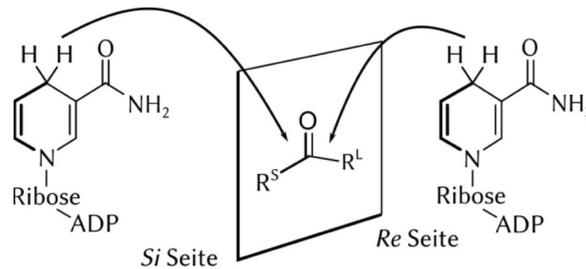
Alkoholdehydrogenasen (ADHs) gehören zu der Klasse der Oxidoreduktasen (*EC* 1.1.1.1 oder 1.1.1.2) und lassen sich grundlegend in zwei Kategorien unterteilen – kurzkettige (*SDRs*) und mittelkettige ADHs (*MDRs*). Kurzkettige ADHs haben ihren Ursprung wahrscheinlich in prokaryotischen Habitaten und besitzen oft lediglich eine eindimensionale  $\alpha/\beta$ -Struktur. Dies bedeutet, dass eine einzige Domäne sowohl für die Bindung des Kofaktors als auch die Katalyse vorhanden ist. Auf der anderen Seite stehen komplexere mittelkettige ADHs, die vermutlich eukaryotischen Ursprungs sind und aus zwei separaten Domänen für denselben Zweck aufgebaut sind.<sup>[134]</sup>

Generell katalysieren ADHs die asymmetrische Reduktion von Aldehyden oder Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen (oder umgekehrt, **Schema 1**). Dafür kommt ein nicotinamidabhängiger Kofaktor [hier NAD(P)H] zum Einsatz, der das benötigte Hydrid für den nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff bereitstellt.



**Schema 1.** Schematische Darstellung der durch eine ADH katalysierte reversible Reduktion eines Ketons zu dem entsprechenden Alkohol. Dabei wird ein Äquivalent NAD(P)H verbraucht.

Dieser Angriff kann von zwei Seiten - der *Re* oder der *Si* Seite - geschehen und beeinflusst die Konfiguration des Produkts, die sich in vielen Fällen vorhersagen lässt. ADHs, die der Prelog-Regel folgen,<sup>[135]</sup> übertragen ein Hydrid des Kofaktors von der *Re* Seite auf den Carbonyl-Kohlenstoff und es wird der (*S*)-Alkohol gebildet, sofern der größere Substituent (hier  $R^L$ ) nach der CIP-Nomenklatur (Cahn-Ingold-Prelog) auch die höhere Priorität besitzt. Dem folgend liefern *anti*-Prelog-ADHs durch Angriff des Hydrids von der *Si* Seite den (*R*)-Alkohol (**Abbildung 13**).<sup>[136-138]</sup>



**Abbildung 13.** *Re* oder der *Si* Seiten Angriff eines Hydrids an ein Keton. Der Kofaktor wurde der übersichtlicher vereinfacht dargestellt. Abbildung angelehnt an Döbber *et al.* und Musa.<sup>[136, 137]</sup>

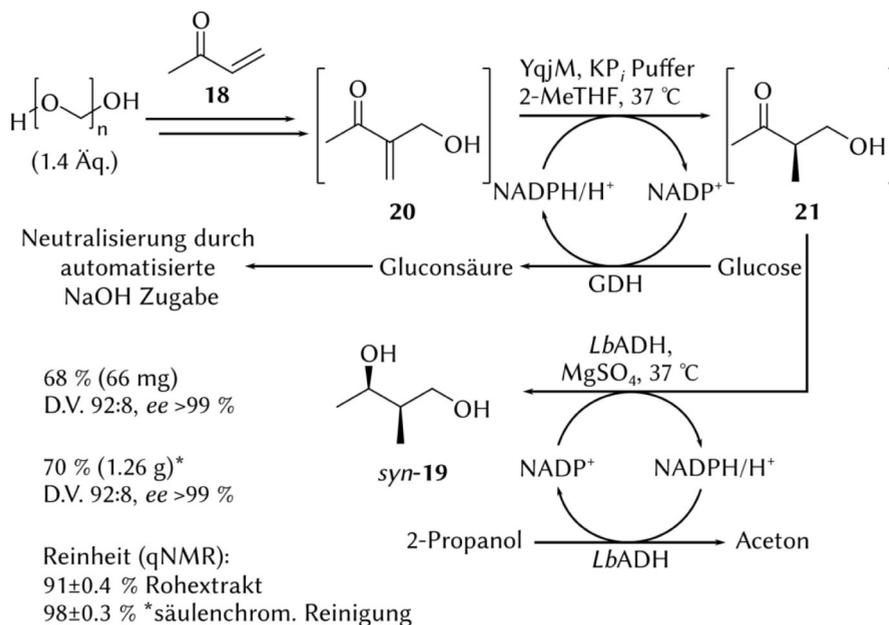
Zwei wichtige Vertreter der ADHs, die auch die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden, sind die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* und *Ralstonia species*. Sie werden nun in den folgenden Kapiteln 2.3.1.1 und 2.3.1.2 vorgestellt.

### 2.3.1.1 Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (*LbADH*)

Die kurzkettige Alkoholdehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus brevis*, im Folgenden auch *LbADH* genannt, wurde erstmal 1997 bei der Untersuchung des *Lactobacillus*-Stranges auf neue ADHs durch die Arbeitsgruppe um Werner Hummel entdeckt.<sup>[139]</sup> Im Allgemeinen wird sie der Enzymklasse 1.1.1.2, den NADP<sup>+</sup>-abhängigen Oxidoreduktasen zugeordnet und ist abhängig von zweiwertigen Metallionen wie Mg<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>.<sup>[140]</sup> Strukturell betrachtet handelt es sich um ein Homotetramer mit einer Größe von 251 Aminosäuren und 26.6 kDa je Einheit.<sup>[140]</sup> Ein einzelnes *LbADH*-Monomer bildet dabei eine große Rossmannfalte mit einem zentralen parallelen  $\beta$ -Faltblatt bestehend aus acht  $\beta$ -Strängen, an deren C-Terminus das aktive Zentrum sitzt. In diesem sind zwei verschieden große hydrophobe Bindetaschen vorhanden, die für die Bindung der Substratreste erforderlich sind. Bei Verwendung von Acetophenon (**16**) als Modellsubstrat wird die Methylgruppe durch Ile<sup>143</sup>, Gly<sup>188</sup>, Glu<sup>144</sup> und Tyr<sup>189</sup> koordiniert.<sup>[137, 140, 141]</sup> Der Carbonylsauerstoff wird durch die katalytisch wichtigen Aminosäuren Ser<sup>142</sup> und Tyr<sup>155</sup> aktiviert und der Carbonylkohlenstoff ist in Richtung des Kofaktors NADPH orientiert. Durch die Ausrichtung der *Si* Seite des Acetophenons (**16**) zum NADPH, wird nach der Reduktion entsprechend (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) erhalten. Dem folgend handelt es sich gemäß Prelog Regel bei der *LbADH* um eine *anti*-Prelog-ADH,<sup>[135]</sup> wobei Ketone mit Halogenen in  $\alpha$ -Position ausgenommen sind, denn es wird nomenklaturbedingt das (*S*)-konfigurierte Produkt gebildet.<sup>[136, 139, 142]</sup>

Generell ist das breite tolerierte Substratspektrum der *Lb*ADH hervorzuheben, wozu zum Beispiel Ketone mit großen Resten, zyklische Ketone, Vinylketone, (Di-)Ketoester oder auch  $\alpha$ -Hydroxyketone zählen, wodurch diverse chirale Produkte zugänglich gemacht werden können.<sup>[27, 139, 142, 143]</sup> Des Weiteren wurde sie in der Vergangenheit in zahlreichen Batch- und Flusssynthesen eingesetzt, wobei im Folgenden zwei ausgewählte Beispiele im Batch präsentiert werden sollen. Die Flusssynthesen werden hingegen noch an anderer geeigneter Stelle erläutert (vgl. Kapitel 2.3.2 & 2.4).

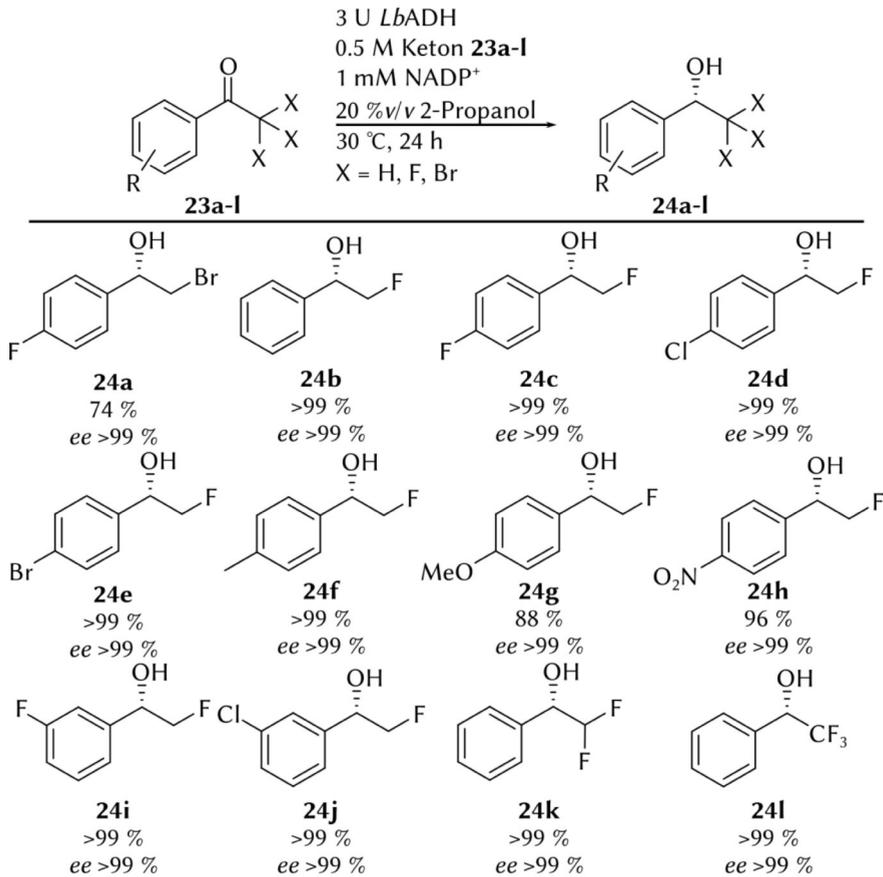
Der Einsatz der *Lb*ADH in kombinierten Chemo- und Biokatalysen ist ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung wichtiger Bausteine unter milden und umweltfreundlicheren Bedingungen.<sup>[144]</sup> Besonders solche Methoden im Eintopfverfahren sind hier hervorzuheben, wie Mantel *et al.* 2021 eindrucksvoll in der Herstellung von  $\alpha$ -methylierten Alkoholen ausgehend von Methylvinylketon (**18**) im Grammmaßstab zeigten.<sup>[145]</sup> Bei der vierstufigen Synthese kamen neben der Enreduktase YqjM die bereits beschriebene *Lb*ADH zum Einsatz, um das (*R,R*)-konfigurierte *syn*-Diol **19** in hervorragenden Stereoselektivitäten und exzellenten Ausbeuten pro Stufe ohne Isolation der Zwischenprodukte **20** und **21** zu erhalten. Zudem wurde die Regenerierung des Kofaktors NADP(H) mit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (GDH) enzymgekoppelt und mit der *Lb*ADH durch den Zusatz von 2-Propanol substratgekoppelt durchgeführt, um hohe Mengen des teuren Kofaktors zu vermeiden. Thematisch bedingt wird an dieser Stelle nur die vierstufige Syntheseroute zum *syn*-Diol **19** illustriert (**Schema 2**); die sechsstufige Route zum *anti*-Diol **22** derselben Autoren wird im Rahmen der *RADH* gezeigt (**Schema 4**).



**Schema 2.** Vierstufiger organo- und biokatalytischer Eintopfprozess zur enantioselektiven Synthese des *syn*-Diols **19** ausgehend vom Methylvinylketon **18**.

Halogenierte Verbindungen spielen heutzutage besonders bei Arzneimitteln eine wichtige Rolle; rund 40 % der in klinischen Studien getesteten Substanzen besitzen ein oder mehrere Halogenatome.<sup>[146]</sup> Die Polarität kann einerseits einen positiven Einfluss auf die Membrandurchlässigkeit eines Wirkstoffes haben, was besonders hinsichtlich der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung ist. Andererseits kann die Anwesenheit von Halogenen einen großen Einfluss auf die biologische Aktivität haben, wie Harris *et al.* am Beispiel des Antibiotikums Vancomycin zeigten, dass ohne Chloride eine um 30–50 % verringerte Wirksamkeit aufwies.<sup>[146, 147]</sup>

So lag es nahe, solche Verbindungen enzymatisch umzusetzen, wie Borzęcka . unter der Verwendung der *LbADH* zeigten.<sup>[148]</sup> Ausgehend der Ketone **23a–I** konnten verschiedene chirale Alkohole **24a–I** in sehr guten bis exzellenten Umsätzen enantiomerenrein zugänglich gemacht werden. Um die Kosten so gering wie nötig zu halten, wurde die Regenerierung des Kofaktors NADPH substratgekoppelt durchgeführt und dieser wurde lediglich substöchiometrisch zum Substrat eingesetzt (**Schema 3**).



**Schema 3.** Synthese verschiedener fluorierter Alkohole **24a-I** unter Verwendung der *Lb*ADH. Die Abbildung wurde Borzëcka *et al.* nachempfunden.<sup>[148]</sup>

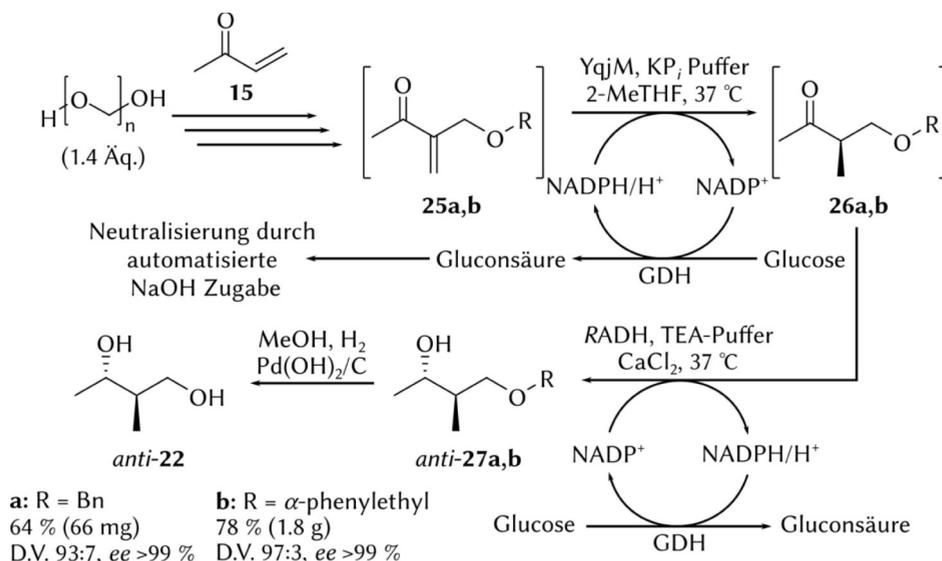
Die Enantiomere konnten ebenfalls durch eine Alkoholdehydrogenase AADH aus *Rhodococcus ruber* erhalten werden.<sup>[148]</sup> Eine ähnliche Synthese wurde einige Jahre später von Hassani *et al.* erneut aufgegriffen und in einem tief eutektischen Lösungsmittel aus Cholinchlorid und Glycerin (1:2 mol/mol) durchgeführt. Auch hier konnten zahlreiche chirale Halohydrine in sehr hohen Umsätzen und Enantiomerenüberschüssen zugänglich gemacht werden.<sup>[149]</sup>

### 2.3.1.2 Alkoholdehydrogenase aus *Ralstonia species* (RADH)

Die meisten Alkoholdehydrogenasen reduzieren Ketone, die zumindest einen kleinen Substituenten tragen, was die Einsatzmöglichkeit oftmals einschränkt.<sup>[150]</sup> 2008 konnte von Lavandera *et al.* eine Alkoholdehydrogenase aus *Ralstonia species* identifiziert werden, mit der genau diese Problematik adressiert werden konnte.<sup>[151]</sup> Bei dieser RADH handelt es sich um eine kurzkettige NADPH-abhängige Prelog-Alkoholdehydrogenase, die aus einer tetrameren Struktur durch vier Monomere aufgebaut ist. Jedes Monomer besteht dabei aus einer klassischen Rossmann-Falte mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt.<sup>[152]</sup> Dadurch entsteht ein hydrophober Tunnel im aktiven Zentrum des Enzyms, bei dem der Nicotinamidring des NADPH am Anfang dieses Tunnels sitzt. In räumlicher Nähe finden sich die Aminosäuren Tyr<sup>150</sup>, Ser<sup>137</sup>, Phe<sup>205</sup>, Leu<sup>144</sup>, Leu<sup>142</sup>, Leu<sup>201</sup>, Val<sup>138</sup>, Ile<sup>91</sup>, His<sup>147</sup> und Gln<sup>191</sup>, wie von Man *et al.* mittels Strukturanalyse festgestellt wurde.<sup>[152]</sup> Dabei ist Tyr<sup>150</sup> sehr wahrscheinlich für die Protonierung eines Alkohols (Produkt nach der Reduktion) verantwortlich, wie von Filling *et al.* beschrieben wurde.<sup>[153]</sup>

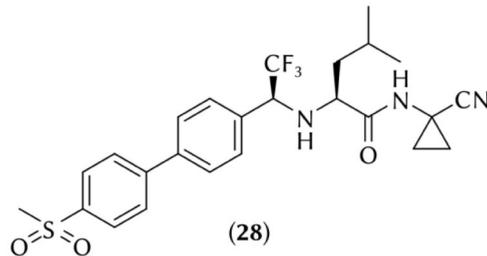
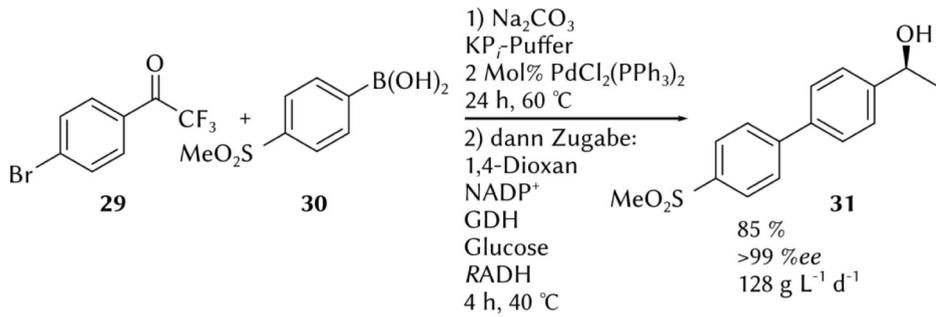
Die RADH ist generell sehr interessant, da sie speziell in der Lage ist, Substrate mit zwei großen Substituenten umzusetzen und hierbei weiterhin hohe Enantio- und Diastereoselektivitäten aufweist.<sup>[151, 152]</sup> Einige hervorzuhebende Beispiele sind zum Beispiel die Umsetzung von 2-Methylbutan-1,3-diol<sup>[145]</sup>,  $\alpha$ -Hydroxyketonen<sup>[154]</sup>,  $\alpha,\alpha$ -Dihaloacetophenonen<sup>[155]</sup>, Thioestern<sup>[156]</sup>, oder  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -ketoestern in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung<sup>[157]</sup>. Auf der Kehrseite ist die ADH trotz der hohen Aktivität mit einer Halbwertszeit von ~6 h nicht besonders stabil; dies kann allerdings durch den Zusatz von Calciumionen auf bis zu 80 h drastisch erhöht<sup>[150, 152]</sup> und durch eine geeignete Immobilisierungsstrategie weiter ausgebaut werden (vgl. Kapitel 3.2).

Einige interessante Anwendungsbeispiele der RADH sollen nun im Folgenden präsentiert werden. Wie schon im Rahmen der *Lb*ADH (**Schema 2**), bewiesen Mantel *et al.* auch unter Verwendung der RADH eindrucksvoll die Kombination von Chemo- und Biokatalyse und konnten in sechs Stufen das (*R,S*)-*anti*-Diol **22** zugänglich machen. Zuerst wurde in fünf Stufen im Eintopfverfahren und ohne Isolierung der Zwischenprodukte **25a,b** und **26a,b** das *anti*-Produkt **27a,b** gebildet, um nach separater abschließender palladiumkatalysierter Hydrierung das *anti*-Diol **22** in hervorragenden Stereoselektivitäten und exzellentem *ee* zu erhalten.<sup>[145]</sup> Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass die Synthese ebenfalls im Grammmaßstab in 78 % (1.8 g) Ausbeute durchgeführt werden konnte (**Schema 4**).



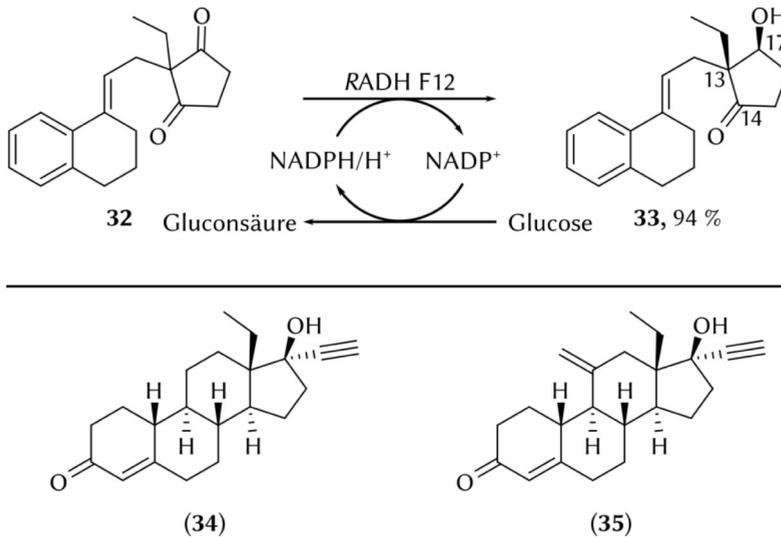
**Schema 4.** Sechsstufiger organo- und biokatalytischer Eintopfprozess zur enantioselektiven Synthese des *anti*-Diols **22** ausgehend von Methylvinylketon (**15**).

González-Martínez *et al.* haben die RADH eingesetzt, um eine Vorstufe des Odanacatib (**28**), einem Inhibitor der Cysteinprotease Cathepsin K, welches in Osteoklasten vorkommt und für den Knochenabbau verantwortlich ist, chemoenzymatisch zugänglich zu machen.<sup>[158, 159]</sup> Die sequenzielle Syntheseroute bestand aus einer Suzuki-Miyaura-Kupplung und einer anschließenden enzymatischen Reduktion in  $KP_i$ -Puffer. Die Autoren hoben dabei besonders die gute Kompatibilität zwischen Palladium und der Alkoholdehydrogenase aus *Ralstonia species* hervor. Ausgehend von dem Trifluoethanon **29** und der Boronsäure **30** konnte das Produkt **31** in 85 % Ausbeute, >99 %*ee* und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 128 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> erfolgreich hergestellt werden (**Schema 5**).



**Schema 5.** Reaktionsgleichung der chemoenzymatischen Sequenz ausgehend vom Trifluoethanon **29** und der Boronsäure **30** zum Odanacatib-Vorläufer **31**. Darstellung von Odanacatib (**28**).

Die fünffache Mutante der RADH-F12 wurde von Chen *et al.* für eine Desymmetrisierung von Ethylsecodion **32** zum (13*R*,17*S*)-Ethylsecol **33** eingesetzt, welches ein wichtiges chirales Intermediat für verschiedene steroidale Medikamente wie Levonorgestrel (**34**) oder Gestoden (**35**) darstellt.<sup>[160, 161]</sup> Bei dieser Reduktion handelte es sich um eine sterisch sehr anspruchsvolle Reaktion, bei der zudem vier verschiedene Stereoisomere gebildet werden konnten. Dennoch war es mit der Mutante möglich, das Secol **33** als einziges Produkt in 94 % Ausbeute zu erhalten (**Schema 6**). Die Autoren betonten, dass dieser Prozess in der Zukunft wichtig sein könnte, um schwierige Probleme der synthetischen Chemie hinsichtlich industrieller Anwendung zu lösen.<sup>[160, 162]</sup>



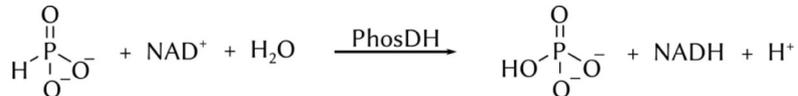
**Schema 6.** Reaktionsgleichung der Desymmetrisierung von Ethylsecodion **32** zum (13*R*,17*S*)-Ethylsecol **33**. Darstellung von Levonorgestrel (**34**) und Gestoden (**35**).

### 2.3.2 Phosphitdehydrogenase (PhosDH)

Die typische Oxidationsstufe von Phosphor in lebenden Zellen beträgt +V, wie z.B. in Nukleotiden, RNA, DNA oder Kofaktoren.<sup>[163-165]</sup> Diese ändert sich für gewöhnlich in enzymatischen Reaktionen auch nicht, sondern es erfolgt nur ein Phosphoryltransfer unter Erhaltung der Oxidationsstufe. Enzyme, die Phosphor einer niedrigeren Oxidationsstufe verwenden oder produzieren, wie Phosphonate (RP(O)(OR')<sub>2</sub> - Oxidationszahl +III - oder Phosphinate (R<sub>2</sub>P(O)OR') - Oxidationszahl +I -, sind hingegen weniger bekannt.<sup>[166]</sup> Ein Beispiel für ein solches Enzym ist die Phosphitdehydrogenase PhosDH aus dem gramnegativen Bakterium *Pseudomonas stutzeri* WM88. Sie wurde 1998 von Metcalf und Wolfe entdeckt und die Charakterisierung und Isolierung wurde 2001 von Costas *et al.* durchgeführt.<sup>[164, 165]</sup> Die PhosDH gehört zu der Familie der NAD<sup>+</sup>-abhängigen D-Hydroxysäuredehydrogenasen und besitzt eine zu 23–34 % identische Sequenz mit anderen Mitgliedern der Enzymklasse.<sup>[167]</sup> Im katalytisch aktiven Zentrum sind zudem einige konservierte Aminosäuren bekannt, die an der Reaktion beteiligt sind – Arg<sup>237</sup>, His<sup>292</sup>, Glu<sup>266</sup> und Lys<sup>76</sup>.<sup>[163, 166, 167]</sup> Eine weitere spätere Studie von Ranaghan *et al.* konnte zusätzlich Met<sup>53</sup> als wichtige Aminosäure identifizieren, die für die Stabilisierung der positiv geladenen His<sup>292</sup>-Seitenkette verantwortlich sein könnte. Dies konnte allerdings strukturell nicht bewiesen werden, sondern es wurde angenommen, dass sich die Interaktion während der Reaktion ausbildet.<sup>[168]</sup> Das pH-Optimum liegt bei

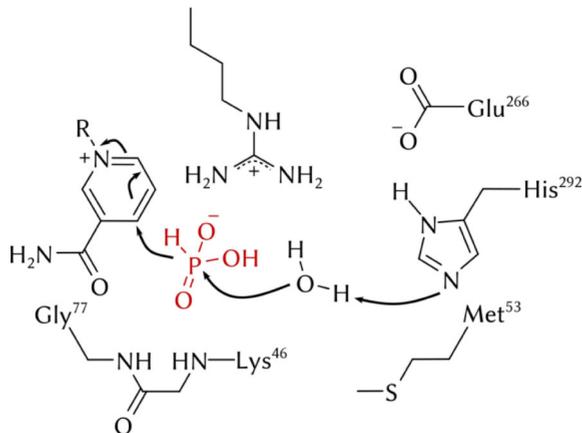
ca. 7.5, jedoch ist sie über einen pH-Bereich von 5–9 aktiv.<sup>[163, 165]</sup> Die natürlichen Substrate der PhosDH sind Phosphit und  $\text{NAD}^+$ , die sie mit einer sehr hohen Affinität umsetzt ( $K_m$ -Werte von  $53.1 \pm 6.7 \mu\text{M}$  und  $54.6 \pm 6.7 \mu\text{M}$ ), weshalb ihre Anwendung auch in der Kofaktor-Regeneration denkbar wäre.<sup>[163, 165, 166, 169]</sup>

Grundlegend wird bei der durch die PhosDH katalysierten Reaktion Phosphit zu Phosphat oxidiert, während  $\text{NAD}^+$  als Hydridakzeptor fungiert und zu NADH reduziert wird (**Schema 7**):<sup>[163, 167, 170]</sup>



**Schema 7.**  $\text{NAD}^+$ -abhängige Oxidation von Phosphit zu Phosphat katalysiert durch die Phosphitdehydrogenase PhosDH.

Der Mechanismus beinhaltet vermutlich drei Schritte – ein Hydridtransfer von Phosphit auf  $\text{NAD}^+$ , ein nukleophiler Angriff durch ein Wassermolekül auf Phosphor und ein Protonentransfer vom Wassermolekül auf die vermutete  $\text{His}^{292}$ -Base.<sup>[171]</sup> Obwohl bereits ausführliche Studien von der Arbeitsgruppe um van der Donk durchgeführt wurden, ist bis heute nicht vollends klar, wie der Mechanismus genau abläuft und insbesondere wie das Enzym den P-H-Bindungsbruch mit Wasser als Nukleophil katalysiert.<sup>[166, 167, 171, 172]</sup> Generell sind drei potenzielle Reaktionspfade möglich - der assoziative, der dissoziative und der konzertierte Mechanismus, die sich in der Reihenfolge der Reaktionsschritte unterscheiden.<sup>[167]</sup> Im assoziativen Mechanismus greift Wasser zuerst nukleophil am Phosphor an, es folgt der Protonentransfer und schließlich der Hydridtransfer, woraus eine pentakoordinierte Phosphorzwischenstufe gebildet wird. Im dissoziativen Mechanismus kommt es hingegen zuerst zum Hydridtransfer auf  $\text{NAD}^+$ , wodurch es zur Ausbildung einer trigonal-planaren Zwischenstufe kommt. Beim letzten potenziellen Pfad, dem konzertierten Mechanismus, finden alle Reaktionsschritte zur gleichen Zeit statt, ohne die Ausbildung einer stabilen Zwischenstufe (**Abbildung 14**).

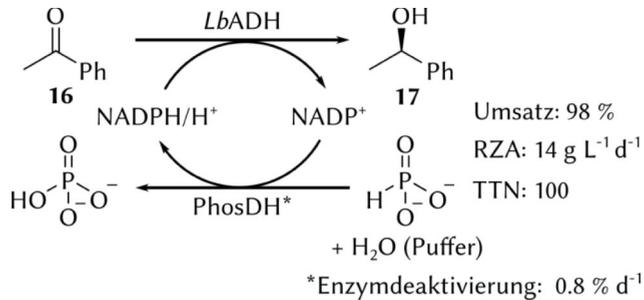


**Abbildung 14.** Genereller Mechanismus der Phosphitdehydrogenase PhosDH. Abbildung Stevens und Hammes-Schiffer sowie Howe und van der Donk nachempfunden.<sup>[171, 172]</sup>

Zusätzlich war wenig bekannt über die Protonierungszustände des Edukts und des Produkts. Eine im Jahre 2020 veröffentlichte ausführliche Studie von Stevens und Hammes-Schiffer sollte durch quantenmechanische und molekularmechanische Simulationen der freien Energien tiefere Einblicke in diese Zustände geben und Rückschlüsse auf den wirklichen Mechanismus ermöglichen.<sup>[171]</sup> Die Simulationen sechs verschiedener Protonierungszustände und zwei möglicher Positionen des Wasserangriffs kamen zu dem Ergebnis, dass es sich um einen konzertierten und asynchronen dissoziativen Mechanismus handeln muss. Dies bedeutet, dass zuerst der Hydridtransfer vom Phosphit auf NAD<sup>+</sup> und anschließend der nukleophile Angriff des Wassermoleküls mit Deprotonierung durch entweder His<sup>292</sup> oder Arg<sup>237</sup> erfolgt. Zusätzlich legten die Berechnungen der freien Energiebarrieren und Reaktionsenergien, die in Übereinstimmung mit experimentellen Daten vorlagen, ein monoanionisches Phosphit als Substrat und Dihydrogenphosphat als Produkt nahe.

Die PhosDH sollte nun auch eine praktische Anwendung finden. Da sie allerdings nur NAD<sup>+</sup> akzeptiert, wurde eine Doppelmutation (E175A und A176R) eingeführt, um ebenfalls NADP<sup>+</sup> als Kofaktor zu tolerieren.<sup>[173]</sup> Weitere Mutationen führten zu einer erhöhten thermischen Stabilität, sodass beispielsweise eine 7000-fach erhöhte Stabilität gegenüber des Wildtyps bei 45 °C erreicht werden konnte. Johannes *et al.* nutzten anschließend ein Zwei-Enzym-System mit der Alkoholdehydrogenase *LbADH* für die Synthese von (*R*)-Phenylethanol (**17**) ausgehend von Acetophenon (**16**) sowohl im Batch, als auch kontinuierlich in einem Enzym-Membranreaktor.<sup>[173]</sup> Nach 180 h kontinuierlicher Produktion konnte ein Umsatz von 98 % (RZA 14 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) mit einer *TTN*

von 100 erreicht werden. Die Enzymdeaktivierung lag bei  $0.8\% \text{ d}^{-1}$ . Das Reaktionsschema ist in **Schema 8** gezeigt.

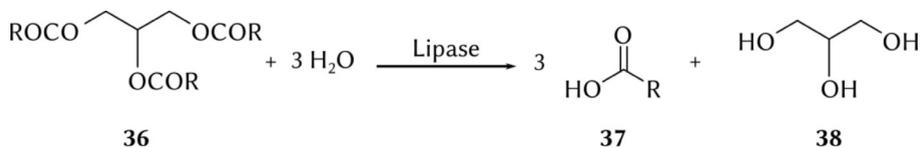


**Schema 8.** Reaktionsschema des Zwei-Enzym-Systems nach Johannes *et al.*<sup>[173]</sup>

Die Reaktion wurde ebenfalls mit einer mutierten *PseFDH* für die Kofaktor-Regenerierung verglichen, die in der gleichen Reaktion bereits von Seelbach *et al.* Verwendung fand.<sup>[174]</sup> Mit ihr konnte, obwohl die aktivere Alkoholdehydrogenase *LkADH* verwendet wurde, lediglich ein Umsatz von 70 % (RZA  $10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) mit einer TTN von 70 erreicht werden. Die Enzymdeaktivierung war mit  $1.1\% \text{ d}^{-1}$  vergleichbar.

### 2.3.3 *Candida antarctica* Lipase B (*CalB*)

Lipasen gehören zu den wichtigsten Vertretern der Enzyme in der Biokatalyse. Dabei handelt es sich um Hydrolasen (*EC* 3.1.1.3), die in ihrer natürlichen Umgebung die Hydrolyse von Triacylglycerolen **36** zu den entsprechenden Fettsäuren **37** und Glycerin (**38**) katalysieren, wie im folgenden **Schema 9** schematisch illustriert.<sup>[175]</sup>



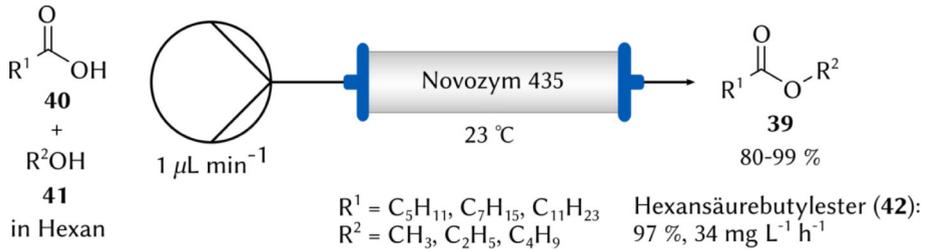
**Schema 9.** Hydrolytische Spaltung von Triacylglycerolen **36** durch Lipasen zu Fettsäuren **37** und Glycerin (**38**).

Sie benötigen keine Kofaktoren, wobei die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen positiven Einfluss auf die Aktivität hat, während  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  eher zu einer leichten Inhibierung der Lipase führen.<sup>[176]</sup> Ihr bevorzugtes pH-Milieu liegt für gewöhnlich zwischen vier und acht, wobei es hier Ausnahmen gibt, wie z.B. die Lipase aus *Aspergillus niger*, die im sauren Milieu und jene aus *Pseudomonas nitroaeducens*, die bei einem pH-Wert von elf besonders aktiv sind.<sup>[176]</sup> Generell wurden Lipasen bereits in einer Vielzahl von

Reaktionen wie Veresterungen, Umesterungen und Hydrolysen eingesetzt.<sup>[177-179]</sup> Die ausgezeichnete Regio-, Chemo- und Stereoselektivität,<sup>[178]</sup> sowie ihre Toleranz gegenüber verschiedenen Reaktionsmedien, wie wässrige und organische Systeme, ionische und superkritische Flüssigkeiten, als auch eutektische Lösungsmittel machen sie zu einem sehr nützlichen Werkzeug für die organische Synthese.<sup>[177]</sup> Industriell wurden Lipasen bereits vielfältig für die Synthese von APIs und Feinchemikalien eingesetzt, wobei ebenfalls die Produktion von Biodiesel immer mehr in den Fokus rückt.<sup>[176, 178, 179]</sup>

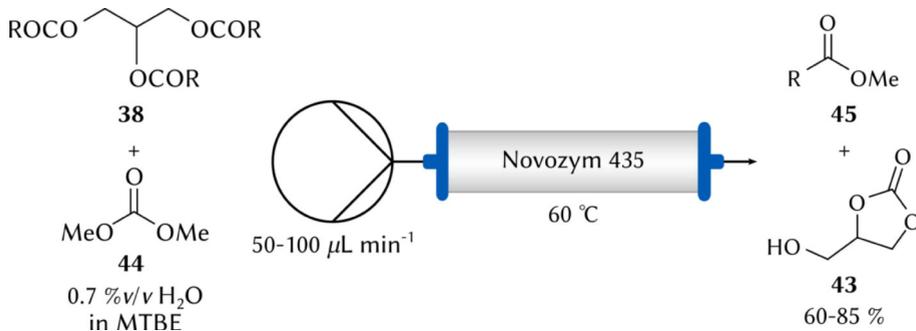
Der bekannteste Vertreter dieser Enzymklasse ist die Lipase B aus *Candida antarctica* (im weiteren Verlauf CalB).<sup>[180]</sup> Bei dem 33 kDa großen Enzym handelt es sich um ein  $\alpha/\beta$ -Protein aus 317 Aminosäuren mit einer katalytischen Triade aus Ser<sup>105</sup>-His<sup>224</sup>-Asp<sup>187</sup> in der aktiven Tasche.<sup>[177, 181]</sup> Bereits 1992 wurde sie auf einem makroporösen Acrylpolymer (Lewatit® VP OC 1600 von Lanxess) immobilisiert und wird heute kommerziell unter dem Namen Novozym 435 von Novozymes A/S Denmark vertrieben.<sup>[177, 182]</sup> Die CalB wurde bereits akademisch und industriell in zahlreichen Batch- und Flusssynthesen eingesetzt.<sup>[183, 184]</sup> Neben der Anwendung in der Biodieselproduktion kam sie bei kinetischen Racematspaltungen<sup>[185-187]</sup> oder verschiedenen chemischen Reaktionen, wie der Morita-Baylis-Hillman-Reaktion,<sup>[188]</sup> Michael-Addition,<sup>[189]</sup> Knoevenagel-Kondensation<sup>[190]</sup> oder Acylierung<sup>[191-193]</sup> zum Einsatz. Dies ist jedoch nur eine kleine Auswahl an möglichen Anwendungen der Lipase.<sup>[177]</sup> Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Anwendung im Fluss liegt, sollen im Folgenden ausgewählte Beispiele in diesem Modus präsentiert werden.

2008 postulierten Woodcock *et al.* eine effiziente Methode zur Synthese von verschiedenen Alkylestern **39**.<sup>[179, 194]</sup> Dazu wurde eine 0.20 M Lösung aus 1:1 Säure **40**:Alkohol **41** in Hexan über eine mit Novozym 435 befüllte Säule (100 mg; 30 cm x 1.65 mm, **Schema 10**) gepumpt. Die Veresterung wurde bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1  $\mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Nach 2 h konnten bereits gute bis exzellente Umsätze erzielt werden und ebenfalls ein Langzeitversuch über 7.5 h zu Hexansäurebutylester (**42**) resultierte in 97 % Umsatz und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 34  $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ .<sup>[194]</sup>



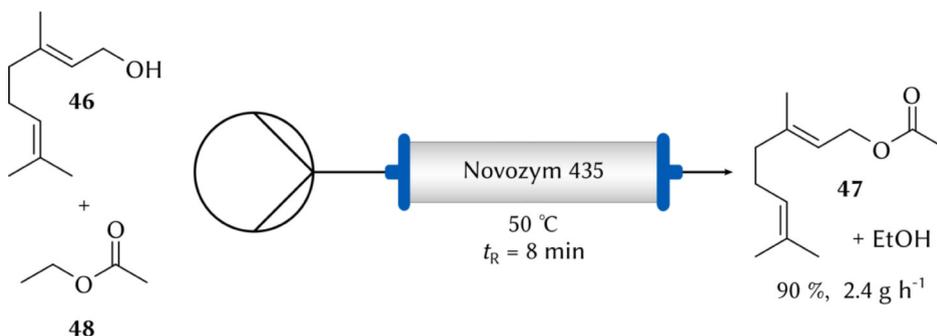
**Schema 10.** Novozym 435 katalysierte Synthese von verschiedenen Alkylestern **39** ausgehend von einer 1:1-Mischung aus Säure **40** und Alkohol **41** in der kontinuierlichen Flusssynthese. Schema angelehnt an Britton *et al.*<sup>[195]</sup>

Leão *et al.* nutzten das Novozym 435 für die Umesterung von Glycerin (**38**) zu Glycerincarbonat (**43**).<sup>[196]</sup> Glycerin (**38**) ist ein Nebenprodukt bei der Herstellung von Biodiesel mit 25 Mol% und macht bezogen auf die gesamte Produktionskapazität rund 10 %m/m aus. Es kann zwar in verschiedenen Industrien weiterverarbeitet werden, aber mit steigender Biodieselproduktion kommt es zu einer Überproduktion. Eine Möglichkeit damit umzugehen ist die *in situ* Synthese von zum Beispiel Glycerincarbonat (**43**), das in den letzten Jahren vielfältige Anwendung in der chemischen, pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie gefunden hat.<sup>[196]</sup> Für diesen Zweck verwendeten die Autoren eine Reaktionslösung aus einem pflanzlichen Öl (**38**) und Dimethylcarbonat (**44**) im Verhältnis 1:10 %v/v mit 0.7 %v/v Wasser in MTBE. Die Lösung wurde über eine mit 1.02 g Enzym bepackte Säule (5 x 1.8 cm) bei 50 und 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  gepumpt, dass in Verweilzeiten von  $t_R = 88$  min bzw. 176 min resultierte und neben Biodiesel **45** konnten gute bis sehr gute Umsätze von 60–85 % zum Glycerincarbonat (**43**) erzielt werden (**Schema 11**). Durch die Verwendung von auf Epoxidharz koimmobilisierter CalB und *Porcine pancreas* Lipase (PPL) konnte der Umsatz auf >99 % gesteigert werden.<sup>[197]</sup>



**Schema 11.** Synthese von Glycerincarbonat (**43**) und Biodiesel **45** ausgehend von pflanzlichen Ölen (**38**) und Dimethylcarbonat (**44**).

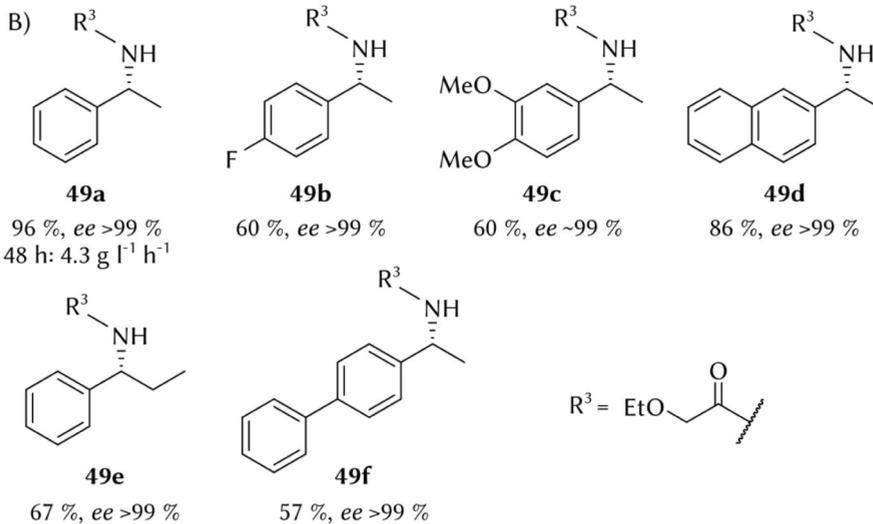
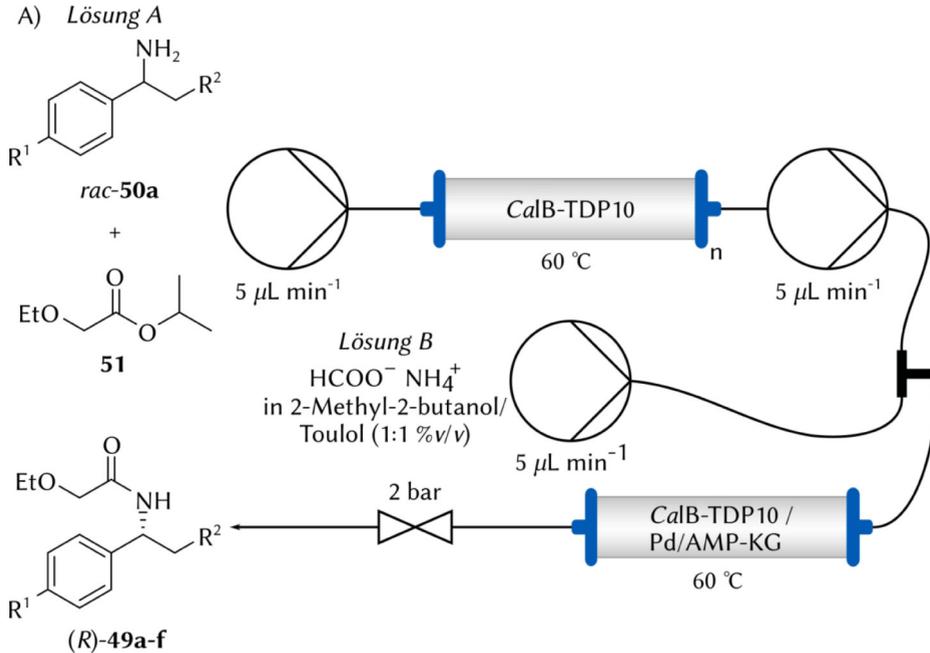
Eine weitere enzymatische Umesterung wurde 2018 durch Adarme *et al.* publiziert.<sup>[198]</sup> Ausgehend von Geraniol (**46**) wurden in der kontinuierlichen Flusssynthese verschiedene Monoterpenester [z.B. Geranylacetat (**47**)] und Ethanol synthetisiert. Dazu wurden als Modellreaktion 150 mg mL<sup>-1</sup> Geraniol (**46**) in Ethylacetat (**48**) durch einen Enzymreaktor (1.00 g Enzym; 8.0 mm x 4.9 cm) bei 50 °C gepumpt und als Enzyme kamen unter anderem das kommerzielle Novozym 435 und eine auf Epoxidharz immobilisierte CalB (CALEPO\_A) zum Einsatz. Für beide Enzyme wurden für Verweilzeiten von 8–60 min sehr gute Umsätze von 80–90 % zum Geranylacetat (**47**) erreicht (**Schema 12**). Dies entsprach einer Produktivität von 2.4 g h<sup>-1</sup> für das Novozym 435 und 2.26 g h<sup>-1</sup> für CALEPO\_A, wobei im letzteren Fall rund sechsmal weniger Protein auf der Festphase vorhanden war. Während CALEPO\_A folglich produktiver war, besaß es jedoch eine schlechte Langzeitstabilität, was eine industrielle Anwendung nicht möglich macht. Das Novozym 435 hingegen produzierte über 8 h konstant hohe Umsätze von bis zu 90 %.<sup>[198]</sup>



**Schema 12.** Umesterung von Geraniol (**46**) und Ethylacetat (**48**) zum Geranylacetat **47** und Ethanol durch das Novozym 435 unter kontinuierlichen Flussbedingungen.

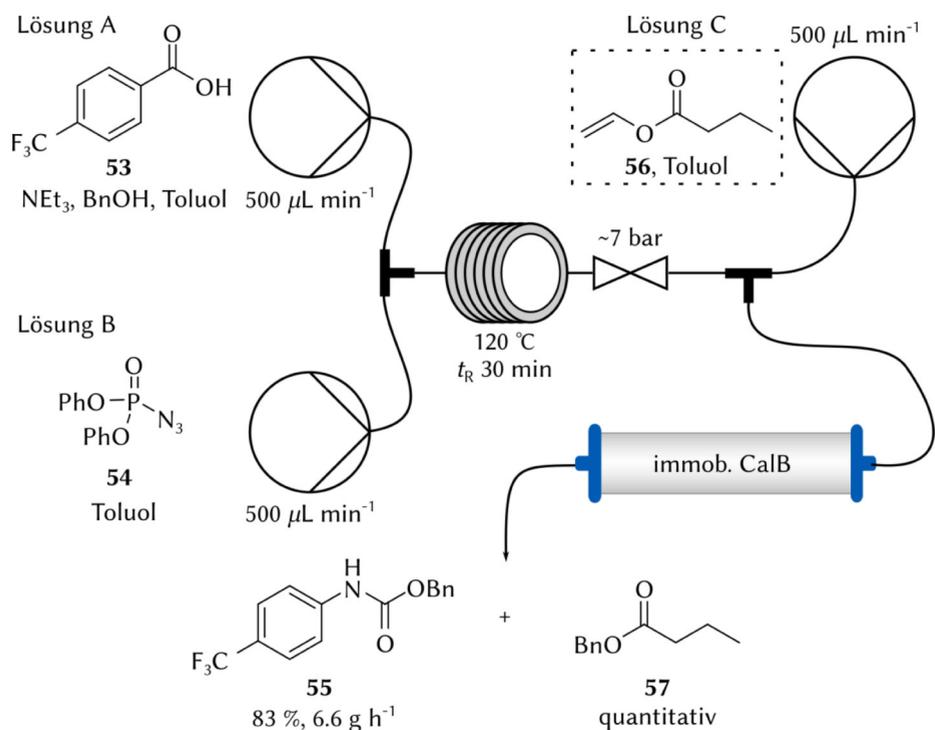
Die CalB konnte auch für dynamisch kinetische Racematspaltungen im kontinuierlichen Fluss eingesetzt werden, wie Farkas *et al.* zeigten. Sie nutzten dafür eine auf Sol-Gel immobilisierte CalB-TDP10<sup>[97]</sup> (TDP für die Organosilane TEOS/DMDEOS/PTEOS), um Amide (*R*)-**49a–f** enantiomerenrein zugänglich zu machen (**Schema 13.A**).<sup>[199, 200]</sup> Dazu wurde im ersten Schritt Lösung A, bestehend aus einem racemischen Amin **50a–f** und 2-Ethoxyisopropylacetat (**51**), über eine oder zwei CalB-TDP10-Säulen gepumpt, woraus das entsprechende (*R*)-Amide **49a–f** mit dem nahezu maximal möglichen 50 % Umsatz hervorging. Die anderen 50 % entsprachen dem nicht umgesetzten (*S*)-Amin **50a–f**. Die Anzahl der benötigten Säulen hing dabei vom eingesetzten Amin ab, da zum Beispiel für Amine **50c** und **50e** mit einer Säule lediglich 34 % und 25 % Umsatz möglich waren.

Der Fluss wurde anschließend über ein T-Stück mit Ammoniumformiat in 2-Methyl-2-butanol/Toluol (1:1 %v/v) kombiniert und über eine heterogen gepackte Säule aus Pd/AMP-KG und CalB-TDP10 gepumpt. Der Palladiumkatalysator diente der Racemisierung des (*S*)-Amins **50a–f** und nach einer ausführlichen Studie stellte sich Pd/AMP-KG (AMP für 3-Aminopropyl, KG für Kieselgel) als am effizientesten heraus. Generell verlaufen metallkatalysierte Racemisierungen von Aminen über eine Imin-Zwischenstufe, wobei weitere Nebenprodukte wie sekundäre Amine, Kohlenwasserstoffe oder Ketone entstehen können.<sup>[199, 201, 202]</sup> Durch zusätzliche Wasserstoff- und Ammoniakquellen können diese Nebenreaktionen jedoch unterdrückt werden und Ammoniumformiat stellte sich als geeignetes Substrat heraus.<sup>[203–205]</sup> Mit diesem Aufbau konnten verschiedene Amide **49a–f** in guten bis exzellenten Ausbeuten und hervorragenden Enantiomerenverhältnissen synthetisiert werden (**Schema 13.B**). Um die Stabilität und Effizienz dieses Systems zu unterstreichen, wurde *rac*-**50a** für 48 h kontinuierlich umgesetzt und das Amid **49a** in einer RZA von ca. 4.3 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und *ee* >99 % erhalten.<sup>[199, 200]</sup>



**Schema 13.A)** Schematischer Flussaufbau der dynamisch kinetischen Racematspaltung ausgehend von racemischen den Aminen **50a-f** zu den enantiomerenreinen Amiden **49a-f** durch die Verwendung einer Sol-Gel immobilisierten CalB-TDP10 und eines Palladium-Katalysators Pd/AMP-KG. **B)** Darstellung der synthetisierten Amide **49a-f**.

Neben verschiedenen Synthesen wurde die CalB auch dafür verwendet, um die Isolierung der Produkte einer DPPA (52)-vermittelten Curtius-Umlagerung zu vereinfachen, wie Baumann *et al.* basierend auf einer Studie aus 2008 von Tierney und Mitarbeitern eindrucksvoll zeigten (**Schema 14**).<sup>[206, 207]</sup> Als Modellsubstrat diente hier das Benzoessäurederivat **53**, das mit der Azidspezies **54** zu dem Carbamat **55** umgesetzt wurde. Dazu wurde Lösung A über ein T-Stück mit Lösung B verknüpft und mit jeweils 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  durch drei Spulenreaktoren bei 120  $^{\circ}\text{C}$  gepumpt. Während so die erwähnte Umlagerung mit einer Verweilzeit von 30 min durchgeführt werden konnte, gestaltete sich die anschließende Produktisolierung schwierig, da sich entstehender Benzylalkohol nicht komplett entfernen ließ. Eine CalB-katalysierte Umsetzung mittels Buttersäurevinylester (**56**, Lösung C) zu dem Ester **57** in einer Domino-Reaktion erleichterte die Isolierung, da dieser organisch extrahiert werden konnte. So konnten schließlich 22 g des Carbamats **55** in rund 4 h isoliert werden, was einer sehr guten Ausbeute von 83 % und einer bemerkenswerten RZA von 6.6  $\text{g h}^{-1}$  entsprach.

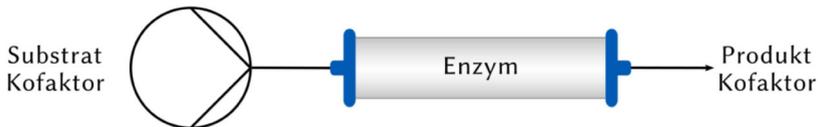


**Schema 14.** Curtius-Umlagerung ausgehend vom Benzoessäurederivat **53** und einer Azidspezies **54** zum Carbamat **55** in der kontinuierlichen Flusssynthese. Um die Isolierung des Produkts zu vereinfachen, wurde *in situ* gebildeter Benzylalkohol mittels Buttersäurevinylester (**56**) und immobilisierter CalB zum Produkt **57** verestert, welches durch Extraktion entfernt werden konnte.

## 2.4 Kofaktor-Regenerierung in der Durchflusssynthese

Die Kofaktor-Regenerierung im Durchfluss kann auf verschiedene Arten geschehen. Es wird unterschieden zwischen dem einfachen Durchfluss (**Schema 15.A**), der Verwendung von immobilisiertem oder eingeschlossenem Kofaktor (**Schema 15.B**) und der Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf (**Schema 15.C**).<sup>[1]</sup>

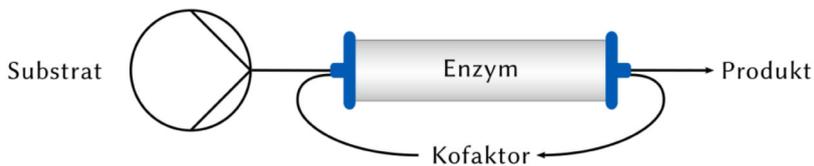
### A) Einfacher Durchfluss



### B) Immobilisierter oder eingeschlossener Kofaktor



### C) Kofaktor-Regenerierung in geschlossenem Kreislauf



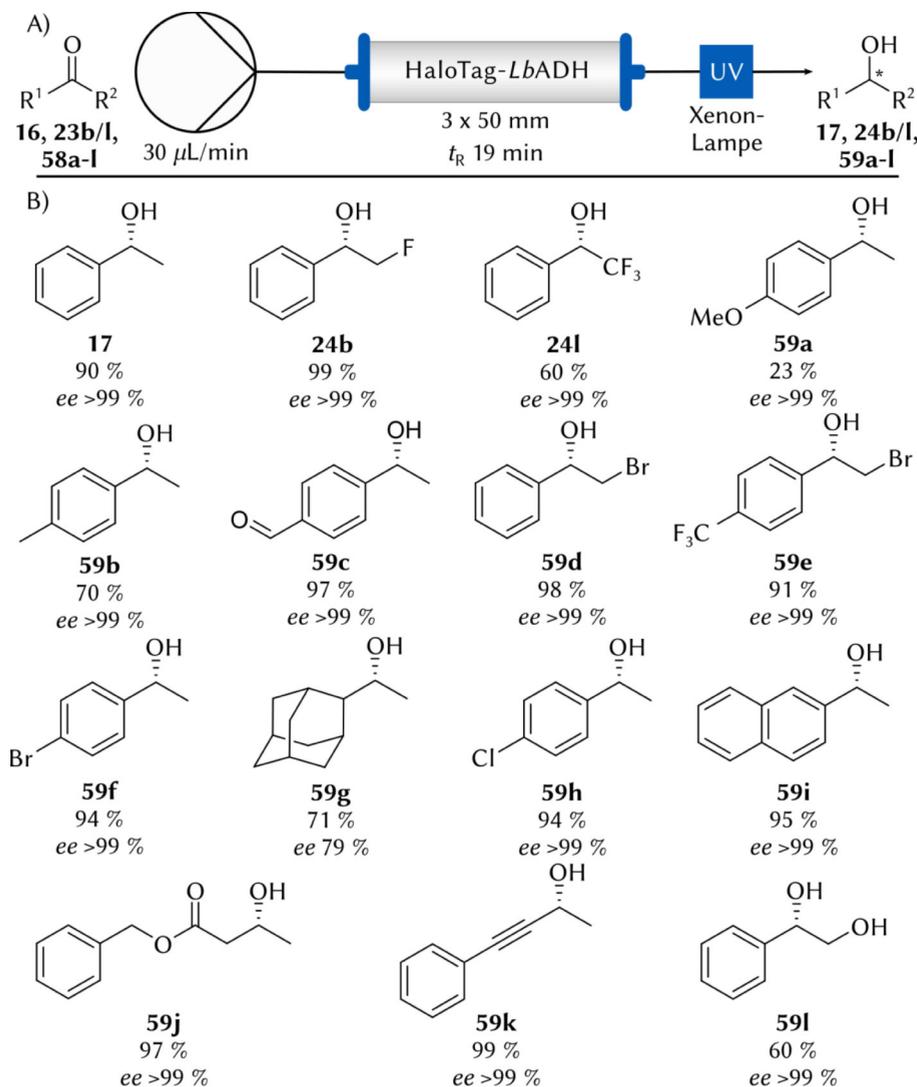
**Schema 15.** Übersicht über die verschiedenen Kofaktor-Regenerierungssysteme in der Durchflusssynthese.<sup>[1]</sup>

Die verschiedenen Systeme, deren Unterschiede, sowie der Stand der Literatur werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

### 2.4.1 Kofaktor-Regenerierung im einfachen Durchfluss

Im einfachen Durchfluss wird eine Mischung aus Substrat, Kofaktor und Puffer vorgelegt und anschließend durch einen Enzymreaktor gepumpt. Dabei kommt es einerseits zur Umsetzung des Substrats zum Produkt, andererseits auch zur Oxidation oder Reduktion des verwendeten Kofaktors. Anschließend verlässt die Lösung den Reaktor und daher muss kontinuierlich für die Zugabe des Kofaktors gesorgt werden, was dieses Verfahren teuer macht. In diesem Modus haben Döbber *et al.* 2018 die HaloTag<sup>TM</sup>-immobilisierte Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (im Folgenden HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH) als

Biotkatalysator für die asymmetrische Reduktion der Ketone **16**, **23b/l**, **58-l** zu den entsprechenden chiralen Alkoholen **17**, **24b/l**, **59a-l** eingesetzt (Schema 16.A).<sup>[129]</sup>



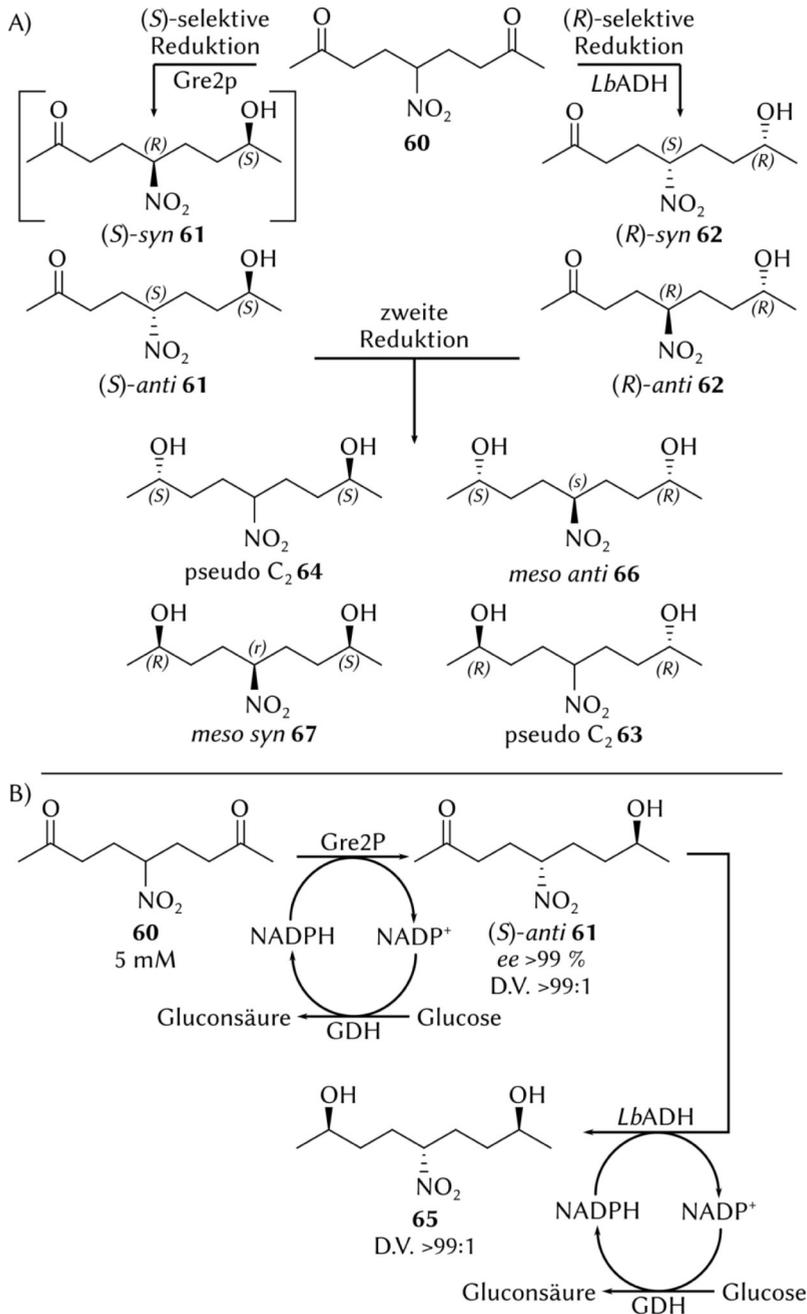
**Schema 16.A)** Flusschema zur asymmetrischen Reduktion nach Döbber *et al.* Die *inline* Reaktionskontrolle wurde mit Hilfe von UV-Adsorption durchgeführt. **B)** 15 verschiedene Ketone **16**, **23b/l**, **58a-l** wurden zu den entsprechenden Alkoholen **17**, **24b/l**, **59a-l** reduziert. Die Abbildung wurde der Originalabbildung von Döbber *et al.* nachempfunden.<sup>[36]</sup>

Dazu wurde eine Lösung aus 50 mM Keton und 0.5 mM NADPH in  $KP_r$ -Puffer (50 mM, pH 7, 1.0 mM  $MgCl_2 \cdot H_2O$ ) vorgelegt. Zusätzlich wurden 10 %v/v 2-Propanol als Kosubstrat zugegeben, um durch die enzymkatalysierte Oxidation von 2-Propanol zu Aceton die *in situ* Regenerierung des Kofaktors zu ermöglichen. So konnte der Einsatz des teuren

Kofaktors auf lediglich 1 Mol% minimiert werden. Je nach Substrat mussten zusätzlich 30 %v/v THF als Lösungsvermittler zugegeben werden, was in einer Gesamtkonzentration von 40 %v/v Lösungsmittel resultierte. Auch dies wurde mit Aktivitätseinbußen von der immobilisierten ADH toleriert. Insgesamt konnten 15 verschiedene Alkohole in überwiegend sehr guten Ausbeuten, sowie nahezu durchgängig exzellenten Enantiomerenüberschüssen >99 % zugänglich gemacht werden (**Schema 16.B**). Abschließend konnte das System für 138 h ohne Umsatzeinbußen stabil gefahren werden.<sup>[36]</sup>

Peschke *et al.* veröffentlichten 2017 die Reduktion des prochiralen 5-Nitrononan-2,8-dions (**60**) im einfachen Durchfluss unter Verwendung von zwei enantiokomplementären Oxidoreduktasen; die (*R*)-selektive *Lb*ADH sowie die (*S*)-selektive Methylglyoxal-Reduktase Gre2p. Zusätzlich wurde die GDH für eine enzymgekoppelte Kofaktor-Regeneration eingesetzt, sodass mit 20 % substöchiometrische Mengen an NADPH eingesetzt werden mussten. Alle Enzyme wurden auf genetischer Ebene mit einem Streptavidin-Bindeprotein versehen und auf Magnetnanopartikel immobilisiert.

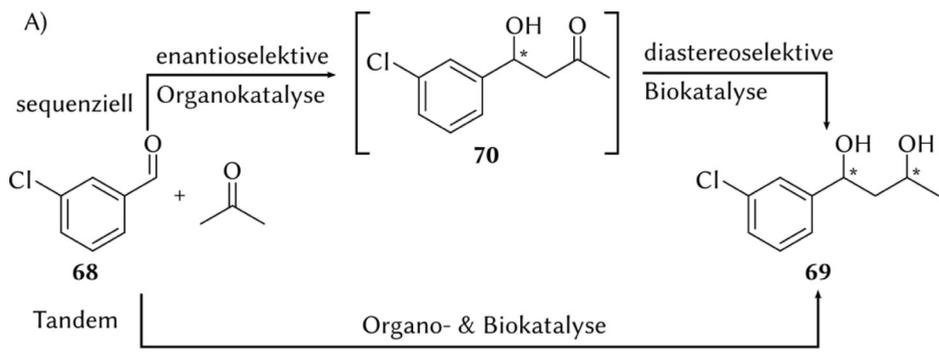
Das Modellsubstrat **60** wurde im ersten Schritt enzymatisch zu verschiedenen Hydroxyketonen **61** und **62** reduziert, wohingegen jenes Keton (*S*)-*syn* **61** über die vorliegende Route nicht zugänglich gemacht werden konnte. Dabei produzierte die *Lb*ADH (*R*)-*syn/anti*-Hydroxyketone **62** mit hervorragendem Enantiomerenverhältnis von >99:1 und einem D.V. von ~60:40. Wenn ein Überschuss an Glukose für die Kofaktor-Regenerierung eingesetzt wurde, erfolgte eine weitere langsame Umsetzung zum pseudo C<sub>2</sub>-Diol **63**. Die Langzeitstabilität wurde zusätzlich über 350 h verfolgt und es konnte keine nennenswerte Reduktion in Enzymaktivität oder Stereoselektivität festgestellt werden. Die Verwendung der Gre2p führte ausschließlich zur Produktion des (*S*)-*anti*-Hydroxyketons **61** und eine weitere langsame Reduktion war auch in diesem zum pseudo C<sub>2</sub>-Diol **64** möglich. Auch hier wurde die Langzeitstabilität über mind. sechs Tage verfolgt und das (*S*)-*anti*-Hydroxyketon **61** konnte anfänglich mit >84 % Umsatz zugänglich gemacht, fiel im Laufe des Experiments jedoch auf ca. 30 % ab, was wahrscheinlich durch eine Inaktivierung des Enzyms über die Zeit zu begründen war (**Schema 17.A**). Anschließend wurden die Gre2p und *Lb*ADH hintereinandergeschaltet, wobei zuerst die Gre2p zum Einsatz kam. Dabei wurden zudem die Reaktorgröße und die Enzymbeladung variiert und so konnte das Diol **65** mit einem Umsatz von 74 % und einem D.V. >99:1 erhalten werden (**Schema 17.B**).



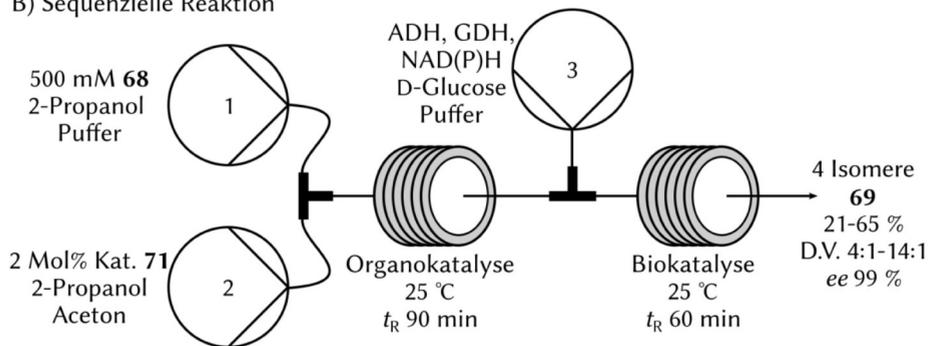
**Schema 17.A)** Sequenzielle enzymatische Reduktion des Diketons **60** zu entsprechenden Hydroxyketonen **61/62** und Diolen **63/64** und **66/67**. Gezeigt sind alle mit diesen Enzymen möglichen Stereoisomere. **B)** Reaktionsschema der Reduktion (**60**) zu dem Hydroxyketon **61** im ersten Schritt und einem Diol **65** im zweiten Schritt. Die Reaktionen wurden durch die Ketoreduktasen Gre2p und LbADH katalysiert unter der Verwendung von NADPH als Kofaktor. Für die Regenerierung kam die Glucose-1-dehydrogenase (GDH) zum Einsatz. Die Abbildung wurde angelehnt an Niemeyer und Mitarbeiter.<sup>[208]</sup>

Im direkten Vergleich konnte das gleiche Produkt im Batchverfahren nur mit einem Umsatz von 38 % und einem D.V. von 39:61 erhalten werden.<sup>[208]</sup> Eine abschließende Untersuchung zeigte, welchen Einfluss die Reaktorkonfiguration auf Diastereoselektivität hatte. Abhängig vom eingesetzten Enzymverhältnis (%*m/m*) konnte bei einem Verhältnis von 4:1 Gre2p/*Lb*ADH nahezu vollständig das *meso-anti*-Diol **66** (D.V. **66/63** 95:5) zugänglich gemacht werden, wohingegen im umgekehrten Falle (1:4 für Gre2p:*Lb*ADH) in nahezu ausschließlicher Produktion des pseudo C<sub>2</sub>-Diols **63** (D.V. **66/63** 98:2) resultierte. Das *meso-syn*-Diol **67** konnte nicht erhalten werden.

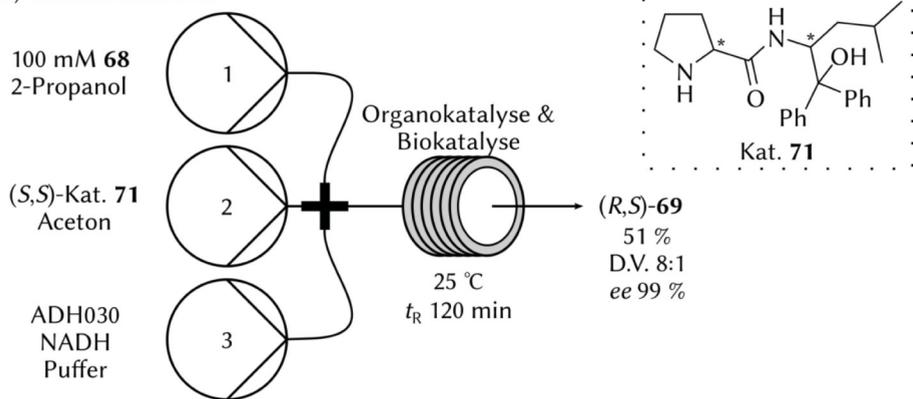
Eine kürzlich veröffentlichte Studie der Gröger Arbeitsgruppe zeigte eindrucksvoll die Reaktionskaskade ausgehend von *m*-Chlorbenzaldehyd (**68**) und Aceton zur Synthese von 1,3-Diolen **69**. Grundlegend handelte es sich dabei um eine enantioselektive organokatalysierte Aldolreaktion zum Alkohol **70** in Schritt 1, gefolgt von einer biokatalytischen Reduktion zum Diol **69** in Schritt 2 (**Schema 18.A**). Dabei wurden sowohl die Batch-, die sequenzielle (**Schema 18.B**) als auch die Domino-Reaktion (**Schema 18.C**) untersucht, was den Autoren zu Folge bisher noch nicht durchgeführt wurde.<sup>[209]</sup> Die Kofaktor-Regenerierung wurde in der sequenziellen Reaktion GDH-katalysiert und in der Tandem-Reaktion substratgekoppelt mit 2-Propanol durchgeführt, sodass in beiden Fällen substöchiometrische Mengen an Kofaktor notwendig waren. Durch die Variation der Stereoisomere des Organokatalysators **71** und der Alkoholdehydrogenasen (ADH030 und ADH270) konnten in der Sequenz alle vier Isomere des Diols **69** in moderaten bis guten Ausbeuten und Diastereoselektivitäten sowie exzellenten Enantioselektivitäten zugänglich gemacht werden. In der Domino-Reaktion wurde lediglich der Katalysator (*S,S*)-Kat. **71** eingesetzt, weshalb hier nur das (*R,S*)-Diol **69** in moderatem Umsatz und sehr guten Selektivitäten erhalten wurde. Jedoch wurde ebenfalls die Bildung des Alkohols nach Reduktion des Aldehyds **68** durch die ADH beobachtet.



## B) Sequenzielle Reaktion



## C) Tandem-Reaktion



**Schema 18.A)** Reaktionskaskade aus organokatalysierter Aldolreaktion und biokatalysierter Reduktion zur Synthese von 1,3-Diolen 69 ausgehend von *m*-Chlorbenzaldehyd (68). Es wurden die Batch-, die sequenzielle (18.B) und die Tandem-Reaktion (18.C) untersucht. Das Schema ist angelehnt an Schober *et al.*<sup>[209]</sup>

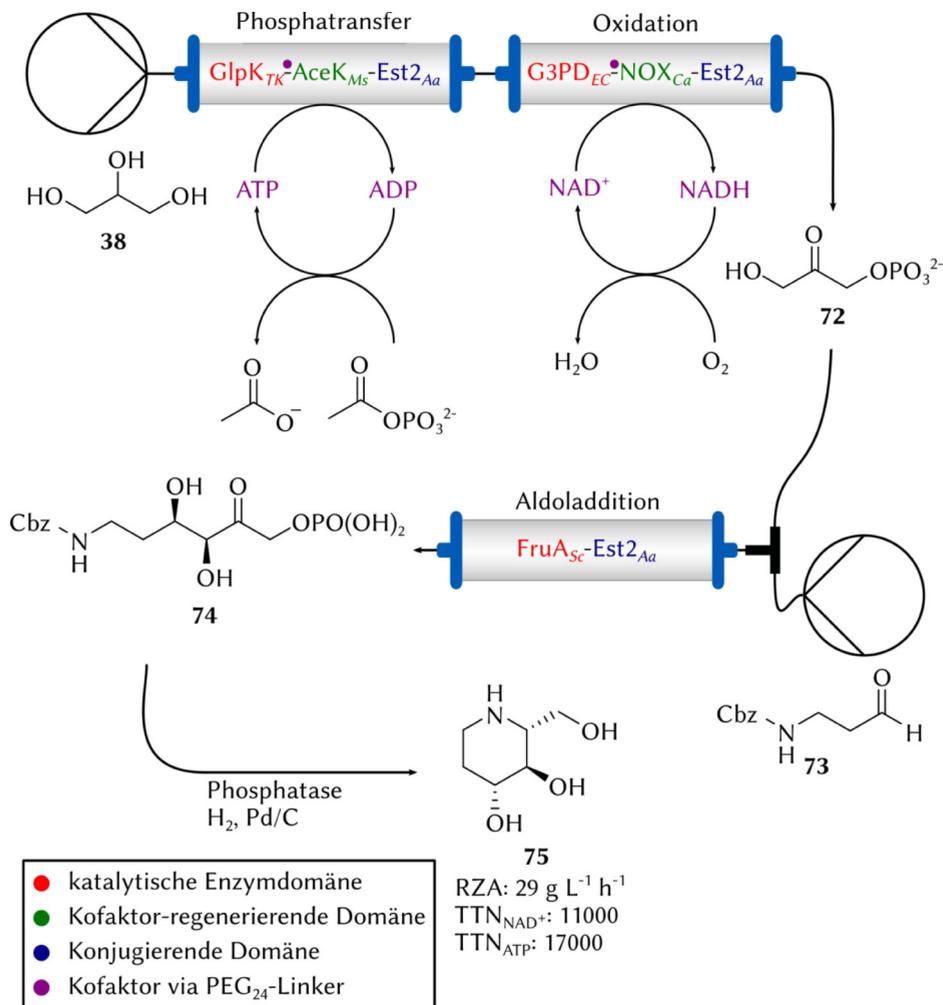
Insgesamt hatten alle vorgestellten Systeme aber einen entscheidenden Nachteil - der Kofaktor wurde lediglich regeneriert, solange er im System war und verließ dieses nach der Reaktion. So musste immer wieder frischer Kofaktor zugeführt werden, was ein großer Kostentreiber ist, besonders wenn die Reaktion in größerem Maßstab durchgeführt werden sollte.

#### 2.4.2 Kofaktor-Regenerierung mit immobilisiertem o. gefangenem Kofaktor

Ein anderes Setup, was zur Kofaktor-Regenerierung verwendet werden kann, nutzt die Möglichkeit, Kofaktoren zu immobilisieren oder in ein Polymer einzuschließen. Im Rahmen eines solchen Systems nutzten Peschke *et al.* Hydrogele in Kombination mit eingeschlossenem Kofaktor NADP<sup>+</sup>.<sup>[210, 211]</sup> So konnte das bereits in 2.4.1 erwähnte 5-Nitrononan-2,8-dion (**60**) kontinuierlich für über 30 h zum pseudo C<sub>2</sub>-Diol **63** umgesetzt werden. Daraus resultierte eine auf NADP<sup>+</sup>-bezogene hohe katalytische Aktivität von über 14000 mol/mol und zudem konnte gezeigt werden, dass der Kofaktor für mindestens 124 h im Hydrogel verblieb, ohne signifikant ausgewaschen zu werden, sodass keine weitere Zugabe notwendig war.<sup>[210, 211]</sup>

Kofaktoren zu immobilisieren ist, wie Scott *et al.* 2019 gezeigt haben, eine weitere bemerkenswerte Möglichkeit, die benötigte Menge um ein Vielfaches zu reduzieren. Sie verwendeten Fusionsproteine, die aus drei Domänen bestanden – einer Kofaktor-abhängigen katalytischen Enzymdomäne (Rot), einer Kofaktor-regenerierenden Domäne (Grün) und einer konjugierenden Domäne (Blau), die jeweils durch Aminosäurelinker miteinander verknüpft waren. Als Kofaktoren kam NADH und ATP zu Einsatz, die über einen PEG<sub>24</sub>-Linker (Lila) mit den Fusionsproteinen verknüpft waren. Die Flexibilität des PEG-Linkers hatte den entscheidenden Vorteil, dass es so möglich war, sowohl die katalytische Domäne als auch die regenerierende Domäne zu erreichen. Ausgehend von Glycerin (**38**) konnte zuerst durch einen Phosphattransfer und einer Oxidation das Zwischenprodukt **72** zugänglich gemacht werden. Dieses wurde anschließend mit dem Aldehyd **73** in einer Aldoladdition zum Produkt **74** und im weiteren Verlauf unter reduktiven Bedingungen zum Naturstoff D-Fagomin (**75**), der prophylaktisch gegen Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden kann<sup>[212]</sup>, umgesetzt. Das Produkt **75** konnte in einer hervorragenden RZA von ca. 29 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> für die Aldolase und einer Enantioselektivität von >99 % erhalten werden. Des Weiteren wurde eine für NADH

katalytische Aktivität von über 10000 mol/mol, sowie für ATP von 17000 mol/mol erzielt (Schema 19).<sup>[213]</sup>

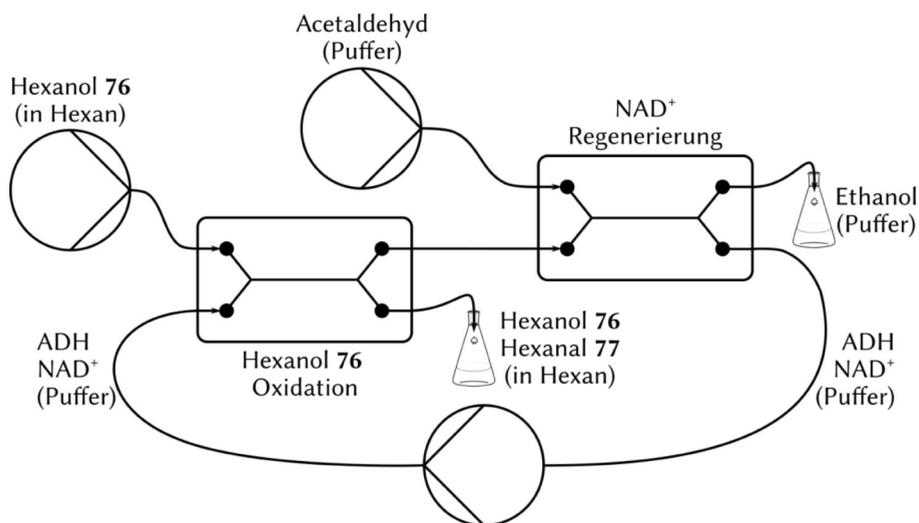


**Schema 19.** Fließschema der Synthese des Naturstoffes D-Fagomin (75) ausgehend von Glycerin (38) unter Verwendung verschiedener Fusionsproteine. Abbildung angelehnt an Scott *et al.*<sup>[213]</sup>

Der Vorteil dieses Systems war, dass keine Zugabe der Kofaktoren notwendig war. Dennoch bedurfte es einiger chemischer Modifikationen des Kofaktors, sowie die Erstellung solcher Fusionsproteine mit verschiedenen Domänen. Um dies zu umgehen, sollen im Folgenden nun Möglichkeiten vorgestellt werden, die es ermöglichten, die Kofaktoren in einem geschlossenen System zu halten und wiederzuverwenden.<sup>[1]</sup>

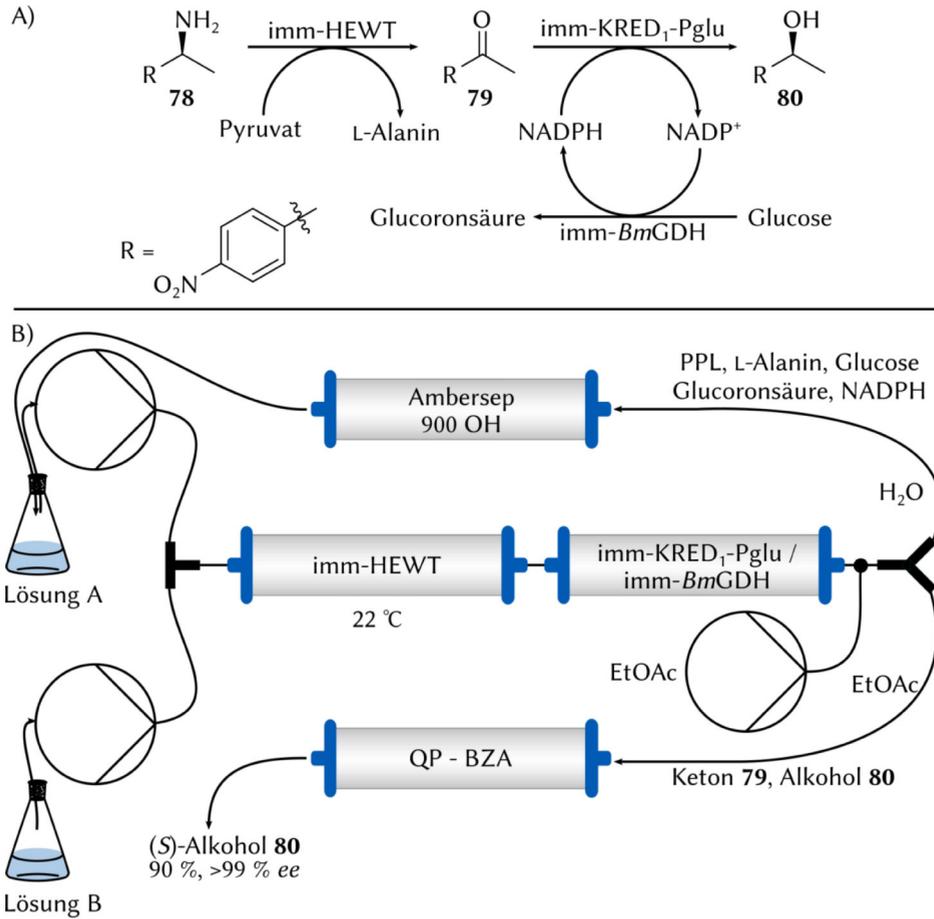
### 2.4.3 Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf

In diesem Kapitel sollte nun die Möglichkeit erörtert werden, die Kofaktor-Regenerierung in einem geschlossenen Kreislauf durchzuführen. Dies bedeutet, dass der einmal in das System eingebrachte Kofaktor jenes nicht mehr verlässt, sondern kontinuierlich rezirkuliert wird. Šalić *et al.* nutzten 2014 ein solches System, um Hexanol (**76**) ADH-katalysiert zu oxidieren und im gleichen Zuge den Kofaktor NAD<sup>+</sup> durch Zugabe von Acetaldehyd zu regenerieren.<sup>[214]</sup> Um eine Trennung der organischen und wässrigen Phase zu ermöglichen, wurde ein paralleler Fluss der beiden Phasen benötigt, was durch Anpassung der Flussraten und den Einsatz verschiedener Mikromixer erzielt werden sollte. Das beste Ergebnis konnte mit einem System aus zwei in Serie geschalteten Chipreaktoren und Flussraten von 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  für die wässrige Phase bestehend aus Enzym und Coenzym in Puffer und 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  für die organische Phase bestehend aus Hexanol (**76**) in Hexan erzielt werden (**Schema 20**). Der erste Reaktor bestand aus jeweils zwei Y-förmigen Ein- und Ausgängen, wobei ein Eingang für das Substrat **76** (gelöst in Hexan) und der zweite Eingang für eine wässrige Suspension aus Enzym (ADH), Kofaktor (NAD<sup>+</sup>) und Puffer verwendet wurde. Innerhalb des Mikroreaktors kam es anschließend zur ADH-vermittelten Oxidation von Hexanol (**76**) zu Hexanal (**77**) und das Produkt wurde durch einen der Ausgänge gesammelt, während der andere Ausgang die wässrige Phase in einen weiteren Reaktor führte. Hier wurde schließlich unter Verwendung von Acetaldehyd der Kofaktor regeneriert und die wässrige Phase in den ersten Reaktor geleitet. Das System konnte drei Tage kontinuierlich für die Oxidation genutzt werden, ohne weitere Zugabe an Kofaktor.<sup>[214]</sup>



**Schema 20.** Flussschema des geschlossenen Kreislaufs zur enzymkatalysierten Oxidation von Hexanol (76) zu Hexanal (77) nach Šalić *et al.*<sup>[214]</sup> Der Kofaktor NAD<sup>+</sup> wird im gleichen Zuge regeneriert und nur einmal dem System zugegeben.

Ebenso wurde ein geschlossenes System von Contente und Paradisi im Jahr 2018 verwendet. In dem vorliegenden Beispiel wurde eine enzymkatalysierte Umwandlung des Amins (*S*)-*p*-Nitromethylbenzylamin (**78**) über das Keton **79** in den entsprechenden (*S*)-konfigurierten Alkohol **80** im geschlossenen System durchgeführt. Das Reaktionsschema ist in **Schema 21.A** dargestellt, das Fließschema in **Schema 21.B**.<sup>[215]</sup> Dazu wurde eine wässrige Lösung A, die unter anderem aus dem umzusetzenden Amin **78** und NADP<sup>+</sup> bestand, über ein T-Stück mit einer zweiten wässrigen Lösung B, unter anderem bestehend aus Pyruvat und PLP, vermischt. Anschließend wurde die Mixtur über eine Transaminase imm-HEWT und Kombisäule aus Ketoreduktase und GDH geleitet. Nach organischer *inline*-Extraktion wurde die wässrige kofaktorhaltige Phase wieder dem System zugeführt, wobei sie über eine Ionentauschersäule (Ambersep 900 OH) gepumpt wurde, um L-Alanin und die Glucuronsäure nach dem *catch-and-release*-Verfahren zu regenerieren (vgl. Kapitel 2.1.2). Der Alkohol **80** konnte so mit einer Ausbeute von 90 % und >99 %*ee* zugänglich gemacht werden und für NADPH wurde ferner eine katalytische Aktivität von 2000 mol/mol erreicht; jedoch war eine Verdünnung der wässrigen Phase über die Zeit nicht zu vermeiden.<sup>[213, 215, 216]</sup>



**Schema 21.A)** Reaktionsschema der enzymkatalysierten Umwandlung von (*S*)-*p*-Nitromethylbenzylamin (**78**) in den entsprechenden (*S*)-Alkohol **80**. **21.B)** Fließschema des geschlossenen Systems nach Contente und Paradisi.<sup>[215]</sup> Lösung A: 6 mM Amin **78** in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8) mit 20 % DMSO, 24 mM Glucose und 0.2 mM NADP<sup>+</sup>; Lösung B: Pyruvat (6 mM) in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8) mit 0.2 mM PLP.

## 3 EIGENE ERGEBNISSE

*I know that new situations can be intimidating. You're looking around and it's all scary and different, but you know, meeting them head-on, charging into them like a bull - that's how we grow as people.*

Dan Harmon, Justin Roiland  
aus der Serie »Rick and Morty« (S01E01)

### 3.1 Kofaktor-Regenerierung in der Flusssynthese

#### 3.1.1 Einleitung

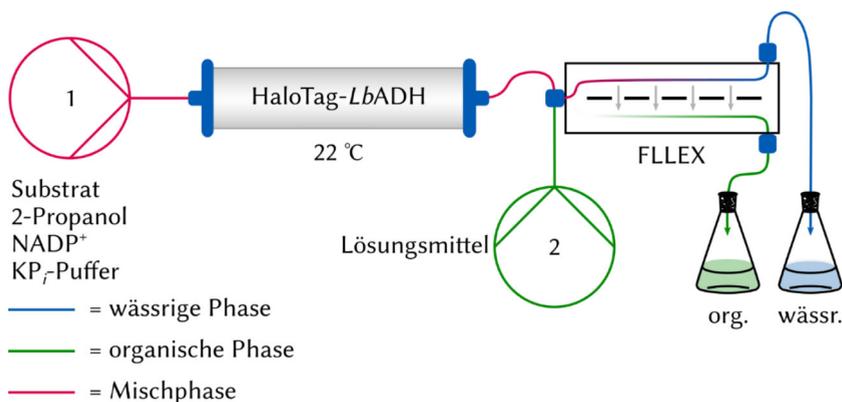
Auf dem Weg zu ökonomischen und nachhaltigeren Synthesen ist die Flusssynthese eine gute Alternative zur klassischen Batchsynthese und ergänzt um die Verwendung von Biokatalysatoren können komplexe Syntheserouten stark vereinfacht und verkürzt werden. Allerdings tritt bei der Verwendung von Oxidoreduktasen die Problematik auf, dass teure Kofaktoren benötigt werden, die es aus ökonomischer Sicht zu recyceln gilt. Für Synthesen im Fluss gibt es, wie bereits in Kapitel 2.3.3 erläutert, einige herausragende Veröffentlichungen zu diesem Thema, jedoch fehlte zu diesem Zeitpunkt ein Modellsystem, welches die Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf ermöglichte. Dies bedeutet, dass der Kofaktor substöchiometrisch eingesetzt wird und anschließend das System nicht mehr verlässt. Eine mögliche Lösungsstrategie soll im Folgenden erläutert und durch eigene Ergebnisse gestützt werden.

#### 3.1.2 Einfacher Durchfluss

In einer ersten Studie sollte dafür der einfache Durchfluss verwendet und anschließend die besten Reaktionsbedingungen auf den geschlossenen Kreislauf (Kapitel 3.1.3) übertragen werden. Dabei stand der Einsatz von substöchiometrischen Mengen des Kofaktors NADPH im Vordergrund. Als Modellenzym wurde die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (im Folgenden *L. brevis* und *LbADH*) verwendet, die zur Immobilisierung mit einem HaloTag™ versehen wurde. Der Dank geht an dieser Stelle an Johannes Döbber für die Bereitstellung des Plasmids und an Beatrix Paschold für die Produktion des Enzyms.

## 3.1.2.1 Aufbau des Systems

Der hier verwendete einfache Durchfluss setzte sich aus zwei Pumpen, einer Omnifit-Säule (hier: 3 x 50 mm) mit HaloTag™-LbADH sowie dem Phasenseparator (FLLEX, engl. für *Flow Liquid Liquid EXtraction*) zusammen. Dabei pumpte Pumpe 1 (Farbcode: Magenta) eine Mischphase aus einem Substrat, NADP<sup>+</sup>, 2-Propanol in KP<sub>r</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) über die Enzymsäule, während Pumpe 2 (Farbcode: grün) dem System organisches Lösungsmittel für die Extraktion bzw. Phasentrennung durch die FLLEX zuführte. Die Phasentrennung geschah dabei durch den Einsatz einer hydrophoben Membran und stellte insgesamt eine Schlüsselposition für den später folgenden geschlossenen Kreislauf dar. Für initiale Experimente wurde mit Ethylacetat ein leicht zugängliches und kostengünstiges Lösungsmittel für Pumpe 2 verwendet. Der verwendete Aufbau des einfachen Durchflusses ist in **Schema 22** illustriert:

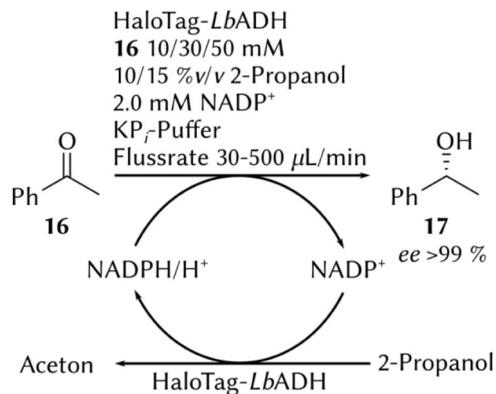


**Schema 22.** Einfacher Durchfluss bestehend aus zwei Pumpen, einem Enzymreaktor und dem FLLEX-System. Die Mischphase (Magenta) wird durch Pumpe 1 über die HaloTag™-LbADH gepumpt und anschließend wird durch Pumpe 2 weiteres organisches Lösungsmittel (Grün) hinzugefügt, um eine anschließende Phasentrennung durch die FLLEX zu vereinfachen. Aceton und 2-Propanol sind trotz zuverlässiger Phasentrennung in beiden Phasen nach Extraktion zu finden.

Die Flussraten der beiden Pumpen wurden mittels Asia Manager Software eingestellt. Dieses System sollte nun in einer ersten Optimierungsstudie dafür verwendet werden, um umsatzbezogene optimierte Prozessparameter und die Effizienz der Phasentrennung durch die FLLEX zu ermitteln. Die gaschromatographische Bestimmung des *ee* an chiraler stationärer Phase (vgl. Kapitel 5.2), als auch die Validierung der Konfiguration des Produkts mittels Drehwerts wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt (**Schema 30**) im Rahmen der kontinuierlichen Synthese verschiedener Alkohole im geschlossenen System (Kapitel 3.1.3.2) durchgeführt.

## 3.1.2.2 Einsatz des einfachen Durchflusssystems

Wie bereits an anderer Stelle erläutert, haben Döbber *et al.* 2018 verschiedene Ketone durch die HaloTag-*LbADH* im einfachen Durchfluss reduziert (vgl. Kapitel 2.4.1, **Schema 16**).<sup>[36, 129]</sup> Dabei wurde unter anderem Acetophenon (**16**) als Substrat eingesetzt, das zu (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) umgesetzt wurde.<sup>[36]</sup> Zugleich oxidierte dasselbe Enzym das Kosubstrat 2-Propanol zu Aceton und regenerierte so den Kofaktor NADPH, der somit einen erneuten Reaktionszyklus durchlaufen konnte.<sup>[36]</sup> Für eine erste Studie sollten nun die von Döbber *et al.* optimierten Reaktionsbedingungen mit 50 mM Acetophenon (**16**), 10 %v/v 2-Propanol bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  als Grundlage dienen.<sup>[36]</sup> Im weiteren Verlauf wurden dann die Substratkonzentration (**16**, 10/30/50 mM), die Menge an 2-Propanol (10/15 %v/v) und die Flussraten (30–500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) variiert. Das entsprechende Reaktionsschema ist in **Schema 23** gezeigt:



**Schema 23.** Reaktionsbedingungen der asymmetrischen enzymkatalysierten Reduktion von Acetophenon (**16**) zu (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) im einfachen Durchfluss. Sowohl die gaschromatographische Bestimmung des *ee*, als auch die Validierung der absoluten Konfiguration mittels Drehwertbestimmung erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt (**Schema 30**, Kapitel 3.1.3.2).

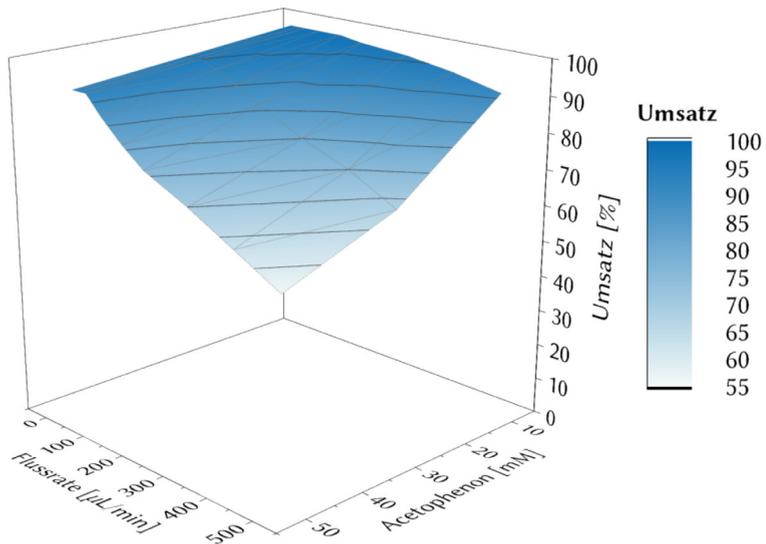
Mit den literaturbekannten Reaktionsbedingungen konnte der Alkohol **17** mit einem Umsatz von 92 % (Lit. 95 %<sup>[36]</sup>) zugänglich gemacht werden und trotz der Erhöhung der Flussrate auf 65  $\mu\text{L}/\text{min}$  blieb dieser konstant, was eine verdoppelte Produktivität und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) des Systems bedeutete. Eine weitere Anhebung der Flussrate führte zu einer stetigen Umsatzabnahme und während für 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  noch 87 % erzielt wurden, so waren es bei 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  76 % und bei 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  schließlich noch 56 %. Wieder ausgehend von den Startbedingungen sollte nun eine Verdünnung der Substratkonzentration auf 30 mM bzw 10 mM durchgeführt werden. Auf diese Weise konnte eine Maximierung des Umsatzes auf 95 % für 30 mM und 98 % für 10 mM erzielt

werden und auch hier konnte durch die Erhöhung der Flussrate auf 65  $\mu\text{L}/\text{min}$  keine Änderung des Umsatzes festgestellt werden. Eine weitere Erhöhung der Flussrate führte nun zu einer Umsatzabnahme, allerdings waren für 30 mM bei 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  noch 86 % möglich und im weiteren Verlauf 68 % bei 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ , wohingegen dies bei 10 mM wenig Einfluss hatte, da hier immer noch 91 % bei 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  möglich waren. Eine Erhöhung der 2-Propanol-Konzentration von 10 auf 15 %v/v hatte lediglich einen minimalen Einfluss auf den Umsatz von  $\sim 1\text{--}2\%$ . Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf die niedrigere 2-Propanol-Konzentration von 10 %v/v eingesetzt, da bekannt ist, dass 2-Propanol einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben kann.<sup>[36]</sup> Die gesamten Ergebnisse der Optimierungsstudie sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

**Tabelle 2.** Optimierungsstudie der asymmetrischen Reduktion von Acetophenon (**16**) unter der Verwendung des einfachen Durchflusses. Dabei wurden die Flussraten, als auch Substrat- und Kosubstratkonzentrationen variiert. Je intensiver das Blau, desto höher der Umsatz. Es handelt sich um Einfachbestimmungen und der Umsatz wurde gaschromatographisch bestimmt. Der *ee* betrug in jedem Fall  $>99\%$ .

2-Propanol [%v/v]	10			15		
Acetophenon ( <b>16</b> ) [mM]	10	30	50	10	30	50
	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]					
30	98	95	92	98	96	94
50	98	95	92	98	96	93
65	98	95	92	98	96	93
100	98	93	87	98	91	88
150	98	90	81	98	90	82
200	97	86	76	97	86	77
300	96	80	70	94	80	72
400	94	75	63	91	73	62
500	91	68	56	89	67	55

Zusätzlich sollten die Ergebnisse für 10 %v/v 2-Propanol in einer 3D-Kurve visualisiert werden, um den Umsatzverlauf und das Maximum dieser Versuchsreihe zu verdeutlichen (**Abbildung 15**). Dazu wurde auf der x-Achse die Konzentration von Acetophenon (**16**) gegen die Flussrate auf der y-Achse und den Umsatz auf der z-Achse aufgetragen. Der Farbverlauf von weiß nach blau indizierte den Umsatz aufsteigend.



**Abbildung 15.** 3D-Kurve zu **Tabelle 2** zur Veranschaulichung des Umsatzverlaufes und des Umsatzmaximums der durchgeführten Versuchsreihe. Der Farbverlauf von weiß nach blau indiziert den Umsatz aufsteigend.

Generell konnte festgestellt werden, dass der Umsatz sowohl mit steigender Flussrate als auch mit steigender Substratkonzentration abnahm. Eine höhere Flussrate resultierte in einer verkürzten Verweilzeit  $t_R$  im Reaktor, weshalb weniger Zeit für Umsetzung des Substrats durch das Enzym vorhanden war. Eine höhere Konzentration hingegen bedeutete, dass mehr Substrat innerhalb der durch die Flussrate vorgegebenen Verweilzeit  $t_R$  umgesetzt werden musste. Der Einsatz eines größeren Enzymreaktors mit entsprechend höherer Gesamtaktivität kann hier zu mehr Umsatz führen.

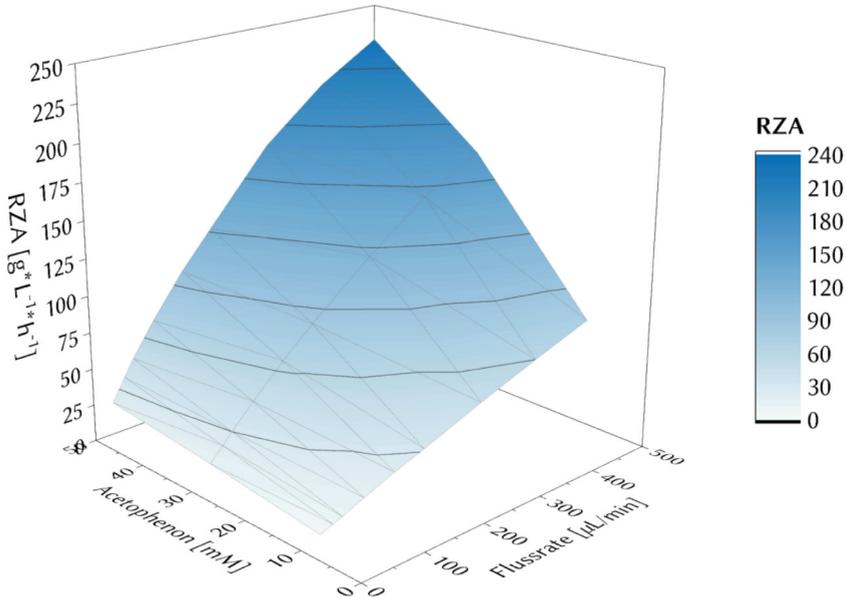
Allerdings ist in der Durchflusschemie nicht nur der Umsatz interessant, sondern vielmehr stellt die bereits erwähnte Produktivität eines Reaktors *die* Kenngröße dar; entsprechend wurde **Tabelle 3** in die theoretische Produktivität übersetzt unter der Annahme, dass 1 mL einer Lösung der gegebenen Konzentration verwendet wurde. Wie in **Tabelle 3** ersichtlich ist, stieg trotz des sinkenden Umsatzes durch höhere Flussraten und Substratkonzentrationen die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA). Während für die Startbedingungen (50 mM **16**, 10 %v/v 2-Propanol und 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) eine RZA von 22  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  erzielt wurde, so konnte diese bis 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf 226  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  gesteigert werden. Allerdings ist an dieser Stelle zu bedenken, dass durch einen geringeren Umsatz

ebenfalls die Menge an nicht umgesetztem Substrat stieg, welches in einer sequenziellen Reaktion stören könnte. Wieder ausgehend von den Startbedingungen verhielt es sich bei Verringerung der Konzentration auf 30 bzw. 10 mM innerhalb derselben Flussrate umgekehrt: die Produktivität des Systems sank, sodass bei 30 mM nur noch  $14 \text{ g}^* \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  und bei 10 mM lediglich  $4.7 \text{ g} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  möglich waren. Da jedoch bis zu einer doppelten Flussrate von  $65 \mu\text{L}/\text{min}$  der Umsatz konstant blieb, konnte hier eine Verdopplung der RZA erzielt werden. Dies bedeutete  $48 \text{ g} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  für 50 mM **16** abfallend auf 30 bzw.  $10 \text{ g} \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  für entsprechend 30 und 10 mM.

**Tabelle 3.** Theoretische Produktivität unter der Annahme, dass eine 1 mL Lösung der gegebenen Konzentrationen verwendet wurde. Dabei wurde ein Farbverlauf von weiß zu blau gewählt und je intensiver das Blau, desto höher die theoretische Produktivität. Werte basierend auf den Resultaten (Einfachbestimmungen) in **Tabelle 2**.

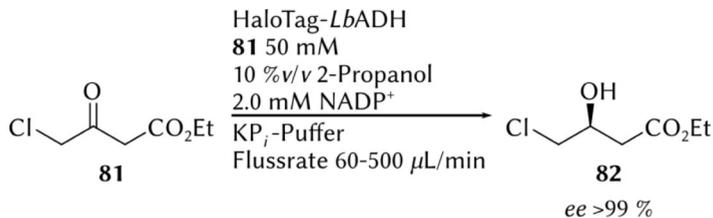
2-Propanol [%v/v]	10			15		
	Acetophenon ( <b>16</b> ) [mM]					
Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	10	30	50	10	30	50
30	4.7	14	22	4.7	14	23
50	7.8	23	37	7.9	23	38
65	10	30	48	10	30	48
100	16	45	70	16	44	70
150	24	65	98	24	65	99
200	31	83	122	31	83	124
300	46	116	169	45	116	173
400	60	145	202	58	141	198
500	73	165	226	72	160	221

Auch an dieser Stelle wurde die Raum-Zeit-Ausbeute in eine 3D-Kurve übersetzt. Dabei wurde wieder die Acetophenon (**16**)-Konzentration auf der x-Achse gegen die Flussrate auf der y-Achse und RZA auf der z-Achse aufgetragen. Dem folgend bedeutete der Farbverlauf von weiß nach blau eine Steigerung der RZA (**Abbildung 16**).



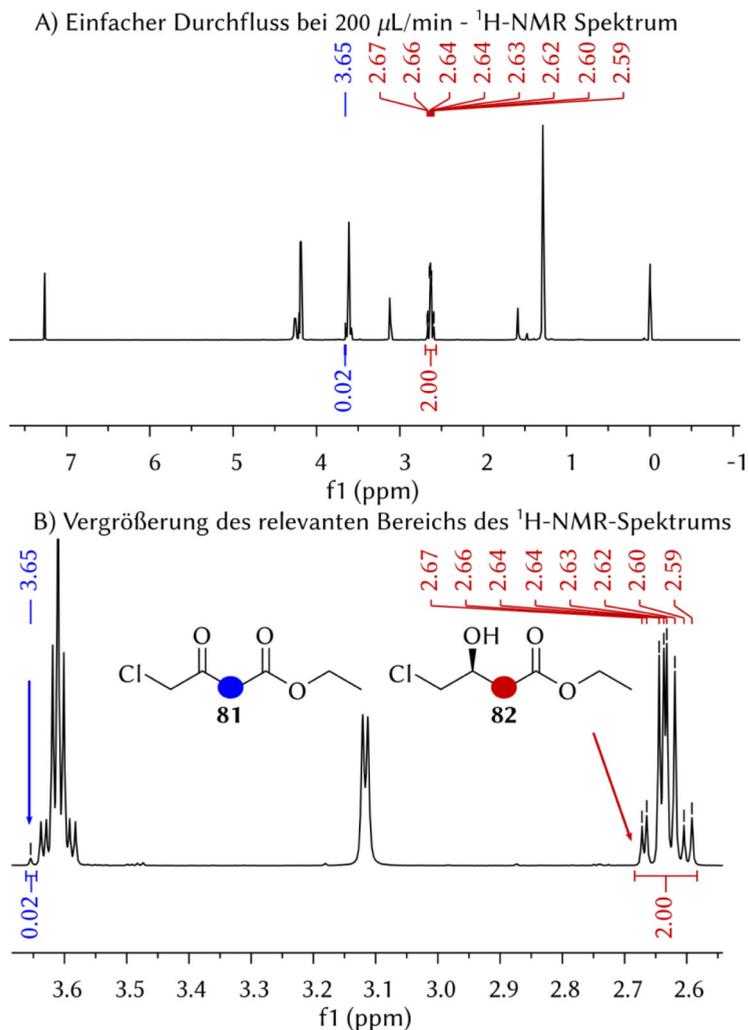
**Abbildung 16.** 3D-Kurve zu **Tabelle 3** zur Verdeutlichung der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und Flussrate. Der Farbverlauf von weiß nach blau indiziert die Raum-Zeit-Ausbeute aufsteigend.

Neben Acetophenon (**16**) sollte nun 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) in diesem Modus zum Alkohol **82** umgesetzt werden und im Rahmen dessen stand eine erste Umsatzoptimierung durch ein Flussratenscreening im Vordergrund. Dazu wurde eine Lösung aus 50 mM Substrat **81**, 10 %v/v 2-Propanol, 2.0 mM NADP<sup>+</sup> in KP<sub>i</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) angesetzt und über die HaloTag™-LbADH-Säule gepumpt. Das entsprechende Reaktionsschema ist in **Schema 24** gezeigt.



**Schema 24.** Asymmetrische enzymkatalysierte Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) im einfachen Durchfluss. Die Kofaktor-Regenerierung wurde entsprechend **Schema 23** durchgeführt. Sowohl die gaschromatographische Bestimmung des *ee* als auch die Validierung der absoluten Konfiguration mittels Drehwertbestimmung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (**Schema 30**, Kapitel 3.1.3.2).

Die Bestimmung des Umsatzes wurde mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie durchgeführt und sollte einmal beispielhaft anhand eines Spektrums gezeigt werden, das unmittelbar nach der Reaktion mit einer Flussrate von  $200\ \mu\text{L}/\text{min}$  aufgenommen wurde - es erfolgte lediglich eine Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo*. **Abbildung 17.A** zeigt dabei das gesamtheitliche Roh- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und es wurden die für die Umsatzbestimmung relevanten Signale integriert. Der Bereich zwischen 2.5 und 3.7 ppm wurde ferner zur besseren Sichtbarkeit in **Abbildung 17.B** vergrößert.



**Abbildung 17.** Umsatzbestimmung der enzymkatalysierten Reduktion des Ketons **81** zum Alkohol **82**. **17.A)** Gesamtheitliches Roh- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Es wurden die benötigten relevanten Signale markiert und integriert. Der Bereich von 2.6–3.7 ppm wurde in **17.B)** vergrößert, um die Signale der entsprechenden Methylengruppen zuordnen zu können. Farbcode: Blau entspricht dem Keton **81** und Rot dem Alkohol **82**.

Das Multipllett im Bereich von 2.59–2.67 ist der rot markierten Methylengruppe des Produkts **82** und das Singulett bei 3.65 ppm der blau markierten Methylengruppe des Edukts **81** zuzuordnen. Es musste sich auf diese Signale fokussiert werden, da sich alle anderen Signale des Edukts mit jenen des Produkts vollständig überlagerten. Auch in diesem Fall war keine vollständige Basislinientrennung vorhanden, weshalb die Methode recht ungenau erschien. Dennoch war eine schnelle Überprüfung des Umsatzes zum Produkt **82** möglich und wurde durch die Bildung des Quotienten der Integrale durchgeführt und betrug 99 %:

$$U = (0.02 / (0.02 + 2.00)) * 100 \% = 99 \%$$

Da auf diese Weise lediglich der relative Umsatz bestimmt wurde, ist die tatsächliche Ausbeute kleiner gleich 99 %. Bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  war das Singulett bei 3.65 ppm nicht mehr durch die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie detektierbar, was ein Indiz für einen vollständigen Umsatz war. Dem folgend ließ sich im Rahmen des Screenings feststellen, dass bis zu einer Flussrate von 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  gemäß  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie vollständiger Umsatz mit einer theoretischen Produktivität von 121  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  erzielt werden konnte. Dies stellte im Vergleich zu Acetophenon (**16**) eine Steigerung dar, da unter den gleichen Bedingungen 81 % und 98  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  erreicht wurden (vgl. **Tabelle 2** und **Tabelle 3**). Bei einer weiteren Erhöhung der Flussrate auf 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  fiel der Umsatz um nur 2 % auf 98 % ab, wohingegen die Produktivität auf bemerkenswerte 394  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  zunahm. Daraus ließ sich ableiten, dass das Substrat **81** für die *Lb*ADH bei gleicher Konzentration prinzipiell besser geeignet war als das vorherige Acetophenon (**16**). Die Ergebnisse der Einfachmessungen sowie die errechnete theoretische Produktivität (vgl. **Tabelle 3**) sind in **Tabelle 4** dargestellt.

**Tabelle 4.** Flussratenscreening der Umsetzung des Ketons **81** zum Alkohol **82**. Ebenso wurde die theoretische Raum-Zeit-Ausbeute berechnet, die sich bei Verwendung einer 1 mL Lösung bei gegebener Substratkonzentration von 50 mM ergab. Es handelte sich um Einfachmessungen.

Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Umsatz [%]	Raum-Zeit-Ausbeute [ $\text{g}^*\text{L}^{-1}*\text{h}^{-1}$ ]
60	quant.	48
80	quant.	64
100	quant.	80
125	quant.	100
150	quant.	121
200	99	159
300	99	239
400	99	318
500	98	394

Die erste Studie unter der Verwendung des einfachen Durchflusses lieferte bis hier hin vielversprechende Ergebnisse - zum einen waren hohe Umsätze mit substöchiometrischen Mengen an Kofaktor möglich und zum anderen funktionierte die Phasentrennung mit Hilfe der FLLEX weitestgehend zuverlässig, da sowohl die wässrige als auch die organische Phase separiert werden konnten. Nichtsdestotrotz konnte ein wahrnehmbarer Ethylacetatgeruch in der wässrigen Phase festgestellt werden, was für eine partielle Extraktion sprach. Entsprechend sollte im weiteren Verlauf ein anderes Lösungsmittel eingesetzt werden - dazu mehr in Kapitel 3.1.2.1. Für den Moment und abgesehen davon, waren die Menge an Kofaktor und die generell funktionierende Phasentrennung eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung eines geschlossenen Systems mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung. Die Idee dahinter war die Separation der wässrigen von der organischen Phase, um erstere erneut dem System zuzuführen. So musste der Kofaktor nur einmal dem System zugegeben werden und konnte dieses nicht mehr verlassen – ein quasi-stationäres System.<sup>[1]</sup> Dieses System sollte nun im Detail in Kapitel 3.1.3 erklärt werden.

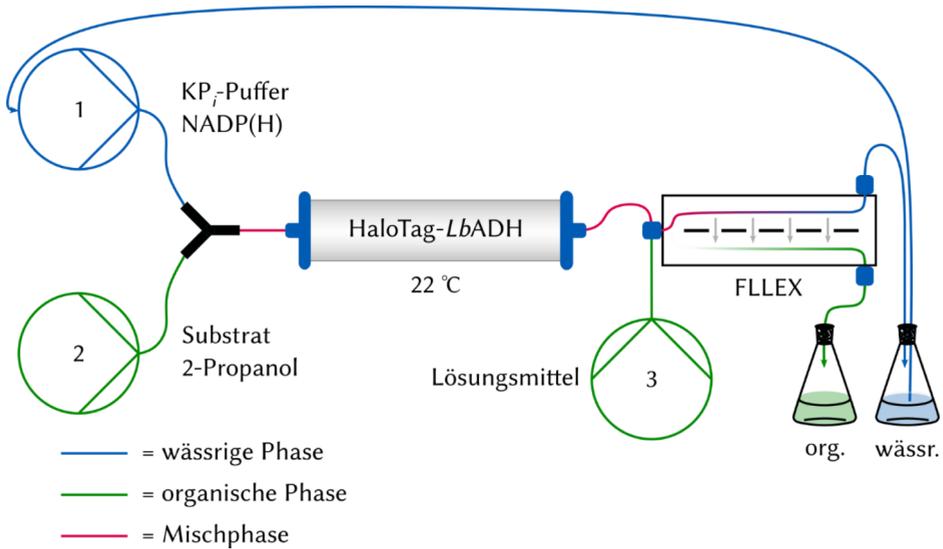
### 3.1.3 Geschlossenes System

Mit den abgeschlossenen Vorarbeiten im einfachen Durchfluss sollte im Anschluss der geschlossene Kreislauf etabliert werden. Es wurde bis hierhin einerseits gezeigt, dass die LbADH in diesem Modus nur geringe Mengen an Kofaktor benötigte und durch Zugabe

des Kosubstrats 2-Propanol in der Lage war, diesen effizient zu regenerieren und dennoch hohe Umsätze zu generieren und andererseits konnte mit Hilfe der FLLEX die wässrige und organische Phase voneinander getrennt werden. Generell lösen sich viele organische Substrate nur zu einem kleinen Teil in wässrigen Systemen und befinden sich deutlich bevorzugt in der organischen Phase. Der geladene Kofaktor bleibt hingegen vollständig in der wässrigen Phase und dies sollte sich nun zu Nutze gemacht werden.

### 3.1.3.1 Aufbau des Systems „geschlossener Kreislauf“

Der geschlossene Kreislauf unterschied sich in einigen Teilen vom einfachen Durchfluss. Der einfache Durchfluss (siehe **Schema 22**) bestand aus zwei Pumpen, wobei eine für die Reaktionslösung und eine für das Lösungsmittel fungierte. Im geschlossenen Kreislauf wurden hingegen drei Pumpen benötigt, da die Reaktionslösung nun in eine wässrige kofaktorhaltige (Pumpe 1; Blau) und organische substrat- und kosubstrathaltige (Pumpe 2; Grün) Lösung separiert wurde. Die beiden Pumpen 1 und 2 wurden durch ein Y-Stück miteinander verknüpft und die Mischphase über die HaloTag™-LbADH-Säule gepumpt. Nach Verlassen des Reaktors wurde der Mischphase Lösungsmittel (Pumpe 3; Grün) zugeführt und diese durch das FLLEX-System in eine wässrige kofaktorhaltige und eine organische produktthaltige Phase getrennt. Die wässrige Phase konnte nun rezirkuliert und mit frischem Substrat gemischt werden, um weitere Umsetzungen zu ermöglichen - ein quasi-stationäres System (**Schema 25**).<sup>[1]</sup>



**Schema 25.** System „geschlossener Kreislauf“ bestehend aus drei Pumpen – Pumpe 1 (Blau): Wässrige kofaktorhaltige Phase; Pumpe 2 (Grün): Organische substrat- und kosubstrathaltige Phase; Pumpe 3 (Grün): Lösungsmittel zur Extraktion.

Da zum Ende des Kapitels 3.1.2.2 bereits angedeutet wurde, dass in der wässrigen Phase ein deutlich wahrnehmbarer Ethylacetatgeruch festgestellt wurde, sollte an dieser Stelle ein Wechsel des Extraktionsmittels (Pumpe 3) durchgeführt werden, um die Phasentrennung zu unterstützen und die partielle Extraktion zu minimieren. Eine solche Anreicherung würde durch polare Lösungsmittel wie beispielsweise Ethanol oder THF weiter verstärkt werden und könnte abhängig von der Toleranz des Enzyms gegenüber organischen Lösungsmitteln einen Einfluss auf die Stabilität und Struktur haben.<sup>[217]</sup> Entsprechend sollte die Wahl auf ein eher unpolares Lösungsmittel fallen, das einerseits eine geringe Löslichkeit in Wasser und andererseits dennoch eine hohe Löslichkeit von Edukt und Produkt bietet. Eine Übersicht der den Sicherheitsdatenblättern entnommenen Löslichkeiten verschiedener laborüblicher Lösungsmittel in H<sub>2</sub>O ist in der folgenden **Tabelle 5** gezeigt:

**Tabelle 5.** Übersicht der log  $K_{OW}$ -Werte für verschiedene gängige Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Löslichkeit in H <sub>2</sub> O [g L <sup>-1</sup> ]	Lösungsmittel	Löslichkeit in H <sub>2</sub> O [g L <sup>-1</sup> ]
<i>n</i> -Pentan	0.1 (25 °C)	MTBE	42 (20 °C)
Toluol	0.58 (25 °C)	Diethylether	65 (20 °C)
Diisopropylether	3.1 (20 °C)	Ethylacetat	80 (25 °C)
Dichlormethan	20 (20 °C)	Tetrahydrofuran	vollständig

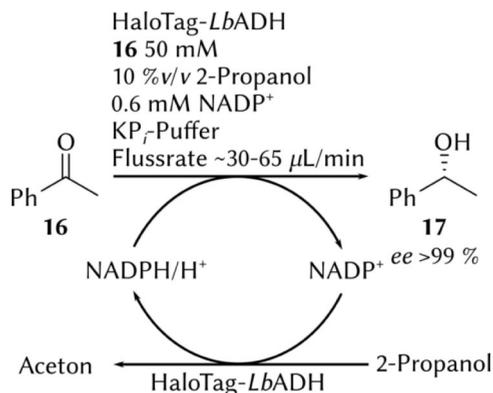
Auffällig ist, dass sich 80 g L<sup>-1</sup> des bis hierhin eingesetzten Ethylacetats in einem Liter Wasser lösen, was rund 8 % entspricht. Dadurch würde bei mehrfacher Rezirkulierung ein großer Teil des Ethylacetat in der wässrigen Phase akkumulieren. Die beiden Ether, Diethylether und Methyl-*tert*-butylether (MTBE), lösen sich bereits zu einem geringeren Anteil in Wasser, allerdings bietet Diethylether aufgrund des niedrigen Siedepunkts von 34 °C wenig Spielraum für eine mögliche Nachfolgereaktion, falls diese unter hohen Temperaturen durchgeführt werden sollte. Auf der linken Seite finden sich mit *n*-Pentan, Toluol und Dichlormethan zwar gängige Lösungsmittel, die jedoch gemäß GHS-Gefahrstoffkennzeichnung als gesundheitsgefährlich eingestuft sind. Auf Diisopropylether trifft dies allerdings nicht zu und ferner ist die geringe Löslichkeit in Wasser von 3.1 g L<sup>-1</sup> und der Siedepunkt von 69 °C hervorzuheben, weshalb dieses Lösungsmittel für den folgenden Verlauf eingesetzt wurde.

### 3.1.3.2 Anwendung des geschlossenen Systems

Die erste Reaktionsoptimierung sollte, wie zuvor, mit Acetophenon (**16**) durchgeführt und die Ergebnisse mit denen des einfachen Durchflusses verglichen werden. Ferner sollten die ermittelten idealen Bedingungen anschließend für einen semi-präparativen Einsatz genutzt werden, um die Effizienz des Systems zu unterstreichen. Im Zuge dessen erfolgte auch erst die Validierung der absoluten Konfiguration.

Für die wässrige Phase (**Schema 25**, Pumpe 1) wurden 0.6 mM NADP<sup>+</sup> in KP<sub>F</sub>-Puffer gelöst; für die organische Phase (**Schema 25**, Pumpe 2) 500 mM Acetophenon (**16**) in 2-Propanol. Insgesamt wurden fünf verschiedene Flussratenkombinationen getestet, die sich auf 30, 40, 50 und 65 μL/min addierten, und zusätzlich war die Flussrate der organischen Phase (Pumpe 2, **Schema 25**) um den Faktor zehn niedriger als die der wässrigen Phase (Pumpe 1, **Schema 25**), um eine maximale Konzentration von 10 %v/v für 2-Propanol und eine Substratkonzentration von 50 mM im Reaktor zu erhalten. Dabei

wurde jedoch eine ideale Mischung angenommen, sodass die tatsächliche Konzentration davon abweichen konnte. Durch diese Maßnahmen sollten zum einfachen Durchfluss ähnliche Bedingungen hergestellt werden, um eine Vergleichbarkeit der Systeme zu ermöglichen. Der Aufbau des geschlossenen Systems wurde bereits in **Schema 25** erläutert und das entsprechende Reaktionsschema ist in **Schema 26** gezeigt:



**Schema 26.** Reaktionsschema der enzymkatalysierten Reduktion von Acetophenon (**16**) zu (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) im geschlossenen System.

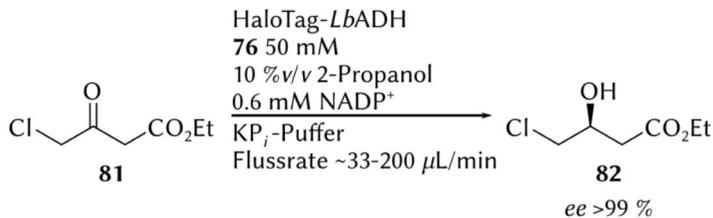
Die Umsatzbestimmung erfolgte gaschromatographisch in einer Dreifachbestimmung und die Ergebnisse mit den entsprechenden Standardabweichungen (SD) der technischen Triplikate (die Proben wurden hintereinander im selben Lauf gesammelt) sind in **Tabelle 6** gezeigt und diese ist wie folgt zu verstehen: Pumpe 1 (wässrige Phase) wurde mit einer an der Pumpe definierten Flussrate von 27 μL/min und Pumpe 2 (organische Phase) mit 2.7 μL/min betrieben (Eintrag 1). Anschließend wurden beide über ein Y-Stück miteinander verbunden und der resultierende Fluss wurde mit einer kombinierten Flussrate von rein rechnerisch 29.7 μL/min über die Enzymkartusche gepumpt, wo nun die Reduktion von Acetophenon (**16**) zum Alkohol **17** durch die HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH gemäß **Schema 26** stattfand. Anschließend wurde dem System Diisopropylether mit derselben Flussrate (29.7 μL/min, am Gerät definiert) des kombinierten Flusses zugeführt (Pumpe 3), wodurch die Phasentrennung in der FLLEX bei ca. 60 μL/min durchgeführt wurde. Auf diese Weise wurde zu Beginn (Eintrag 1) ein zum einfachen Durchfluss vergleichbarer Umsatz von ca. 97 % (Eintrag 1) erzielt (vgl. Döbber *et al.* mit 95 %<sup>[36]</sup>). Auch im weiteren Verlauf überzeugte das System in der Leistung, denn trotz Steigerung der Flussrate auf bis zu 65 μL/min fiel dieser nur im einstelligen Bereich auf ca. 92 % herab (Eintrag 2–5). Die doppelte Flussrate hatte eine

Halbierung der Verweilzeit  $t_R$  im Reaktor und folglich eine nahezu verdoppelte Produktivität zur Folge. Dies deckte sich ebenfalls mit den im einfachen Durchfluss erhaltenen Umsätzen von 92 % für 30, 50 und 65  $\mu\text{L}/\text{min}$  (vgl. Kapitel 3.1.2.2, **Tabelle 2**). Allerdings wurden keine weiteren Optimierungsversuche unternommen, da im ersten Schritt die Funktionsfähigkeit des geschlossenen Kreislaufs anhand von Acetophenon (**16**) gezeigt werden konnte.

**Tabelle 6.** Asymmetrische enzymkatalysierte Reduktion von Acetophenon (**16**) zu (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) im geschlossenen Kreislauf. Dargestellt sind die verwendeten Flussraten für Pumpe 1 (wässrige Phase), Pumpe 2 (organische Phase) und Pumpe 3 (Lösungsmittel/Extraktion; Flussrate rein rechnerisch). Dabei ist die Flussrate der Pumpe 3 gleich der Summe der Flussraten von Pumpe 1 und 2. Der Umsatz wurde gaschromatographisch bestimmt und ist mit der SD der technischen Triplikate angegeben.

Eintrag	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]			Umsatz $\pm$ SD [%]
	Wässrige Phase	Organische Phase	Extraktion	
1	27	2.7	29.7	97 $\pm$ 1.8
2	36	3.6	39.6	93 $\pm$ 0.4
3	45	4.5	49.5	92 $\pm$ 0.4
4	54	5.4	59.4	91 $\pm$ 0.1
5	59	5.9	64.9	93 $\pm$ 1.4

Darauf aufbauend stand in der nächsten Testreihe, wie bereits im einfachen Durchfluss (Kapitel 3.1.2.2, **Schema 24**, **Tabelle 4**), die enzymkatalysierte Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) zu dem entsprechenden Alkohol **82** im Fokus. Der Aufbau des Systems wurde in Kapitel 3.1.3.1 erläutert und die Reaktionsbedingungen waren dabei der vorangegangenen Reduktion von Acetophenon (**16**) unverändert mit 50mM **81** in 10 %v/v 2-Propanol für die organische Phase, sowie 0.6 mM NADP<sup>+</sup> in KP<sub>i</sub>-Puffer für die wässrige Phase (**Schema 27**).



**Schema 27.** Reaktionsschema der enzymkatalysierten Reduktion des Ketons **81** zum Alkohol **82** im geschlossenen System. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde an spätere Stelle (**Schema 30**) durchgeführt.

Da bereits zuvor im einfachen Durchfluss mit dem Keton **81** quantitative Umsätze bis zu einer Flussrate von 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  erzielt wurden, sollte das Screening an dieser Stelle auf

kombinierte Flussraten bis zu 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  erweitert werden (**Tabelle 7**). Die Bestimmung des relativen Umsatzes erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in einer Dreifachbestimmung als technische Triplikate und die Vorgehensweise wurde bereits an anderer Stelle erläutert (Kapitel 3.1.2.2, **Abbildung 17**).

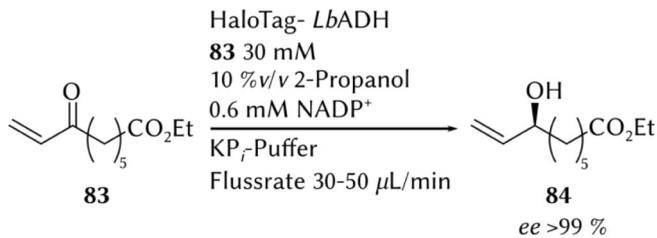
**Tabelle 7.** Flussratenscreening der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**). Die Umsatzbestimmung erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und angegeben wurde, soweit möglich, der Mittelwert des Umsatzes der technischen Triplikate (N=3) mit der entsprechenden Standardabweichung SD.

Eintrag	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]			Umsatz [%]
	wässrige Phase	organische Phase	Extraktion	
1	30	3	33	quant.
2	50	5	55	quant.
3	70	7	77	quant.
4	90	9	99	quant.
5	104	10.4	114	quant.
6	136	13.6	149	97 $\pm$ 0.003
7	182	18.2	200	89 $\pm$ 0.004

Während im einfachen Durchfluss bis zu einer Flussrate von 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Kapitel 3.1.2.2, **Tabelle 4**) vollständige Umsätze zum Produkt **82** erzielt wurden, so verhielt es sich im geschlossenen System ähnlich. Bis zu einer kombinierten Flussrate von ca. 115  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Einträge 1–5) konnte in beiden Fällen quantitativer Umsatz festgestellt werden, wohingegen dieser jedoch für die kombinierte Flussrate von ca. 150  $\mu\text{L}/\text{min}$  im geschlossenen Kreislauf um 3 % geringer ausfiel (Eintrag 6). Bei der in diesem System höchsten getesteten Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  waren immer noch sehr gute 89 % möglich (Eintrag 7), was im direkten Vergleich jedoch ca. 10 % weniger war als im einfachen Durchfluss. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Umsätze in den letzten beiden Einträgen 6 & 7 war eine mögliche schlechtere Durchmischung, da hier nur ein einfaches Y-Stück verwendet wurde, wohingegen im einfachen Durchfluss die Reaktionslösung vorgemischt und kontinuierlich gerührt wurde. Die Folge daraus war möglicherweise eine im Reaktor lokal höhere Konzentration, was zu einer Minderung des Umsatzes führen konnte. Für eine bessere Durchmischung könnte das Y-Stück durch beispielsweise einen Chipmixer ersetzt werden. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da für den semi-präparativen Ansatz (siehe unten) ohnehin die Flussratenkombination von 90/9  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Pumpe 1/Pumpe 2) gewählt wurde, um auch

über einen langen Zeitraum möglicherweise einen vollständigen Umsatz gewährleisten zu können.

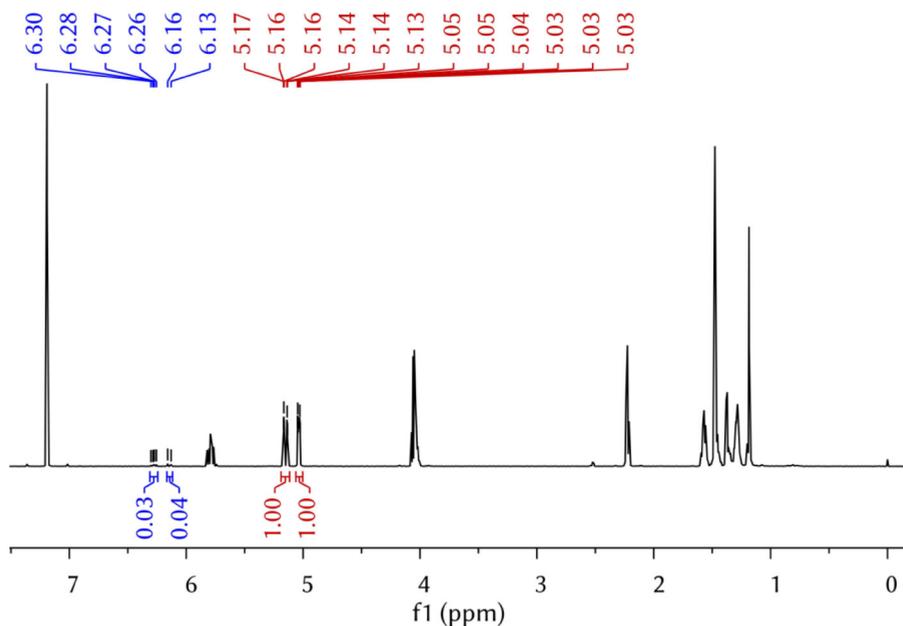
Als nächstes Testsubstrat wurde das Keton **83** eingesetzt, welches erstmals von Neufeld *et al.* 2014 enzymatisch unter der Verwendung einer P450-Monooxygenase zugänglich gemacht wurde.<sup>[218]</sup> Bei der Klasse der chiralen ( $\omega$ -2)-Hydroxy- $\omega$ -alkansäureester handelt es sich um besonders interessante Struktur motive, die in verschiedenen biologisch aktiven Naturstoffen vorkommen und dazu zählen zum Beispiel auch carbozyklische Oxylipine, die so unter anderem von Eichenauer *et al.* synthetisiert werden konnten.<sup>[219]</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun der Allylkohol **84** im etablierten geschlossenen Flussverfahren dargestellt werden. Die Reaktionsbedingungen waren bis auf die Konzentration von 30 mM identisch zu den vorherigen beiden Testreihen, wobei an dieser Stelle anzumerken ist, dass keine Umsetzung im einfachen Durchfluss erfolgte (**Schema 28**).



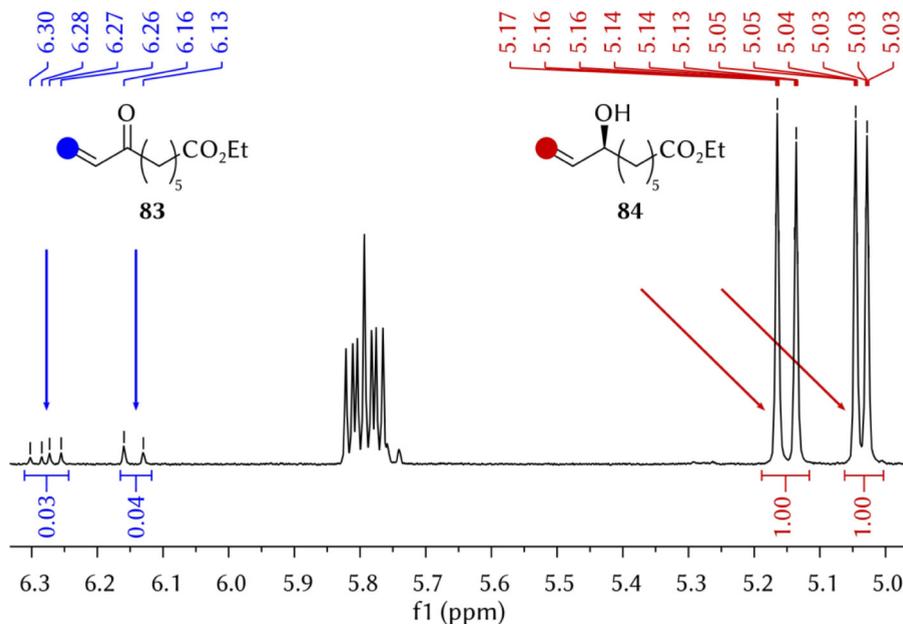
**Schema 28.** Asymmetrische enzymkatalysierte Reduktion des Keton **83** zum (S)-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester (**84**) im geschlossenen Kreislauf. Der Aufbau des System ist in Kapitel 3.1.3.1 erläutert. Die Substratkonzentration von 30 mM entspricht der Konzentration im Reaktor. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde an spätere Stelle (**Schema 30**) durchgeführt.

Für eine Umsatzbestimmung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurden die Verhältnisse aus Edukt **83**- und Produkt **84**-Doppelbindungssignalen gebildet, sodass es sich hierbei lediglich um die Bestimmung des relativen Umsatzes U handelt. Wie dies durchgeführt wurde, sollte nun einmal anhand eines Beispiels bei 55 µL/min (Eintrag 3) gezeigt werden (**Abbildung 18**).

A) Geschlossener Kreislauf bei 55  $\mu\text{L}/\text{min}$  -  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum



B) Vergrößerung des relevanten Bereichs des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums



**Abbildung 18.** Umsatzbestimmung der enzymkatalysierten Reduktion des Ketons **83** zum Alkohol **84**. **18.A)** Gesamtheitliches Roh- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo*. Dabei sind die chemischen Verschiebungen der relevanten Doppelbindungsprotonen markiert. Der Bereich von 5.0–6.3 ppm wurde in **18.B)** vergrößert, um die Signale der entsprechenden Doppelbindungsprotonen besser identifizieren zu können. Farbcode: Blau entspricht dem Keton **83** und Rot dem Alkohol **84**.

**Abbildung 18.A** zeigt das gesamtheitliche Roh-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, das unmittelbar nach der Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck aufgenommen wurde. Hervorgehoben sind die Signale der endständigen Doppelbindungsprotonen des Produkts **84** bei 5.03–5.05 und 5.13–5.17 ppm (in Rot) und des Edukts **83** bei 6.13–6.16 und 6.26–6.30 ppm (in Blau), da diese für die Bestimmung des Umsatzes maßgeblich waren. Die Normierung erfolgte dabei auf die Protonen des Produkts. In **Abbildung 18.B** wurde anschließend der dafür relevante Bereich vergrößert, um diese Signale besser identifizieren zu können. Die Bestimmung des relativen Umsatzes U erfolgte nun durch die Bildung des Quotienten aus dem summierten Integral der Protonen des Produkts **84** (in Rot) und dem summierten Integral aller markierten Protonen und betrug somit 97 %.

$$U = (2.00 / (0.07 + 2.00)) * 100 \% = 97 \%$$

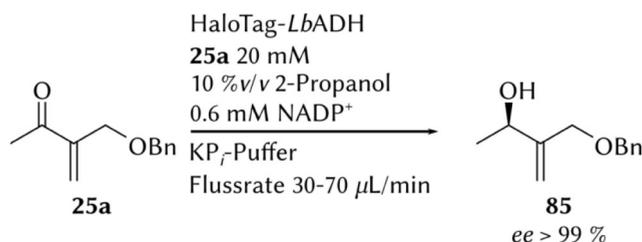
Die so ermittelten Ergebnisse des kurzen Flussratenscreenings sind in **Tabelle 8** aufgeführt. Dabei wurde jeweils der Mittelwert des Umsatzes der technischen Triplikate mit der entsprechenden Standardabweichung SD angegeben.

**Tabelle 8.** Flussratenscreening der Reduktion des Ketons **83** zum Allylalkohol **84**. Angegeben wurde der Mittelwert des Umsatzes der technischen Triplikate (N=3) mit entsprechender Standardabweichung SD.

Eintrag	Flussrate [ $\mu$ L/min]			Umsatz $\pm$ SD [%]
	wässrige Phase	organische Phase	Extraktion	
1	30	3	33	98 $\pm$ 0.01
2	40	4	44	99 $\pm$ 0.01
3	50	5	55	97 $\pm$ 0.01

Für alle drei getesteten Flussratenkombinationen (Einträge 1–3) konnten nahezu vollständige Umsätze zum Allylalkohol **84** verzeichnet werden, die durchweg reproduzierbar gewesen sind. An dieser Stelle wurde allerdings kein Enantiomerenüberschuss ermittelt. Dies wurde zusammen mit der Bestimmung der absoluten Konfiguration im Rahmen der semi-präparativen Ansätze (**Schema 30**) durchgeführt. Generell ließ sich festhalten, dass ebenfalls Michael-Systeme mit langkettigen Resten auf einer Seite von der *Lb*ADH und in diesem Modus umgesetzt werden konnten. Die theoretische Raum-Zeit-Ausbeute war hier im Vergleich zu den vorherigen Substraten jedoch geringer, da das Substrat in einer Konzentration von 30 mM (vorher 50 mM für **16** und **81**) eingesetzt wurde.

Das letzte Keton **25a** besaß ebenfalls ein Michael-System und konnte über eine Morita-Baylis-Hillman(MBH)-Reaktion dargestellt werden. Es wurde bereits 2018 von Mantel *et al.* synthetisiert und ist als Baustein für viele Totalsynthesen oder Polymersynthesen eingesetzt worden.<sup>[220]</sup> Die entsprechende Reaktionsgleichung der Reduktion zum Allylalkohol **85** im neuartigen Flusssystem ist im folgenden **Schema 29** gezeigt.

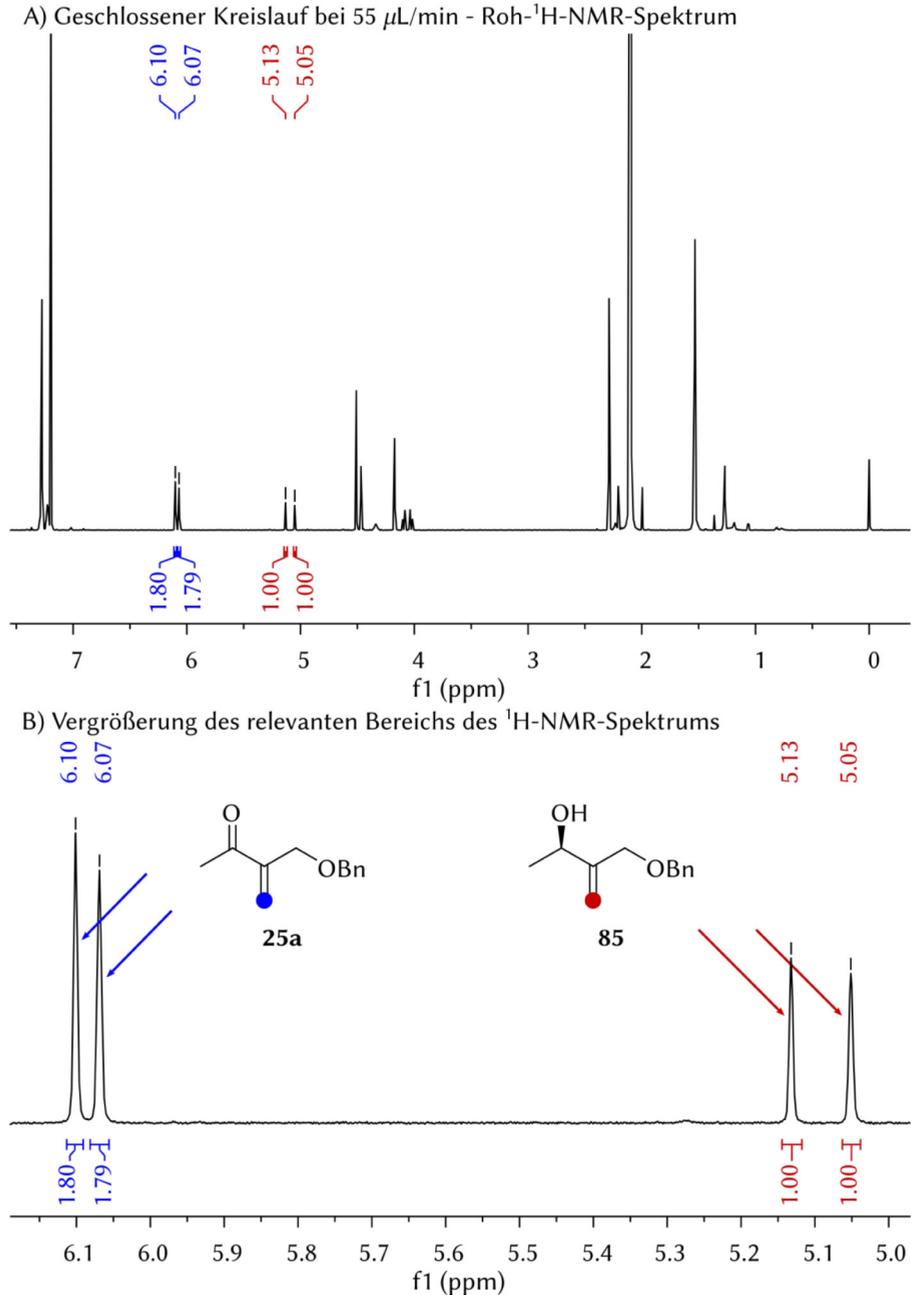


**Schema 29.** Asymmetrische enzymkatalysierte Reduktion des MBH-Ketons **25a** zum (*R*)-[[(Benzyloxy)-methyl]but-3-en-2-ol (**85**) im geschlossenen Kreislauf. Der Aufbau des System ist in Kapitel 3.1.3.1 erläutert. Die Substratkonzentration von 20 mM entspricht der Konzentration im Reaktor. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde an spätere Stelle (**Schema 30**) durchgeführt.

Die Reaktionsbedingungen waren überwiegend identisch zu den vorherigen eingesetzten Ketonen **16**, **81** und **83** in diesem System, wobei das MBH-Keton **25a** in einer Konzentration von lediglich 20 mM eingesetzt wurde. Die Bestimmung des relativen Umsatzes erfolgte auch hier mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie in einer Dreifachbestimmung (technische Triplikate) und wurde analog zur vorherigen Umsetzung durchgeführt. Dies sollte im folgenden Beispiel anhand eines Experiments bei einer Flussrate von 55 µL/min (Eintrag 3, **Tabelle 9**) gezeigt werden (**Abbildung 19**). Eine Ermittlung des Enantiomerenüberschuss erfolgte ebenfalls zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen der semi-präparativen Experimente weiter unten in diesem Kapitel. **Abbildung 19.A** zeigt das komplette Roh-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Edukt **25a** in Blau, Produkt **85** in Rot markiert), dass unmittelbar nach der Reaktion und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck aufgenommen wurde.

In **Abbildung 19.B** ist ein Ausschnitt desselben Spektrums zu sehen, bei dem der für die Umsatzbestimmung relevante Bereich zwischen 5.0–6.2 ppm vergrößert wurde. Es wurde wie zuvor der Quotient aus den Integralen der markierten Doppelbindungsprotonen des Produkts **85** und des Edukts **25a**) gebildet und daraus folgte ein Umsatz von 36 % zum Produkt **85**.

$$U = \frac{2.00}{1.80 + 1.79 + 2.00} * 100 \% = 36 \%$$



## Eigene Ergebnisse

Die Ergebnisse des gesamten Flussratenscreenings von 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  bis 77  $\mu\text{L}/\text{min}$  sind in **Tabelle 9** aufgezeigt und dabei wurde jeweils der Mittelwert des Umsatzes der technischen Triplikate mit der entsprechenden Standardabweichung SD angegeben:

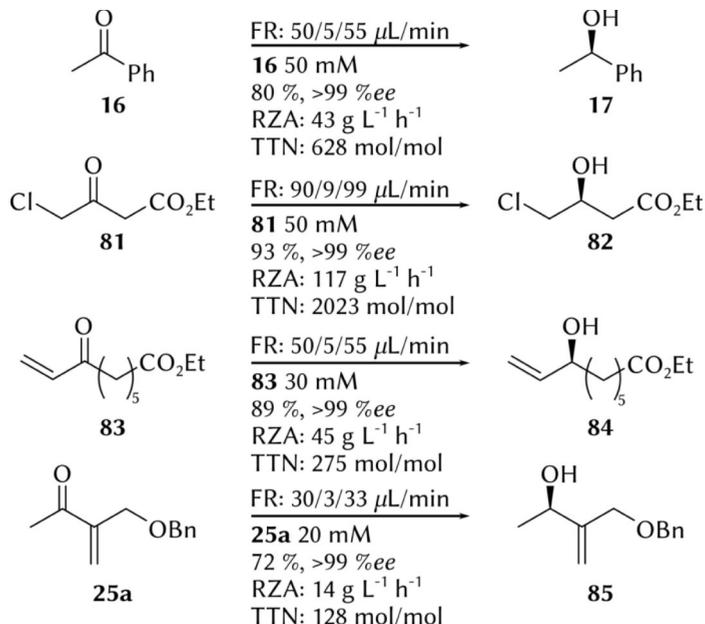
**Tabelle 9.** Flussratenscreening der Reduktion des Ketons (**25a**) zum Allylalkohol **85**. Umsatzbestimmung wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt. Angegeben wurde der Mittelwert des Umsatzes der technischen Triplikate (N=3) mit der entsprechenden Standardabweichung SD.

Eintrag	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]			Umsatz $\pm$ SD [%]
	wässrige Phase	organische Phase	Extraktion	
1	30	3	33	82 $\pm$ 0.05
2	40	4	44	54 $\pm$ 0.03
3	50	5	55	36 $\pm$ 0.02
4	60	6	66	26 $\pm$ 0.01
5	70	7	77	34 $\pm$ 0.01

Bereits bei 44  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Eintrag 2) konnte nur noch ein Umsatz von 54 % erzielt werden und bei weiter steigender Flussrate bis zu 77  $\mu\text{L}/\text{min}$  fiel er schließlich auf 34 % ab. Auffällig war der Ausreißer bei 66  $\mu\text{L}/\text{min}$ , der mit 26 % niedriger ausfiel, verglichen mit den 34 % der nächsthöheren Flussrate von 77  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Dies war an dieser Stelle ggf. auf temporäre Mischungsprobleme durch das Y-Stück zurückzuführen. Angesichts dieser Ergebnisse und in Anbetracht der niedrigen Substratkonzentration von 20 mM konnte hier geschlussfolgert werden, dass das MBH-Keton **25a** nicht in gleichem Maße vom Enzym akzeptiert wurde, wie die zuvor verwendeten Ketone **16**, **81** und **83**, woraus eine geringere Produktivität des Systems resultierte.

Nachdem gezeigt werden könnte, dass mit dem neuen System die einzelnen Ketone **25a**, **16**, **81** und **83** reduziert werden können, sollten diese nun in einer kontinuierlichen Synthese ebenfalls in diesem System eingesetzt werden. Die verwendeten Reaktionsbedingungen und die entsprechenden Ergebnisse sind in **Schema 30** dargestellt. Nach der Isolierung der Produkte wurden die Ausbeute, die Raum-Zeit-Ausbeute, der Enantiomerenüberschuss (*ee*) und die *TTN* (engl. *total turnover number* für Gesamtumsatzzahl) für  $\text{NADP}^+$  bestimmt. Die *TTN* gibt dabei an, wie viel Mol Produkt pro Mol Kofaktor in einer Reaktion gebildet wurde.<sup>[221, 222]</sup> Die Konfiguration der Produkte wurde nun mittels Drehwertbestimmung validiert. Alle Ketone **16**, **25a**, **81** und **83** wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten von 72–93 % und exzellentem *ee* >99 % zu den entsprechenden Alkoholen **17**, **82**, **84**, **85** umgesetzt. Dabei wurden zudem moderate bis sehr hohe Raum-Zeit-Ausbeuten von 14–117  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  und *TTN* von 128–2023 mol/mol

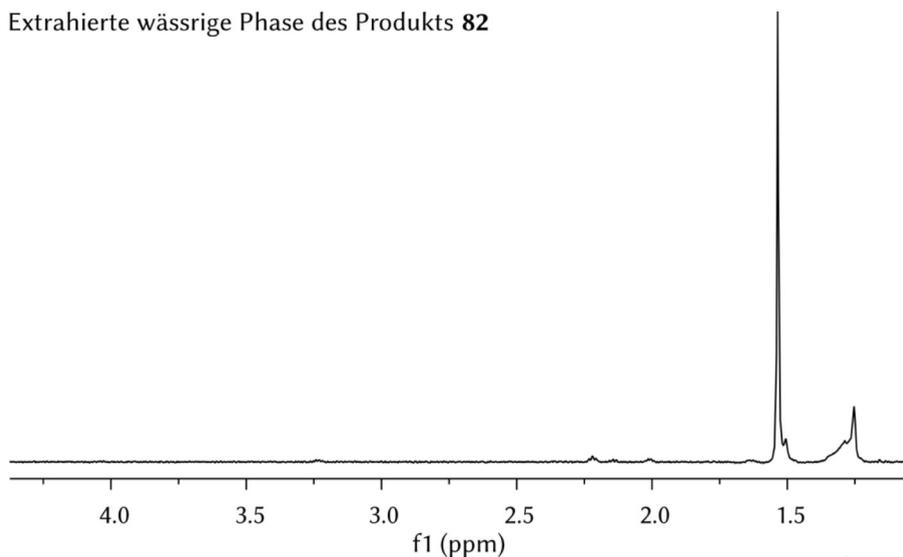
erreicht. Wie zuvor schon angedeutet, zeigte sich nun auch die geringere RZA des Ketons **25a** aufgrund niedrigerer Substratkonzentrationen und Flussraten.



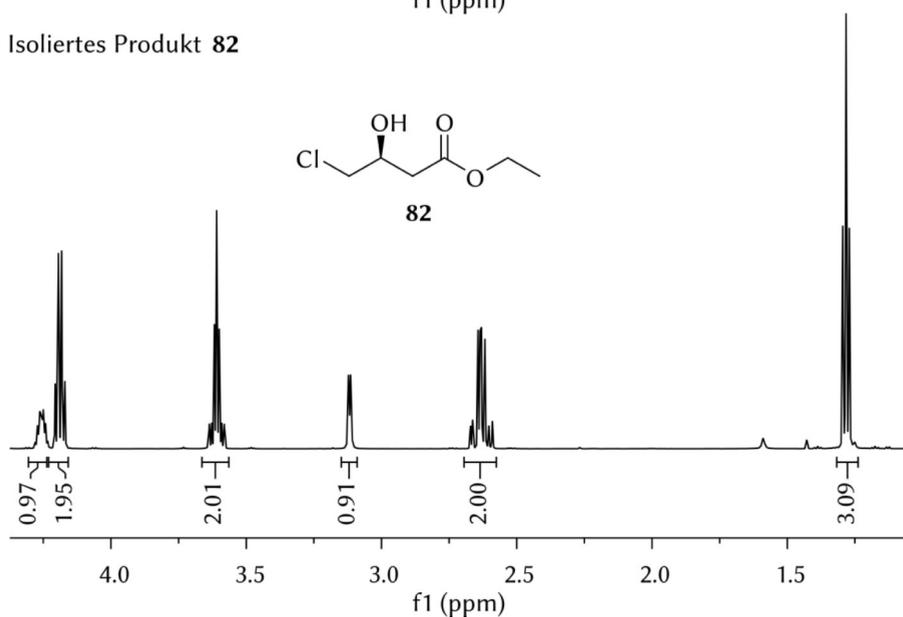
**Schema 30.** Kontinuierliche Reduktion der Ketone **16**, **25a**, **81** und **83** im geschlossenen System mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung. Angegeben sind die Flussraten als Pumpe 1 (wässrig)/Pumpe 2 (organisch)/Pumpe 3 (Extraktion). Die angegebene Substratkonzentration entspricht der tatsächlichen Konzentration im Reaktor. RZA: Raum-Zeit-Ausbeute, TTN: engl. total turnover number für den Kofaktor NADP<sup>+</sup>, FR: Flussrate.

Um die Effizienz der Phasentrennung hervorzuheben, wurde nach jedem Lauf die wässrige kofaktorhaltige Phase mit organischem Lösungsmittel extrahiert und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie auf Substrat- bzw. Produktkontaminationen überprüft. Beispielhaft sind im Folgenden das Spektrum der extrahierten wässrigen Phase (**Abbildung 20**, oben) und das Produktspektrum (**Abbildung 20**, unten) des Alkohols **82** dargestellt. Beim Vergleich der Spektren ist zu erkennen, dass in der wässrigen Phase keine im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nachweisbare Substrat- oder Produktkontamination vorzufinden war. Das gleiche Ergebnis konnte ebenfalls bei den anderen in diesem Modus synthetisierten Alkoholen **17**, **84** und **85** erzielt werden und bewies damit sowohl eine sehr gut funktionierende Phasentrennung als auch eine hohe Effizienz des geschlossenen Systems mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung und -Zirkulierung.

Extrahierte wässrige Phase des Produkts **82**



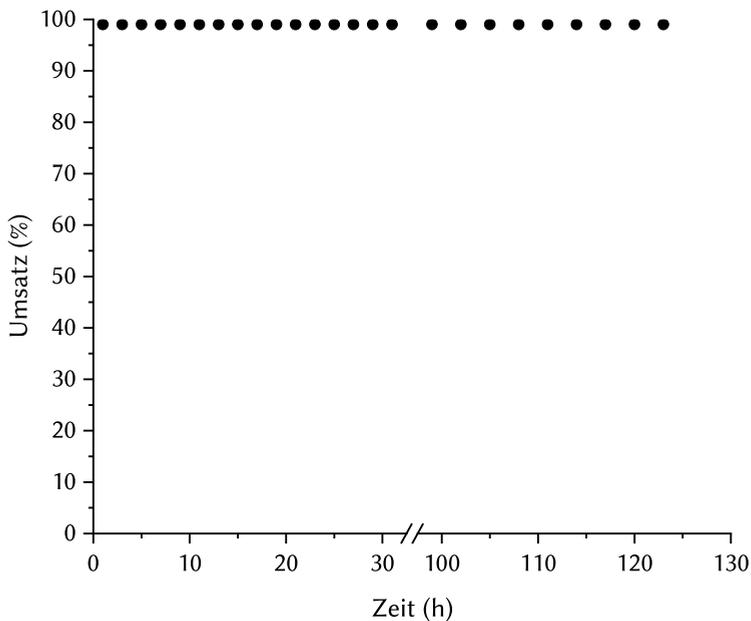
Isoliertes Produkt **82**



**Abbildung 20.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der organisch extrahierten wässrigen Phase der kontinuierlichen Synthese des Alkohols **82** (oberes Spektrum) zum Vergleich mit dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Alkohols **82** (unteres Spektrum). In der wässrigen Phase sind keine Kontaminationen zu sehen.

Zusätzlich sollte nun noch das Verhalten des neuartigen Flusssystems in einem Langzeitversuch untersucht werden. Dazu wurde das Keton **81** über 32 h kontinuierlich im geschlossenen System unter bekannten Bedingungen (50 mM **81** in 10 %v/v 2-Propanol, sowie 0.6 mM  $\text{NADP}^+$  in  $\text{KP}_i$  Puffer) reduziert. Der Alkohol **82** konnte mit einer Ausbeute von ca. 1.4 g und einer sehr hohen RZA von  $121 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhalten werden.

Ferner wurde mit 12855 mol/mol für NADP(H) eine zu diesem Zeitpunkt in der bekannten Literatur höchsten *TTN* für NADP<sup>+</sup> mit kontinuierlicher Regeneration im Durchfluss erzielt.<sup>[213, 215, 216]</sup> Ebenfalls wurde die Stabilität der Enzymkartusche in einem Leistungstest über 123 h unter den identischen Bedingungen validiert. Der Umsatz wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie überprüft und das Ergebnis ist in **Abbildung 21** dargestellt.



**Abbildung 21.** Leistungstest des Kofaktor-Regenerierungssystems über 123 h. 50 mM des Ketons **81** wurden dazu durch das System gepumpt und durch die HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH reduziert. Der Übersicht halber wurde der Abschnitt zwischen 30 h und 100 h ausgeblendet.

Die HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH war über 123 h dazu in der Lage, das Keton **81** vollständig zu reduzieren. Zu beobachten war an dieser Stelle jedoch, dass sich die Enzymkartusche mit der Zeit gelb-braun verfärbte, dass aber keinen Einfluss auf den Umsatz hatte. Allerdings lief der Lauf hinsichtlich der kontinuierlichen Kofaktor-Regenerierung nicht problemlos ab, da nach 38 h eine Verstopfung der hydrophoben Membran in der FLLEX auftrat und keine saubere Phasentrennung mehr möglich gewesen war. Dies hatte zur Folge, dass die organische in der wässrigen Phase akkumulierte, weshalb die wässrige Phase erneuert wurde. Nach weiteren 32 h waren von den neuen 4.0 mL jedoch nur noch ca.

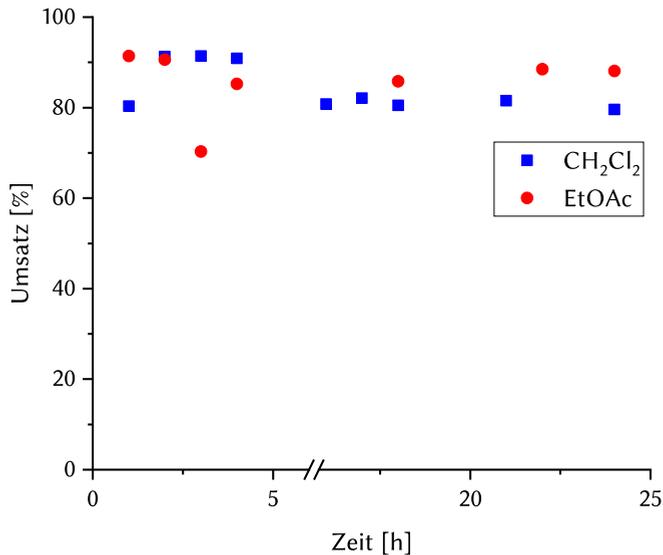
## *Eigene Ergebnisse*

2.0 mL vorhanden. Um jedoch den Lauf hier nicht abrechnen zu müssen und gleichzeitig eine geringere NADP(H)-Konzentration zu testen, wurde die wässrige Phase mit 1.5 mL  $KP_7$ -Puffer verdünnt, was einer Endkonzentration des Kofaktors von ca. 0.4 mM entsprach. Es konnte auch hier kein Einbruch des Umsatzes festgestellt werden.

Zur Interpretation der beobachteten Vorgänge könnte die Verringerung der wässrigen Phase auf das verwendete 2-Propanol zurückzuführen sein. Es fungierte auf der einen Seite als Kosubstrat für die Kofaktor-Regenerierung, andererseits wurde es auch als Lösungsvermittler benötigt. Dies bedeutete ebenfalls, dass die wässrige Phase partiell in die organische extrahiert werden konnte (und umgekehrt) und somit dem System entzogen wurde. Dieser Effekt wurde aus eigener Erfahrung besonders durch eine nicht ordentlich funktionierende FLLEX, beispielsweise durch verstopfte Membrane und undichte BPRs als häufigste Ursache, verstärkt.

### Extraktionslösungsmittel

Obwohl zu Beginn dieses Kapitels die Wahl des Lösungsmittels durch eine partielle Wasserlöslichkeit ausführlich begründet wurde, so sollten mit Ethylacetat und Dichlormethan dennoch zwei weitere laborübliche Lösungsmittel für die Extraktion (Pumpe 3) getestet werden. Dies sollte eine gewisse Flexibilität des Systems in der Wahl des Lösungsmittels (Pumpe 3) ermöglichen, was in Anbetracht möglicher Nachfolgereaktionen von großem Interesse sein könnte. Als Modellsubstrat wurde Acetophenon (**16**) eingesetzt und die Versuche über 24 h verfolgt (**Abbildung 22**). Für Ethylacetat (EtOAc, Rot) lagen die Umsätze in einem Bereich von 85 und 90 %, für Dichlormethan ( $CH_2Cl_2$ , Blau) zwischen 80 und 90 %. In beiden Fällen blieb dies auch über einen Zeitraum von 24 h weitestgehend unverändert. Die auffälligen Schwankungen konnten hier einerseits an Konzentrationsschwankungen aufgrund nicht-idealer Mischung im System liegen, andererseits an der partiellen Extraktion des Lösungsmittels in die wässrige Phase und somit Rezirkulierung über den Enzymreaktor. Nichtsdestotrotz zeigte dieses Experiment, dass hier ebenfalls auf weitere Lösungsmittel zurückgegriffen werden konnte, solange Substrat und Produkt in diesem löslich sind und solange eine gewisse Toleranz seitens des Enzyms gegenüber dem Lösungsmittel vorliegt.



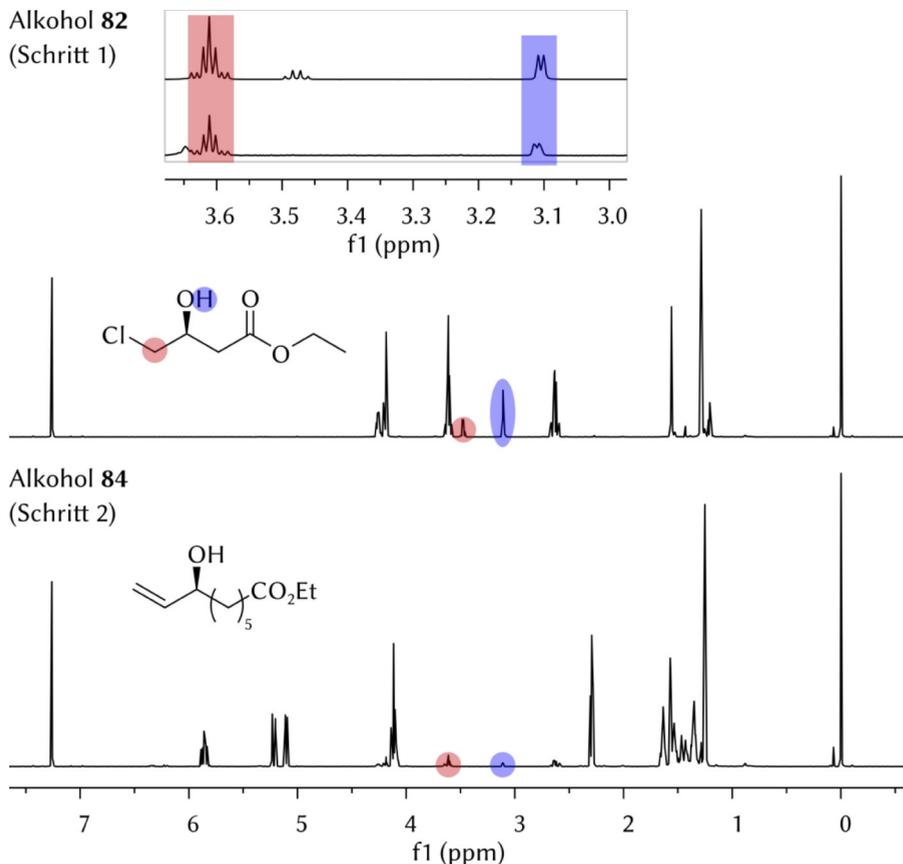
**Abbildung 22.** Variation der Extraktionsmittel in der kontinuierlichen Durchflusssynthese. Der Reaktionsverlauf wurde hierbei über 24 h beobachtet. Die Umsätze wurden gaschromatographisch ermittelt. In Blau sind die Umsätze unter Verwendung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und in Rot von EtOAc als Extraktionsmittel der FLLEX dargestellt.

Wie bis hier gezeigt werden konnte, wurde mit dem geschlossenen System ein System entwickelt, das durch Phasentrennungstechnik eine Rezirkulation und Regenerierung des teuren Kofaktors ermöglichte. Die Effizienz wurde zusätzlich sowohl durch die Langzeitversuche als auch dadurch, dass die wässrige Phase keine Substrat- oder Produktkontamination enthielt, bewiesen. Entsprechend lag es nun nahe, mit einer einzigen kofaktorhaltigen wässrigen Lösung zwei verschiedene Ketone in einem konsekutivexperiment umzusetzen.

#### Konsekutivexperiment

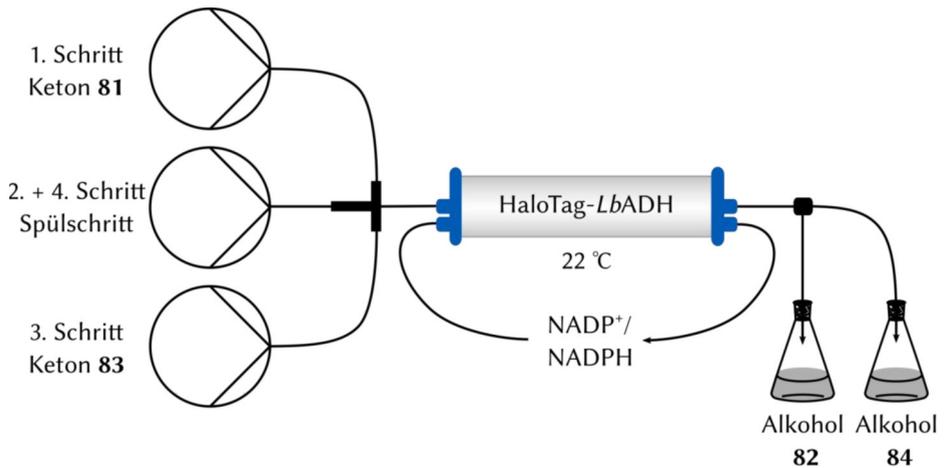
Für diesen Zweck wurden in einem ersten Experiment zuerst 50 mM Keton **81** nach bekannter Vorschrift (geschlossenes System) bei einer Flussrate von 90/9/99  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Pumpe 1, 2, 3) zum Alkohol **82** und im direkten Anschluss, nach Spülen der Spritze innerhalb der Pumpe mit 2-Propanol, 30 mM Keton **83** bei einer Flussrate von 50/5/55  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Pumpe 1, 2, 3) zum Alkohol **84** reduziert. Leider war dieser Ansatz nicht erfolgreich, da nach der zweiten Reduktion (**84**) Spuren der ersten Reduktion (**82**) im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zu finden waren, wie die folgende **Abbildung 23** zeigt. Das obere Spektrum entspricht dabei dem Alkohol **82** nach Schritt 1 und das untere Alkohol **84**

nach Schritt 2. Gleiches gilt für den hervorgehobenen Bereich zwischen 3–4 ppm, der die Kontamination im unteren Spektrum (mit Vergrößerung) verdeutlicht.



**Abbildung 23.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des ersten Experiments unter Verwendung einer wässrigen kofaktorhaltigen Lösung. Schritt 1 entsprach der Umsetzung des Ketons **81** zum Alkohol **82**. Anschließend erfolgte nach Spülen der Spritze innerhalb der Pumpe die Umsetzung des Ketons **83** zum Allylalkohol **84**. Zur Verdeutlichung der Kontamination des Allylalkohols **84** durch Alkohol **82** wurde der Bereich zwischen 3.0–3.6 ppm vergrößert. Farbcode: Rot:  $\alpha\text{-CH}_2$ -Gruppe des Alkohols **82**, Blau: Proton der OH-Gruppe.

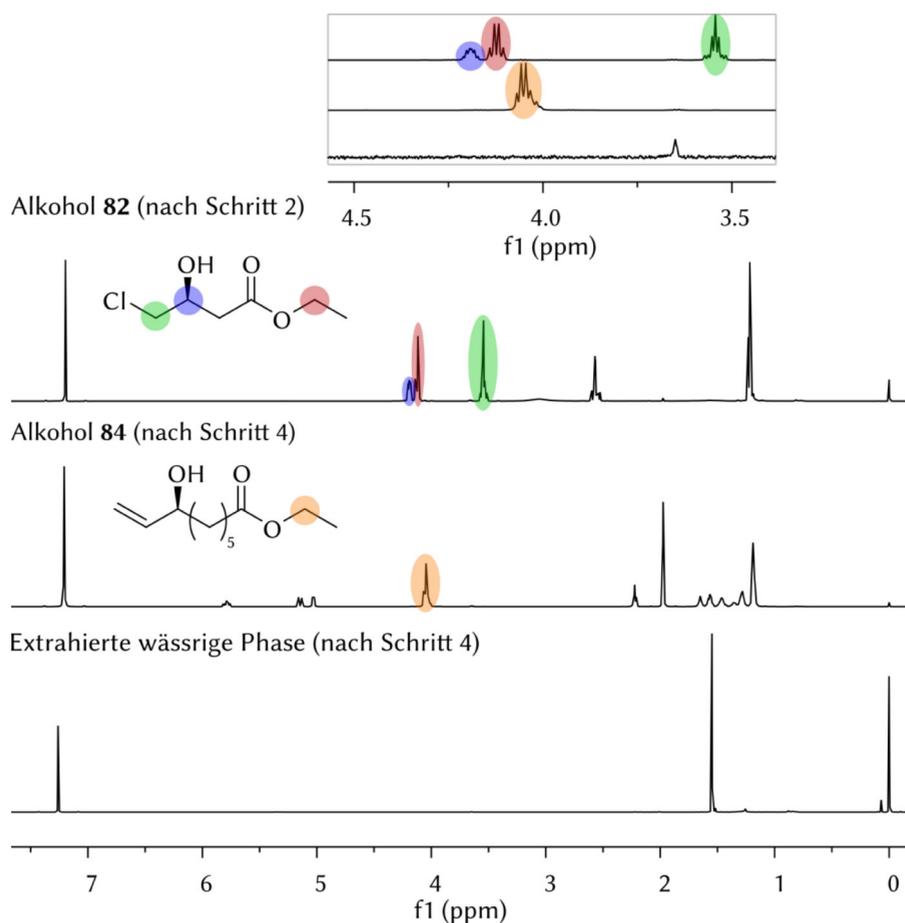
Dem Ergebnis folgend und um diese Kontamination zu vermeiden, sollte im nächsten Schritt ein Spülschritt mit 300 mM Aceton in  $\text{KP}_7$ -Puffer zwischen den beiden Läufen, sowie zum Ende des gesamten Experiments eingebaut werden. Die Vorgehensweise ist schematisch in **Schema 31** illustriert. Hier gilt zu beachten, dass die Nummerierung der Schritte verändert ist aufgrund der eingebauten Spülschritte - Schritt 1 und 3 entsprechen nun der Reduktion, Schritt 2 und 4 der Spülung.



**Schema 31.** Schematischer Aufbau des Konsekutivexperiments mit lediglich einer kofaktorhaltigen wässrigen Lösung. Eingesetzt wurde das etablierte geschlossene System.

Erneut wurde zuerst Keton **81** zum entsprechenden Alkohol **82** reduziert. Nun wurde der Spülvorgang (Schritt 2) für 10 min durchgeführt, bevor das zweite Keton **83** dem System zugeführt wurde. Nach vollendeter Reduktion (**84**) wurde der Waschvorgang (Schritt 4) erneut durchgeführt und der Lauf beendet.

Auf diese Weise konnten alle Produkte ohne im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erkennbaren Substrat-/Produktkontaminationen erhalten werden, was im Folgenden durch **Abbildung 24** bestätigt werden sollte. In **Abbildung 24** (oben) ist zur Validierung das Roh- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des ersten Alkohols **82** gezeigt, welches direkt nach dem Experiment (nach Schritt 2) und Entfernen des Lösungsmittels aufgenommen wurde. Zum Vergleich zeigt in **Abbildung 24** das mittlere Spektrum den Alkohol **84**, der nach Schritt 4 erhalten wurde. Das untere Spektrum zeigt abschließend die extrahierte wässrige Phase nach Beendigung des Experiments, um die gut funktionierende Phasentrennung zu unterstreichen. Die Signale der im relevanten und vergrößerten Bereich wurden dabei farblich markiert und den entsprechenden Protonen zugeordnet. Bemerkenswert war an dieser Stelle, dass weder in den Produktspektren noch in der wässrigen Phase Kontaminationen von Produkt und Edukt vorhanden waren. Dies sollte zusätzlich durch den hervorgehobenen Bereich zwischen 3.5 und 4.5 ppm validiert werden.



**Abbildung 24.** Das obere  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt Alkohol **82** als erstes Produkt nach Schritt 2, welches direkt nach dem Experiment und Entfernen des Lösungsmittels aufgenommen wurde. Das mittlere  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt Alkohol **84** als zweites Produkt nach Schritt 4 zum Vergleich. Das untere Spektrum zeigt zudem die extrahierte wässrige Phase nach Beendigung des Experiments. Es wird eine Vergrößerung des Bereichs zwischen 3.5 ppm und 4.5 ppm gezeigt, um den relevanten Bereich hervorzuheben, der zeigt, dass keine Kontaminationen von Produkt und Edukt vorhanden waren.

Schließlich konnte der Alkohol **82** mit einer sehr guten Ausbeute von 92 % und einer RZA von  $114 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  erhalten werden. Mit Alkohol **84** konnte eine Ausbeute von 87 %, respektive einer RZA von  $31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erzielt werden. Jedoch war hier die RZA geringer als in der semi-präparativen kontinuierlichen Synthese (**Schema 30**; 31 zu  $45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Eine mögliche Erklärung war, dass der Spülvorgang aufgrund der hohen Acetonkonzentration von 300 mM einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms hatte. Dies wurde durch ein einfaches Experiment überprüft: Keton **81** wurde nach bekannten Bedingungen im geschlossenen System zum Alkohol **82** umgesetzt. Anschließend wurde der Waschschritt für 15 min durchgeführt und dieselbe Reduktion wiederholt. Die

Umsätze wurden mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft. Wohingegen der erste Lauf mit einem Umsatz von 85 % beendet werden konnte, so waren im zweiten Lauf sogar 90 % möglich, was bedeutete, dass kein negativer Einfluss durch den Spülvorgang zu verzeichnen war. Die oben erwähnte niedrigere RZA ließ sich dementsprechend durch Fehler bei der Einwaage oder Extraktion erklären, da der Ansatz im niedrigen Milligramm-Maßstab durchgeführt wurde und jegliche Fehler stärker ins Gewicht fielen. Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass ein System entwickelt wurde, mit dem ein teurer Kofaktor [hier: NADP(H)] im kontinuierlichen Durchfluss rezirkuliert und regeneriert werden konnte. Dabei kam eine Phasenseparationstechnik durch die FLLEX zum Einsatz, die es ermöglichte, die wässrige kofaktorhaltige Phase erneut dem System zuzuführen. Für die gleichzeitige Nutzung der *LbADH* wurden hierdurch lediglich substöchiometrische Mengen an Kofaktor benötigt und folglich war eine bemerkenswerte *TTN* von 12855 mol/mol für NADP(H) möglich. Des Weiteren war ein bis dato literaturunbekannter Substratwechsel im gleichen System möglich, sprich es wurde für die Reduktion zweier Ketone nur eine einzige wässrige kofaktorhaltige Lösung benötigt. Zwischen den Substraten musste ein Spülschritt mit Aceton implementiert werden und es konnte keine Kreuzkontamination der Produkte und der wässrigen Phase im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum festgestellt werden.

Wie eingangs erwähnt, sollte es sich bei dem etablierten System um ein anderweitig einsetzbares „Modul“ handeln. Dies meinte, dass es entweder mit anderen Katalysatoren in eine Folgereaktion eingebaut werden kann oder dass die *LbADH* durch ein anderes Enzym ersetzt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher beide Varianten getestet. Im folgenden Kapitel 3.1.4 sollte zuerst eine Folgereaktion aus HaloTag™-*LbADH* und der Lipase *CalB* betrachtet werden.

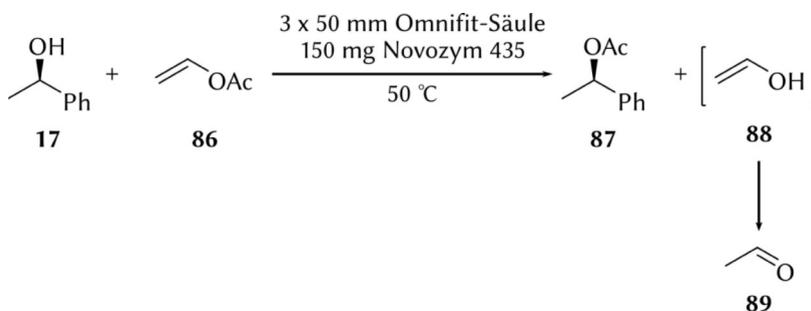
### 3.1.4 Konsekutivreaktion mit der Lipase *CalB* (Novozym 435)

Die *CalB* wurde in immobilisierter Form in einer Vielzahl von Flusssynthesen eingesetzt, wie bereits in Kapitel 2.3.3 erläutert und sollte im Rahmen dieser Arbeit als kommerzielles Novozym 435 ebenfalls in diesem Modus mit dem geschlossenen Kreislauf in einer Enzymkaskade gekoppelt werden. Enzymkaskaden kombinieren dabei verschiedene Biotransformationen innerhalb einer Produktsynthese und können so eine umweltfreundliche und kostengünstige Alternative zu konventionellen Verfahren darstellen, weshalb sie immer weiter in den Fokus rücken.<sup>[223, 224]</sup> Dazu waren jedoch

noch einige Vorversuche im einfachen Durchfluss notwendig und die Vorgehensweise, sowie Ergebnisse zu diesem Thema werden im Folgenden präsentiert.

### 3.1.4.1 Vinylacetat Konzentrationsscreening

Durch die Vorversuche mit einem Modellsystem im einfachen Durchfluss sollte gezeigt werden, ob und wie gut die Lipase CalB (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) mit Vinylacetat (**86**) als Acetylquelle zum Produkt **87** in diesem Modus acetylieren kann. Bei dieser Reaktion kam es gleichzeitig zur Bildung des Vinylalkohols **88**, der spontan zu Acetaldehyd (**89**) tautomerisiert (**Schema 32**):



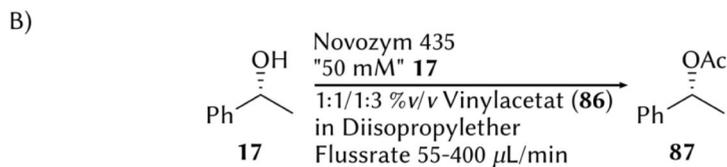
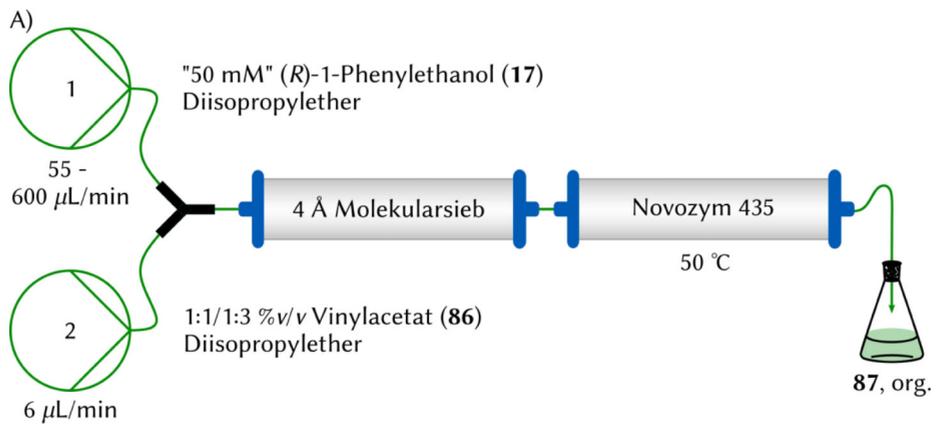
**Schema 32.** Reaktionsgleichung der Novozym 435-katalysierten Acetylierung von (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) zum acetylierten Produkt **87**.

Der Alkohol **17** wurde hier als Substrat eingesetzt, da dieser aus der HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH katalysierten Reduktion von Acetophenon (**16**) hervorging (Reaktionsgleichung siehe **Schema 23** und Aufbau geschlossener Kreislauf siehe Kapitel 3.1.3.1). Unter der Annahme, dass diese Reduktion nahezu vollständig ablief, zum Beispiel durch die Verwendung einer längeren HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH-Säule, wurde eine hypothetische 50 mM Lösung des Alkohols **17** angenommen, der nach der Phasentrennung in Diisopropylether (DIPE) vorlag. Aufgrund dessen wurde diese Konzentration als Startwert für die Vorversuche verwendet. Beide Substrate **16** und **86** wurden in Diisopropylether gelöst und in den Pumpen 1 und 2 vorgelegt. Zusätzlich wurde Vinylacetat (**86**) in zwei Konzentrationen eingesetzt – 1:1 %v/v und 1:3 %v/v Vinylacetat (**86**) zu Diisopropylether. Die Flussrate für Pumpe 1 wurde variiert und jene von Pumpe 2 auf 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  fixiert. Auf diese Weise wurde das Acetat **86** in verschiedenen Überschüssen relativ zum Alkohol **17** eingesetzt (**Tabelle 10**, Werte >1 = Überschuss):

**Tabelle 10.** Verschiedene Überschüsse von Vinylacetat (**86**), Pumpe 2, Flussrate konstant 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  relativ zu (*R*)-1-Phenylethanol (**17**, Pumpe 1, variierte Flussraten) in Abhängigkeit von der Flussrate. Bei Werten  $>1$  ist ein Überschuss vorhanden.

Flussrate ( <i>R</i> )-1-Phenylethanol ( <b>17</b> )	Vinylacetat ( <b>86</b> ) in DIPE 1:1 %v/v	Vinylacetat ( <b>86</b> ) in DIPE 1:3 %v/v
55 $\mu\text{L}/\text{min}$	12	5.9
100 $\mu\text{L}/\text{min}$	6.5	3.3
150 $\mu\text{L}/\text{min}$	4.3	2.2
200 $\mu\text{L}/\text{min}$	3.3	1.6
300 $\mu\text{L}/\text{min}$	2.2	1.1
400 $\mu\text{L}/\text{min}$	1.6	0.8

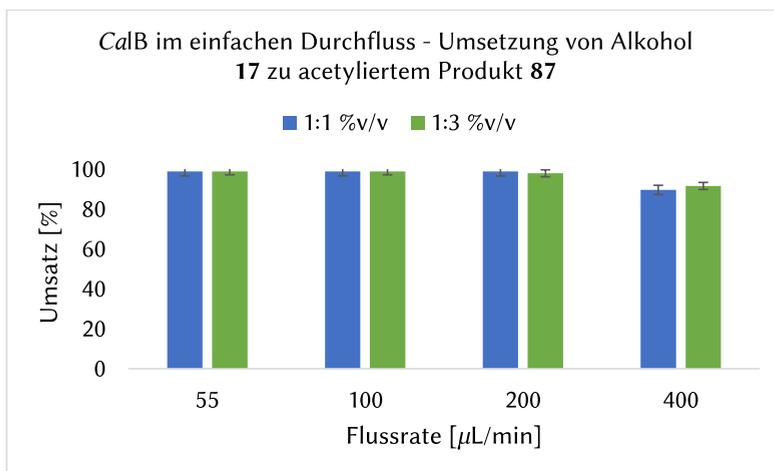
Außerdem wurde dem Enzymreaktor (3 x 50 mm; 150 mg *CalB*) eine 3 x 100 mm Trockensäule befüllt mit aktiviertem 4 Å Molekularsieb (Menge: 500 mg) vorgeschaltet, um mögliche Feuchtigkeit aus der Reaktionslösung zu entfernen, die das Reaktionsgleichgewicht beeinflussen könnte. Der verwendete Flussaufbau ist in **Schema 33.A** gezeigt, die entsprechende Reaktionsgleichung in **Schema 33.B**.



**Schema 33.** Einfacher Durchfluss für die lipasekatalysierte Acetylierung von (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) mit Vinylacetat (**86**). Dabei zeigt **33.A** den schematischen Flussaufbau und **33.B** die zugehörige Reaktionsgleichung.

Nachdem das Systemvolumen überwunden wurde, begann die Sammlung der Produktlösung. Für jede gewählte Flussrate wurden hintereinander ohne Unterbrechung des Laufs drei Proben à 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  gesammelt (technische Triplikate) und der Umsatz

von (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) zum acetylierten Produkt **87** mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden **Abbildung 25** mit der Standardabweichung aufgeführt. Unabhängig der Konzentration des Vinylacetats (**86**, 1:1 %v/v in Blau vs. 1:3 %v/v in Grün) konnte bis zu einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  vollständiger Umsatz erzielt werden. Bei 400  $\mu\text{L}/\text{min}$  konnte immer noch ein Umsatz von rund 90 % erreicht werden, was im Vergleich zu 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  einer fast verdoppelten Produktivität entsprach.

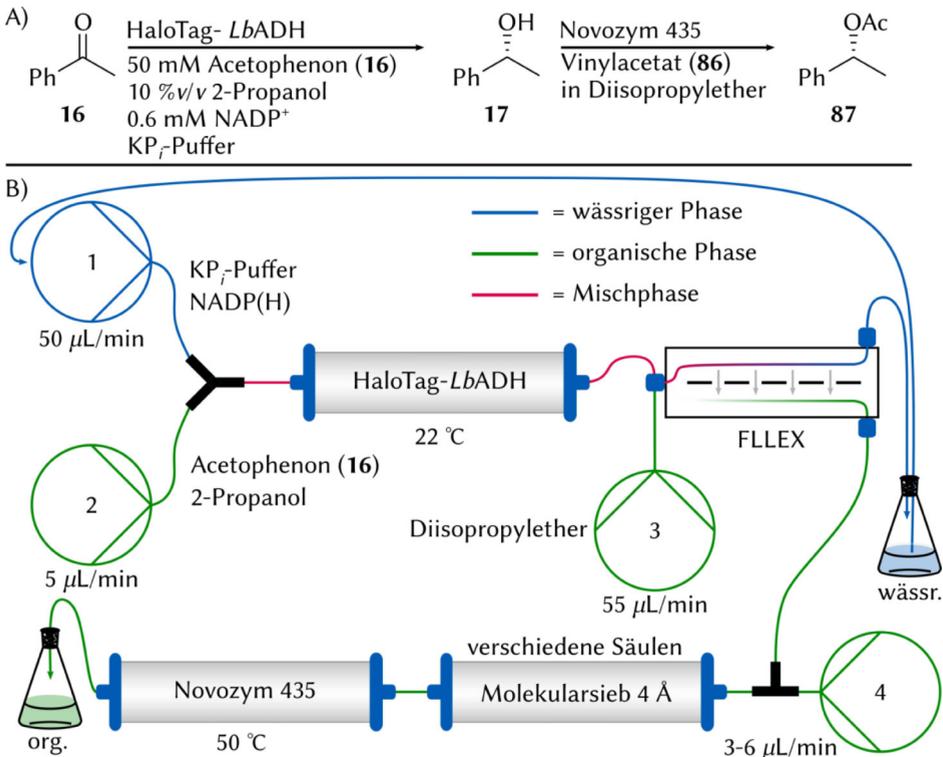


**Abbildung 25.** Darstellung des Umsatzes der Novozym 435-katalysierten Acetylierungsstudie von (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) zum acetylierten Produkt **87** im einfachen Durchfluss (**Schema 22**). In Blau ist die Vinylacetat (**86**)-Konzentration von 1:1 %v/v und in Grün jene von 1:3 %v/v gezeigt. Es handelte sich um technische Triplikate, da innerhalb eines Laufs hintereinander drei Produktmischungen gesammelt und nach Entfernen des Lösungsmittels mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie auf Umsatz überprüft wurden.

Für die Kombination mit dem geschlossenen System war im vorliegenden Fall allerdings nur die Flussrate von 55  $\mu\text{L}/\text{min}$  von Bedeutung, da dies der Flussrate des organischen Auslasses nach der FLLEX entsprach. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die *CalB* den Alkohol **17** problemlos im Fluss acetylieren konnte und hier eine Flexibilität zu höheren Flussraten und somit höherer Produktivität gegeben ist. Aus diesem Grund sollte die *CalB* nun folglich mit dem geschlossenen System in einer Folgereaktion gekoppelt werden. Wie gut das funktionierte als auch welche Problemstellungen auftraten, erläutert nun Kapitel 3.1.4.2.

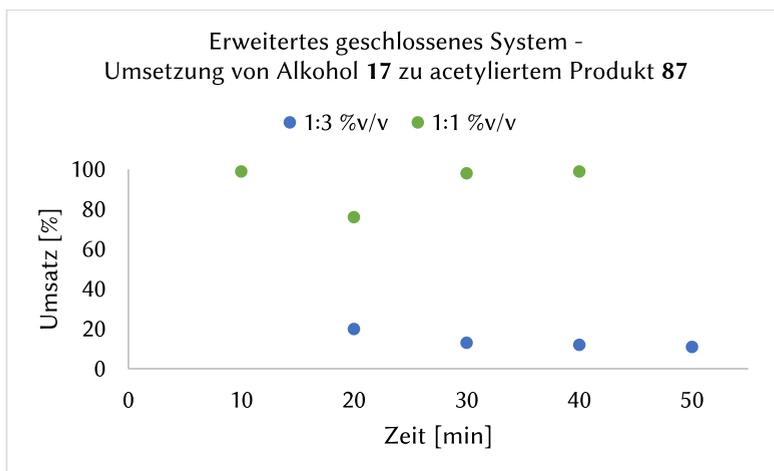
## 3.1.4.2 Geschlossenes System mit konsekutiver Acetylierung

Wie bereits im vorherigen Kapitel wurden zur Kombination des geschlossenen ADH-Systems mit der Lipase-katalysierten Acetylierung ebenfalls die zwei Konzentrationen 1:1 und 1:3 %v/v Vinylacetat (**86**) zu Diisopropylether getestet, um eine bessere Vergleichbarkeit zum einfachen Durchfluss gewährleisten zu können. Zuerst wurde Acetophenon (**16**), wie bereits in Kapitel 3.1.3.2 detailliert beschrieben, im geschlossenen System zum Alkohol **17** durch die HaloTag™-LbADH reduziert. Nun wurde der organische Ausgang der FLLEX (grün) jedoch nicht gesammelt, sondern durch ein T-Stück mit einer weiteren Pumpe 4 verknüpft, die Vinylacetat (**86**) in Diisopropylether zuführte. Der Fluss wurde anschließend über eine Trockensäule (befüllt mit 500 mg 4 Å Molekularsieb) und folgend über die Novozym 435-Kartusche geleitet, um das acetylierte Produkt **87** zu erhalten (Reaktionsschema siehe **Schema 34.A**, Fließschema siehe **Schema 34.B**).



**Schema 34.A)** Schematische Darstellung der Reaktion – Umsetzung des Substrats **16** zum Produkt **87** durch die HaloTag™-LbADH und das Novozym 435 im geschlossenen System (Vergleich Kapitel 3.1.3.2). **34.B)** Der Aufbau des geschlossenen Systems mit anschließender Acetylierung durch die CalB.

Zu Beginn wurde ermittelt, ob die Bedingungen für Vinylacetat (**86**) des einfachen Durchflusses auf das erweiterte geschlossene System übertragen werden können und dazu wurde die Flussrate für Pumpe 4 initial auf  $6 \mu\text{L}/\text{min}$  fixiert. Der Enzymkartusche wurde wie zuvor eine Trockensäule ( $3 \times 100 \text{ mm}$ ;  $4 \text{ \AA}$  Molekularsieb, Menge:  $500 \text{ mg}$ ) vorgeschaltet und die Produktlösung gesammelt, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden worden war (Zeitpunkt  $t=0$ ). Die Ergebnisse der ersten Läufe sind in der folgenden **Abbildung 26** gezeigt:

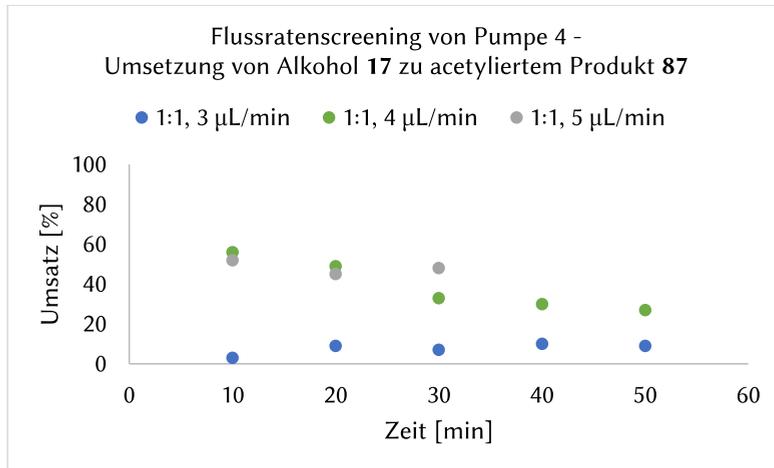


**Abbildung 26.** Erstes Screening im erweiterten geschlossenen System mit fixierter Flussrate von  $6 \mu\text{L}/\text{min}$  für Pumpe 4 und Volumenverhältnissen von 1:1 und 1:3 %v/v Vinylacetat (**86**):Diisopropylether, um eine Vergleichbarkeit zum einfachen Durchfluss (vgl. **Abbildung 25**) zu ermöglichen. Die produktthaltige Lösung wurde gesammelt, nachdem das Totvolumen des System überwunden worden ist und die Umsatzbestimmung wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt.

Obwohl mit beiden Konzentrationen im einfachen Durchfluss (vgl. **Abbildung 25**) nahezu vollständige Umsätze erzielt werden konnten, unterschieden sie sich in diesem Modus nun sehr deutlich voneinander. Für 1:1 %v/v (12-facher Überschuss - vgl. **Tabelle 10**) konnten bis auf einen Ausreißer bei 20 min vollständige Umsätze erzielt werden. Für 1:3 %v/v konnten hingegen lediglich 20 % Umsatz über 50 min erreicht werden, was darauf hindeutete, dass ein großer Überschuss an Vinylacetat (**86**) unumgänglich war, da vermutlich ein Teil des Vinylacetats mit vorhandener Restfeuchte aus dem geschlossenen System abreagierte und die eigentliche Reaktion verhinderte.

Entsprechend der Ergebnisse der ersten Tests wurde der Fokus im weiteren Verlauf auf die Konzentration von 1:1 %v/v Vinylacetat (**86**) zu Diisopropylether gelegt. Aus ökonomischen Gründen war dennoch eine Minimierung des deutlichen Überschusses an

Vinylacetat **86** erstrebenswert und folglich wurde die Flussrate von Pumpe 4 auf 3–5  $\mu\text{L}/\text{min}$  gesenkt (**Abbildung 27**).



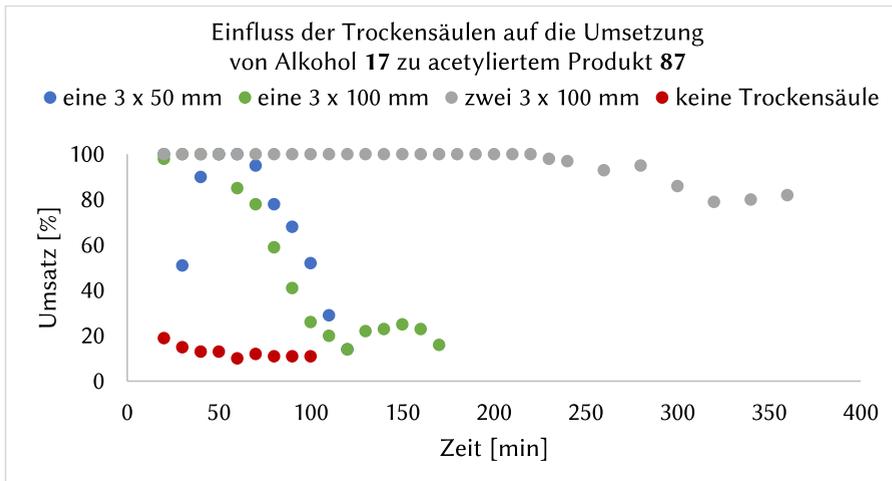
**Abbildung 27.** Flussratenscreening für Pumpe 4 (3–5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Überschüsse siehe Tabelle 10). In diesem Fall wurde lediglich das Volumenverhältnis von 1:1  $\%v/v$  Vinylacetat (**86**):Diisopropylether verwendet. Die Produktlösung wurde gesammelt, nachdem das Totvolumen des System überwunden worden ist und die Umsatzbestimmung wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt.

Für 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  wurden Umsätze von ca. 10 % erreicht, 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  begann bei moderaten 60 % und fiel rasch auf 20 % herab. Bei 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  war zu erwähnen, dass es nach 30 min zu einem Systemfehler gekommen war - die FLLEX fiel aus, es war keine saubere Phasentrennung und somit eine weitere Umsetzung nicht möglich. Der Trend aus den vorherigen Ergebnissen war trotzdem erkenntlich und weit weg von vollständigem Umsatz.

Um einen Fehler im initialen Experiment mit 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  (**Abbildung 26**) für Pumpe 4 (für die Konzentration von 1:1  $\%v/v$ ) auszuschließen, wurde das Experiment erneut durchgeführt und über einen Zeitraum von 170 min verfolgt. Der Umsatz blieb wie zuvor über 50 min vollständig, brach anschließend jedoch ein, sodass nach weiteren 50 min nur noch ein Umsatz von 26 % erzielt werden konnte. Die nächsten 60 min variierte dieser zwischen 16 und 25 % (**Abbildung 28**, grüne Messpunkte). Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung kurzzeitig mit vollständigem Umsatz bezogen auf das Zwischenprodukt (*R*)-1-Phenylethanol (**17**) ablief. Für den anschließenden Umsatzeinbruch wurde vermutet, dass trotz der vorhandenen Trockensäule immer noch genug Wasser präsent war, um die Rückreaktion zum Alkohol **17** zu katalysieren. Zur

Überprüfung wurden drei weitere Experimente durchgeführt und die Ergebnisse sind ebenfalls in **Abbildung 28** gezeigt:

1. Keine vorgeschaltete Trockensäule (rote Messpunkte)
2. Eine 3 x 50 mm Trockensäule (blaue Messpunkte)
3. Zwei 3 x 100 mm Trockensäulen (graue Messpunkte)



**Abbildung 28.** Grüne Messpunkte → Duplikat des ersten Versuchs mit 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 1:1 %v/v Vinylacetat (86):Diisopropylether (vgl. **Abbildung 26**). Rote, blaue und graue Messpunkte → gleicher Ansatz, jedoch mit unterschiedlicher Anzahl und Größe an vorgeschalteten Trockensäulen. Die produktthaltige Lösung wurde gesammelt, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden worden war und die Umsatzbestimmung wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt.

Ohne eine vorhandene Trockensäule (rote Messpunkte) war von Anfang an nur ein geringer Umsatz von 19 % möglich, der anschließend auf 11 % nach 100 min abfiel. Dies zeigte an dieser Stelle bereits, welchen Einfluss die vorgeschaltete Säule auf das die Produkt 87-Bildung hatte. Bei Versuch 2 (3 x 50 mm Säule; blaue Messpunkte) konnte überraschenderweise eine Verbesserung zum initialen Versuch mit einer doppelt so langen Trockensäule (3 x 100 mm Säule, grüne Messpunkte) erzielt werden, denn der Umsatz blieb etwas länger stabil, fiel jedoch nach 120 min auf nur noch 14 % ab. Möglicherweise war das Molekularsieb in der längeren Säule nicht vollständig trocken. Die Verwendung von zwei hintereinander geschalteten Säulen (Versuch 3, zwei 3 x 100 mm Säulen, graue Messpunkte) war schlussendlich zielführend, denn so konnte der Umsatz über 210 min konstant vollständig gehalten werden. Erst im Anschluss fiel er nach weiteren 150 min auf immer noch gute 82 %. Besonders auffällig war an dieser

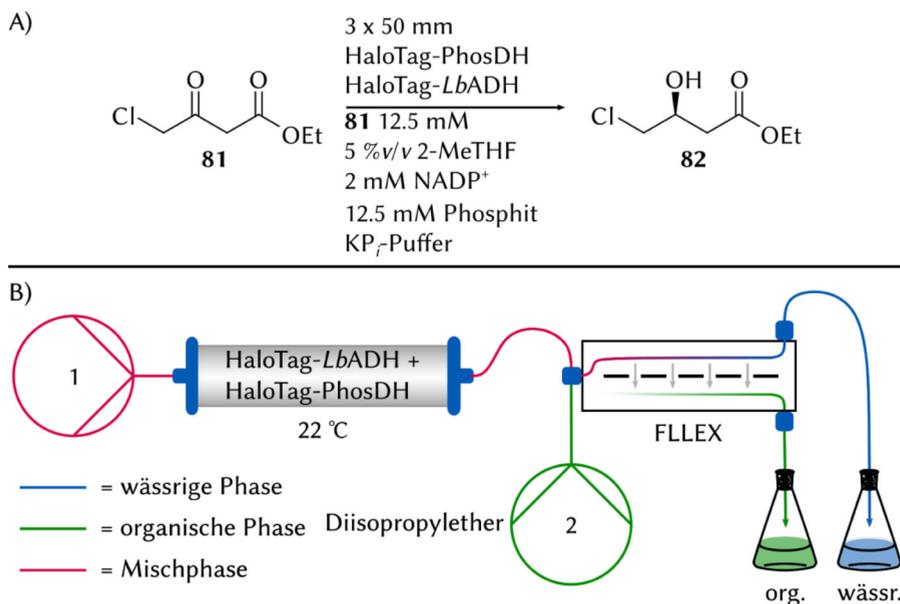
Stelle, dass die sonst undurchsichtige Säule mit dem Reaktionsverlauf milchig-transparent wurde, da das 4 Å Molekularsieb mit Wasser gesättigt war. Dies könnte zukünftig als Indikator genutzt werden, um die Säule rechtzeitig gegen eine neue austauschen zu können. Außerdem wäre ein paralleler Betrieb mehrerer Trockensäulen denkbar, die gezielt durch eine Weiche zugänglich gemacht werden könnten. Jedoch sollte bedacht werden, dass mit jedem Austausch einer Säule Substrat und Produkt verloren geht, was quantifiziert und einkalkuliert werden muss, um in präparativen Ansätzen eine genaue Raum-Zeit-Ausbeute angeben zu können.

Als Zwischenfazit lässt sich festhalten, dass sich das geschlossene System mit einer nachfolgenden Enzymreaktion koppeln ließ und vollständige Umsätze zum acetylierten Produkt **87** möglich gewesen sind. Jedoch muss hier verdeutlicht werden, dass es sich um ein sehr komplexes System handelte, da die organische Lösung aus der FLLEX viele verschiedene Komponenten enthielt: Acetophenon (**16**), (*R*)-1-Phenylethanol (**17**), 2-Propanol, Diisopropylether und ggf. wässrigen Puffer, sofern die Extraktion nicht vollständig abgelaufen war. Aufgrund dieser Komplexität konnten die ermittelten Bedingungen der Vorversuche im einfachen Durchfluss (siehe Kapitel 3.1.4.1) nicht einfach auf das geschlossene System übertragen werden. Besonders die wässrigen Anteile im System hatten einen großen Einfluss auf den Reaktionsverlauf, denn sie waren vermutlich dafür verantwortlich, dass Vinylacetat (**86**) frühzeitig abreagierte und der Reaktion somit entzogen wurde. Außerdem musste beachtet werden, dass jede Verstopfung im System, besonders der FLLEX-Membrane, dazu führte, dass keine Phasentrennung und Nachfolgereaktion mehr möglich waren. Jegliche größere Druckschwankung durch Undichtigkeiten hatten denselben Effekt (mehr dazu wurde bereits am Ende des Kapitels 3.1.3.2 erläutert).

### 3.1.5 Modellsystem HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH und PhosDH

Die Toleranz der HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH gegenüber höheren 2-Propanolkonzentrationen von bis zu 15 %v/v, mindestens aber 10 %v/v über einen langen Zeitraum, konnte in Kapiteln 3.1.2 & 3.1.3 erfolgreich demonstriert werden. Dies lässt sich aber nicht auf jedes beliebige Enzym übertragen, denn die Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln ist bei Enzymen oftmals begrenzt. Um diese Problematik gezielt anzugehen, sollte nun ein alternatives Kofaktor-Regenerierungssystem im Fluss getestet werden, bei dem 2-Propanol durch ein weniger wasserlösliches Lösungsmittel, wie z.B. 2-MeTHF ersetzt werden könnte.

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert, katalysiert die Phosphitdehydrogenase (PhosDH) die NADP<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von Phosphit zu Phosphat und regeneriert dabei den Kofaktor NADPH. Als Vorbereitung zur Anwendung im Fluss wurde das Enzym von Niklas Kiel unter Betreuung von Beatrix Paschold mit einem HaloTag™ durch einen *Gibson Assembly* versehen, sodass eine anschließende Immobilisierung auf dem HaloLink™-Resin ermöglicht wurde. Als Basis diente hierbei das Plasmid der HaloTag™-LbADH. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anschließend eine Zwei-Enzym-Säule bestehend aus HaloTag™-LbADH und HaloTag™-PhosDH hergestellt werden, um eine asymmetrische Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) zum entsprechenden Alkohol (**82**) durchzuführen (Reaktionsschema und Reaktionsbedingungen siehe **Schema 35.A**; Fließschema siehe **Schema 35.B**). Die PhosDH regenerierte dabei den Kofaktor, die LbADH reduzierte das Keton. Der Aufbau des Flusssystems unterschied sich nicht von dem vorher genutzten einfachen Durchfluss.



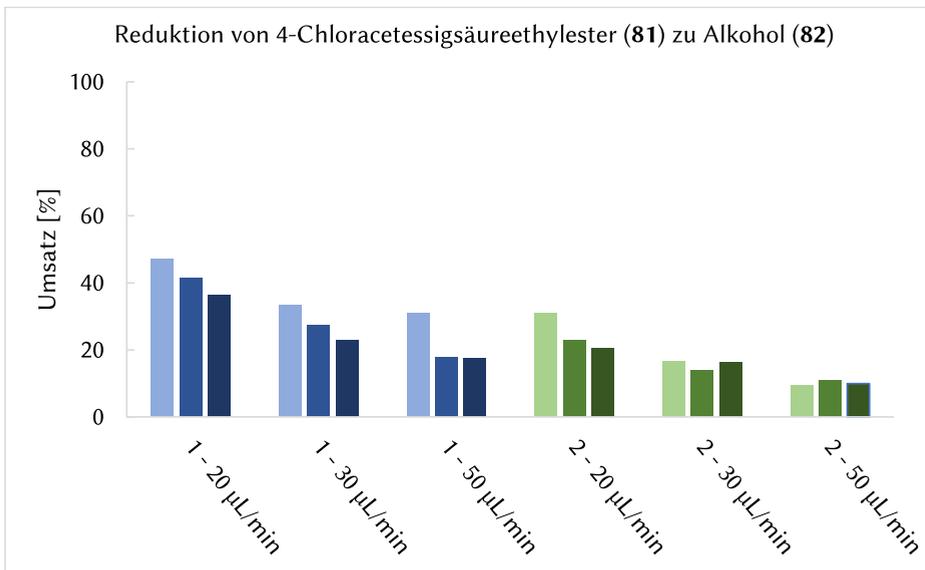
**Schema 35.A)** Reaktionsbedingungen der asymmetrischen Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) zum entsprechenden Alkohol **82**. Eingesetzt wurde ein Zwei-Enzym-Reaktor bestehend aus HaloTag™-PhosDH zur Regenerierung des Kofaktors NADPH und HaloTag™-LbADH zur Reduktion des Substrats **81**. **35.B)** Aufbau des einfachen Durchflusses - für mehr Infos siehe Kapitel 3.1.2.1.

Für die Studie im Rahmen dieser Arbeit wurden zu Beginn zwei verschiedene Enzymsäulen gefertigt. Dazu wurden die benötigten Lysate gemischt und anschließend über die mit HaloLink™-Resin befüllten Säulen geleitet:

*Säule 1:* 1.2 U (3 mL Lysat) HaloTag<sup>TM</sup>-PhosDH + 384 U (3 mL Lysat) HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH

*Säule 2:* 0.5 U (1.2 mL Lysat) HaloTag<sup>TM</sup>-PhosDH + 614 U (4.8 mL Lysat) HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH

Anschließend wurde die Reduktion bei verschiedenen Flussraten (20, 30 und 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) durchgeführt und nachdem das Totvolumen überwunden war, hintereinander drei 500  $\mu\text{L}$ -Proben der Reaktionslösung gesammelt und bzgl. des Umsatzes miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind als technische Triplikate in **Abbildung 29** dargestellt. Dabei entsprechen die Balken in blau der Säule 1 und jene in Grün der Säule 2.



**Abbildung 29.** Flussratenscreening unter der Verwendung zwei Zwei-Enzym-Reaktoren, die mit unterschiedlichen Mengen an HaloTag<sup>TM</sup>-PhosDH und HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH hergestellt wurden. Säule 1 entspricht den blauen Balken; Säule 2 den grünen Balken. Gesammelt wurden die Proben, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden war.

Wie zu erwarten, sank der Umsatz mit steigender Flussrate als Folge der kürzeren Verweilzeit des Substrats im Reaktor und ferner war die Menge an PhosDH der limitierende Faktor, da der Umsatz mit Säule 1 entsprechend höher ausfiel. Besonders auffällig war jedoch auch, dass der Umsatz mit dem Verlauf der Produktsammlung abnahm, was die Folge entweder einer Deaktivierung des Enzyms oder einer zu langsamen Kofaktor-Regenerierung aufgrund geringer Enzymaktivität sein konnte. Mögliche Lösungsansätze wären hierbei sowohl die Annäherung der Aktivitäten der Enzyme und die Erhöhung der Kofaktormenge als auch eine Erhöhung des Phosphits, denn dieses wird für die Kofaktor-Regenerierung benötigt. Des Weiteren könnte eine

Temperaturerhöhung einen positiven Einfluss auf den Umsatz haben. Dies galt es in der nächsten Studie zu testen. Dafür wurden zwei Säulen eingesetzt - Säule 1 (5 x 50 mm, siehe Seite 109) und eine mit 5 x 100 mm doppelt so lange und mit 2.0 U PhosDH (5 mL Lysat) aktivere Säule 2. Die Substratkonzentration betrug weiterhin 12.5 mM. Die Ergebnisse sind der folgenden **Tabelle 11** gezeigt, wobei Einträge 1–3 Säule 1 und Einträge 4–6 der aktiveren Säule 2 entsprechen.

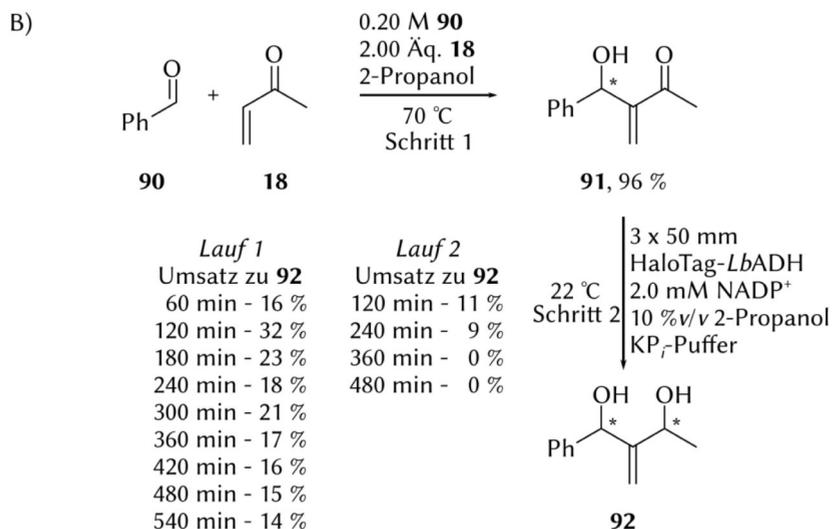
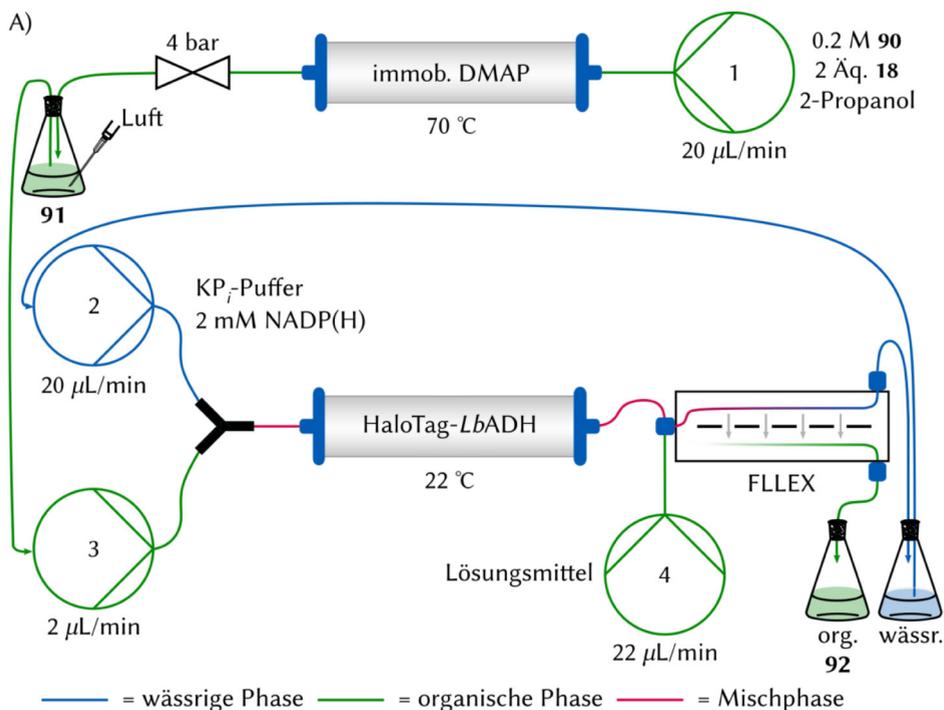
**Tabelle 11.** Screening verschiedener Reaktionsbedingungen unter der Verwendung zwei verschiedener Zwei-Enzym-Reaktoren bestehend aus HaloTag™-LbADH und HaloTag™-PhosDH. Gesammelt wurden die Proben, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden war. Die Umsätze sind als technische Triplikate mit der Standardabweichung (SD) angegeben.

Eintrag	2-MeTHF [%v/v]	NADP <sup>+</sup> [mM]	Phosphit [mM]	Temperatur [°C]	Umsatz ± SD [%]
1	5	2	30	22	40 ± 1.2
2	5	5	30	22	34 ± 2.2
3	5	5	30	30	49 ± 0.4
4	5	5	30	22	78 ± 13
5	5	2	30	30	89 ± 1.3
6	5	5	30	30	98 ± 0.6

Für die Einträge 1–3 konnte insgesamt festgestellt werden, dass lediglich die Temperaturerhöhung von 22 °C auf 30 °C in einem Umsatzplus von rund 10 % resultierte, wohingegen die Erhöhung des Kofaktors auf 5 mM sogar ein Umsatzdefizit zur Folge hatte. Dies ließ sich aber mit der Nutzungsdauer der Säule begründen und konnte mit der längeren Säule widerlegt werden: Einträge 5 und 6 zeigen, dass die Erhöhung des Kofaktors ebenfalls einen positiven Effekt auf den Umsatz hatte (89 % zu 98 %). Neben der Temperaturerhöhung und der Erhöhung der Kofaktormenge hatte hier aber letztlich die Menge der PhosDH den größten Einfluss auf den Umsatz. Generell war an dieser Stelle festzuhalten, dass es sich hierbei lediglich um eine kurze Machbarkeitsstudie handelte, bei der lediglich Trends zu erkennen waren. Hier sollte zukünftig ein *design of experiment* durchgeführt werden, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Nichtsdestotrotz zeigte das System, dass die PhosDH erfolgreich mittels HaloTag™ immobilisiert werden konnte und ebenfalls im Durchfluss dazu in der Lage ist, den Kofaktor NADPH zu regenerieren.

### 3.1.6 Morita-Baylis-Hillmann und das geschlossene System

Neben einer dem geschlossenen System nachgeschalteten Reaktion (vgl. Kapitel 3.1.4), war ebenfalls denkbar, dem System eine Reaktion vorzuschalten. Im Rahmen einer Studie in Kooperation mit Teresa Friedrichs sollte dies anhand einer Morita-Baylis-Hillman(MBH)-Reaktion gezeigt werden. Die Kombination aus Chemo- und Biokatalyse rückt dabei immer weiter in den Fokus, da so durchaus aufwendige Synthesen wichtiger Produkte unter milden und umweltfreundlichen Bedingungen zugänglich werden können.<sup>[144]</sup> Dabei sollte zuerst ausgehend von Benzaldehyd (**90**) und Methylvinylketon (MVK, **18**) das MBH-Produkt **91** im Fluss hergestellt werden (**Schema 36**, Schritt 1) und direkt in das etablierte geschlossene System zur Reduktion (**92**) eingeführt werden (**Schema 36**, Schritt 2). Der entsprechende schematische Aufbau ist in **Schema 36.A** und das Reaktionsschema in **Schema 36.B** dargestellt. Im ersten Schritt wurden 0.2 M Benzaldehyd (**90**) und 2 Äq. MVK (**18**) in 2-Propanol gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin durch Pumpe 1 bei 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  über eine 80 x 5 mm große Säule mit immobilisiertem DMAP auf Polystyrol als Organokatalysator (ca. 3 mmol/g) geleitet, wobei das MBH-Produkt **91** mit 96 % Umsatz erhalten werden konnte (Reaktionsbedingungen wurden zuvor von Teresa Friedrichs ermittelt). Die resultierende Lösung wurde aufgefangen und ein Luftstrom durch diese geleitet, um überschüssiges MVK (**18**) zu stripfen, da eine Umsetzung durch die *Lb*ADH unterbunden werden sollte. Eine Qualifikation der Effizienz des Strippings wurde jedoch nicht durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Einleitung dieser Reaktionslösung in das etablierte geschlossene System (Pumpe 2; 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) und eine Vereinigung dieser mit einer wässrigen kofaktorhaltigen Lösung (Pumpe 3; 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) wurde durch ein Y-Stück ermöglicht.



**Schema 36.A)** Flusschema der Tandemreaktion bestehend aus einer Morita-Baylis-Hilman-Reaktion im ersten Schritt und einer direkten enzymatischen Reduktion im etablierten geschlossenen System im zweiten Schritt. **36.B)** Entsprechendes Reaktionsschema der Tandemreaktion.

Die MBH-Reaktion zum Alkohol **91** (Schritt 1) wurde kontinuierlich und die anschließende enzymatische Reduktion zum Diol **92** (Schritt 2) zweifach durchgeführt

mit einem wässrigen Spülschritt zwischen beiden Läufen, um Komponenten des vorherigen Laufs aus der Säule zu spülen. Die Umsatzanalyse erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie; eine *ee*- und D.V.-Bestimmung wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht durchgeführt, da zuerst eine Umsatzoptimierung im Fokus lag. Für beide enzymatischen Reaktionen konnten lediglich niedrige Umsätze erzielt werden; während im ersten Lauf nach 120 min maximal 32 % für Schritt 2 möglich waren, die im weiteren Verlauf auf bis zu 14 % abfielen, so konnten im zweiten Lauf zu Beginn rund 10 % und nach 6 h kein Umsatz mehr verzeichnet werden.

An dieser Stelle waren mehrere Erklärungen denkbar. Einerseits könnte das MBH-Produkt **91** nicht gut von der *LbADH* toleriert worden sein, dass beispielsweise mit einer längeren und aktiveren Enzymkartusche gelöst werden könnte. Andererseits konnte noch vorhandenes MVK (**18**) ein Problem darstellen, welches entweder dazu in der Lage war, das Enzym zu inhibieren oder es wurde schneller umgesetzt, da es aufgrund der Größe das aktive Zentrum schneller erreichte. Dies wurde allerdings bis zu diesem Zeitpunkt nicht verifiziert und sollte sich dies durch weitere Studien bewahrheiten, wären Optimierungen der MBH-Reaktion hinsichtlich der Reduzierung an eingesetztes MVK (**18**) nötig. Sollte sich dies schließlich als nicht zielführend erweisen, wäre ein semikontinuierlicher Reaktionsverlauf mit Isolierung des MBH-Produkts **91** denkbar.

### 3.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die bis hier hin präsentierten Ergebnisse zeigten, dass ein System zur Regenerierung des teuren Kofaktors NADP(H) in der kontinuierlichen Durchflusssynthese entwickelt werden konnte. Die Anwendung einer Phasenseparationstechnik ermöglichte es, diesen zu rezirkulieren und somit nur einmal dem System zugeben zu müssen. Aufgrund dessen und der herausragenden Leistung der HaloTag<sup>TM</sup>-*LbADH*, waren nur substöchiometrische Mengen des Kofaktors notwendig. Es wurden vier verschiedene Ketone **16**, **25a**, **81**, **83** zu den entsprechenden Alkoholen **17**, **82**, **84**, **85** in guten bis sehr guten Raum-Zeit-Ausbeuten umgesetzt. Zusätzlich konnte der Alkohol **82** in einer kontinuierlichen Synthese über 32 h im Grammmaßstab zugänglich gemacht werden. Reaktionsläufe über 123 h waren ebenfalls erfolgreich möglich und es wurde eine der zu dem Zeitpunkt höchsten *total turnover number* für den Kofaktor NADP(H) von 12855 mol/mol erreicht. Zudem konnte ein Substratwechsel mit einer einzigen kofaktorhaltigen wässrigen Phase durchgeführt werden, wofür lediglich ein Spülschritt zwischen den verschiedenen Substraten eingebaut werden musste. Um eine Flexibilität

für vorgeschaltete oder nachgeschaltete Reaktionen zu bieten, wurden zudem verschiedene organische Lösungsmittel für die Extraktion in der FLLEX erfolgreich in 24 h-Läufen getestet.

Ein Beispiel für eine solche nachgeschaltete Folgereaktion war die Erweiterung des geschlossenen Systems um ein zweites Enzym, wie es anhand der Lipase CalB demonstriert wurde. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die organische Phase sofort in einer weiteren Reaktion umgesetzt werden kann. Acetophenon (**16**) wurde durch die HaloTag™-LbADH zu (*R*)-Phenylethanol (**17**) im geschlossenen System reduziert und anschließend durch die Lipase unter Zugabe von Vinylacetat (**86**) acetyliert. Vollständige Umsätze bezogen auf den Alkohol (**17**) zum acetylierten Produkt **87** konnten erzielt werden, sofern einerseits Vinylacetat (**86**) in großem Überschuss und andererseits zwei Trockensäulen mit 4 Å Molekularsieb eingebaut wurden. Die kontinuierliche Synthese des Produkts **87** konnte auf diese Weise über 4 h aufrechterhalten werden. Neben der Umsetzung weiterer Substrate für die Folgereaktion, wäre zukünftig die Verwendung von DMAP als Organokatalysator anstelle der Lipase denkbar. Dies hätte den Vorteil, dass die Notwendigkeit der Trockensäulen eliminiert werden könnte, da keine Rückreaktion wie beim Einsatz des Enzyms katalysiert werden würde.

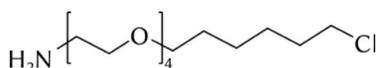
Neben einer dem geschlossenen System nachgeschalteten Reaktion, wurde ebenfalls eine vorgeschaltete Reaktion anhand einer Morita-Baylis-Hillmann-Reaktion demonstriert. Für diesen Zweck wurde die produktthaltige Lösung der MBH-Reaktion direkt in das geschlossene System zur enzymatischen Reduktion eingeführt. Der organokatalytische Schritt zum MBH-Produkt **91** konnte dabei mit hervorragenden 96 % Umsatz performt werden, während im zweiten Schritt lediglich geringe Umsätze von 10–32 % zum Diol **92** möglich waren (Tendenz über die Zeit sinkend). Hier sind weitere Studien nötig, die neben der Akzeptanz des MBH-Produkts **81** besonders den Einfluss des MVK **18** auf die LbADH herausstellen.

Eine weitere Möglichkeit für eine vorgeschaltete Reaktion wäre die Reduktion der Doppelbindung eines Michael-Systems unter Verwendung der Enreduktase YqjM, gefolgt von der bereits beschriebenen asymmetrischen Reduktion durch die HaloTag™-LbADH. Ein solche Reaktionskaskade aus YqjM und LbADH wurde bereits 2014 von Classen *et al.* in der Batchsynthese basierend auf Vorarbeiten von Korpak und Pietruszka in 2011 durchgeführt.<sup>[37, 225]</sup> Hier wäre die Implementierung der Reaktionskaskade in den Fluss unter Verwendung des geschlossenen Systems zur kontinuierlichen Kofaktor-Regenerierung denkbar. Dazu passende Studien zur Anwendung einer HaloTag™-YqjM-

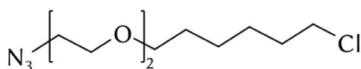
Variante wurden von Diana-A. Amariei im Rahmen eines Forschungspraktikums und von Marisa Bickmann im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt und werden in Kapitel 3.3 nochmal thematisiert.

Schließlich sollte ein weiteres Enzym, die Phosphitdehydrogenase (PhosDH) für die Kofaktor-Regenerierung etabliert werden. Dies ist besonders interessant, wenn zukünftig Enzyme verwendet werden sollen, die nicht in der Lage sind, den Kofaktor selbst zu regenerieren oder eine Intoleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln wie 2-Propanol aufweisen. Als Modellsystem wurde die HaloTag<sup>TM</sup>-PhosDH zusammen mit der HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH koimmobilisiert und im einfachen Durchfluss eingesetzt. Mit diesem Zwei-Enzym-Reaktor konnte nun das Keton **81** zum Alkohol **82** erfolgreich in 98 % Umsatz mit lediglich substöchiometrischen Mengen an NADP<sup>+</sup> und *in situ* Regenerierung zu NADPH umgesetzt werden. Für einen anschließenden Einsatz im geschlossenen System muss jedoch eine Möglichkeit gefunden werden, Phosphit permanent und in genauer Menge dem System zugeben zu können. Die Verwendung eines zusätzlichen Zuflusses durch eine weitere Pumpe wäre allerdings problematisch, da die wässrige Phase auf Dauer verdünnt werden würde, was einen Einfluss auf die Kofaktorkonzentration hätte.

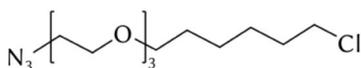
Wie bereits in Kapitel 2.2 thematisiert wurde, sollte für gewöhnlich für jedes Enzym eine eigene Immobilisierungsstrategie entwickelt werden. Auch die HaloTag<sup>TM</sup>-Immobilisierung selbst bietet noch Spielraum für Anpassungen an verschiedene Enzyme. So könnte zum Beispiel der HaloTag<sup>TM</sup>-Ligand zwischen dem HaloTag<sup>TM</sup> und dem Enzym der Wahl in der Kettenlänge modifiziert werden. Dazu konnten im Rahmen einer Bachelorarbeit von Stella M. Pauls verschiedene glykolbasierte Reaktivlinker zugänglich gemacht werden, wie in der folgenden **Abbildung 30** dargestellt.<sup>[3]</sup>



93, 4 %, 6 Schritte



94, 50 %, 2 Schritte



95, 40 %, 2 Schritte

**Abbildung 30.** Übersicht der verschiedenen hergestellten glykolbasierten Reaktivlinker von Stella Pauls.<sup>[3]</sup> Dabei ist der Linker **93** für die Knüpfung an Festphasen mit zum Beispiel Epoxiden gedacht. Die Linker **94** und **95** werden hingegen via CuAAC an Festphasen mit Dreifachbindungen geknüpft.

Auf diese Weise werden zwei Strategien zur Bindung an eine Festphase möglich - einerseits via Aminogruppe (Linker **93**) an z.B. Epoxide oder mittels eines Azids via Kupfer-Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC, Linker **94** und **95**) an freie Dreifachbindungen. Die erste Strategie ist dabei jedoch bereits durch den Hersteller u.a. des HaloLink™-Resins Promega bekannt und dementsprechend sollte der Fokus auf der Anwendung der Azid-Linker **94** und **95** liegen. Besonders der minimierte Syntheseaufwand ist hierbei anzuführen, da die beiden Azidlinker **94** und **95** in lediglich zwei Stufen zugänglich gemacht werden konnten. Der aminbasierte Linker **93** (oder auch Derivate mit anderer Kettenlänge) benötigten hingegen sechs Stufen.

**Synopsis: Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Flusssynthese**

- I. Die Entwicklung eines Systems zur kontinuierlichen Kofaktor-Regenerierung im Durchfluss konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Dabei kam die HaloTag™-LbADH für die asymmetrische Reduktion der Ketone **16**, **25a**, **81**, **83** zum Einsatz.
- II. Das System performte in Dauerläufen bis zu 32 h problemlos und generierte sehr gute Raum-Zeit-Ausbeuten bis zu  $121 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sowie eine *TTN* für  $\text{NADP}^+$  von  $12855 \text{ mol/mol}$ .
- III. Ein Substratwechsel unter der Verwendung einer einzigen kofaktorhaltigen wässrigen Lösung ist möglich gewesen ohne Substrat- oder Produktkontamination der vorangegangenen Synthese.
- IV. Die Implementierung einer enzymatischen Folgereaktion als auch einer organokatalytischen vorgeschalteten Reaktion waren ebenfalls möglich und erfolgreich.

## 3.2 *Catalytically active inclusion bodies (CatIBs)*

### 3.2.1 Einleitung

Nachdem bis zu diesem Punkt mit dem HaloTag™ eine Immobilisierungsstrategie verwendet wurde, die einerseits die Bildung eines Fusionsproteins und andererseits die Verwendung einer teuren Festphase voraussetzt, sollte mit den *catalytically active inclusion bodies* (im Folgenden CatIBs) nun eine weitere innovative Methode vorgestellt und in der kontinuierlichen Durchflusssynthese mit Kofaktor-Regenerierung angewendet werden.<sup>[226]</sup> Der generelle Einsatz von CatIBs im Fluss war bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur nicht bekannt. Der Fokus wurde dabei auf CatIBs der Alkoholdehydrogenase RADH aus *Ralstonia species* gelegt.

### 3.2.2 Kenntnisstand

Bei den *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) handelt es sich um Bionanomaterialien oder Protein-Immobilisate, die durch heterologe Expression in Bakterien hergestellt werden.<sup>[227]</sup> Im Vergleich zu anderen Methoden wird keine zusätzliches Trägermaterial benötigt (vgl. Kapitel 2.2.1), was einerseits Kosten, andererseits auch zeitintensive Optimierungsstudien spart.<sup>[24, 228]</sup> Allerdings sind nicht alle *inclusion bodies* auch katalytisch aktiv und lange Zeit ging man davon aus, dass solche *inclusion bodies* nur inaktives Protein beinhalten, die bei der Überexpression rekombinanter Gene entstehen.<sup>[229, 230]</sup> Dementsprechend wurden sie gewöhnlich nur für Studien zur Enzymfaltung und nicht für Laborsynthesen eingesetzt. Neue Studien belegten jedoch, dass es sich um ein Gleichgewicht zwischen falsch gefaltetem inaktivem und korrekt gefaltetem katalytisch aktivem Protein handeln muss, das z.B. durch angepasste Kultivierung und Induktion gezielt beeinflusst werden kann.<sup>[2, 231]</sup> Aber auch die Wahl gezielter Modifikationen auf molekularer Ebene am N- oder C-Terminus ist essenziell, um CatIBs zu produzieren.<sup>[2]</sup> Dazu zählen beispielsweise:

1. Dimeres 3-HAMP *coiled-coil* (abgeleitet vom Sauerstoffsensorprotein Aer2 aus *Pseudomonas aeruginosa*) und tetrameres TdoT *coiled-coil* (Tetramerisierungsdomäne des Zelloberflächenproteins Tetrabrachio aus *Staphylothermus marinus*)<sup>[227, 230, 232-235]</sup>
2. Aggregationsanfällige Domänen/Proteine<sup>[236-240]</sup>
3. synthetische Peptide als sogenannte „pull-down“-tags<sup>[235, 241-243]</sup>

2019 wurde von *Jäger et al.* eine umfassende Studie zur Bildung von enzymatischen CatIBs veröffentlicht.<sup>[230]</sup> Dabei kamen unter anderem zwei Alkoholdehydrogenasen *LbADH* und *RADH* sowie die Thiamin-Diphosphat (ThDP)-abhängige Benzaldehydlyase *PfBAL* aus *Pseudomonas fluorescense* zum Einsatz. In dieser Studie wurden neben TdoT-Konstrukten auch 3HAMP-Konstrukte in Bezug auf folgende Punkte miteinander verglichen:

1. die Bildungseffizienz der CatIBs als Aktivität der unlöslichen IB-haltigen Pelletfraktion (oder Fluoreszenz bei Fluoreszenzproteinen) im Verhältnis zur Aktivität des Zellrohextrakts nach der Zellyse (entspricht 100 %)
2. die Ausbeute der CatIBs (g<sub>Lyophilisat</sub> pro 100 g *E. coli*-Nasszellen)
3. Restaktivität im Vergleich zum gelösten reinen Enzym

Sowohl TdoT-*RADH* als auch TdoT-*PfBAL* wurden mit einer Effizienz >80 % gebildet; behielten dabei jedoch nur eine sehr geringe Restaktivität von 1-2 % im Vergleich zum isolierten, gereinigten Protein. Im Vergleich dazu konnte unter Verwendung der 3HAMP-Domäne für die beiden Enzyme eine Bildungseffizienz von ca. 75 % erzielt werden und die Autoren betonten an dieser Stelle, dass mit Blick auf  $k_{cat}$  und der Restaktivität eine 6- und 18-fache Steigerung für 3HAMP-*RADH* und 3HAMP-*PfBAL* erreicht wurde. Besonders auffällig im Rahmen der Studie waren hergestellte Konstrukte der *LbADH*. Während die Tdot-Variante lediglich mit einer Effizienz von ca. 5 % bei einer Restaktivität von ca. 6 % gebildet wurde, konnte unter Verwendung der 3HAMP-Domäne mit rund 50 % Bildungseffizienz (allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung) und einer Restaktivität von 10 % eine Verbesserung erzielt werden.

Allgemein wurde festgestellt, dass die Bildungseffizienz abhängig vom Enzym war und im Speziellen von der für Lösungsmittel zugänglichen hydrophoben Oberfläche.<sup>[230]</sup> Die Verwendung der TdoT-Domäne resultierte in einer höheren Bildungseffizienz und Reinheit der CatIBs, wohingegen im Kontrast dazu Enzyme mit der 3HAMP-Domäne eine höhere Restaktivität besaßen.<sup>[230]</sup> Mögliche Begründungen für die höhere Aktivität der 3HAMP-Konstrukte war der höhere Lipidgehalt und die weniger dicht-gepackte Struktur im Vergleich zu den TdoT-Pendants.<sup>[227]</sup>

In einer neuen Studie der Gruppe um Krauss wurde speziell die CatIBs-Bildung der *RADH* aufgegriffen. Bei dem Enzym handelt es sich um eine sehr große tetramere Struktur, weshalb es möglicherweise kontraproduktiv gewesen war, eine große *coiled coil*-Domäne als Aggregation-induzierenden Tag zu verwenden. Diese wurde nun gegen

kleine ca. 8 kDa große synthetische Peptide als „pull-down“-tags substituiert, die über z.B. PT-Linker (PTPPTTPPTPTPTPTP) an den jeweiligen Terminus des Proteins gebunden wurden. Die Autoren fokussierten sich in diesem Fall auf die Verwendung von GFIL8, 18AWT und L6KD. Bei 18AWT handelte es sich dabei um ein *alpha*-helikales Octadecapeptid 18A (EWLKAFYEKVLKELKELF), bei L6KD (LLLLLLKD) um ein Tensid-ähnliches und bei GFIL8 (GFILGFIL) um ein vollständig hydrophobes Peptid.<sup>[241-243]</sup> Die auf diese Weise gebildeten Konstrukte stellten sich dabei als beste Konstrukte bezogen auf die Bildungseffizienz heraus.

1. GFIL8 am N-Terminus mit 76 %
2. 18AWT am C-Terminus mit 71 %
3. L6KD am C-Terminus mit 66 %
4. L6KD am N-Terminus mit 58 %
5. GFIL8 am N-Terminus mit 16 %

Gemäß der oben genannten Definition, bedeutete z.B. Punkt 1 also, dass das Fusionsprotein mit GFIL8 am N-Terminus, was der unlöslichen IB-haltigen Pelletfraktion entsprach, eine Restaktivität von 76 % im Verhältnis zum Zellextrakt nach der Zellyse besaß. Für die weitere Charakterisierung wurde die Restaktivität bezogen auf das isolierte reine Protein (entspricht 100 %) bestimmt und dabei konnten besonders für N-terminale GFIL8 und L6KD-Varianten eine Aktivität von 18 % bzw. 17 % erreicht werden, was im Vergleich zu den vorherigen *coiled-coil* Domänen eine Verbesserung darstellte. Dies ging Hand in Hand mit einer ebenfalls hohen Biomassen-spezifischen Aktivität von ca. 30 U/g Nasszellen. Im Vergleich dazu lagen die anderen verwendeten Tags bei lediglich <10 U/g Nasszellen. Zusätzlich spielte auch die CatIB-Stabilität eine entscheidende Rolle. Für die N-terminalen Konstrukte waren nach fünf Tagen Inkubationszeit immer noch 87–96 % der Aktivität vorhanden; angeführt vom GFIL8-Tag, wohingegen das lösliche Enzym dabei auf eine Aktivität von nur noch 31 % zurückfiel. Die C-terminalen Varianten waren dabei signifikant schlechter, lediglich die TdoT-Variante konnte nach fünf Tagen noch eine Restaktivität von 45 % aufweisen.

### 3.2.3 Zielsetzung

Da sich schließlich das RADH-Konstrukt mit dem N-terminalen GFIL8 als beste Option herausstellte, wurde dieses im Rahmen der vorliegenden Arbeit im ersten Schritt für den Einsatz in der Flusssynthese vorbereitet. Der Dank geht an dieser Stelle an Gizem Ölçucu

für die Bereitstellung der CatIBs. Dazu sollten zuerst eine geeignete Immobilisierungsmethode entwickelt und im weiteren Verlauf die CatIBs im Fluss eingesetzt werden. Für diesen Zweck sollten die etablierten Systeme (siehe Kapitel 3, einfacher Durchfluss und geschlossenes System) unter der Verwendung von 2-Propanol als Kosubstrat zum Einsatz kommen. Anschließend sollte ein kombiniertes Zwei-Enzym-System angewendet werden, um die im Vergleich zur *LbADH* weniger aktive *RADH* (in CatIBs) bzgl. der Kofaktor-Regenerierung zu unterstützen und somit höhere Umsätze zu ermöglichen. Die dabei auftretenden Problematiken sollten herausgearbeitet und soweit möglich, eine Lösungsstrategie präsentiert werden. Einige Ergebnisse wurden bereits publiziert.<sup>[2]</sup>

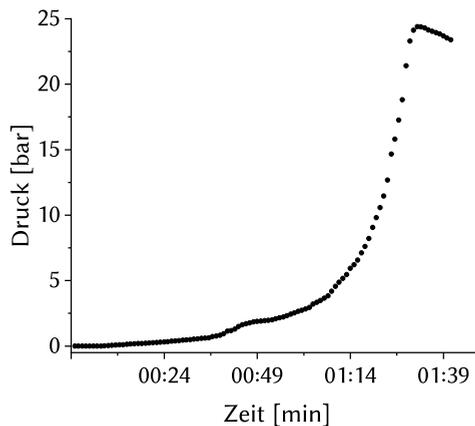
### 3.2.4 Immobilisierung

Die Verwendung von *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) in der Flusssynthese brachte eine entscheidende Hürde mit sich - die Größe dieser kleinen Aggregate. Aufgrund dessen können sie einerseits aus Reaktoren ausgewaschen werden, was die Gesamtaktivität des Enzymreaktors minimiert, andererseits können sie für einen hohen Systemdruck sorgen, was unter Umständen zum Abbruch des Laufs führt. Daher musste eine geeignete Methode entwickelt werden, um dieses Bionanomaterial<sup>[227]</sup> in z.B. eine Omnifitsäule packen zu können. Die Idee und das Ziel waren nun, solche Aggregate physikalisch durch die Verwendung eines Füllmaterials in einer Säule zu fixieren, ohne dabei die Enzymaktivität durch z.B. extreme pH-Schwankungen zu beeinflussen. Zudem sollte das verwendete Material einfach zugänglich und kostengünstig sein. Die Verwendung von Kieselgel lag hier nahe, da dieses schon seit vielen Jahren für die Immobilisierung von Enzymen verwendet wird und als enzymverträglich gilt.<sup>[244, 245]</sup> Als Füllstrategie sollte das „Sandwich-Prinzip“ angewendet werden und die folgende, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode erwies sich als zielführend:

1. Einfüllen von etwas Kieselgel, um den Boden der Säule zu bedecken.
2. Spülen mit Puffer (50 mM TEA, pH=7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) von der Seite, über die das Kieselgel eingeführt wurde, um die Lage zu verdichten und so ein Herausspülen der CatIBs zu vermeiden.
3. Hinzufügen der CatIBs und Wiederholung des Spül- bzw. Verdichtungsschritts (siehe Punkt 2).

4. Auffüllen der Säule mit Kieselgel und erneute Wiederholung des Spülschritts. Die Füllhöhe des Kieselgels in diesem Schritt ist dabei etwas höher als die Tiefe des Stempels des Deckels, damit schließlich eine leichte Kompression durchgeführt wird, um so ebenfalls ein Auswaschen zu verhindern.

Jedoch war diese Vorgehensweise für die Verwendung von ausschließlich CatIBs nicht zielführend, da es bereits bei der o.g. Füllprozedur zu einer erheblichen Steigerung des Gegendrucks kam. Um dies zu quantifizieren, wurde anschließend der Systemdruck bei 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  mittels Asia Manager Software verfolgt und in der folgenden **Abbildung 31** dargestellt. Dabei ist der zeitliche Verlauf auf der Abszisse und der Systemdruck auf der Ordinate dargestellt:



**Abbildung 31.** Der Druckverlauf des Systems wurde mittels Asia Manager Software verfolgt. Der Peak bei 1:30 min indiziert den Systemabbruch, da bei einem Druck von 25 bar die Sicherheitsschaltung der Pumpen eingreift.

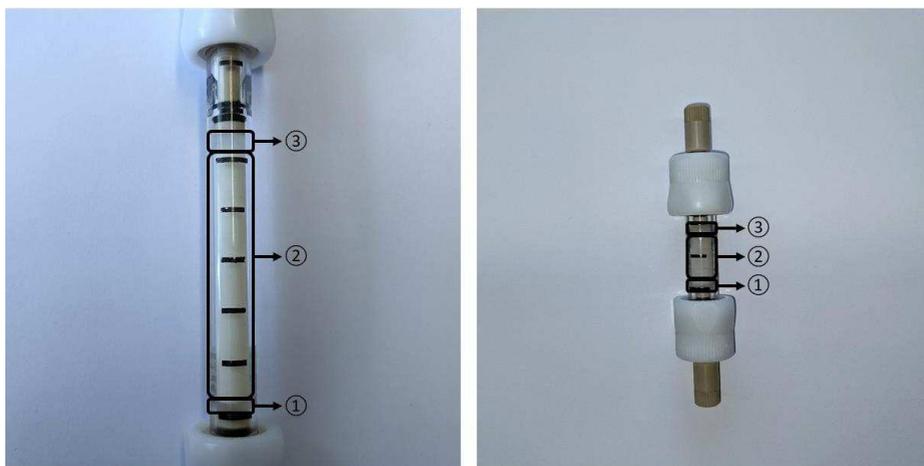
Bereits nach einer Minute konnte ein Anstieg des Drucks verzeichnet werden und nach ca. 1:30 min kam es zum Abbruch des Systems, da der durch die Sicherheitsschaltung der Pumpen vorgegebene maximale Systemdruck von 25 bar erreicht wurde. Somit war ein Einsatz dieser Säule in der Flusssynthese nicht möglich. Da als Hauptproblem die Größe der CatIBs vermutet wurde, wurde Punkt 3 der Füllmethode / Teil ② der Säulen angepasst (vgl. **Abbildung 32**) - die CatIBs wurden nun vorher mit Kieselgel im Verhältnis von 1:2–1:2,5 %m/m (CatIBs:Kieselgel) gemischt. Bereits bei den zur vorherigen Vorgehensweise analogen Spülversuchen konnte kein signifikanter Gegendruck mehr festgestellt werden und auch das Verwenden der Pumpen

funktionierte auf Antrieb ohne Komplikationen hinsichtlich des Gegendrucks. Für den weiteren Verlauf wurden auf diese Weise mehrere Säulen unterschiedlicher Größe und Gesamtaktivität gepackt. Entsprechende Füllparameter und die Gesamtaktivitäten der Säulen sind in der folgenden **Tabelle 12** gezeigt:

**Tabelle 12.** Spezifische Parameter (z.B. Kieselgelmenge, Gesamtaktivität und CatIB-Menge) der verwendeten Enzymreaktoren. Dabei besteht ein direkter Bezug zu **Abbildung 32**.

Parameter	5 x 150 mm (links)	5 x 50 mm (rechts)
Höhe des Reaktorbetts ①–③	5.6 cm	2.2 cm
Kieselgelbett Höhe → ①	2 mm	2 mm
Menge an CatIBs → ②	137 mg (30 U)	55 mg (12 U)
Menge an Kieselgel → ②	343 mg	138 mg
Höhe der CatIB/Kieselgel-Mixtur → ②	5 cm	1.9 cm
Kieselgelbetthöhe → ③	4 mm	2 mm

Die Menge an Kieselgel oberhalb und unterhalb der CatIB-Mischung kann je nach Bedarf variiert werden, sollte aber mindestens 2 mm betragen. Mögliche fertige Säulen sind in **Abbildung 32** dargestellt. Dabei entspricht ① der ersten Kieselgel-Lage, ② der CatIB oder im folgenden auch CatIB-Kieselgel-Mixtur und ③ der abschließenden Kieselgel-Lage.



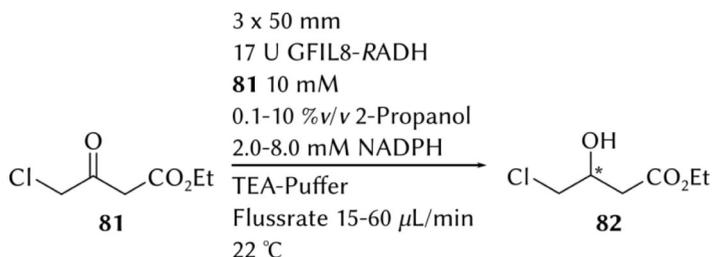
**Abbildung 32.** Darstellung zwei verwendeter Enzymreaktoren. Linke Abbildung: 5 x 150 mm Omnit-Säule, die mit 165 mg (36 U) GFIL8-CatIBs befüllt wurde. Einsatz: kontinuierliche und präparative Synthese. Rechte Abbildung: 5 x 50 mm Omnit-Säule, befüllt mit 55 mg (12 U) GFIL8-CatIBs. Einsatz: Studien zur Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen. ① Kieselgel, ② CatIB/Kieselgel-Mixtur, ③ Kieselgel.

Für die ersten Studien in der Flusssynthese wurde jedoch die kleinere Säule (**Abbildung 32**, rechte Säule, 5 x 50 mm) verwendet. Die größere Säule (**Abbildung 32**, linke Säule, 5 x 150 mm) wurde später für die kontinuierliche, semi-präparative Synthese genutzt (siehe Kapitel 3.2.9).

### 3.2.5 RADH-CatIBs im einfachen Durchfluss

Da nun eine Möglichkeit gefunden wurde, den Enzymreaktor mit dem Bionanomaterial zu befüllen, konnte sich der Nutzung im Fluss angenommen werden, da dies der Literatur zur Folge noch nicht durchgeführt wurde. Als Hauptziel stand, wie schon bei der HaloTag™-LbADH (vgl. Kapitel 3), die Verwendung im geschlossenen System mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung im Vordergrund (vgl. Kapitel 3.1.3).

In einer ersten Studie wurde das Keton **81** eingesetzt, da es sich im Rahmen der Studien zur LbADH als gutes Substrat erwies. Die Reaktionsgleichung sowie -bedingungen sind im folgenden **Schema 37** gezeigt:



**Schema 37.** Reaktionsbedingungen der Umsetzung des Ketons **81** zum Alkohol **82** durch RADH-CatIBs im einfachen Durchfluss. Dabei wurde die Menge an Kosubstrat 2-Propanol und Kofaktor NADPH variiert. Zudem wurden die Experimente in einem Flussratenbereich von 15–60  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. TEA-Puffer: 50 mM, pH 7.5, 0.8 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Das Substrat **81** wurde erst im einfachen Durchfluss (Aufbau vgl. **Schema 22**) eingesetzt und des Weiteren wurden die Flussrate als auch die Menge des Kosubstrats 2-Propanol variiert, um einen möglichen Einfluss auf die Enzymaktivität zu ermitteln. Zusätzlich wurde zu Beginn der reduzierte Kofaktor NADPH verwendet (zuvor  $\text{NADP}^+$ ), um die erste Umsetzung zu beschleunigen, da dieser nicht zuerst reduziert werden musste, denn die verwendete RADH-Säule hatte lediglich eine Gesamtaktivität von ca. 17 U. Die Umsatz- und *ee*-Bestimmung erfolgte gaschromatographisch und die Ergebnisse des Screenings sind in **Tabelle 13** gezeigt.

Die Versuche 1–5 wurden mit einer Kofaktor-Konzentration von 2 mM durchgeführt, sodass bei einer Substratkonzentration von 10 mM ein maximaler Umsatz von 20 %

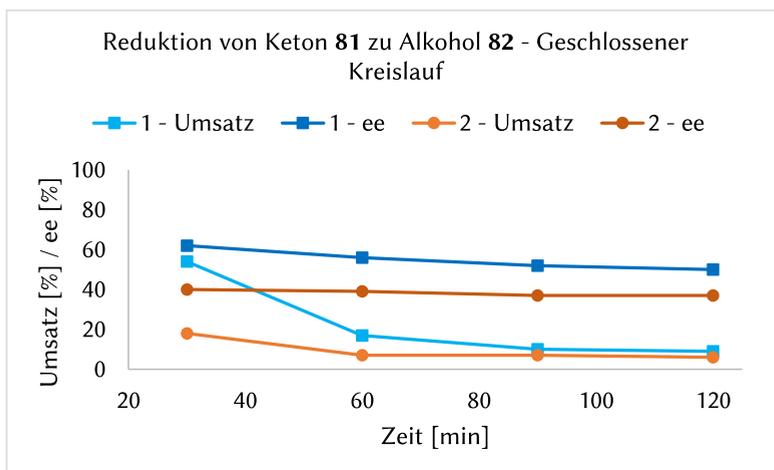
möglich war - sofern der Kofaktor nicht regeneriert wurde. Dabei sollte zuerst die generelle Leistung des Systems überprüft werden, ohne größere Mengen des teuren Kofaktors zu verwenden. Auf den Umsatz hatten weder die getesteten Flussraten noch die Menge an 2-Propanol einen signifikanten Einfluss, denn dieser stagnierte zwischen 30 und 35 %. Schließlich wurde die NADPH-Konzentration auf 8 mM sowie die 2-Propanolkonzentration auf 10 %v/v angehoben und mit 91 %, respektive 94 % konnte unter diesen Bedingungen nahezu vollständiger Umsatz erzielt werden; allerdings war der *ee* mit max. 58 % nicht zufriedenstellend.

**Tabelle 13.** Screening von Reaktionsbedingungen der Reduktion des Substrats **81** zum Alkohol **82**.

Eintrag	Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	NADPH [mM]	2-Propanol [%v/v]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]
1	30	2	0.1	29	23
2	15	2	1	33	35
3	30	2	1	34	37
4	30	2	5	37	55
5	60	2	5	32	46
6	30	8	5	91	n.b.
7	30	8	10	94	58

Bereits an dieser Stelle wurde deutlich, dass das Keton **81** kein ideales Substrat für die RADH war, da einerseits keine guten *ee* erreicht werden konnten und andererseits nur (fast) stöchiometrische Mengen an Kofaktor einen hohen Umsatz ermöglichten. Dennoch wurde es testweise im geschlossenen Kreislauf eingesetzt und der Aufbau wurde bereits in Kapitel 3.1.3.1 erläutert und in **Schema 25** dargestellt.

Die Bedingungen waren identisch zum einfachen Durchfluss, wobei nun der Kofaktor zu Beginn äquimolar eingesetzt wurde, um auszuschließen, dass eine zu geringe Konzentration für einen niedrigen Umsatz verantwortlich wäre. Die Flussratenkombination betrug 3/27/30  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Pumpe 1, 2, 3) und die Produktsammlung erfolgte über 120 min mit Probenahme in 30 min-Abständen. Die Umsätze sowie *ee* sind in der folgenden **Abbildung 33** dargestellt. Blau stellt hierbei den ersten Versuch und orange den zweiten Versuch dar. Im ersten Lauf konnte zu Beginn ein Umsatz von 53 % erzielt werden. Dieser fiel danach allerdings auf ca. 20 % ab, da vermutlich der Kofaktor verbraucht war und unzureichend regeneriert wurde. Der *ee* stagnierte hingegen bei ca. 60% und war somit vergleichbar zum einfachen Durchfluss (vgl. **Tabelle 13**). Im zweiten Lauf konnte das Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden.



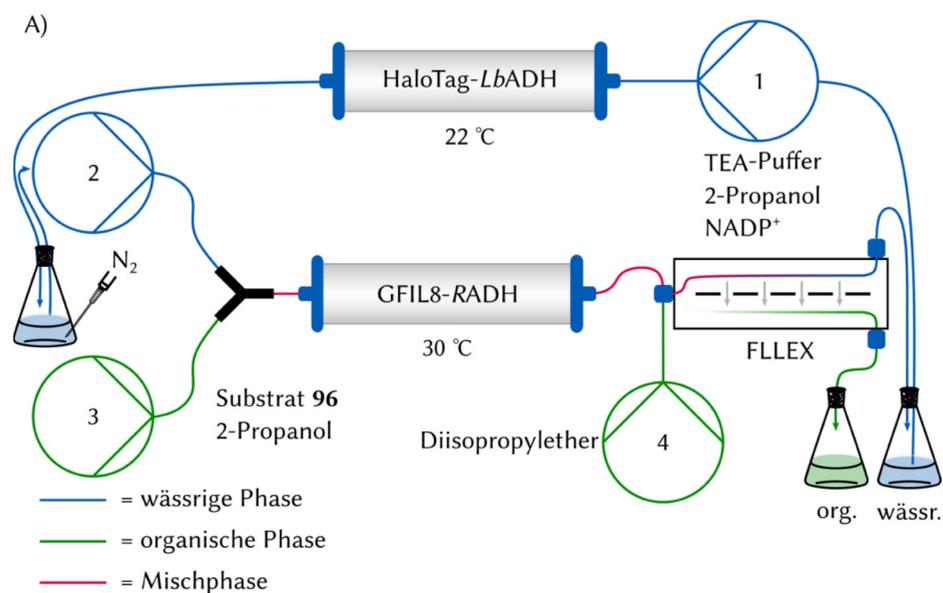
**Abbildung 33.** Zwei Läufe im geschlossenen Kreislauf unter der Verwendung des Ketons **76**. Pumpe 1: 100 mM 4-Chloracetessigsäureethylester (**81**) in 2-Propanol (entspricht 10 mM im Reaktor bei idealer Mischung); Pumpe 2: 2 mL einer 1 mM NADPH-Lösung in TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>); Pumpe 3: Diisopropylether.

Da eine mögliche Begründung die zu niedrige Gesamtaktivität war, um zusätzlich zur Substratreduktion die Kofaktor-Regenerierung durchzuführen, wurde nun ein kombiniertes System mit der HaloTag™-LbADH getestet. Die Funktionsweise des Systems, entsprechende Ergebnisse sowie aufgetretene Probleme sind im folgenden Kapitel erläutert.

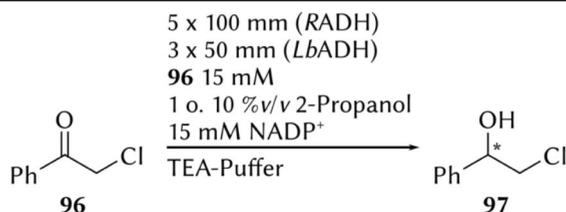
### 3.2.6 RADH-CatIBs und HaloTag™-LbADH im kombinierten System

Die HaloTag™-LbADH performte im Rahmen vorangegangener Studien bereits sehr zuverlässig über einen langen Zeitraum (siehe Kapitel 3.1.3). Aus diesem Grund sollte sie in einem kombinierten System mit den RADH-CatIBs eingesetzt werden. Die Voraussetzung war allerdings eine räumliche Trennung, da die LbADH nur für das Kofaktor-Recycling genutzt werden sollte, wohingegen eine gemischte Säule nicht zielführend gewesen wäre, da die LbADH Ketone ebenfalls umsetzt und die beiden Enzyme enantiokomplementär zueinander sind. Aufgrund der Verwendung zweier Enzyme wurde das System deutlich komplexer und eine reibungslose Phasentrennung durch die FLLEX war hier absolut notwendig, da das Substrat ansonsten partiell in die wässrige Phase extrahiert werden würde und eine Umsetzung durch die LbADH stattfindet. Der Aufbau des kombinierten Systems ist in **Schema 38.A** dargestellt. Das kombinierte System bestand aus vier Pumpen. Drei Pumpen (hier Pumpen 2–4) waren äquivalent zum bekannten geschlossenen Kreislauf (siehe Kapitel 3.1.3) und in diesem

Fall wurde das System um Pumpe 1 erweitert. Sie pumpt eine Lösung bestehend aus 15 mM NADP<sup>+</sup> in TEA-Puffer und 1 %v/v 2-Propanol über die HaloTag™-LbADH-Säule, um den Kofaktor zu NADPH zu reduzieren. Die resultierende Lösung wurde aufgefangen und durch einen N<sub>2</sub>-Strom sollte entstandenes Aceton ausgegast werden, um die Konzentration an organischen Bestandteilen, die die RADH inaktivieren könnten, so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde sie durch Pumpe 2 dem „RADH-System“ zugeführt. Pumpe 3 war mit Pumpe 2 durch ein Y-Stück verbunden und stellte ω-Chloracetophenon (**92**) in 2-Propanol bereit. Die Wahl fiel nun auf dieses Keton **92**, da es der Literatur zur Folge durch die RADH mit einer hohen relativen Reaktionsrate zum Alkohol **93** mit exzellenten Enantioselektivität >99 % umgesetzt wurde.<sup>[151]</sup> Das entsprechende Reaktionsschema ist in **Schema 38.B** dargestellt.



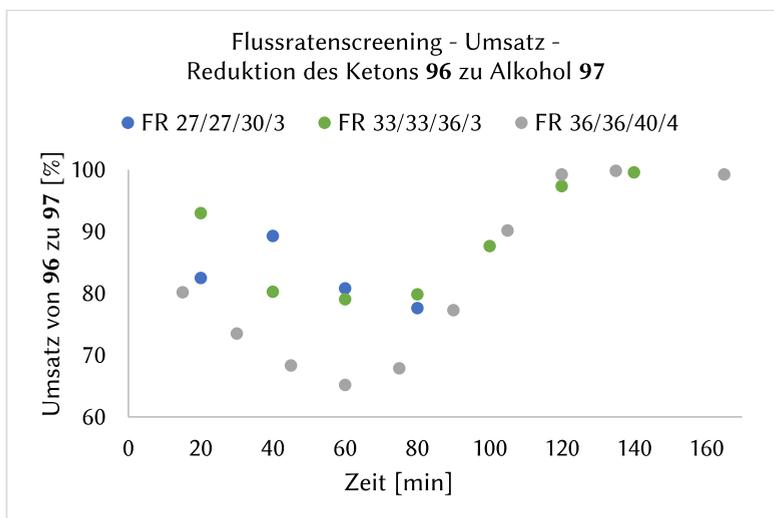
B)



**Schema 38.A)** Kombiniertes System unter der Verwendung der RADH-CatIBs (12 U) und der HaloTag™-LbADH (270 U) basierend auf dem geschlossenen Kreislauf. **38.B)** Reaktionsschema der Reduktion des Ketons **96** zum Alkohol **97** durch die RADH-CatIBs. TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>).

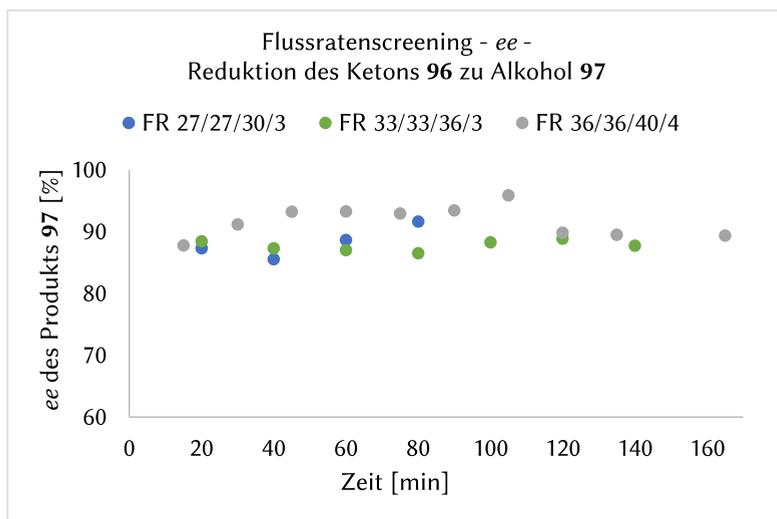
Zu Beginn wurde ein Flussratenscreening mit folgenden Flussratenkombinationen durchgeführt (Pumpe 1/2/3/4  $\mu\text{L}/\text{min}$ ): 27/27/3/30, 33/33/3/36 und 36/36/4/40. Allerdings ist hier anzumerken, dass für die erste Flussraten-Kombination aufgrund eines Systemfehlers (Ausfallen der FLLEX) lediglich vier Messpunkte vorhanden waren.

In **Abbildung 34** sind die Umsätze zum Alkohol **97** dargestellt und die angegebenen Zeiten entsprachen der Produktsammlung, nachdem das Totvolumen durchlaufen wurde. Die Enantiomerenüberschüsse sind in **Abbildung 35** gezeigt und eine Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Gaschromatographie.



**Abbildung 34.** Umsätze des Flussratenscreenings im kombinierten System unter Verwendung des Ketons **96**. Flussraten (FR) sind angegeben für Pumpe 1/2/3/4 (vgl. **Schema 38**). Die Umsatzbestimmung erfolgte gaschromatographisch an chiraler stationärer Phase.

Die Umsätze variierten deutlich voneinander und es fiel auf, dass es zu einer *lag*-Phase kam. Der Umsatz startete zuerst auf hohem Niveau, sank dann um bis zu 15 % nach 60 min und stieg anschließend wieder auf nahezu vollständigen Umsatz nach 115 min. Für letztere Kombination blieb dieser dann auch bis zu 165 min konstant. Die Enantiomerenüberschüsse lagen bei rund 90 % und waren damit im Vergleich zur Literatur (99 %<sup>[154]</sup>) nicht zufriedenstellend.

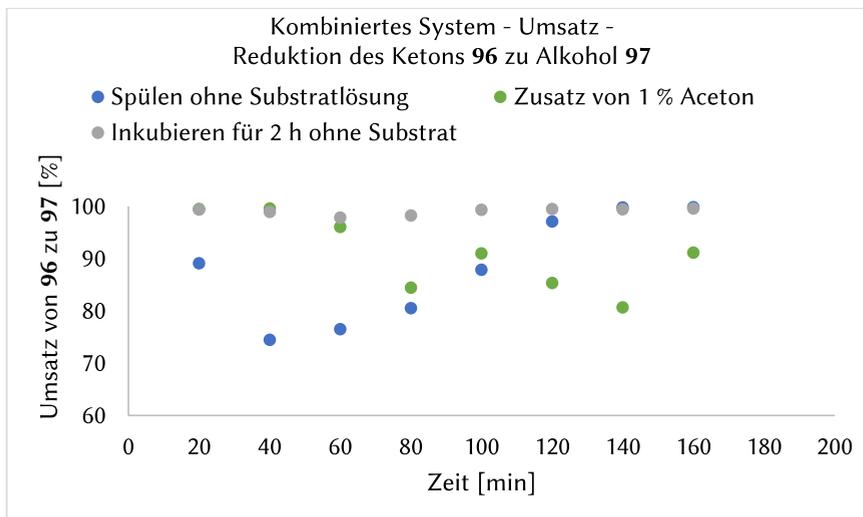


**Abbildung 35.** Zugehörige Enantiomenüberschüsse des Flussratenscreenings. Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 34. Flussraten (FR) sind angegeben für Pumpe 1–4. Der Enantiomenüberschuss wurde gaschromatographisch an chiraler stationärer Phase bestimmt.

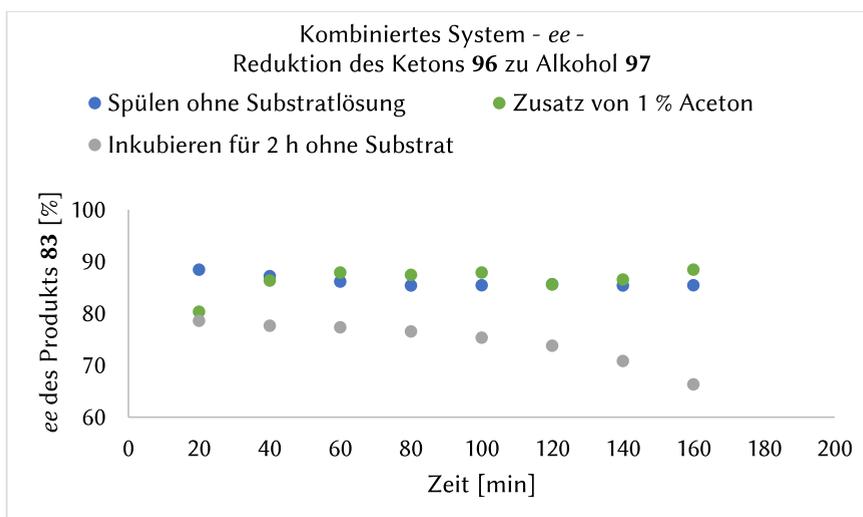
Im nächsten Schritt lag der Fokus zuerst auf der Eliminierung der *lag*-Phase. Dabei wurden verschiedene Reaktionsbedingungen des neuen, geschlossenen kombinierten Systems getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 36** (Umsatz) und **Abbildung 37** (*ee*) illustriert. Vorab eine kurze Erläuterung zu der Vorgehensweise:

Zu Beginn wurde das System ohne die substrathaltige Lösung (Pumpe 3) für 30 min gespült (siehe blaue Kurve), da auf diese Weise eine NADPH-Sättigung im CatIB-Reaktor erzielt werden sollte. Allerdings konnte auf diese Weise keine Verbesserung der *lag*-Phase festgestellt werden. Als nächstes wurde dieser Lösung 1 %v/v Aceton zugegeben (siehe grüne Messpunkte), um von Beginn an dem realen System näher zu kommen, da bei nicht vollständigem Entgasen durch das N<sub>2</sub> mit der Zeit Aceton in der Lösung von Pumpe 2 akkumulierte. Allerdings war die *lag*-Phase hier ebenfalls vorhanden, jedoch mit zu Beginn vollständigem Umsatz. Dies könnte jedoch daran liegen, dass der Spülvorgang nach dem vorherigen Experiment nicht erfolgreich gewesen war und somit ein Teil des Substrats bis zur vollständigen Umsetzung auf der Säule verweilte. Da diese *lag*-Phase unabhängig von der gewählten Flussraten-Kombination rund 2 h andauerte, wurde das System nun für diesen Zeitraum mit allen Komponenten außer dem Substrat gespült (in Grau). In der Tat war auf diesem Wege keine *lag*-Phase mehr zu sehen und der Umsatz blieb für 160 min nahezu konstant vollständig. Auffällig war hierbei jedoch der Einbruch des *ee* auf 70 % und fallend, was an einer nicht idealen Phasentrennung

liegen könnte, da so eine Umsetzung durch die enantiokomplementäre *LbADH* ermöglicht wurde.



**Abbildung 36.** Umsätze der Durchläufe im kombinierten System unter der Verwendung des Ketons **96**. Blaue Kurve: Das System wurde ohne substrathaltige Lösung (Pumpe 3) für 30 min gespült. Grün: Zugabe von 1%v/v Aceton zur substrathaltigen Lösung (Pumpe 3). Grau: Inkubieren des System mit allen Komponenten außer dem Substrat **96**. Weitere Parameter sind bereits in **Abbildung 34** beschrieben. Die Umsatzbestimmung erfolgte gaschromatographisch an chiraler stationärer Phase.



**Abbildung 37.** Zugehörige Enantiomerenüberschüsse. Reaktionsbedingungen siehe **Abbildung 34** und **Abbildung 36**. Der Enantiomerenüberschuss wurde gaschromatographisch an chiraler stationärer Phase bestimmt.

Obwohl die Studie hinsichtlich des *ee* keine mit der Literatur vergleichbaren Ergebnisse erzielte und auch die Verwendung des geschlossenen Systems generell mit der RADH problematisch erschien, sollte dennoch mit den besten Bedingungen ein Langzeitversuch durchgeführt werden. Allerdings traten ab diesem Zeitpunkt Probleme auf, die nicht gelöst werden konnten. Beim Zusammentreffen der wässrigen und organischen Lösungen (Pumpen 2 und 3) begann das Substrat **96** auszukristallisieren, was für einen direkten Druckanstieg und Ausfall der Pumpen sorgte. Verschiedene Salzkonzentrationen des Puffers, andere Flussraten und Substratkonzentrationen, zusätzliche Lösungsmittel, aber auch neue und größere Schläuche konnten dieses Problem nicht beheben.

An dieser Stelle musste leider festgestellt werden, dass jegliche Lösungsansätze, sowohl für die Reaktionsbedingungen als auch für den Systemaufbau, nicht erfolgreich verliefen. Zudem war der Systemaufbau ohnehin nicht ideal, da zwei verschiedene Immobilisierungstechniken angewendet und zueinander enantiokomplementäre Enzyme eingesetzt wurden. Schließlich sollte eine letzte Studie durchgeführt werden, in der 2-Propanol für die Kofaktor-Regenerierung durch Cyclohexanol ersetzt wurde, da bekannt ist, dass die RADH Substrate mit zwei großen Substituenten sehr gut tolerierte.<sup>[151, 152]</sup>

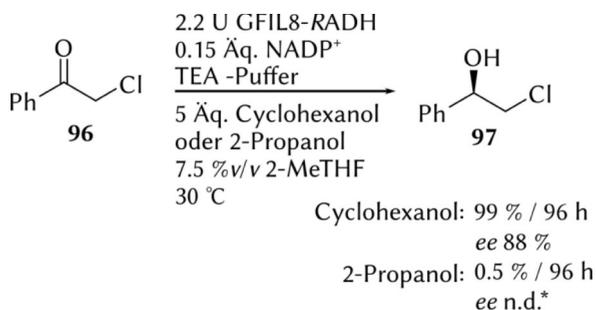
### 3.2.7 Batch-Synthese

Durch Kroutil und Mitarbeiter war bereits bekannt, dass es sich bei 2-Propanol um ein schlechtes (Ko-)Substrat für die RADH handelte.<sup>[151]</sup> Aus diesem Grund sollte mit Cyclohexanol ein weiteres Kosubstrat für die Kofaktor-Regenerierung getestet und mit 2-Propanol hinsichtlich der Leistung (Umsatz und *ee*) verglichen werden. Dazu wurden zwei Reduktionen mit  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) als Substrat im Batch durchgeführt. Als Kosolvent waren 7.5 %v/v 2-MeTHF notwendig, um den Löslichkeitsproblemen, wie sie zum Ende des vorangegangenen Kapitels 3.2.6 beschrieben wurden, entgegenzuwirken. Der Kofaktor NADP<sup>+</sup> wurde substöchiometrisch eingesetzt und die exakten Reaktionsbedingungen und Ergebnisse sind in **Schema 39** zu sehen.

Nach 96 h Reaktionszeit konnte kein Umsatz bei Verwendung von 2-Propanol verzeichnet werden und das Substrat **96** kristallisierte überraschenderweise mit der Zeit am Kolbenrand aus. Dementsprechend konnte hier auch keine Aussage über den *ee* getroffen werden. Für Cyclohexanol hingegen als Kosubstrat war hingegen nach 24 h ein

## Eigene Ergebnisse

Umsatz von 28 % mit einem *ee* von 98 % zu sehen. Nach weiteren 72 h konnte nahezu vollständiger Umsatz und keine Kristallisation festgestellt werden.



**Schema 39.** Reaktionsbedingungen und Ergebnisse der Reduktionen im Batch von  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) durch die RADH-CatIBs. TEA-Puffer: 50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>.

Allerdings war hier auffällig, dass der *ee* im Laufe der Reaktion auf 88 % sank. Ob der *ee* mit einer kürzeren Reaktionszeit verbessert werden konnte, wurde in einem weiteren Ansatz mit der doppelten Enzymmenge (4.4 U) bezogen auf die Enzymaktivität U überprüft. Es wurden nach jeweils 24 h Proben gaschromatographisch analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 14** zusammengefasst.

**Tabelle 14.** Überprüfung der Auswirkung auf den *ee* durch kürzere Reaktionszeit und doppelter Menge an Enzym (bezogen auf die Enzymaktivität U) im Batch.

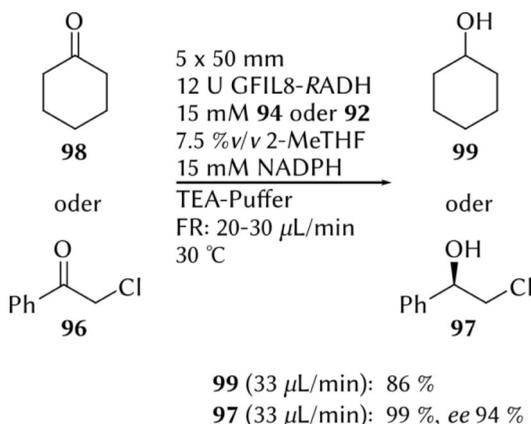
Zeit	Umsatz	<i>ee</i>
[h]	[%]	[%]
24	59	95
48	99	90
72	99	86

Im Vergleich zu dem vorherigen Versuch konnte der Umsatz nun innerhalb von 24 h auf knapp 90 % gesteigert werden, allerdings unter leichten *ee*-Einbußen auf 95 %. Nach weiteren 24 h war die Reaktion vollständig abgelaufen, aber auch hier wurde eine weitere Abnahme des *ee* auf 90 % festgestellt und im weiteren Verlauf sank er auf lediglich 86 %. An diesem Punkt ist allerdings anzumerken, dass keine weitere Optimierungsstudie durchgeführt wurde, da es sich hier lediglich um eine Machbarkeitsstudie handelte. Es konnte gezeigt werden, dass die RADH nahezu keine Aktivität unter der Verwendung von 2-Propanol aufwies. In Anbetracht dessen erklärte dies nun auch die schlechte Leistung in den Systemen der vorangegangenen Kapitel 3.2.5 und 3.2.6. Das

Hauptaugenmerk sollte jedoch, wie bereits zuvor, die Verwendung unter Flussbedingungen sein, um so eine synthetische Anwendung zu ermöglichen.

### 3.2.8 Einfacher Durchfluss

Nachdem die gepackte CatIB Säule vorbereitet wurde (12 U, 5 x 50 mm *Omnifit*-Säule; siehe Kapitel 3.2.4), konnte diese nun zunächst im einfachen Durchfluss getestet werden. Der Aufbau entsprach dabei jenem aus **Schema 22** und es wurden  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) und Cyclohexanon (**98**) mit einer Substratkonzentration von 15 mM als Testsubstrate verwendet. Diese wurden im Laufe der Reaktion zu den entsprechenden Alkoholen **97** und **99** reduziert, wobei der Fokus auf der asymmetrischen Reduktion des Ketons **96** lag. Die Reaktionsbedingungen und das passende Reaktionsschema sind in **Schema 40** dargestellt:



**Schema 40.** Reaktionsschema und Reaktionsbedingungen der Synthese der Alkohole **97** und **99** im einfachen Durchfluss mit stöchiometrischen Mengen an NADPH. FR = Flussrate. TEA-Puffer: 50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>.

Der Umsatz wurde über 120 min mit Probenahme in 20-minütigen Abständen verfolgt und die Sammlung des Produkts begann, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden wurde. Für Cyclohexanon (**98**) wurden drei verschiedene Flussraten, 10/20/33 µL/min, getestet. Die Ergebnisse des Screenings sind in **Tabelle 15** dargestellt.

**Tabelle 15.** Flussratenscreening der Umsetzung von Cyclohexanon (**98**) im einfachen Durchfluss. Zeit der Sammlung -  $t=0$  entspricht dem Zeitpunkt, wenn der Fluss das System durchlaufen hatte. Die Reaktionbedingungen sind in **Schema 40** beschrieben.

Flussrate [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	33	20	10
Zeit [min]	Umsatz [%]	Umsatz [%]	Umsatz [%]
20	88	85	81
40	87	85	79
60	86	85	79
80	85	85	77
100	85	86	77
120	86	86	n.b.

Für eine Flussrate von  $33 \mu\text{L}/\text{min}$  konnte ein durchschnittlicher Umsatz von ca. 86 % über 120 min erreicht werden. Überraschenderweise erzielte eine Erniedrigung der Flussrate auf 20 bzw.  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  keine Verbesserung, sondern führte tendenziell zu schlechteren Ergebnissen. Da  $33 \mu\text{L}/\text{min}$  im Rahmen dieser Studie die besten Ergebnisse zeigte, wurde für die asymmetrische Reduktion von  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) von Beginn an ebenfalls diese verwendet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 16** gezeigt.

**Tabelle 16.** Flussratenscreening der Umsetzung von  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) im einfachen Durchfluss. Zeit der Sammlung -  $t=0$  entspricht dem Zeitpunkt, wenn der Fluss das System durchlaufen hatte. Die Reaktionbedingungen sind in **Schema 40** beschrieben.

Zeit [min]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]
20	>99	94
40	>99	94
60	>99	93
80	>99	94
100	>99	93
120	>99	94

Über einen Verlauf von 120 min verlief die Reaktion mit vollständigem Umsatz zum Produkt **97** und sehr guten *ee* um 94 %, der dennoch im Vergleich zur Literatur etwas niedriger ausfiel (99 %<sup>[151]</sup>). Aufgrund der hervorragenden Ergebnisse sollten die Reaktionsbedingungen auf das etablierte geschlossene System übertragen werden, wie im folgenden Kapitel 3.2.9 gezeigt werden soll.

### 3.2.9 RADH-CatIB im geschlossenen System

Das System wurde bereits im Rahmen der HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH zur kontinuierlichen Kofaktor-Regenerierung in der Durchflusssynthese etabliert (siehe Kapitel 3.1.3). Dabei wurde eine Phasentrennung durchgeführt, sodass die kofaktorhaltige wässrige Phase rezirkuliert und folglich nur substöchiometrische Mengen NADP(H) benötigt wurden.

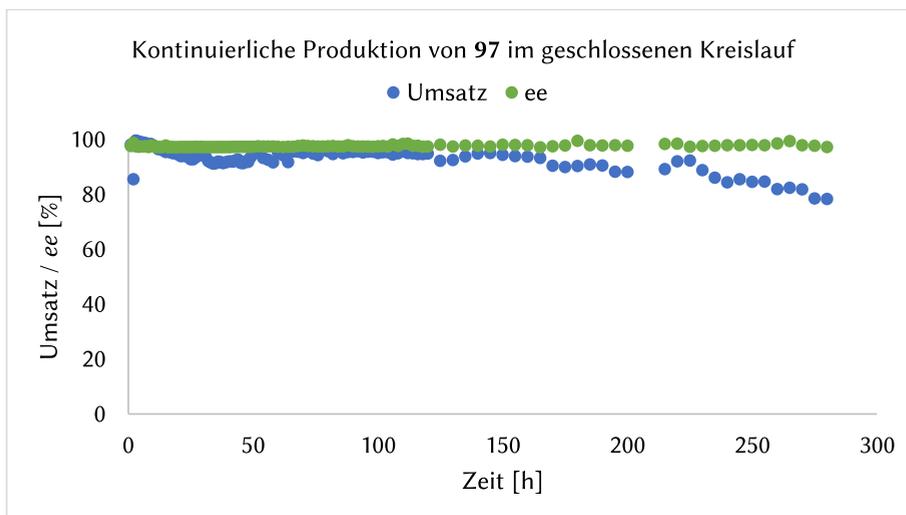
Wie zum Schluss des Kapitels 3.2.6 beschrieben, traten bei der Verwendung von 2-Propanol in Kombination mit  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) zu dem Zeitpunkt nicht lösbare Probleme auf, da  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**) im Y-Stück kristallisierte (vgl. Kapitel 3.2.6), was im weiteren Verlauf ebenfalls im Batch beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.2.7). Mit Cyclohexanol als Kosubstrat und Lösungsmittel konnte dies im Batchversuch unterbunden werden, sodass nun vermutet wurde, dass eine Übertragung auf das geschlossene System möglich war.

Es wurden verschiedene Substratkonzentrationen (10/12.5/15 mM) eingesetzt und der Kofaktor NADP<sup>+</sup> wurde mit 10/12.5/15 mM entsprechend der Substratkonzentration äquimolar verwendet (**Tabelle 17**). Direkt zu Beginn konnte die Annahme bestätigt werden, dass kein zusätzliches 2-MeTHF benötigt wurde. Die Probleme der Kristallisation beim Zusammentreffen der wässrigen und organischen Phase konnten an dieser Stelle nicht mehr beobachtet werden und traten auch nach einigen Stunden nicht mehr auf. Für eine Konzentration von 10 mM konnte ein durchschnittlicher Umsatz von ca. 75 % erreicht werden. Der *ee* wurde auf beeindruckende 99 % gesteigert und war somit äquivalent zur Literatur<sup>[154]</sup>, was sich entsprechend auf das Fehlen von 2-MeTHF zurückführen ließ. Im Vergleich zum einfachen Durchfluss konnte der Umsatz um 5 % und im Vergleich zu 2-Propanol als Kosubstrat um 15–25 % gesteigert werden. Mit erhöhter Substratkonzentration auf 12.5 bzw. 15 mM wurden im Mittel 70 bzw. 57 % Umsatz erreicht; der *ee* blieb dabei unverändert bei 99 %. Eine Reduktion auf substöchiometrische 2 mM NADP<sup>+</sup> resultierte schließlich einer Umsatzsteigerung auf 69 %, allerdings mit leichten *ee*-Einbußen auf 98 %. In Anbetracht dessen, dass hier mit 2 mM NADP<sup>+</sup> im Vergleich zu den vorherigen 15 mM nur ein Bruchteil verwendet wurde, war dies aus ökonomischer Sicht dennoch bevorzugt.

**Tabelle 17.** Screening verschiedener Substratkonzentrationen im geschlossenen Kreislauf (System siehe **Schema 25**).

Konz. [mM]	10 ( <b>96</b> ), 10 (NADP <sup>+</sup> )		12.5 ( <b>96</b> ), 12.5 (NADP <sup>+</sup> )		15 ( <b>96</b> ), 15 (NADP <sup>+</sup> )		15 ( <b>96</b> ), 2 (NADP <sup>+</sup> )	
	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]
60	76	99	71	98	55	99	76	98
120	77	99	71	99	55	99	71	98
180	76	99	70	99	58	99	69	98
240	75	99	69	99	58	99	69	98
300	74	99	70	99	58	99	67	98
360	73	98	70	99	59	99	66	98

Diese Bedingungen wurden schließlich in der kontinuierlichen Synthese des Alkohols **97** eingesetzt. Dafür wurde zudem eine größere Säule mit der 2.5-fachen Enzymmenge (5 x 150 mm, 38 U Gesamtaktivität, siehe Kapitel 3.2.4) verwendet, um einerseits vollständigen Umsatz zu ermöglichen und andererseits die Stabilität über die Zeit zu gewährleisten.

**Abbildung 38.** Kontinuierliche Produktion über 280 h des Alkohols **97** im geschlossenen Kreislauf. Dabei ist in blau der Umsatz und in grün der *ee* dargestellt.

Nach 120 h kontinuierlicher Produktion konnte eine hervorragende Gesamtausbeute von 3.0 mmol (92 %) mit 98 % *ee* erreicht werden. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute

von  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sowie einer *TTN* für NADP(H) von  $374 \text{ mol/mol}$ . Der Umsatz wurde anschließend noch weitere 160 h beobachtet, um die Stabilität der Säule über die Zeit zu verifizieren, wie in **Abbildung 38** zu sehen ist. Der Enantiomerenüberschuss bleibt dabei unverändert und der Umsatz sank auf immer noch gute  $78 \%$ .

### 3.2.10 Zusammenfassung und Ausblick

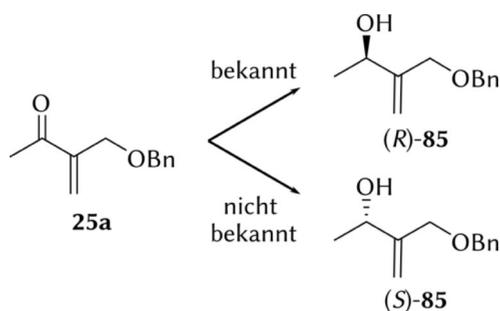
In diesem Abschnitt konnte eine Methode zur Nutzung von *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) in der Durchflusssynthese etabliert werden. Für das Packen eines Enzymreaktors in Form einer Säule musste das Bionanomaterial mit Kieselgel in einem Verhältnis von 1:2.5 %m/m (CatIBs:Kieselgel) gemischt werden, um durch Verstopfungen verursachte Druckprobleme zu vermeiden, die ohne Kieselgel auftraten. Die auf diese Weise hergestellten Enzymreaktoren konnten so anschließend im einfachen Durchfluss und geschlossenen Kreislauf erfolgreich eingesetzt werden.

Der initiale Einsatz im einfachen Durchfluss unter Verwendung des Ketons **81**, mit dem zuvor im Rahmen der HaloTag™-LbADH hervorragende Ergebnisse produziert werden konnten, stellte sich als nicht ideales Substrat für die RADH heraus. So konnten zwar gute Umsätze, jedoch keine guten *ee* erzielt werden. Im geschlossenen Kreislauf konnten dann in beiden Fällen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten werden.

Die nächste Verwendung im Zwei-Enzym-System bestehend aus HaloTag™-LbADH und CatIB-RADH funktionierte besser, war dennoch nicht ideal, da hier zwei Immobilisierungsstrategien in einem System verwendet wurden. Es wurde, je nach Reaktionsbedingungen, entweder ein guter Umsatz oder ein guter *ee* erzielt, wenngleich letzterer mit maximal  $90 \%$  nicht die von Kroutil und Mitarbeitern postulierten  $99 \%$  erreichte.<sup>[151]</sup> Schließlich war dieses System auch aus ökonomischer Sicht nicht zielführend, da der Kofaktor in zum Produkt stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden musste. Des Weiteren traten hier schließlich nicht lösbare Komplikationen auf, da das Keton **92** innerhalb des Systems kristallisierte und zur Verstopfung des Systems führte.

Im letzten Schritt konnte dann ein sehr gut funktionierendes System etabliert werden, indem lediglich das Kosubstrat 2-Propanol durch Cyclohexanol ersetzt wurde. Auf diese Weise konnte der „klassische“ geschlossene Kreislauf verwendet werden und es wurde keine Kristallisation des Ketons **96** mehr festgestellt. Mit lediglich  $2 \text{ mM}$  NADP<sup>+</sup> wurde der Alkohol **97** so nach 120 h mit einer Ausbeute von  $3.0 \text{ mmol}$  und  $98 \%$  *ee* erhalten, was folglich einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und einer *TTN* für NADP(H) von

374 mol/mol entsprach. Nach weiteren 280 h fiel der Umsatz auf immer noch gute 78 %. Entsprechend lässt sich hier zusammenfassend sagen, dass die herausfordernde Aufgabe der Verwendung von CatIBs in der Flusssynthese mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung erfolgreich bewältigt wurde. Am Ende benötigte es keine komplexen Zwei-Enzysysteme, sondern lediglich einen simplen Austausch des Kosubstrats zu Cyclohexanol. Da an dieser Stelle der Fokus auf der Etablierung des Systems lag, sollten nun weitere Substrate unter den Bedingungen mit Cyclohexanol als Kosubstrat getestet werden. Denkbar wären hier die in Kapitel 3.1.3.2 verwendeten Ketone **16**, **25a**, **81**, **83**, um nach Reduktion die entsprechenden Enantiomere zu erhalten. Dies wäre besonders im Falle des (*S*)-Enantiomers **85** interessant, da es nicht Literatur-bekannt ist (vgl. **Schema 41**).

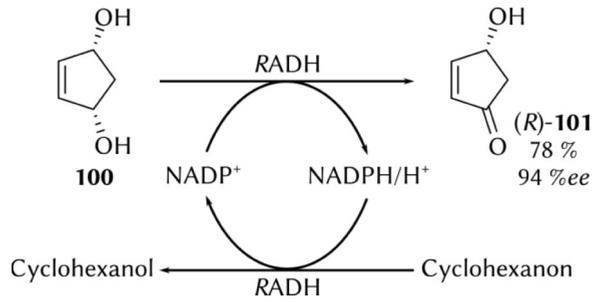


**Schema 41.** Darstellung der Produkte (*R*)-**85** und (*S*)-**85** nach der asymmetrischen Reduktion des MBH-Ketons **25a**. Dabei war das Produkt (*R*)-**85** bereits enzymatisch im Fluss zugänglich<sup>[1]</sup>, das Enantiomer (*S*)-**85** hingegen noch nicht.

Wie bereits in Kapitel 3.1.6 erläutert, wären so auch Reaktionskaskaden denkbar, in denen einerseits das MBH-Keton **25a** im Fluss hergestellt wird und anschließend direkt enzymatisch durch die RADH (in CatIBs) reduziert würde.

Neben dem Einsatz im reduktiven Modus, könnte das System auch im oxidativen Modus für z.B. die Desymmetrisierung von *cis*-4-Cyclopenten-1,3-diol (**100**) eingesetzt werden, wie Holec *et al.* bereits im Batch unter Verwendung der RADH gezeigt haben.<sup>[246]</sup> Das Produkt **100** gehört zur Klasse der 4-Hydroxy-2-Cyclopentenone und diese stellen eine wichtige Klasse für Bausteine für eine Vielzahl von Naturstoffen dar.<sup>[246-252]</sup>

Die Autoren konnten selektiv ein stereogenes Zentrum eliminieren und das Keton (*R*)-**101** in 78 % Ausbeute und exzellenten 94 %*ee* zugänglich machen. Als Kosubstrat kam hier Cyclohexanol anstelle des Cyclohexanons zum Einsatz. Das Reaktionsschema ist im Folgenden dargestellt:



**Schema 42.** Desymmetrisierung von *cis*-4-Cyclopenten-1,3-diol (**100**) zum Keton (*R*)-**101** unter der Verwendung der RADH nach Holec *et al.* Diese Reaktion wäre denkbar für den Einsatz im geschlossenen System unter oxidativen Bedingungen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Etablierung einer Reaktionskaskade in Kombination mit der YqjM, wie Classen *et al.* bereits ausführlich für die Batchsynthese beschrieben haben.<sup>[37]</sup>

**Synopsis: *Catalytically active inclusion bodies (CatIBs)* in der kontinuierlichen Flusssynthese**

- I. Erfolgreiche Herstellung von Enzymreaktoren mit CatIBs durch physikalisches Fixieren in einer Säule mit Kieselgel.
- II. Der Einsatz von Cyclohexanol als Kosubstrat anstelle des 2-Propanols für die Kofaktor-Regenerierung war für die RADH notwendig, um stabile Umsätze und Enantiomerenüberschüsse generieren zu können.
- III. Nach 120 h kontinuierlicher Produktion mit substöchiometrischen Mengen NADP(H) konnte der Alkohol **93** mit einer Gesamtausbeute von 3.0 mmol (92 %) in 98 % *ee* erhalten werden. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sowie einer *TTN* für NADP(H) von 374 mol/mol.
- IV. Der Umsatz fiel nach insgesamt 280 h dauerhafter Produktion auf immer noch gute 78 % ab bei konstantem *ee*.

### 3.3 *Old Yellow Enzymes* und YqjM

Die Klasse der Enreduktasen lässt sich in fünf Unterkategorien einteilen.<sup>[253]</sup> Dabei wird unterschieden zwischen

1. Fe-S Cluster-abhängigen Enoatreduktasen
2. Mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (*MDR*)
3. Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (*SDR*)
4. NADPH-abhängigen Chinon-Reduktase-ähnlichen Enreduktasen
5. *Old Yellow Enzymes* (*OYE*)

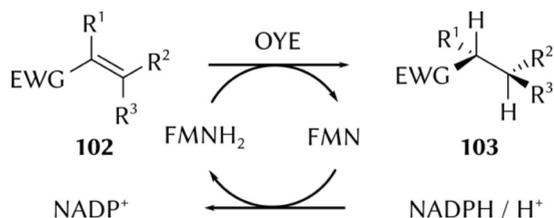
Da der Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf der YqjM aus *Bacillus subtilis*, einem *Old Yellow Enzyme* liegt, soll sich im Folgenden auch nur auf diese Klasse der Enreduktasen beschränkt werden.

#### 3.3.1 Einleitung

Die *Old Yellow Enzymes* (*OYE*) beschreiben eine der fünf Klassen der Enreduktasen, die zu den Flavoproteinen gehören und Flavinmononukleotid (FMN) als Kofaktor tragen. Das erste Enzym (*OYE*, EC 1.6.99.1) dieser Klasse wurde von Christian und Warburg 1933 aus untergäriger Hefe isoliert und als „gelbes Ferment“ betitelt.<sup>[254]</sup> Daraufhin konnten weitere gelbe Enzyme isoliert werden und es erfolgte nachträglich die Umbenennung in *Old Yellow Enzyme* (*OYE1*).<sup>[253]</sup> Die erste Kristallstruktur des *OYE* wurde Mitte der 1950er Jahre von Theorell veröffentlicht.<sup>[255]</sup> Für seine herausragende Forschung zu Oxidationsenzymen wurde er mit dem Medizinnobelpreis im gleichen Jahr geehrt.<sup>[256]</sup> Viele Jahre später konnten Fox und Karplus 1994 die oxidierte und reduzierte Form der *OYE* mit einer Auflösung von 2.00 Å abbilden.<sup>[257, 258]</sup> Dabei handelte es sich um ein Dimer mit einer Größe von ~45 kDa und einem nicht-kovalent gebundenen FMN pro Einheit. Das FMN ist für die gelbe Farbe verantwortlich und mit dem Riboflavin, auch als Vitamin B2 bekannt, identisch. Der Farbstoff lässt sich vom Holoprotein trennen und das eigentliche Apoprotein ist farblos.<sup>[259]</sup> Generell handelt es bei diesen Enreduktasen um NADPH-abhängige Oxidoreduktasen, die die asymmetrische Reduktion von mit elektronenziehenden Gruppen aktivierten Olefinen katalysieren und dabei in einem Schritt ein bis zwei stereogene Zentren aufbauen. Zu dem breiten Substratspektrum gehören  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde und Ketone, Carbonsäuren und eine Vielzahl an Derivaten wie Ester, zyklische Imide, Nitrile, Lactone.<sup>[260-262]</sup> Aber auch Nitroalkene werden von diesen Enzymen akzeptiert und umgesetzt, wie z.B. sowohl Gröger als auch

Faber und Mitarbeiter gezeigt haben.<sup>[263, 264]</sup> Auch wenn bereits viel über Enreduktasen bekannt ist, sind ihre physiologische Rolle sowie die natürlichen Substrate bis heute unbekannt.<sup>[259]</sup> Jedoch ist bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress spielen, sowie an der Detoxifizierung von elektrophilen Substanzen beteiligt sind.<sup>[253, 259]</sup>

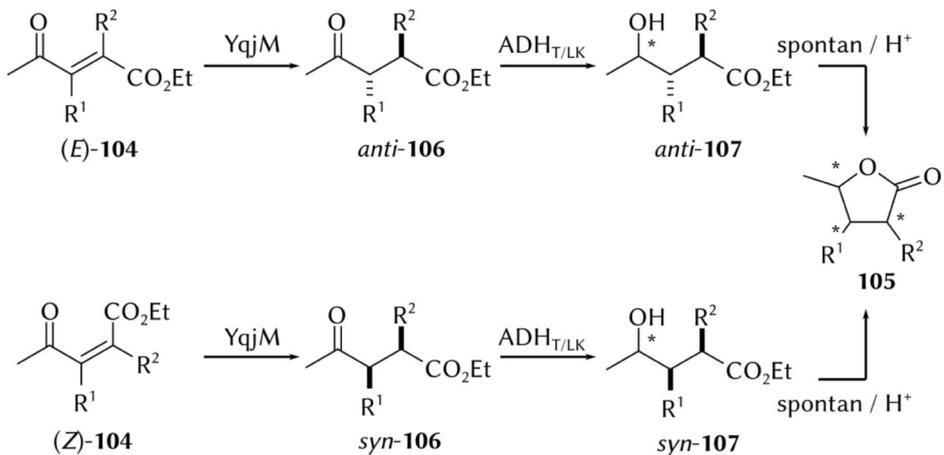
Nichtsdestotrotz konnten zahlreiche herausragende Veröffentlichungen von Brown *et al.*,<sup>[265]</sup> Kohli und Massey,<sup>[266]</sup> Barna *et al.*<sup>[267]</sup> und Breithaupt *et al.*<sup>[268]</sup> tiefe Einblicke in den katalytischen Mechanismus der OYE-Familie gewähren. Die Kombination aus ortsspezifischer Mutagenese und verschiedenen Kristallstrukturen bewiesen die Wichtigkeit von His<sup>191</sup> und Asn<sup>194</sup> für die Bindung des Sauerstoffatoms von zum Beispiel  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylen. Kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an die beiden erwähnten Aminosäuren, kann sich entsprechend der  $\beta$ -Kohlenstoff des Substrats über das N-5 des Flavins positionieren. Dies erklärt auch, warum der Hydridtransfer über das N-5 des Flavins geschieht. Für die anschließende Protonierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs ist Tyr<sup>196</sup> unabdingbar.<sup>[256, 266]</sup> Dieser Mechanismus wird oft als „Ping-Pong-bi-bi“-Mechanismus bezeichnet, da sowohl das Substrat, der Kofaktor FMN, als auch das Koenzym NADPH im selben aktiven Zentrum gebunden werden. Hier kommt es dann aus der Sicht des FMN zu einem reduktiven und oxidativen Schritt. Im ersten Teilschritt wird der Kofaktor FMN stufenweise zu FMNH<sub>2</sub> via FMNH durch das Koenzym NADPH reduziert. Im folgenden oxidativen Schritt überträgt die reduzierte FMNH<sub>2</sub>-Spezies nun formal ein Hydrid auf das  $\beta$ -Kohlenstoffatom des Substrats **102**. Eine anschließende Protonierung des Tyr<sup>196</sup> schließt die Reaktion zum Produkt **103** ab. In seltenen Fällen ist eine *cis*-Addition an die Doppelbindung möglich, allerdings laufen nahezu alle Reaktionen der OYE bedingt durch die Ausrichtung der beteiligten Aminosäuren und Kofaktoren über eine *anti*-Addition an die Doppelbindung ab. Ein Reaktionsschema ist im folgenden **Schema 43** dargestellt:



**Schema 43.** Reaktionszyklus der OYE ausgehend des Substrats **102** mit aktivierter Doppelbindung zum *anti*-konfigurierten Produkt **103** unter Oxidation des Kofaktors FMNH<sub>2</sub> zu FMN. EWG (engl. *electron withdrawing group*) für elektronenziehende Gruppe.

Ein bekanntes Enzym der OYE-Familie ist die YqjM aus *Bacillus subtilis*, bei der es sich um ein *thermophilic-like* (Klasse II) Enzym handelt. Im Vergleich zu anderen OYEs besteht sie aus zwei katalytisch abhängigen Dimeren, wobei ein Arginin am C-Terminus in das aktive Zentrum des anderen ragt, und an der Substratbindung beteiligt ist. Zwei solcher Dimere lagern sich dann zu einem Dimer von Dimer zusammen wie von Kitzing *et al.* beschrieben wurde.<sup>[269]</sup> Ein weiterer Unterschied sind die Aminosäuren im hochkonservierten aktiven Zentrum, die einerseits für die Regulierung des Redoxpotentials des FMN und andererseits für die Ligandenbindung zuständig sind. Während in vielen OYEs für ersteres Tyr<sup>37</sup> verantwortlich ist, wird dies in der YqjM durch Cys<sup>26</sup> reguliert. Für die Liganden- und Inhibitorbindung ist im „klassischen“ Fall Tyr<sup>375</sup> involviert, wohingegen die YqjM lediglich ein N-terminales Tyr<sup>28</sup> benötigt, welches bereits in weiteren Enzymen dieser Klasse gefunden werden konnte.

Die YqjM hat eine besondere Anwendung in der Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen gefunden. Classen *et al.* konnten mit ihrer Hilfe ausgehend von *E/Z*-Ethyl-4-oxopent-2-enoat-Derivaten (**104**) in einer zweistufigen Batch-Reaktionskaskade chirale  $\gamma$ -Butyrolactone (**105**) zugänglich machen. Im ersten Schritt wurde das  $\alpha/\beta$ -ungesättigte Keton (*E*)-**104**/*Z*)-**104** durch die YqjM zum *anti*- bzw. *syn*-Produkt **106** reduziert. Der zweite Reaktionsschritt wurde anschließend von verschiedenen Alkoholdehydrogenasen übernommen und so konnten selektiv Hydroxyketone *anti/syn* **107** mit drei stereogenen Zentren zugänglich gemacht werden (**Abbildung 39**).<sup>[37]</sup>



**Abbildung 39.** Zwei-Enzym-Reaktionskaskade im Batch nach Classen *et al.*. Im ersten Schritt kommt es zur Reduktion der Doppelbindung durch die YqjM und im folgenden zweiten Schritt zur Reduktion der Carbonylfunktion durch die Alkoholdehydrogenase.<sup>[37]</sup>

### 3.3.2 YqjM in der Durchflusssynthese

Im Rahmen eines Forschungspraktikums von Diana-A. Amariei und einer Bachelorarbeit von Marisa Bickmann sollte die YqjM in der Flusssynthese eingesetzt werden, um solche  $\gamma$ -Butyrolactone, wie am Ende des vorherigen Kapitels beschrieben, zukünftig ebenfalls in diesem Modus zugänglich machen zu können.<sup>1</sup> Im Rahmen dieser Projekte wurden einerseits die Grundlagen dafür geschaffen (Immobilisierung der YqjM; Anwendung im einfachen Durchfluss), und andererseits sollte die YqjM in einem kombinierten System mit der HaloTag™-LbADH eingesetzt werden, um eine Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Flusssynthese zu ermöglichen.<sup>[5]</sup> Das etablierte System wurde bereits in Kapitel 3.2.6 erläutert. Die wichtigsten Ergebnisse des Forschungspraktikums und der Bachelorarbeit sollen an dieser Stelle präsentiert werden.

Für den Einsatz in der Flusssynthese wurde die HaloTag™-Immobilisierungsstrategie angewendet, da es sich hierbei, wie bereits mit der LbADH gezeigt werden konnte, um eine einfache und effiziente Immobilisierungsmethode handelt. Die HaloTag™-LbADH erwies sich über einen langen Zeitraum als stabil und es konnten gute Ergebnisse in der kontinuierlichen Flusssynthese erzielt werden (vgl. siehe Kapitel 3).

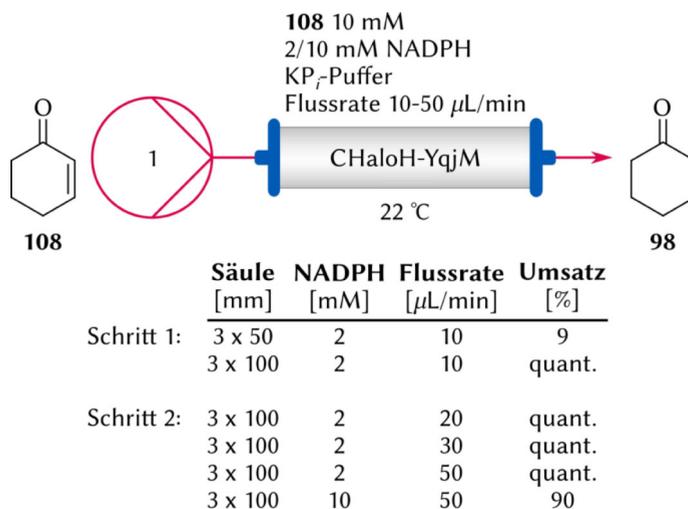
Unter Anleitung von Martin Wäscher wurden von Marisa Bickmann und Diana-A. Amariei im Rahmen der Studie zur Enreduktase YqjM verschiedene Konstrukte hergestellt - zum einen wurde der HaloTag™ an den N-Terminus (als YqjM-NHalo) und zum anderen an den C-Terminus (als YqjM-CHalo) geknüpft. Hinsichtlich der spezifischen Aktivität stellte sich die CHalo-Variante mit ca. 950 U/mg (ca. 30 % im Vergleich zum Wildtyp) der N-Halo-Variante mit ca. 350 U/mg (ca. 10 % im Vergleich zum Wildtyp) als überlegen heraus und dies änderte sich auch nach viertägiger Lagerung im Kühlschrank nicht, weshalb der Einsatz der YqjM-CHalo-Variante im Fluss im Fokus lag.

Der für den Fluss eingesetzte Enzymreaktor (3 x 50 mm oder 3 x 100 mm) wurde nach bereits bekannter Anleitung durchgeführt.<sup>[1, 36]</sup> Dazu wurden für die kürzere Säule 5 mL des Lysats und für die längere Säule 10 mL des Lysats bei 30  $\mu$ L/min über das HaloLink™-Resin gepumpt und diese sollten zunächst hinsichtlich des Umsatzes miteinander verglichen werden. Dazu wurde der etablierte einfache Durchfluss verwendet und eine Stammlösung bestehend aus Cyclohexanon (**108**) und 20 Mol% NADPH in KP<sub>r</sub>-Puffer

---

<sup>1</sup> Die Bachelorarbeit von Marisa Bickmann und das Forschungspraktikum von Diana-A. Amariei wurden unter Anleitung des Verfassers dieser Dissertation, Benedikt Baumer, und Martin Wäscher im Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.<sup>[5]</sup>

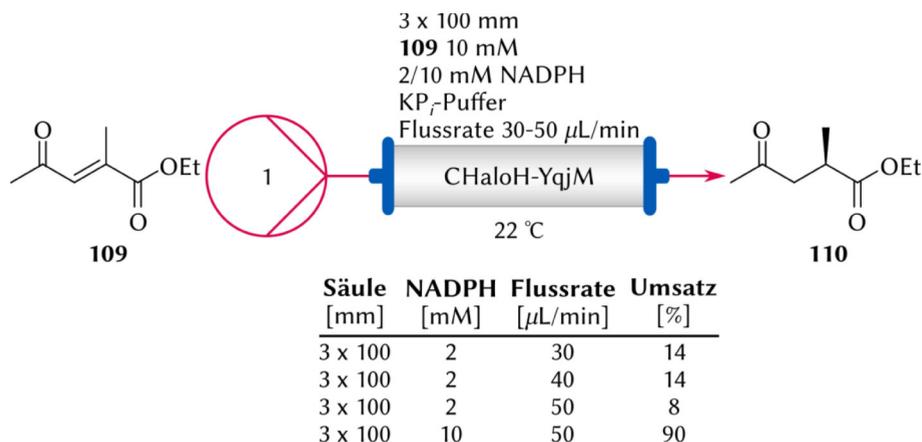
(20 mM, pH 6.5) mit einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  über die Säulen gepumpt. Nachdem das Totvolumen des Systems überwunden war, wurden 300  $\mu\text{L}$  Fraktionen gesammelt. Hier ist zu beachten, dass zu Beginn ein Unterschuss an Kofaktor zugesetzt wurde, um zu Beginn möglichst sparsam mit dem teuren Kofaktor umzugehen, sodass lediglich maximal 20 % Umsatz möglich waren. So konnte bei Verwendung des 3 x 50 mm-YqjM-CHalo-Enzymreaktors ein Umsatz zu Cyclohexanon (**98**) von 9 % und bei Verwendung des 3 x 100 mm-Reaktors vollständiger Umsatz erzielt werden (**Schema 44**, Schritt 1). Aufgrund der besseren Leistung der längeren Säule wurde diese für weitere Experimente verwendet und eine Steigerung der Flussraten auf 20, 30 und 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  erzielte hier ebenfalls vollständigen Umsatz und der Einsatz von stöchiometrischen Mengen NADPH bei 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  erreichte einen hervorragenden Umsatz von 90 % (siehe **Schema 44**, Schritt 2).



**Schema 44.** Schematische Darstellung und Ergebnisse des einfachen Durchflusses mit Cyclohexenon (**108**) als Substrat, das durch die CHaloH-YqjM zu Cyclohexanon (**98**) reduziert wurde. Schritt 1 entspricht dabei dem Säulenvergleich; Schritt 2 dem Flussratenscreening.

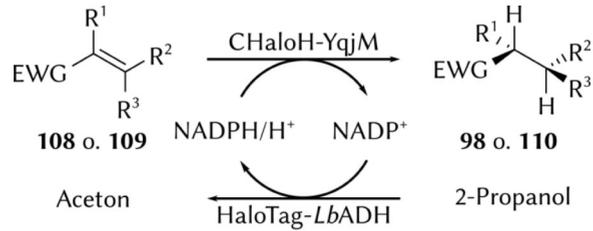
Als nächstes Testsubstrat wurde (*E*)-2-Methyl-4-oxopentansäureethylester (**109**) verwendet, da dieses bereits durch Classen *et al.* in einer Batchkaskade für die Synthese von chiralen  $\gamma$ -Butyrolactonen **105** eingesetzt wurde und zukünftig eine ähnliche Synthese im Fluss ermöglicht werden soll (**Abbildung 39**). Die Reaktionsbedingungen waren identisch zu Cyclohexenon (**108**), jedoch wurde direkt die längere und aktivere Enzymsäule genutzt. Mit 20 Mol% NADPH konnten für 30 und 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  gute Umsätze zum Produkt **110** von 14 % (maximal 20 %) erreicht werden. Für 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  sank der Umsatz allerdings auf 8 % und folglich, da kein vollständiger Umsatz erreicht werden

konnte, wurde der äquimolare Lauf bei 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte schließlich unter Aufbau eines stereogenen Zentrums ein guter Umsatz von 75 % erzielt werden (**Schema 45**). Eine Bestimmung des *ee* wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt, da die Methodenentwicklung und Umsatzoptimierung im Vordergrund lagen. Dies ist auch für den weiteren Verlauf gültig.



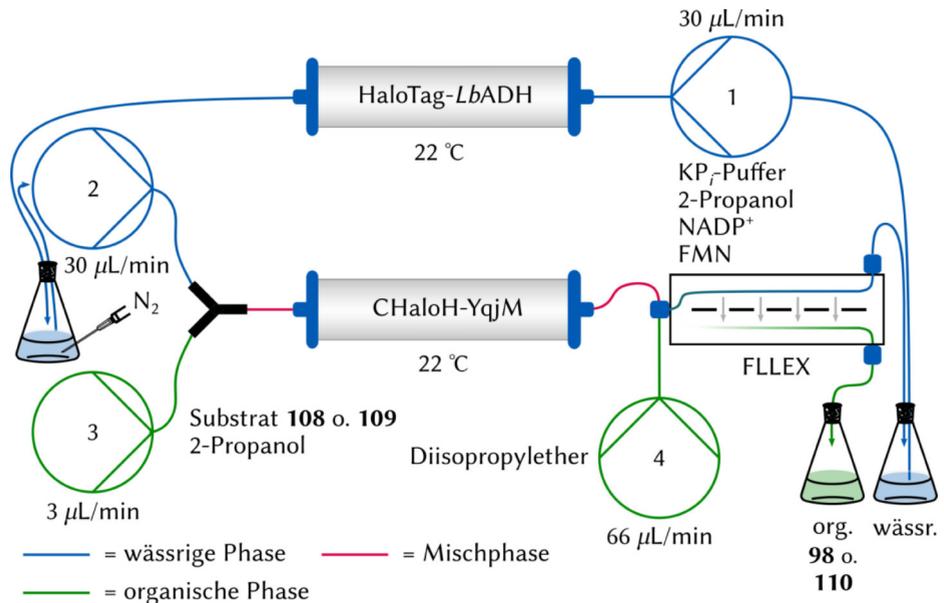
**Schema 45.** Schematische Darstellung und Ergebnisse des einfachen Durchflusses mit (*E*)-2-Methyl-4-oxopentansäureethylester (**109**) als Substrat, das durch die CHaloH-YqjM zum Produkt (**110**) reduziert wurde.

Nachdem erste Versuche im einfachen Durchfluss durchgeführt wurden und zeigen konnten, dass die HaloTag<sup>TM</sup>-immobilisierte YqjM im Fluss einsetzbar war, sollte nun zusätzlich ein Kofaktor-Regenerierungssystem implementiert werden. Als Grundlage wurde das Kombinationssystem verwendet, welches aus Kapitel 3.2.6 bekannt ist, um mit der HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH als zweites eingesetztes Enzym den Kofaktor zu regenerieren. Zum einen war hier unabdingbar, dass die beiden Enzyme voneinander räumlich getrennt vorlagen, da die ADH das für die YqjM benötigte aktivierte Michael-System zerstören würde und somit keine Reduktion der Doppelbindung mehr stattfinden könnte und zum anderen die Zugabe von 2-Propanol notwendig war, um  $\text{NADP}^+$  zu NADPH zu reduzieren. Jedoch war an dieser Stelle nicht bekannt, welchen Einfluss das Kosubstrat auf die YqjM hatte. Das zugrundeliegende Reaktionsschema ist in **Schema 46** gezeigt:



**Schema 46.** Reaktionszyklus der CHaloH-YqjM ausgehend der Substrate **108** o. **109** zu den Produkten **98** o. **110**. Dabei lag der Fokus auf dem Zwei-Enzym-System bestehend aus CHaloH-YqjM und HaloTag™-LbADH. Die ADH ist dabei für die Kofaktor-Regenerierung zuständig. EWG (engl. *electron withdrawing group*) für elektronenziehende Gruppe.

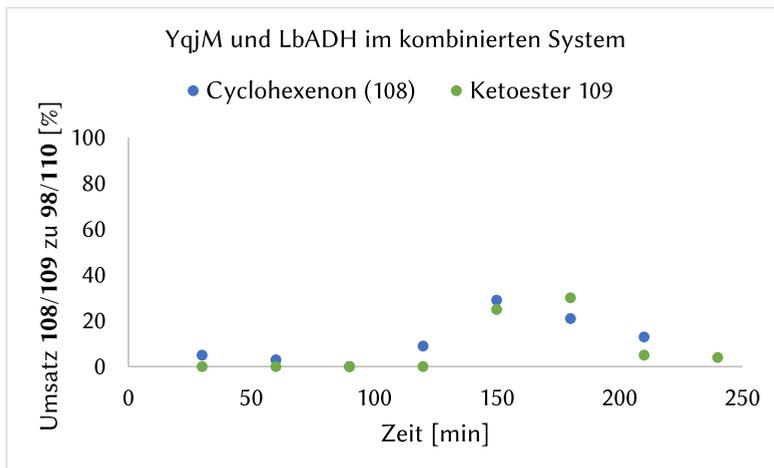
Das verwendete System ist in **Schema 47** dargestellt und die Funktionsweise wurde bereits in Kapitel 3.2.6 ausführlich erläutert, sodass an dieser Stelle darauf verzichtet wird.



**Schema 47.** Kombiniertes System unter der Verwendung der CHaloH-YqjM und der HaloTag™-LbADH basierend auf dem geschlossenen Kreislauf. Im Vergleich zum geschlossenen System (**Schema 25**) bestand das System aus vier Pumpen.

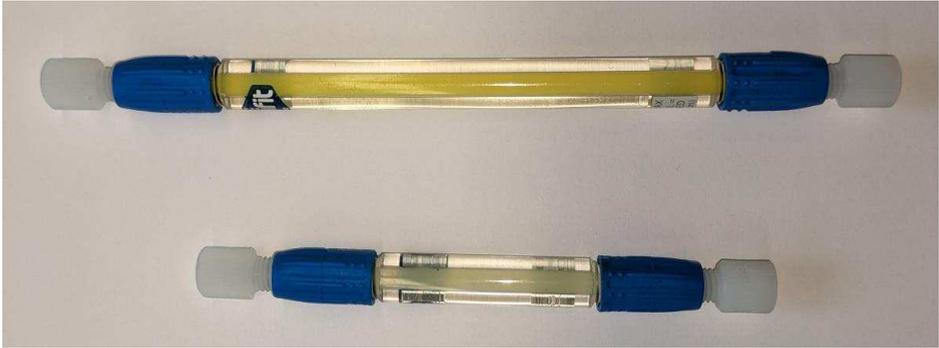
In diesem System wurden, wie zuvor im einfachen Durchfluss, Cyclohexanon (**108**) oder der Ketoester **109** zu den entsprechenden Produkten **98** und **110** durch die Enreduktase YqjM reduziert. Die Substratkonzentration betrug 15 mM und der Kofaktor äquimolar eingesetzt. Die Sammlung der produkthaltigen Lösung nach der FLLEX geschah über einen Zeitraum von 240 min mit Probenahme in 30 min Abständen nach dem das Totvolumen des Systems überwunden wurde. Für beide Läufe war auffällig, dass zu

Beginn nur sehr geringer Umsatz vorhanden war, der dann stetig bis auf 0 % abfiel. Erst nach ca. 90 min für Cyclohexenon (**108**) bzw. 120 min für den Ketoester **109** stieg er wieder an und erreichte nach etwa 150 bzw. 180 min ein Umsatzmaximum von in beiden Fällen knapp 30 %. Anschließend fiel er wieder ab (**Abbildung 40**).



**Abbildung 40.** Ergebnis der Anwendung des Kombinationssystems aus CHaloH-YqjM and HaloTag™-LbADH zur Reduktion von Cyclohexenon (**108**) und des Ketoesters **109**. Gesammelt wurde, nachdem das Totvolumen durchlaufen worden war, für 240 min mit Probenahme in 30 min Abständen.

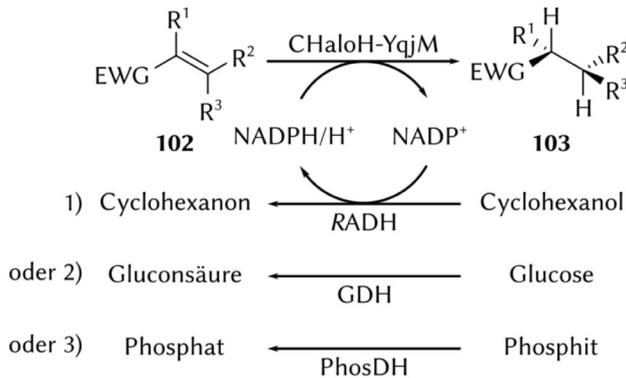
Dieses Verhalten war an dieser Stelle überraschend, da das System bereits im Rahmen der RADH-CatIBs mit guten Umsätzen über einen längeren Zeitraum funktionierte. Jedoch ist das hier vorliegende System komplexer, da für die Reduktion neben NADPH ebenfalls FMN benötigt wird. Dieses wurde zwar initial dem System zugegeben, allerdings war denkbar, dass es das aktive Zentrum des Enzyms nicht schnell genug erreichte. Des Weiteren war im Vergleich zum oben beschriebenen einfachen Durchfluss 2-Propanol anwesend, welches einerseits über Pumpe 2 und andererseits zusätzlich durch die substrathaltige Lösung in Pumpe 3 zugeführt wurde. Dies könnte dafür sorgen, dass FMN aus dem Enzym gewaschen wurde. In beiden Fällen wäre die Begründung eine unzureichende Bereitstellung des Kofaktors, was zusätzlich dadurch untermalt wurde, dass sich die durch FMN bedingte gelbe YqjM-Säule mit der Zeit entfärbte. Dies wurde einmal beispielhaft in **Abbildung 41** illustriert. Bei der oberen leuchtend gelben Säule handelte es sich um eine neue, frisch hergestellte HaloTag™-YqjM-Säule, während die untere kleine Säule bereits einige Reaktionszyklen durchlaufen hat und mit der Zeit entfärbte.



**Abbildung 41.** Die obere Säule zeigt eine neu hergestellte HaloTag™-YqjM-Säule, die eine durch FMN-bedingte leuchtend gelbe Farbe hat. Die untere Säule stellt eine Säule dar, die bereits einige Reaktionszyklen durchlaufen hat und in einer Entfärbung resultierte.

### 3.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Projekts konnte gezeigt werden, dass der HaloTag™ eine geeignete Möglichkeit ist, die YqjM zu immobilisieren, um diese anschließend im einfachen Durchfluss einzusetzen. Die Verwendung einer mindestens 3 x 100 mm langen Säule erwies sich als notwendig, um je nach Substrat gute bis sehr gute Umsätze mit äquimolaren Mengen NADPH erzielen zu können. Anschließend wurde die YqjM im kombinierten System mit der HaloTag™-LbADH eingesetzt, die benötigtes NADPH bereitstellen sollte. Allerdings kam es an diesem Punkt zu einigen Hürden hinsichtlich des Umsatzes. So war unabhängig des eingesetzten Substrats zuerst nahezu kein Umsatz zu sehen, dann kam es zu einem sprunghaften Anstieg und letztlich wieder zu einem Abfall. Wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, wäre eine mögliche Begründung eine unzureichende Bereitstellung des Kofaktors FMN, der mit der Zeit zusätzlich durch 2-Propanol rausgewaschen werden könnte. Sollte sich der Einsatz von 2-Propanol für die YqjM im geschlossenen System als problematisch herausstellen, könnte dies durch den Einsatz alternativer Kofaktor-Regenerierungsmethoden gelöst werden (siehe **Schema 48**).



**Schema 48.** Reduktion eines Substrats **102** zum Produkt **103** unter der Verwendung der CHaloH-YqjM. Die Kofaktor-Regenerierung kann hierbei auf verschiedene Arten durchgeführt werden. EWG (engl. *electron withdrawing group*) für Elektronen-ziehende Gruppe.

Bereits in Kapitel 3.2.9 stellte sich der Einsatz der RADH-CatIBs mit Cyclohexanol als Kosubstrat als effiziente Methode heraus. Das System konnte dabei über mehrere Tage stabil gefahren werden, ohne eine weitere Zugabe von NADP(H) zu benötigen. Es ist jedoch zu beachten, dass dann Cyclohexanon (**108**) nicht als Substrat eingesetzt werden sollte, da nach YqjM-katalysierter Reduktion der Doppelbindung Cyclohexanon (**98**) entsteht, welches die LbADH-katalysierte Oxidation von NADPH zu NADP<sup>+</sup> zur Folge hätte.

Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz der GDH, die in der Vergangenheit bereits vielfach eingesetzt wurde. Diese regeneriert dabei den Kofaktor unter Oxidation von Glucose zu Gluconsäure. In dem System könnte, je nach Substrat, gänzlich auf organische Solvenzien verzichtet werden, die einen negativen Einfluss hinsichtlich der Stabilität von Enzymen haben können. Allerdings würde der Einsatz von Glucose zu höheren Viskositäten der Lösungen führen, jedoch ist hier entscheidend, wie viel Glucose eingesetzt und bei welcher Temperatur das System gefahren werden würde. Telis *et al.* bestimmten mit Hilfe eines Rheometers die Viskositäten verschiedener wässriger Glucoselösungen bei unterschiedlicher Temperatur.<sup>[270]</sup> Je höher die Glucosekonzentrationen, desto viskoser die resultierende Lösung. Bei 20 °C und einer Konzentration von 10 %w/w liegt die dyn. Viskosität bei ca. 1.3 mPa\*s; bei Verdopplung der Konzentration bei ca. 2.0 mPa\*s. Eine Erhöhung der Temperatur auf 25 °C resultiert in 1.1 respektive 1.7 mPa\*s. Zum Vergleich: Die Viskosität von Milch liegt im Vergleich bei 20 °C ebenfalls bei 2.0 mPa\*s und sollte keine Probleme darstellen (gilt es jedoch zu testen). Ein Auszug der Ergebnisse ist in der folgenden **Tabelle 18** gezeigt.

**Tabelle 18.** Viskositäten wässriger glukosehaltiger Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration und Temperatur. Tabelle angelehnt an Telis *et al.*<sup>[270]</sup> Als Referenz gilt destilliertes Wasser: 1,001 mPa\*s bei 20 °C.

Konzentration (%w/w)	10 %w/w	20 %w/w	30 %w/w
Temperatur [°C]	Dyn. Viskosität $\eta$ [mPa*s]		
20	1.26	1.96	3.21
25	1.13	1.70	2.65
35	0.89	1.35	2.07

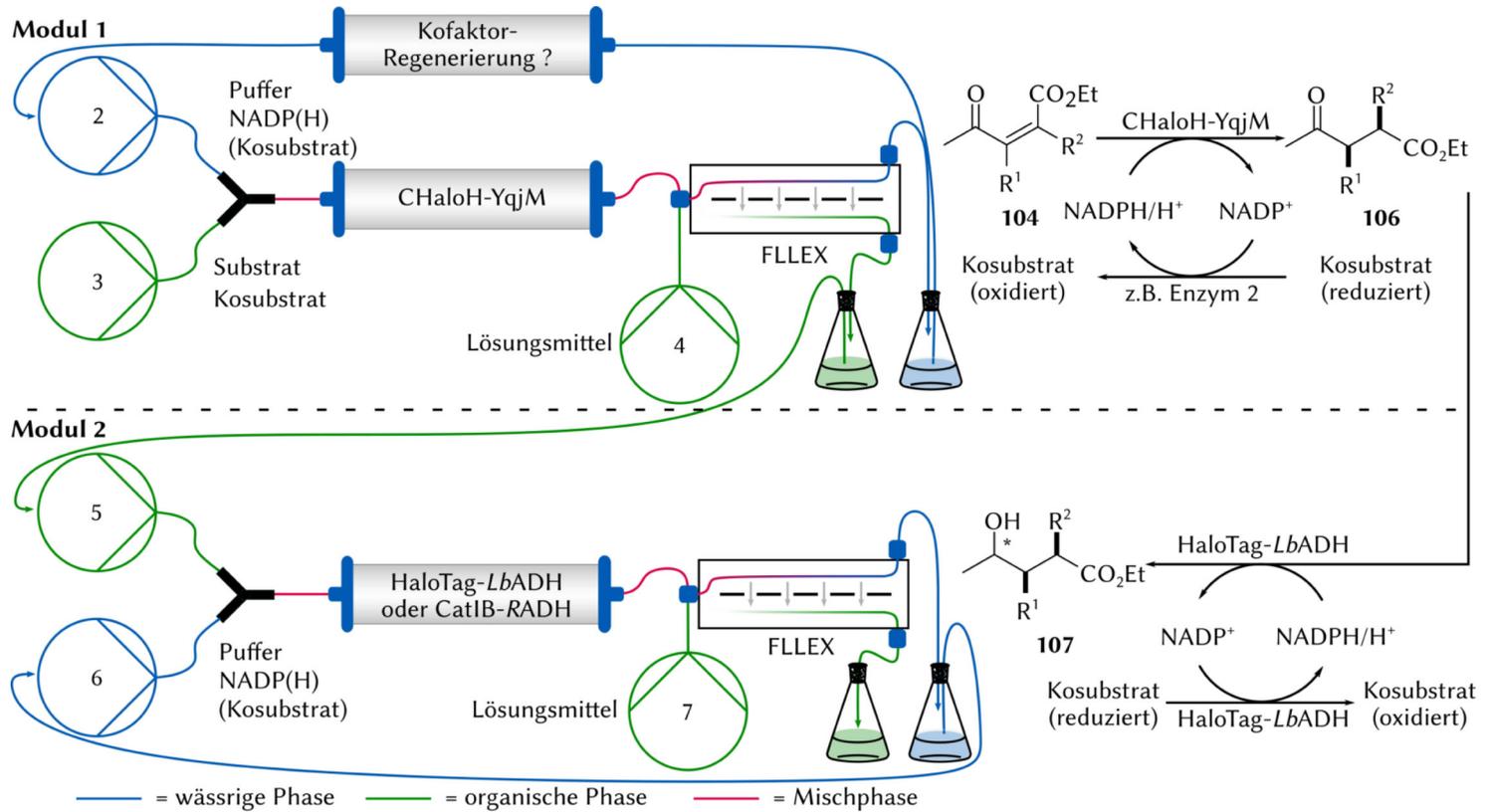
Ein weiterer wichtiger Punkt ist an dieser Stelle aber auch die Bildung der Gluconsäure, die in der wässrigen Phase akkumuliert und folglich für einen pH-*shift* sorgen würde. Die Entfernung könnte mit Hilfe einer Ionentauschersäule durchgeführt werden; für einen möglichen pH-*shift* wäre der Einsatz eines Titrators (ggf. *inline*) denkbar.

Die letzte hier erwähnte Möglichkeit wäre die Verwendung der Phosphitdehydrogenase, die bereits im Rahmen dieser Arbeit in einer Machbarkeitsstudie getestet wurde. Sie katalysiert die Regenerierung des NAD(P)H durch die Oxidation von Phosphit zu Phosphat mit einer sehr hohen thermodynamischen Gleichgewichtskonstante von  $K_{eq} = 1 \times 10^{11}$ . Die Reaktion verläuft hier nahezu irreversibel, allerdings müsste hier eine geeignete Lösung gefunden werden, wie Phosphit allmählich über einen Zeitraum zugegeben werden kann, da dieses im Verlauf der Reaktion verbraucht wird.

Sollte ein geeignetes Kofaktor-Regenerierungssystem gefunden werden, sollte das Augenmerk auf eine Reaktionskaskade gelegt werden, wie bereits von Classen *et al.* im Batch durchgeführt (siehe **Kapitel 3.3.1** und **Abbildung 39**). In **Schema 49** ist hierzu eine schematische Darstellung einer Durchfluss-Reaktionskaskade im geschlossenen Kreislauf dargestellt, wobei jedes Modul als in sich geschlossenes System fungieren sollte. Dies soll ebenfalls betonen, dass das geschlossene System zukünftig als Blaupause gelten könnte. Ausgehend von Substrat **-104** würde im ersten Schritt die aktivierte Doppelbindung durch die CHaloH-YqjM reduziert werden. Anschließend sollte der organische Ausgang der FLLEX in das zweite geschlossene System (Modul 2) eingeführt werden, um die Ketofunktionalität des Zwischenprodukts **106** via Alkoholdehydrogenase (z.B. *LbADH* oder *RADH*) zum entsprechenden Alkohol zu reduzieren. Hier wäre allerdings zu ermitteln, ob eine weitere Kosubstrat-Zugabe notwendig wäre und wenn ja, wie diese am besten dem System zugegeben werden kann. Mit 2-Propanol könnte dies über die wässrige Phase geschehen.

## *Eigene Ergebnisse*

Wenn man hingegen in Modul 1 bereits die *RADH* für die Kofaktor-Regenerierung einsetzen würde, so würde Cyclohexanol als Kosubstrat eingesetzt werden. Anschließend würde das oxidierte Kosubstrat Cyclohexanon in Modul 2 eingeführt und folglich über die HaloTag™-*LbADH* (oder *RADH*) gepumpt. Die Kofaktor-Regenerierung könnte nun auf diese Weise stattfinden, ohne das weiteres 2-Propanol benötigt wird. Hier wäre allerdings zuerst zu testen, ob die HaloTag™-*LbADH* das Cyclohexanon/Cyclohexanol-System akzeptiert (**Schema 49**).



**Schema 49.** Reaktionskaskade im geschlossenen System mit kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung sowohl für die Reduktion CHaloH-YqjM (Modul 1), als auch anschließend für die HaloTag™-LbADH oder CatIB-RADH (Modul 2).

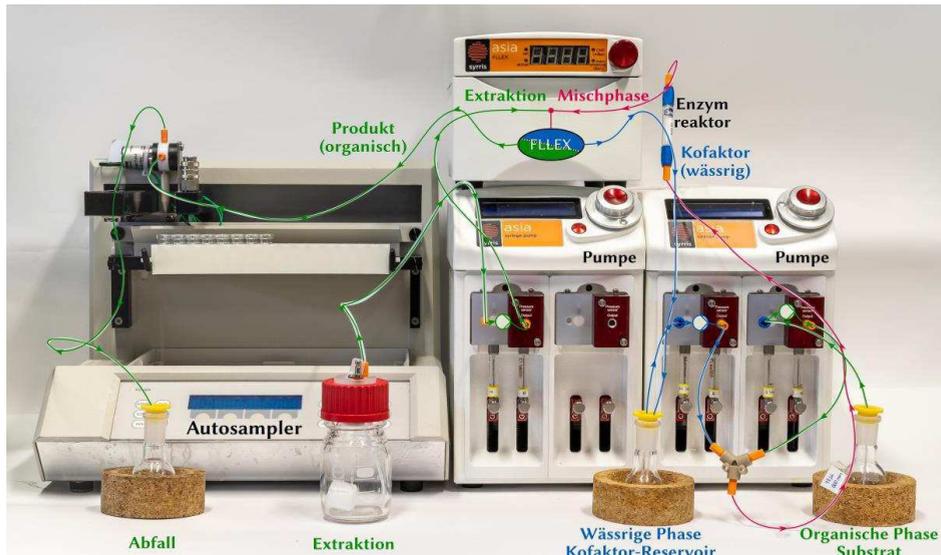
**Synopsis: *Old Yellow Enzymes* und YqjM**

- I. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Marisa Bickmann und des Forschungspraktikums von Diana-A. Amariei konnte die CHaloH-YqjM erfolgreich kloniert (für weitere Informationen siehe Bachelorarbeit) und anschließend immobilisiert werden.
- II. Erfolgreicher Einsatz der CHaloH-YqjM im einfachen Durchfluss mit stöchiometrischen Mengen an NADPH und Cyclohexanon (**108**) und (*E*)-2-Methyl-4-oxo-2-pentensäureethylester (**109**) als Modellsubstrate.
- III. Der Einsatz im geschlossenen Kreislauf (Kombinationssystem mit HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH) unter der Verwendung von 2-Propanol als Kosubstrat war nicht erfolgreich. Es konnte erst nach einiger Zeit ein Umsatz verzeichnet werden, der jedoch schnell wieder abfiel - unabhängig des eingesetzten Substrats.

### 3.4 Technische Zusammenfassung

#### 3.4.1 Realer Flussaufbau

Da sich bis zu diesem Zeitpunkt darauf beschränkt wurde, die eingesetzten Flussysteme lediglich schematisch zu zeigen, sollten nun einmal die verwendeten Geräte von Syrris anhand des Aufbaus zum geschlossenen System illustriert werden (**Abbildung 42**).



**Abbildung 42.** Abbildung des geschlossenen Kreislaufs mit entsprechenden Geräten von Syrris. Zu sehen sind zwei Pumpen (unten in der Mitte und unten rechts) à vier Pumpenkanäle von denen hier drei benötigt werden. Das obere Gerät entspricht der FLLEX zur Phasentrennung mit schematisch angedeutetem Funktionsprinzip. Rechts daneben ist eine Omnifit-Säule als Enzymreaktor und auf der linken Seite der Autosampler für die Sammlung des Produkts - an dieser Stelle könnte auch ein einfaches Becherglas eingesetzt werden. Farbcode: Blau - wässrige kofaktorhaltige Phase, grün - organische substrathaltige Phase und Lösungsmittel zur Extraktion, Magenta - Mischphase. Der Dank geht an Dr. Andreas Klein für die Aufnahme und Bereitstellung der Abbildung.

Sowohl der Aufbau als auch die Funktionsweise wurden bereits detailliert im Rahmen der vorliegenden Arbeit erläutert, sodass an dieser Stelle nur noch einmal die wichtigsten Punkte hervorgehoben werden sollten.

Generell wurden für das geschlossene System zwei Pumpen mit je zwei einzelnen Kanälen benötigt, von denen insgesamt drei zum Einsatz kamen. Abhängig von der Flussrate waren diese flexibel durch verschiedene Spritzen anzupassen. Die hier verwendeten gelben Spritzen deckten einen Bereich von 1.0–250  $\mu\text{L}/\text{min}$  ab. Für höhere Flussraten wurden zusätzlich blaue Spritzen eingesetzt, die normalerweise von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  bis 2.5 mL/min eingesetzt werden konnten. Daneben sind noch zwei weitere Modelle

vorhanden: Grüne Spritzen von 5.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  bis 1.25 mL/min und rote Spritzen von 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  bis 10 mL/min, die im Rahmen dieser Arbeit nicht benötigt wurden.

Ein Kanal (rechte Pumpe, linker Kanal) pumpte eine wässrige Phase (Blau) bestehend aus Kofaktor und Puffer in das System, der zweite Kanal (rechte Pumpe, rechter Kanal) wurde für die organische Phase (Grün) aus Substrat in Kosubstrat verwendet. Beide Kanäle wurden im weiteren Verlauf durch ein Y-Stück miteinander verknüpft und die so erzielte Durchmischung war für die durchgeführten Experimente ausreichend und entsprechende Ergebnisse reproduzierbar. Eine bessere Durchmischung vor dem Reaktor könnte beispielsweise durch den Einsatz von Chipmixern erzielt werden. Die nun resultierende Mischphase (Magenta) wurde über den Enzymreaktor gepumpt, damit die enzymkatalysierte Reaktion stattfinden konnte. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch die FLLEX in eine wässrige kofaktorhaltige und eine organische substrathaltige Phase und dazu wurde durch einen weiteren Kanal (linke Pumpe, linker Kanal) ein organisches Lösungsmittel zur Extraktion (Grün) zugeführt. Die wässrige Phase wurde schließlich in einem Vorlagekolben gesammelt und konnte so dem System erneut zugeführt werden, während die produktthaltige Lösung mittels Autosampler gesammelt wurde. Die Steuerung der Geräte erfolgte an der Asia Manager Software oder bei Experimenten über 24 h (und länger) an den Geräten, da die Software zeitweise abstürzte und den Lauf beendete.

### 3.4.2 Hergestellte (Enzym-)Reaktoren

 Abschließend werden noch einmal die unterschiedlichen (Enzym-)Reaktoren hervorgehoben, die während dieser Arbeit hergestellt wurden. Die Grundlagen der vorliegenden Arbeit liegen in vorangegangenen Arbeiten von Döbber *et al.* und insbesondere im Einsatz der HaloTag™-LbADH im einfachen Durchfluss.<sup>[36, 137]</sup> Dieser wurde adaptiert und darauf aufbauend konnte der neuartige geschlossene Kreislauf entwickelt werden, mit dem eine Kofaktor-Regenerierung und -Rezirkulierung in der kontinuierlichen Flusssynthese durch eine Phasentrennung ermöglicht wurde. So konnten ausgehend von vier verschiedenen Ketonen die jeweiligen Alkohole mit vollständiger Enantioselektivität in guten bis hervorragenden Raum-Zeit-Ausbeuten von bis zu 117 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> zugänglich gemacht werden. Da das System über 123 h ohne Umsatzeinbußen performte, waren zudem hervorragende *total turnover numbers* >12000 mol/mol für den Kofaktor NADP(H) möglich. Schließlich konnte gezeigt werden, dass mit lediglich einer kofaktorhaltigen

wässrigen Phase nacheinander zwei verschiedene Substrate ohne Kreuzkontamination umgesetzt werden können.<sup>[1]</sup>



Als nächstes wurde eine alternative Strategie zur Kofaktor-Regenerierung im Fluss entwickelt. Dazu wurde die literaturbekannte Phosphitdehydrogenase PhosDH mit einem HaloTag™ versehen, sodass diese ebenfalls z.B. in einer Omnifit-Säule auf HaloLink™-Resin immobilisiert werden konnte. Es wurde eine Zwei-Enzym-Säule bestehend aus HaloTag™-PhosDH und HaloTag™-LbADH hergestellt, wobei die PhosDH für die NADPH-Regenerierung zuständig war und die LbADH für die asymmetrische Reduktion des verwendeten Ketons. Nach Optimierung der Säule und des Systems konnte der entsprechende Alkohol mit nahezu vollständigem Umsatz mit substöchiometrischen Mengen an NADPH zugänglich gemacht werden.



Mit der Enreduktase YqjM wurde ein weiteres Enzym mit dem HaloTag™ versehen und für den Einsatz im Fluss vorbereitet. Nach Optimierung des Enzymreaktors konnte dieser erfolgreich im einfachen Durchfluss eingesetzt werden und die Doppelbindungen zwei verschiedener Substrate in guten bis sehr guten Umsätzen reduzieren. Für den Einsatz im geschlossenen Kreislauf wurde ein paralleles System aus YqjM für die Reduktion des Substrats und die LbADH für die Regenerierung des Kofaktors aufgebaut und beide Enzyme lagen separiert voneinander vor. Allerdings brachte dieser Aufbau einige Herausforderungen mit sich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht gelöst werden konnten.



Durch einfaches Befüllen einer Omnifit-Säule wurde ein Novozym 435-Enzymreaktor hergestellt. Mit diesem konnte im Anschluss im einfachen Durchfluss die Acetylierung eines Alkohols erfolgreich mit nahezu vollständigen Umsätzen abhängig von der Flussrate durchgeführt werden. Anschließend konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination aus Novozym 435 und HaloTag-LbADH eine enzymatische Dominoreaktion im Fluss durchgeführt werden kann. Dazu wurde zuerst die asymmetrische Reduktion eines Ketons durch die LbADH im geschlossenen Kreislauf vollzogen und folgend wurde die organische Phase nach der Phasentrennung der FLLEX direkt mit einem zuvor hergestellten Novozym 435-Enzymreaktor gekoppelt. Durch den zusätzlichen Einsatz von Molekularsiebsäulen konnte die Acetylierung erfolgreich für über 200 min betrieben werden.

**GFIL8-RADH-CatIBs** Neben der bisher eingesetzten HaloTag™-Immobilisierungsstrategie, wurde im Rahmen der Arbeit eine weitere innovative Strategie angewendet und in der Flusssynthese eingesetzt, was der Literatur entsprechend vorher nicht möglich war. Für diesen Zweck wurden sogenannte *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) der RADH hergestellt, die trotz der geringen Größe in einer Omnifit-Säule fixiert werden konnten. Nach einigen Optimierungen des Systems konnten die RADH-CatIBs im geschlossenen Kreislauf die asymmetrische Reduktion eines Ketons durchführen. Nach 120 h kontinuierlicher Produktion konnte der entsprechende Alkohol in sehr guter Ausbeute von 92 % mit 98 %*ee* isoliert werden. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $3.6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und durch den substöchiometrischen Einsatz von NADP(H) sowie kontinuierlicher Kofaktor-Regenerierung durch dasselbe Enzym, wurde zusätzlich eine TTN für NADP(H) von 374 mol/mol erzielt. Um die Stabilität der Säule hervorzuheben, wurde das System für weitere 160 h betrieben ohne Veränderung des *ee* und leichten Umsatzeinbußen.<sup>[2]</sup>

**immob. DMAP** Zuletzt sollte gezeigt werden, dass dem geschlossenen Kreislauf ebenfalls eine Reaktion vorgeschaltet werden konnte. Dabei sollte im ersten Schritt eine Morita-Baylis-Hillmann (MBH)-Reaktion unter Verwendung von immobilisiertem DMAP durchgeführt werden, welches für diesen Zweck in einer Omnifitsäule immobilisiert wurde. Auf diese Weise konnte die MBH-Reaktion erfolgreich im einfachen Durchfluss mit nahezu vollständigem Umsatz durchgeführt werden. Das produktthaltige Gemisch wurde nach Verlassen der Säule direkt mit dem geschlossenen System mit HaloTag™-LbADH verknüpft und nach der enzymkatalysierten Reduktion konnte ein entsprechendes Diol in dieser Dominoreaktion mit 10–32 % Umsatz zugänglich gemacht werden.

### 3.4.3 System- und Fehleranalyse

Wie bereits zu Anfang der vorliegenden Arbeit erwähnt, wurde sich im Verlauf der Arbeit auf die Ergebnisse und die Entwicklung der verschiedenen Flusssysteme fokussiert und dabei aufgetretene technische Problemstellungen oftmals vernachlässigt. Trotz der chemischen Erfolge ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass es durchaus sehr aufwendig war, die recht komplexen Systeme zu betreiben. Es wurde mit diesem System Neuland in der Arbeitsgruppe beschritten, weshalb immer wieder neue Herausforderungen auftraten, die es zu lösen galt. Neben einigen in den Service-Materialien des Herstellers diskutierten Lösungsansätzen, sind verschiedene wichtige Ansätze für vorher

unbekannte Engpässe erst zum Ende dieser Arbeit möglich geworden. Um den Arbeitseinsatz des Systems für folgende Arbeiten intensivieren zu können, sollten die nachfolgenden Aspekte beachtet werden, die sich speziell auf den laufenden und erhaltenden Betrieb fokussieren.

Die FLLEX zur Phasentrennung der wässrigen von der organischen Phase stellte eine essenzielle Basis für die vorliegende Arbeit dar, um die Kofaktor-Regenerierung und -Rezirkulierung in der kontinuierlichen Flusssynthese zu ermöglichen. Dabei handelte es sich jedoch um ein sehr sensibles Gerät, welches auf kleine Druckschwankungen und Undichtigkeiten im System mit einer fehlerhaften Phasentrennung reagierte. Dies ließ sich insbesondere an zwei Ursachen erkennen: Einerseits ließen sich in den Schläuchen von der Membrankammer der FLLEX zu den *back pressure regulator* (kurz *BPR*, dt. Gegendruckregler; von denen zwei vorhanden sind) zwei Phasen erkennen und andererseits erreichte das System nicht den voreingestellten Systemdruck von beispielsweise 3.0 bar (laut. Asia Manager Software). Dabei wurde der Druck des in diesem Fall Zuflusses für Lösungsmittel (Extraktion) der FLLEX als Anhaltspunkt genommen, da hier keine zusätzlichen Gegendrücke durch vorhandene Säulen entstanden und bei reibungsloser Funktionsfähigkeit lag dieser zwischen 3.0 bar und 3.1 bar. Die Hauptursachen für die auftretenden Probleme waren gewöhnlicherweise verstopfte Membrane und Glaschips in der FLLEX und den BPR, als auch undichte Kolben der Spritzen in den Spritzenpumpen und Anschlüsse innerhalb des Systems. Eine vorherige Säuberung des Systems und Filtration des Puffers und der substrathaltigen Lösungen halfen die Probleme zu minimieren. Nichtsdestotrotz kam es auch so immer wieder zu Salzablagerungen an den rauen Oberflächen der Chips, welche für eine Verstopfung und damit gehinderte Phasentrennung sorgten. Eine regelmäßige Kontrolle des Systems, vor und besonders während der Läufe, war entsprechend absolut notwendig, um die Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten. Zusätzlich konnten die Omnifit-Säulen mit blauen Endstücken als weitere Fehlerquelle identifiziert werden, da diese Säulen sehr anfällig für Glasbruch am Glasgewinde durch Verunreinigungen feiner Partikel waren, was außerdem eine Beschädigung des innenliegenden abdichtenden Gummirings zur Folge hatte. Durch das Umwickeln des Gewindes mit Teflonband bei neuen Säulen konnte auch dies schließlich minimiert werden.

## 4 EXPERIMENTELLER TEIL

*Sometimes we search for one thing but discover another.*

Barney Stinson  
aus der Serie »How I Met Your Mother« (S03E14)

### 4.1 Allgemeine Angaben

#### 4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Reagenzien und Lösungsmittel kommerziell erworben. Lösungsmittel wurden zudem nach laborüblichen Vorschriften von Wasser befreit.<sup>[271]</sup>

#### 4.1.2 Kleinteile der Durchflusschemie

Kleinteile (z.B. Schläuche, Adapter, Verteiler, Schrauben und Schneidringe) wurden entweder von Syrris oder durch die Firma Techlab erworben. Die Spritzen in den Spritzenpumpen wurden ebenfalls von Syrris erworben oder von der SETonic GmbH überholt.

### 4.2 Analytik, Geräte und Software

#### 4.2.1 Durchflusschemie

Für die Durchflusschemie wurden Geräte der Firma Syrris des Typs Asia verwendet.

*Spritzenpumpen:* Die Spritzenpumpen wurden bis zu einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit gelben (50  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ) und für höhere Flussraten mit blauen (500  $\mu\text{L}/1.00 \text{ mL}$ ) Spritzen ausgerüstet.

*FLLEX:* Das FLLEX (*Flow Liquid Liquid EXtraction*)-Modul wurde mit originalen FLLEX PTFE oder Merck FHLP02500 PTFE-Membranen ausgestattet. Im Falle der Merck-Membrane musste zusätzlich der Polyethylen-Träger entfernt werden. Der Systemdruck wurde auf 3.0 bar festgelegt und der *CMP* (*cross-membrane pressure*) war abhängig vom Lösungsmittel. Weitere Werte können der Software Asia Manager, dem Service-Handbuch der FLLEX oder einschlägigen Experimenten (z.B. 100 mbar für EtOAc, 50 mbar für  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 50 mbar für Diisopropylether) entnommen werden.

*Temperatursteuerung:* Für Temperaturen über 37 °C wurde der Asia Heater mit Säulenaufsatz verwendet. Für Temperaturen unter 37 °C wurde ein temperiertes Wasserbad verwendet, in das die benutzte Säule eingetaucht wurde.

*Autosampler:* Als Autosampler wurde jener des Typs FC 203B der Firma *Gilson* verwendet. Dieser wurde entweder über die Asia Manager Software gesteuert oder im manuellen Modus direkt am Gerät.

*Software:* Als Software diente die Asia Manager Software (Version 1.71). Mit Hilfe dieser wurden alle Geräte gesteuert, als auch die entsprechenden Flussraten definiert.

#### 4.2.2 Präparative Säulen-/Flashchromatographie

Die Produktisolierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit säulenchromatographisch an Kieselgel 60M (0.040–0.063 mm, 230–400 mesh) der Firma Macherey-Nagel unter leicht erhöhtem Druck durch Druckluft. Die verwendete mobile Phase ist in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben, wobei überwiegend PE:EtOAc-Lösungsmittelgemische verwendet wurden.

#### 4.2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die qualitative Verfolgung der Reaktionen erfolgte mittels der Dünnschichtchromatographie. Hierfür wurden Fertigfolien des Typs POLYGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub> beschichtet mit 0.2 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Entwicklung erfolgte für gewöhnlich einerseits mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm und andererseits durch das Anfärben mittels wässriger Kaliumpermanganat-Lösung (1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25 mL 10 %iger NaOH, 200 mL H<sub>2</sub>O) und anschließender Trocknung mit einem Heißluftföhn. Als mobile Phase wurden überwiegend PE:EtOAc-Lösungsmittelgemische verwendet.

#### 4.2.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance DRX 600 aufgenommen. Als Lösungsmittel für die Proben dienten deuterierte Lösungsmittel, welche käuflich erworben wurden; speziell CDCl<sub>3</sub> und DMSO-d<sub>6</sub>. Die Kalibrierung erfolgte ebenfalls auf diese Lösungsmittel bei 297 K und lautet wie folgt: CDCl<sub>3</sub> δ [ppm]: <sup>1</sup>H-NMR = 7.26, <sup>13</sup>C-NMR = 77.2; DMSO-d<sub>6</sub> δ [ppm]: <sup>1</sup>H-NMR 2.50, <sup>13</sup>C-NMR = 39.5.

Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu diesen Resonanzen aufgenommen. Zur Auswertung wurden ferner DEPT-(135°-Pulse)-, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HSQC und <sup>1</sup>H-

<sup>13</sup>C-HMBC-Spektren aufgenommen. Die abschließende Auswertung erfolgte mittels der Software MestReNova 10 der Firma Mestrelab Research S.L.. Konnte keine eindeutige Zuordnung der Peaks durchgeführt werden, so sind diese mit einem \* markiert.

#### 4.2.5 Infrarotspektroskopie (IR)

Infrarotspektren wurden mit einem PerkinElmer SpectrumTwo Infrarotspektrometer im ATR-Verfahren (*attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) vermessen. Die Absorptionsbanden im Spektrum sind in  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] angegeben.

#### 4.2.6 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*, Hochauflösende Massenspektrometrie) wurde im Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) durchgeführt. Verwendet wurden folgende Geräte: UHR-QTOF maXis 4G von Bruker Daltonics oder das Ion-Trap-API-Massenspektrometer Finnigan LCQ Deca von Thermo Quest mit Elektronensprayionisation (ESI). Die Messungen wurden von Dr. P. Tommes ausgeführt.

#### 4.2.7 Gaschromatographie (GC)

Die GC wurde im Rahmen dieser Arbeit für Umsatzbestimmungen als auch für die Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen (*ee*) verwendet. Als Gerät diente das GC-System TraceGC von Thermo Scientific. Die Parameter und benutzten chiralen stationären Phasen sind den jeweiligen Produkten angefügt.

#### 4.2.8 Bestimmung des spezifischen Drehwertes [ $\alpha$ ]

Die Bestimmung der Drehwerte von optisch aktiven und enantiomerenreinen Proben wurde mit Hilfe des Polarimeters P8000-TF der Firma Krüss durchgeführt. Der Drehwinkel in einer 0.5 dm langen Küvette bei 598 nm (Na-D-Linie) mindestens dreimal gemessen. Die Proben temperatur betrug 20 °C. Ausgehend vom gemessenen Drehwinkel konnte der spezifische Drehwert  $[\alpha]_D^{20}$  über  $[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c \cdot d}$  bestimmt werden. Dabei entspricht  $\alpha$  dem gemessenen Drehwinkel,  $c$  der Konzentration der Lösung in g/100 mL und  $d$  der Länge der Küvette in dm.

### 4.3 Methoden

#### AAV 1: Allgemeine Vorschrift zum Enzymaufschluss

*HaloTag*<sup>TM</sup>-LbADH: Als Grundlage wurde die HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH, die in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurde, genutzt. Dazu wurden 2.0 g Zellpellet in 8.0 mL KP<sub>i</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst. Der anschließende Zellaufschluss wurde mittels Ultraschall und der Bandelin SONOPLUS Sonotrode mit einer SONOPLUS KE76-Kegelspitze im Modus 2 x 5 min, 5 x 10 %-Zyklen bei einer Leistung von 35 % durchgeführt. Der erhaltene Rohextrakt wurde bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 7084 *rcf* zentrifugiert und der erhaltene Überstand dekantiert und ohne weitere Schritte für die Immobilisierung, die hier zeitgleich auch eine Reinigungsmethode darstellt, genutzt. Nicht eingesetztes Lysat wurde für die spätere Verwendung aliquotiert (1.0 mL Aliquots), mit N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

#### AAV 2: Aktivitätsassay HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH

Die Aktivität des Zellrohextrakts wurde vor und nach der Immobilisierung durch einen photometrischen Assay bestimmt. Dabei wurde die NADPH-Abnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm und 30 °C in einem Shimadzu UV-Spektrometer UV-1800 verfolgt. Die verwendete Küvette hatte ein Volumen von 1.00 mL und wurde mit einer Lösung aus 970 µL (11 mM) Acetophenon (**16**), 20 µL (10 mM) NADPH und 10 µL Enzym befüllt. Als Puffer wurde KP<sub>i</sub> (100 mM, pH=7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) verwendet. Die Gesamtaktivität vor der Immobilisierung betrug 768 U, nach der Immobilisierung 406 U. Somit befand sich in der Säule eine theoretisch maximale Aktivität des Enzyms von 362 U.

#### AAV 3: Allgemeine Vorschrift für die Immobilisierung mit HaloTag<sup>TM</sup>

Die Immobilisierung erfolgte grundlegend nach einer Vorlage von Döbber *et al.*<sup>[36]</sup> Dazu wurde eine Omnifit-Säule mit dem HaloLink<sup>TM</sup>-Resin und unter Zuhilfenahme einer 3.0 mL-Spritze mit Luer-Lock-Adapter und passendem Schlauch (ID: 0.5 mm) befüllt. Dazu wurde das HaloLink<sup>TM</sup>-Resin in Puffer suspendiert, in die Spritze gefüllt und anschließend in die Säule gespritzt. Auf diese Weise konnten Lufteinschlüsse verhindert und das Säulenvolumen nahezu vollständig ausgenutzt werden. Das Nassgewicht in der Säule betrug z.B. ca. 400 mg für eine 3 x 50 mm Säule. Anschließend wurde die befüllte Säule mit einer Syrris Asia-Spritzenpumpe (mit gelben Spritzen) verbunden und für 30 min bei einer Flussrate von 250 µL/min mit Puffer gespült. Für die eigentliche

Immobilisierung wurde nun das vorhandene Lysat bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  über die Säule gepumpt und abschließend der Spülschritt wiederholt. Die Säule war nun einsatzbereit und wurde bei Nichtnutzung bei 4 °C über Puffer mit geschlossenen Enden gelagert.

Für die Herstellung der HaloTag™-LbADH/HaloTag™-PhosDH-Kombisäule wurden die verwendeten Lysate erst gemischt und anschließend wurde die Mischung über die Säule gepumpt.

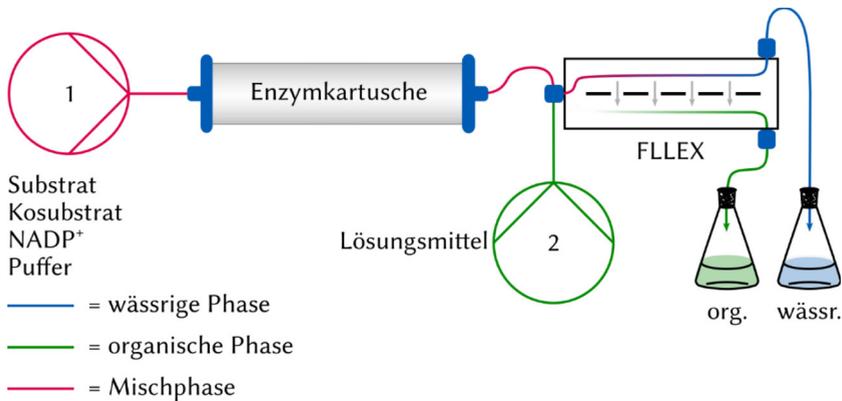
#### AAV 4: Allgemeine Synthese der racemischen Standards

Das Keton der Wahl (1.0 Äq) wurde in 1.8 mL Lösungsmittel gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 1.6 Äq Cer(III)chlorid•Heptahydrat hinzugefügt und solange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Nun wurde Natriumborhydrid (2.0 Äq) portionsweise (vier Portionen, jede nach 15 min) hinzugefügt. Nach Zugabe der letzten Portion wurde für weitere 60 min gerührt. Nun wurde ein Tropfen Essigsäure hinzugefügt und es bildete sich ein grauer Niederschlag. Durch die Zugabe von dest. Wasser konnte eine homogene Lösung wiederhergestellt werden, die dreimal mit EtOAc extrahiert wurde. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch mit PE:EtOAc (8:2) als mobile Phase. Das Produkt konnte als leicht gelbes Öl erhalten werden. Die exakten Einwaagen und Ausbeuten sind in **Tabelle 19** gezeigt.

**Tabelle 19.** Einwaagen und Ergebnisse der Synthese der racemischen Standards.

	Keton <b>83</b>	Keton <b>25a</b>	Keton <b>81</b>	Keton <b>96</b>
Substrat	100 mg, 0.5 mmol	100 mg, 0.5 mmol	220 mg, 1.3 mmol	100 mg, 0.7 mmol
Lösungsmittel	1.8 mL Methanol	1.8 mL Ethanol	1.8 mL Methanol	2.2 mL Methanol
CeCl <sub>3</sub> •H <sub>2</sub> O	205 mg, 0.8 mmol	196 mg, 0.8 mmol	1.1 Äq, 523 mg, 1.1 mmol	1.6 Äq, 252 mg, 1.1 mmol
NaBH <sub>4</sub>	40 mg, 1.1 mmol	38 mg, 1.0 mmol	101 mg, 2.7 mmol	49 mg, 1.3 mmol
Ausbeute [%]	<i>rac-84</i> , 94	<i>rac-85</i> , 80	<i>rac-83</i> , 72	<i>rac-97</i> , 75

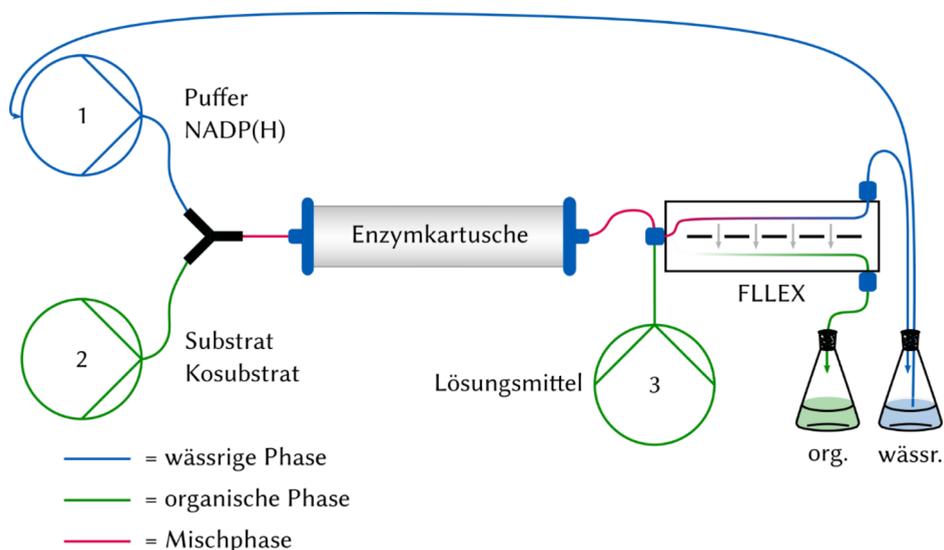
## AAV 5: Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss



Es wurde eine Lösung aus 10/30/50 mM Substrat, 10/15 %v/v 2-Propanol,  $KP_i$ -Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM  $MgCl_2$ ) und 2.0 mM  $NADPNa_2$  hergestellt.

Dazu wurde das Substrat zuerst in einem Vial 1 in 2-Propanol vorgelöst; in Vial 2 wurde dasselbe mit  $NADPNa_2$  in Puffer durchgeführt. Anschließend wurden beide Lösungen unter ständigem Rühren gemischt. Die erhaltene Lösung wurde nun in Pumpe 1, die bis zu Flussraten von 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  mit gelben Spritzen bestückt war, gefüllt. Als Enzymreaktor wurde eine Omnifit-Säule (3 x 50 mm) mit HaloTag™-*LbADH* verwendet. Der Lauf wurde mit entsprechender Flussrate (an geeigneter Stelle definiert) gestartet und durch die Enzymkartusche gepumpt. Das Produkt wurde anschließend durch die FLLEX mit einem Lösungsmittel der Wahl (Diisopropylether, Ethylacetat oder Dichlormethan) extrahiert und mit einem Autosampler in beliebigen Zeitabständen gesammelt. Mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte eine schnelle Umsatzüberprüfung. Die exakte Bestimmung des Umsatzes und des *ee* erfolgte mittels GC oder HPLC

## AAV 6: Allgemeine Vorschrift für das Screening und die Synthese im geschlossenen Kreislauf



### Grundlegende Informationen

*Pumpe 1* (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): 0.5 mg (0.64 mmol) NADPN<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL KP<sub>7</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst.

*Pumpe 2* (Lösung 2, substrathaltige organische Phase): Zur Einstellung verschiedener Konzentrationen wurde das Substrat in 10 %v/v 2-Propanol gelöst.

*Pumpe 3* (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Verschiedene Lösungsmittel zur Extraktion, wie Diisopropylether, Essigsäureethylester oder Dichlormethan wurden verwendet.

*FLLEX*: Der Systemdruck wurde auf 3.0 bar fixiert. Der *CMP* war anhängig vom verwendeten Lösungsmittel (Diisopropylether 50 mbar, Ethylacetat 100 mbar).

### Reaktionsverfahren für das Screening

Insgesamt wurden drei verschiedene Pumpen benötigt, um das Screening der Reaktionsbedingungen durchführen zu können. Pumpen 1 und 2 wurden mit gelben Spritzen (50  $\mu$ L und 100  $\mu$ L) bestückt, sofern die Flussrate 250  $\mu$ L/min nicht überstieg, und mit den entsprechenden Lösungen 1 und 2 befüllt. Als Enzymreaktor wurde eine mit Omnifit-Säule mit immobilisierter HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH (3 x 50 mm, Immobilisierung siehe AAV 3) verwendet. Pumpen 1 und 2 wurden mit entsprechender Flussrate gestartet und durch ein Y-Stück miteinander verknüpft. Die entstandene Mischphase wurde durch die

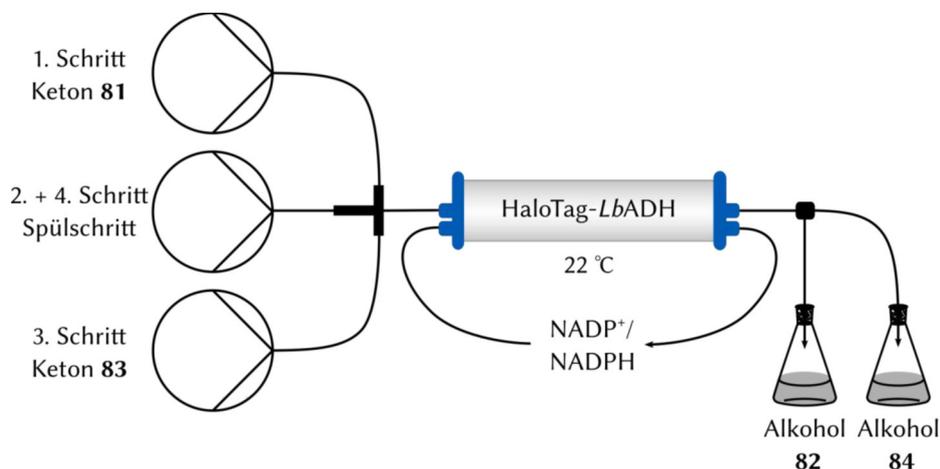
Enzymkartusche gepumpt, in der das verwendete Keton zum Alkohol reduziert wurde. Anschließend wurde die Mischphase durch die FLLEX in eine wässrige und organische Phase separiert. Nun, nachdem das Totvolumen des Systems überwunden wurde, wurde die wässrige Phase zurück in das Vorlagegefäß von Pumpe 1 geleitet, um eine Rezirkulation und Wiederverwendung des Kofaktors zu ermöglichen. Die organische produktthaltige Phase wurde hingegen mit einem Autosampler gesammelt.

Dabei wurden neben verschiedenen Substraten und Substratkonzentrationen auch verschiedene Flussraten getestet - entsprechende Parameter sind an geeigneter Stelle angegeben. Die Analyse des Produkts wurde unter der Verwendung verschiedener Verfahren wie GC, HPLC oder <sup>1</sup>H-NMR durchgeführt.

#### Reaktionsverfahren für die Synthese im geschlossenen Kreislauf.

Das Verfahren entspricht weitestgehend dem des Screenings. Allerdings wurde, nachdem der Vorlagekolben von Pumpe 2 (Substrat) leergelaufen war, 2-Propanol hinzugefügt, um das System zu spülen (Dauer war abhängig von den verwendeten Flussraten). Die anderen Pumpen blieben unberührt und liefen weiter. Die Isolierung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch (*n*-Pentan:EtOAc 9:1). Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diisopropylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die abschließende Analyse auf Substrat- oder Produktkontaminationen erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR.

### AAV 7: Vorschrift für Substratwechsel im geschlossenen Kreislauf



#### Grundlegende Informationen

*Pumpe 1* (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): 0.5 mg (0.64 mmol)  $\text{NADPNa}_2$  wurde in 1.0 mL  $\text{KP}_i$ -Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gelöst.

*Pumpe 2* (Lösung 2, substrathaltige organische Phase): Es wurden drei separate Lösungen hergestellt. Lösung 1: Keton **81** (23 mg, 0.14 mmol) wurde in 260  $\mu\text{L}$  2-Propanol gelöst, was in einer 500 mM Lösung resultierte. Lösung 2: Keton **83** (21 mg, 0.11 mmol) wurde in 512  $\mu\text{L}$  2-Propanol gelöst, was einer 200 mM Lösung entsprach. Die Reaktorkonzentrationen entsprachen aufgrund des Flussratenverhältnisses 50 bzw. 20 mM.

*Pumpe 3* (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Verschiedene Lösungsmittel zur Extraktion, wie Diisopropylether, Essigsäureethylester oder Dichlormethan wurden verwendet.

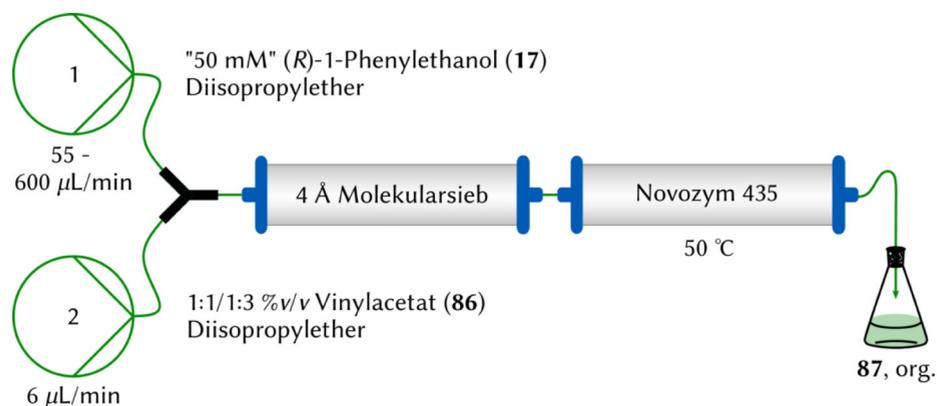
*Spüllösung* (für Pumpe 1): 300 mM Aceton in  $\text{KP}_i$ -Puffer.

#### Reaktionsverfahren

Das Ziel des konsekutiven Experiments war die Umsetzung zwei verschiedener Ketone mit nur einer einzigen wässrigen kofaktorhaltigen Phase. Die Vorgehensweise entsprach dennoch im Grunde der AAV 6. Zuerst wurden die Pumpen 1 und 2 mit den Lösungen 1 und 2 befüllt. Das Keton **71** (Lösung 1) wurde anschließend zuerst umgesetzt (Schritt 1). Die Flussraten betragen hier: Pumpe 1 90  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 2 9.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 3 99  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nach dem eigentlichen abschließenden 2-Propanol-Spülvorgang wurde ein weiterer Spülvorgang mit der Spüllösung (Pumpe 1, 300 mM Aceton in  $\text{KP}_i$ ) für

10 min bei 90  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt (Schritt 2). Dafür wurde zunächst Pumpe 2 in den Vorlagekolben für die kofaktorhaltige wässrige Phase entleert und nun die Spritze mit der Spüllösung befüllt. Bis diese das Totvolumen durchlaufen hatte, wurde der Rest der kofaktorhaltigen Lösung, der sich noch im System befand, aufgefangen. Anschließend wurde Keton **83** (Lösung 2) nach dem gleichen Prinzip umgesetzt (Schritt 3). Das System wurde mit derselben wässrigen kofaktorhaltigen Phase neu gestartet. Die Flussraten betragen: Pumpe 1 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 2 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 3 55  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Der abschließende Spülvorgang mit der Spüllösung wurde aufgrund der niedrigeren Flussrate nur für 10 min durchgeführt (Schritt 4). Der Alkohol **82** wurde vollständig umgesetzt und mit 92 % Ausbeute als gelbes Öl ( $ee > 99\%$ , 21 mg, RZA 114  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , nach Schritt 1 und 2) erhalten. Für den Alkohol **84** wurde eine Produktmischung von 97/3 erhalten, die säulenchromatographisch (*n*-Pentan:EtOAc 8:2) gereinigt wurde. Abschließend konnte das Produkt **84** als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 87 % ( $ee > 99\%$ , 18 mg, RZA 31  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , nach Schritt 3 und 4) erhalten werden.

#### AAV 8: Allgemeine Vorschrift für das Screening im einfachen Durchfluss mit der Lipase CalB (Novozym 435)



#### Grundlegende Information

*Pumpe 1* (Lösung 1, Alkohol **17**): Es wurde eine 50 mM Lösung des Alkohols **17** in Diisopropylether angesetzt.

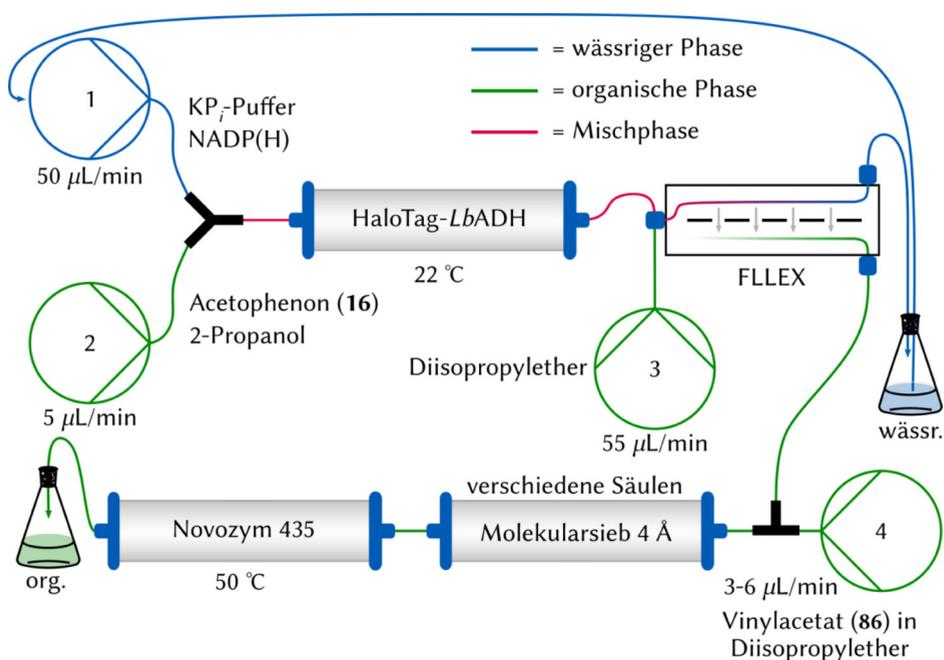
*Pumpe 2* [(Lösung 2, Vinylacetat (**86**)): Vinylacetat (**86**) wurde zu 1:1 oder 1:3 %v/v Vinylacetat (**86**) zu Diisopropylether im Lösungsmittel gelöst.

Druck: Der Systemdruck wurde auf 3.0 bar fixiert.

### Reaktionsverfahren

Die Pumpen wurden vorab mit den vorbereiteten Lösungen 1 und 2 befüllt und mit einem Y-Stück verknüpft. Eine mit 150 mg CalB befüllte Omnifit-Säule (3 mm x 50 mm) wurde als Enzymreaktor verwendet. Die Flussraten für Pumpe 1 wurden variiert und daraus ergaben sich ebenfalls verschiedene Vinylacetat (**86**)-Konzentrationen in der Lösung. Pumpe 2 wurde hingegen auf 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  fixiert und nachdem der Fluss das Totvolumen des Systems überwunden hatte, begann die Sammlung der Produktlösung mittels des Autosamplers. Eine Umsatzbestimmung wurde mit Hilfe des  $^1\text{H}$ -NMR durchgeführt.

### AAV 9: Geschlossener Kreislauf mit Lipase CalB (Novozym 435)



### Grundlegende Information

**Pumpe 1** (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): 0.5 mg (0.64  $\mu\text{mol}$ ) NADPNa<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL  $\text{KPi}$ -Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gelöst.

**Pumpe 2** (Lösung 2, substrathaltige organische Phase): Es wurde eine 0.5 M Lösung aus Acetophenon (**16**) in 2-Propanol angesetzt.

**Pumpe 3** (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Für das FLLEX-System wurde Diisopropylether als Extraktionsmittel verwendet.

*Pumpe 4:* Es wurden zwei verschiedene Lösungen unterschiedlicher Konzentration von Vinylacetat (**86**) in Diisopropylether angesetzt (1:1 oder 1:3 %v/v), die separat voneinander getestet wurden.

*Enzymreaktoren:* Für den Aufbau wurden eine HaloTag<sup>TM</sup>-LbADH (3 x 50 mm) und eine CalB-Säule (3 x 50 mm; 150 mg) hergestellt.

*Trockensäulen:* Es wurden verschiedene Trockensäulen benötigt. Dazu wurden Omnifit-Säulen mit aktiviertem 4 Å Molekularsieb befüllt.

*FLLEX:* Es wurde die FHLP02500 PTFE-Membran von Merck mit entferntem Trägermaterial verwendet. Die CMP der FLLEX betrug 50 mbar bei einem Systemdruck von 3.0 bar.

### Reaktionsverfahren

Das System wurde dem geschlossenen Kreislauf in AAV 6 entsprechend begonnen. Nachdem das Totvolumen durchlaufen worden war, wurde der organische Ausgang der FLLEX nicht gesammelt, sondern über ein T-Stück mit Pumpe 4 verknüpft. Der kombinierte Fluss wurde über keine/eine/zwei Trockensäule/n und anschließend über die Lipase CalB geleitet. Die Flussraten betragen: Pumpe 1 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 2 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 3 55  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe 4 3–6  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Die Sammlung der Produktlösung erfolgte mittels des Autosamplers in definierten Zeitabständen. Die Überprüfung des Umsatzes erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.

### **AAV 10: Vorschrift für Screening im einfachen Durchfluss (RADH-CatIBs)**

Systemaufbau siehe AAV 5. In Vial 1 wurde eine 15 mM Lösung von Cyclohexanon (**98**) oder  $\omega$ -Chloroacetophenon (**96**) mit 4.0 mL Gesamtvolumen und 7.5 %v/v 2-MeTHF hergestellt. In Vial 2 wurde eine ebenfalls 15 mM aus NADPH in TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) angesetzt. Die beiden Lösungen wurden anschließend gemischt und unter ständigem Rühren in Kanal 1 einer Syrris Asia-Pumpe gefüllt. Als Enzymreaktor wurde eine RADH-CatIBs befüllte Omnifit-Säule (Größe: 5 x 50 mm) verwendet. Der Lauf wurde mit gewünschter Flussrate gestartet (an entsprechender Stelle angegeben). Die Extraktion erfolgte durch das FLLEX-System mit Diisopropylether mit identischer Flussrate, und das resultierende Produktgemisch wurde mit einem Autosampler mit Probennahme in 20 min Abständen gesammelt, nachdem das Totvolumen durchlaufen worden war. Mittels Dünnschichtchromatographie (PE:EtOAc 9:1) erfolgte eine schnelle Umsatzüberprüfung. Die exakte Bestimmung des Umsatzes

und des *ee* erfolgte gaschromatographisch. Die GC-Methoden sind an entsprechender Stelle angefügt.

### **AAV 11: Allgemeine Vorschrift für Screening und Synthese im geschlossenen Kreislauf (RADH-CatIBs)**

#### Grundlegende Information

Der Systemaufbau entspricht dem aus AAV 6.

*Pumpe 1* (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): In einem 10 mL Spitzkolben wurden 4.0 mL einer Lösung aus 2.0/10/12.5/15 mM NADPNa<sub>2</sub> in TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) angesetzt. 2.0 mM entsprach dem Ansatz mit substöchiometrischer Menge an Kofaktor.

*Pumpe 2* (Lösung 2, substrathaltige organische Phase): Das Keton **96** wurde in Cyclohexanol zu 100/125/150 mM gelöst. Aufgrund des Flussratenverhältnisses betrug die tatsächliche Konzentration im Reaktor jedoch 10/12.5/15 mM und war somit äquivalent zur Kofaktor-Konzentration (bei idealer Mischung).

*Pumpe 3* (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Zur Extraktion in der FLLEX wurde Diisopropylether als Lösungsmittel verwendet.

*FLLEX*: Es wurde die FHLP02500 PTFE-Membran von *Merck* mit entferntem Trägermaterial verwendet. Die CMP der FLLEX betrug 50 mbar bei einem Systemdruck von 3.0 bar.

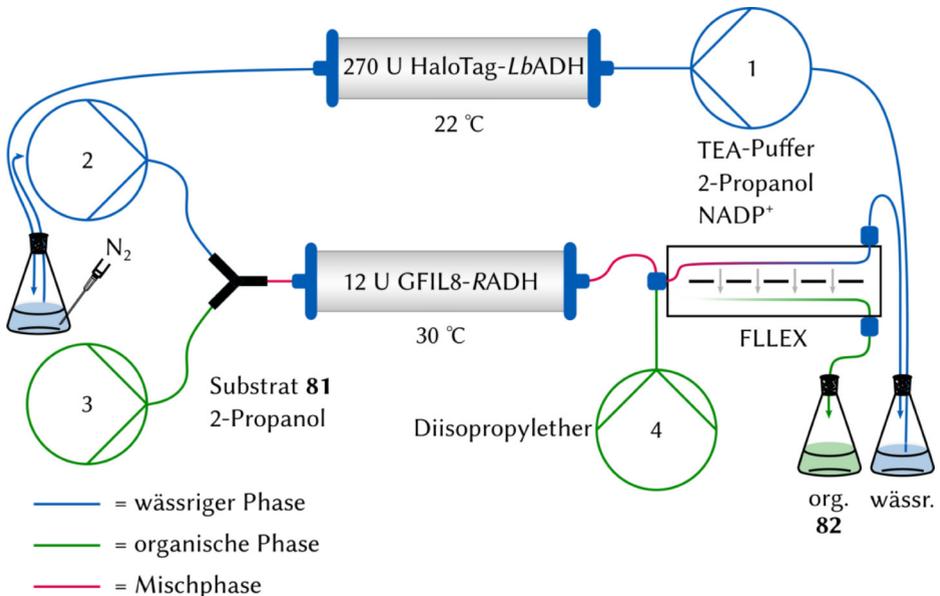
#### Reaktionsverfahren

Die Pumpen wurden vorab mit den vorbereiteten Lösungen 1 und 2 befüllt. Eine mit RADH-CatIBs (GFIL8) befüllte Omnifit-Säule (Screening: 5 mm x50 mm, 55 mg/12 U; Synthese: 5 mm x 150 mm 138 mg/30 U) wurde als Enzymreaktor verwendet. Die Flussraten wurden wie folgt eingestellt: Pumpe 1 30  $\mu$ L/min, Pumpe 2 3  $\mu$ L/min, Pumpe 3 33  $\mu$ L/min. Nachdem der Fluss das Totvolumen des Systems überwunden hatte, begann die Sammlung der produkthaltigen Lösung mit Hilfe des Autosamplers im manuellen zeitgesteuerten Modus (Bedienung am Gerät) in 60 min Abständen. Zudem wurde die wässrige Phase in den Vorlagekolben von Pumpe 1 zurückgeführt, um die Rezirkulation und Wiederverwendung des Kofaktors zu ermöglichen. Der Umsatz sowie der *ee* wurden gaschromatographisch überprüft - die Methode ist an entsprechender Stelle erwähnt.

### AAV 12: Allgemeine Vorschrift für das Packen/Befüllen einer CatIB-Säule

Um die RADH-CatIBs physikalisch in einer Säule einzuschließen, wurde Kieselgel als weitere stationäre Phase verwendet. Für das Screening für optimale Reaktionsbedingungen wurde eine 5 x 50 mm Omnifit-Säule verwendet. Für die kontinuierliche Synthese des Alkohols **97** wurde hingegen eine 5 x 150 mm Omnifit-Säule mit verstellbarem Stempel verwendet. Beide Säulen wurden zunächst mit einer Kieselgelschicht (ca. 2 mm hoch) befüllt. Anschließend wurde von der gegenüberliegenden Seite mit Puffer (TEA 50 mM, pH 7, 0,8 mM CaCl<sub>2</sub>) gespült, um das Kieselgel zu verdichten. Darauf wurde eine Mischung (gut durchmischt!) aus CatIBs und Kieselgel (1:2,5 %w/w) gefüllt und der Spülvorgang wiederholt. Schließlich wurde vorsichtig (!) eine weitere Schicht Kieselgel zugefügt, die dabei etwas höher sein musste als der obere Stempel, damit beim Verschließen eine leichte Kompression stattfand. Dies war zwingend notwendig, damit ein Rausspülen der CatIBs verhindert werden konnte. Der Spülvorgang wurde ein nochmal durchgeführt.

### AAV 13: Allgemeine Vorschrift für CatIBs und HaloTag™-LbADH (kombiniertes System) im geschlossenen Kreislauf



### Grundlegende Information

*Pumpe 1* (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): 35.4 mg NADPNa<sub>2</sub> wurde in 3.0 mL TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) gelöst. Anschließend wurden 32  $\mu$ L 2-Propanol zugegeben.

*Pumpe 2*: (Lösung 2, gesammelte Lösung von Pumpe 1).

*Pumpe 3* (Lösung 3, substrathaltige organische Phase): Es wurden 150 mM Keton **81** in 2-Propanol gelöst (Lösung musste ggf. leicht temperiert werden).

*Pumpe 4* (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Für das FLLEX-System wurde Diisopropylether als Extraktionsmittel verwendet.

*Enzymreaktoren*: Für den Aufbau wurden eine HaloTag™-LbADH und eine RADH-CatIB-Säule benötigt.

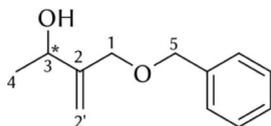
*FLLEX*: Es wurde die FHLP02500 PTFE-Membran von Merck mit entferntem Trägermaterial verwendet. Die CMP der FLLEX betrug 50 mbar bei einem Systemdruck von 3.0 bar.

### Reaktionsverfahren

Die Pumpen wurden mit gelben Spritzen (50  $\mu$ L und 100  $\mu$ L) ausgestattet und anschließend wurden Pumpe 1/3/4 mit den hergestellten Lösungen befüllt. Pumpe 1 wurde gestartet und über die HaloTag™-LbADH geleitet, in einem 2.0 mL Vial aufgefangen und solange gesammelt, bis ca. 1.0 mL vorhanden waren. Die Lösung wurde vorsichtig mit einem N<sub>2</sub>-Strom durchspült, um gebildetes Aceton partiell zu entfernen. Die restliche Vorgehensweise entspricht dem geschlossenen Kreislauf mit den RADH-CatIBs und ist in AAV 11 erläutert.

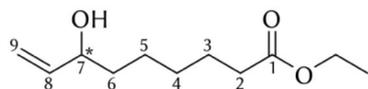
## 4.4 Synthesen und Analytik

### 4.4.1 *rac*-3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-ol (*rac*-85)



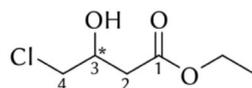
Der allgemeinen Vorschrift folgend wurde Keton **25a** (1.0 Äq., 100 mg, 0.5 mmol) in 1.8 mL Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Cer(III)chlorid•Heptahydrat (1.6 Äq., 196 mg, 0.8 mmol) zugefügt und es wurde so lange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Die folgende Zugabe von Natriumborhydrid (2.0 Äq., 38 mg, 1.0 mmol) erfolgte portionsweise in vier Portionen und jede nach 15 min. Nach Hinzufügen eines Tropfens Essigsäure bildete sich ein grauer Niederschlag und die Zugabe von dest. H<sub>2</sub>O resultierte wieder in einer homogenen Lösung. Diese wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produkts *rac*-**85** erfolgte säulenchromatographisch mit PE:EtOAc (8:2) als mobile Phase. Das Produkt *rac*-**85** konnte als leicht gelbes Öl mit einer Ausbeute von 80 % erhalten werden. Die analytischen Daten stimmten mit jeder der enantiomerenreinen Verbindung überein (vgl. Kapitel 4.4.8).

### 4.4.2 *rac*-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (*rac*-84)



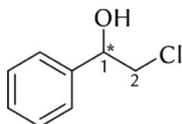
Der allgemeinen Vorschrift folgend wurde Keton **83** (1.0 Äq., 100 mg, 0.5 mmol) in 1.8 mL Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Cer(III)chlorid•Heptahydrat (1.6 Äq., 205 mg, 0.8 mmol) zugegeben und solange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Die nun folgende Zugabe von Natriumborhydrid (2.0 Äq., 40 mg, 1.1 mmol) erfolgte portionsweise in vier Portionen und jede nach 15 min. Nach Hinzufügen eines Tropfens Essigsäure bildete sich ein grauer Niederschlag und die Zugabe von dest. H<sub>2</sub>O resultierte wieder in einer homogenen Lösung. Diese wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produkts *rac*-**84** erfolgte säulenchromatographisch mit PE:EtOAc (8:2) als mobile Phase. Das Produkt *rac*-**84** konnte als leicht gelbes Öl mit einer Ausbeute von 94 % erhalten werden. Die analytischen Daten stimmten mit jeder der enantiomerenreinen Verbindung überein (vgl. Kapitel 4.4.9).

#### 4.4.3 *rac*-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (*rac*-82)



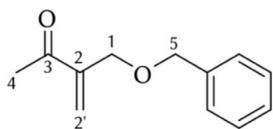
Der allgemeinen Vorschrift folgend wurde Keton **81** (1.0 Äq., 220 mg, 1.3 mmol) in 1.8 mL Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Cer(III)chlorid•Heptahydrat (1.1 Äq., 523 mg, 1.1 mmol) zugegeben und solange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Die nun folgende Zugabe von Natriumborhydrid (2.0 Äq., 101 mg, 2.7 mmol) erfolgte portionsweise in vier Portionen und jede nach 15 min. Nach Hinzufügen eines Tropfens Essigsäure bildete sich ein grauer Niederschlag und die Zugabe von dest. H<sub>2</sub>O resultierte wieder in einer homogenen Lösung. Diese wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produkts *rac*-**82** erfolgte säulenchromatographisch mit PE:EtOAc (8:2) als mobile Phase. Das Produkt *rac*-**82** konnte als leicht gelbes Öl mit einer Ausbeute von 72 % erhalten werden. Die analytischen Daten stimmten mit jedem der enantiomerenreinen Verbindung überein (vgl. Kapitel 4.4.10).

#### 4.4.4 *rac*-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (*rac*-97)



Der allgemeinen Vorschrift folgend wurde Keton **96** (1.0 Äq., 100 mg, 0.7 mmol) in 1.8 mL Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Cer(III)chlorid•Heptahydrat (1.6 Äq., 252 mg, 1.1 mmol) zugegeben und solange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Die nun folgende Zugabe von Natriumborhydrid (2.0 Äq., 49 mg, 1.3 mmol) erfolgte portionsweise in vier Portionen und jede nach 15 min. Nach Hinzufügen eines Tropfens Essigsäure bildete sich ein grauer Niederschlag und die Zugabe von dest. H<sub>2</sub>O resultierte wieder in einer homogenen Lösung. Diese wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die kombinierten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Isolierung des Produkts *rac*-**97** erfolgte säulenchromatographisch mit PE:EtOAc (8:2) als mobile Phase. Das Produkt *rac*-**97** konnte als leicht gelbes Öl mit einer Ausbeute von 75 % erhalten werden. Die analytischen Daten stimmten mit jedem der enantiomerenreinen Verbindung überein (vgl. Kapitel 4.4.11).

## 4.4.5 3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25a)



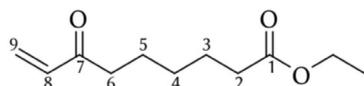
Die Veretherung nach Morita-Baylis-Hillman wurde nach literaturbekannter Vorschrift von Mantel *et al.* durchgeführt.<sup>[145]</sup> Der Aufschluss des *para*-Formaldehyds

wurde in einem 100 mL Schlenkkolben, der aus einem Heizschrank (107 °C) entnommen wurde, durchgeführt. Dazu wurden der Paraformaldehyd (1.40 Äq, 1.24 g, 41.5 mmol), Benzylalkohol (6.5 Äq, 20 mL, 192 mmol) und DABCO (0.05 Äq, 166 mg, 1.5 mmol) vorgelegt und anschließend bei 80 °C so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Nun wurde die Lösung auf Eis gelegt und Methylvinylketon (**18**, 1.00 Äq, 2.4 mL, 30 mmol) tropfenweise hinzugegeben und für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Benzoesäure (0.05 Äq., 183 mg, 1.5 mmol) und im folgenden Verlauf wurde die Temperatur auf 45 °C angehoben und für weitere 64 gerührt.

Anschließend wurde das Gemisch direkt auf eine Säule gegeben und das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc 93:7) mit einer Ausbeute von 69 % bzw. 3.9 g als farbloses Öl erhalten werden. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

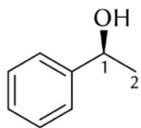
**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]=7.37–7.30 (m, 4H, *o*-CH, *m*-CH), 7.30–7.28 (m, 1H, *p*-CH), 6.27 (s, 1H, 2'-H), 6.06 (s, 1H, 2'-H), 4.52 (s, 2H, 5-H), 4.14 (s, 2H, 1-H), 2.31 (s, 3H, 4-H); **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]=198.7 (C-3), 144.6 (C-2), 138.2 (*ipso*-CH), 128.3 (*p*-CH), 127.5 (*m*-CH, *o*-CH), 126.0 (C-2'), 71.8 (C-5), 67.4 (C-1), 26.1 (C-4).

#### 4.4.6 7-Oxonon-8-ensäureethylester (83)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von *Huo* durchgeführt.<sup>[219, 272]</sup> In einem 250 mL *Schlenk*-Kolben wurde Zinkpulver (1.5 Äq, 4.4 g, 67 mmol) vorgelegt und anschließend wurde der Kolben sekuriert. Nun wurde im Stickstoffgegenstrom und unter Rühren Iod (0.05 Äq, 570 mg, 2.3 mmol) zugegeben und solange gerührt, bis sich ein lila Nebel gebildet hatte. Anschließend wurden langsam 45 mL DMA hinzugegeben und nach einiger Zeit entstand eine graue Suspension. Schließlich erfolgte die Zugabe von 6-Bromhexansäureethylester (1.0 Äq, 8.0 mL, 45 mmol) und das Reaktionsgemisch wurde für 17.5 Stunden bei 80°C gerührt. Die Überprüfung des Reaktionsverlaufs erfolgte mittels GC/MS. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und auf Eis gelegt. Der Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (310 mg, 0.3 mmol) wurde zugegeben, gefolgt von Acrylsäurechlorid (1.1 Äq, 4.0 mL, 49 mmol) und das Eisbad wurde entfernt. Nun wurde das Reaktionsgemisch weitere 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Überprüfung des Umsatzes erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (PE:EtOAc 8:2). Nach vollendeter Reaktion wurde der Katalysator über Celite® abfiltriert und die Lösung einmal mit NH<sub>4</sub>Cl gewaschen. Die erhaltene wässrige Phase wurde viermal mit 75 mL EtOAc extrahiert und die gesammelten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc 9:1) konnte das Produkt **83** als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 67 % (6.0 g) erhalten werden.

**R<sub>f</sub>** = 0.18 (PE:EtOAc 9:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 6.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>8,9b</sub>=17.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>8,9a</sub>=10.5 Hz, 1H, 8-H), 6.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>9b,8</sub>=17.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9b,9a</sub>=1.3 Hz, 1H, 9-H<sub>b</sub>), 5.89 (dd, <sup>3</sup>J<sub>9a,8</sub>=10.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9a,9b</sub>=1.3 Hz, 1H, 9-H<sub>a</sub>), 4.04 (q, <sup>3</sup>J<sub>OCH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub>=7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub>=7.3 Hz, 2H, 6-H), 2.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub>=7.4 Hz, 2H, 2-H), 1.54–1.47 (m, 4H, 3H, 5-H), 1.28–1.24 (m, 2H, 4-H), 1.17 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub></sub>=7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 200.6 (C-7), 172.9 (C-1), 136.6 (C-8), 128.8 (C-9), 59.8 (OCH<sub>2</sub>), 38.7 (C-6), 33.5 (C-2), 28.1 (C-4), 24.4 (C-5), 23.2 (C-3), 14.3 (CH<sub>3</sub>); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  = 2991, 2938, 2867, 1731, 1682, 1615, 1459, 1401, 1372, 1301, 1245, 1180, 1104, 1064, 1031, 963, 861, 737 cm<sup>-1</sup>.

4.4.7 (*R*)-Phenylethan-1-ol (**17**)

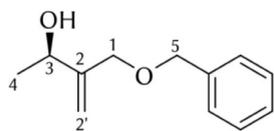
Die Synthese mit Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf wurde generell nach der AAV 6 durchgeführt und wird im Folgenden noch spezifiziert:

- Pumpe 1: 0.5 mM NADPNa<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL KP<sub>7</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst.
- Pumpe 2: Acetophenon (**16**, 61 mg, 0.51 mmol) wurde in 961  $\mu$ L 2-Propanol gelöst, um eine 500 mM-Lösung zu erhalten.
- Flussraten: Pumpe 1: 50  $\mu$ L/min  
 Pumpe 2: 5  $\mu$ L/min  
 Pumpe 3: 55  $\mu$ L/min

Insgesamt wurden 56 mg Substrat **16**/Produkt **17**-Gemisch mit 88 % Umsatz (12 % Substrat) gesammelt. Nach säulenchromatographischer Isolierung konnte das Produkt schließlich mit einer Ausbeute von 49 mg (80 %, RZA 43 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als hellgelbes Öl erhalten werden. Daraus ergab sich für NADPH eine katalytische Produktivität von 628 mol/mol.

$R_f$  = 0.40 (*n*-Pentan:EtOAc 8:2);  $[\alpha]_D^{20}$  = +44.6 (*c*=1.16 in CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.44–7.32 (m, 4H, ArH), 7.31–7.25 (m, 1H, 5-H), 4.91 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub>=6.5 Hz, 1H, 1-H), 1.81 (s, 1H, OH), 1.51 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>2,1</sub>=6.5 Hz, 3H, 1'-H); **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 146.2 (*ipso*-CH), 128.8 (*o*-CH/*m*-CH), 127.8 (*p*-CH), 125.7 (*o*-CH, *m*-CH), 70.8 (C-1), 25.5 (C-2); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  = 3339, 3064, 3029, 2973, 2928, 2877, 1493, 1450, 1368, 1284, 1261, 1203, 1096, 1076, 1029, 1010, 997, 897, 759, 697, 606, 539 cm<sup>-1</sup>; **GC**: Säule: Lipodex G, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm); Trägergas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar; Lösungsmittel: MTBE; Methode: 90 °C-15 min, 10 °C/min auf 150 °C-5 min; Retentionszeit:  $t_R$  [(*S*)-**17**] = 15.6 min,  $t_R$  [(*R*)-**17**] = 16.3 min,  $t_R$  [Acetophenon (**16**)] = 7.8 min.

#### 4.4.8 (*R*)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (**85**)

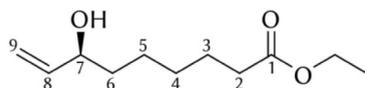


Die Synthese mit Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf wurde generell nach AAV 6 durchgeführt und wird im Folgenden noch spezifiziert:

- Pumpe 1: 0.5 mM NADPNa<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL KP<sub>i</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst.
- Pumpe 2: Keton (**25a**, 23 mg, 0.12 mmol) wurde in 583  $\mu$ L 2-Propanol gelöst, um eine 200 mM-Lösung zu erhalten.
- Flussraten: Pumpe 1: 30  $\mu$ L/min  
 Pumpe 2: 3  $\mu$ L/min  
 Pumpe 3: 33  $\mu$ L/min

Insgesamt wurden 21 mg Substrat **25a**/Produkt **85**-Gemisch mit 80 % Umsatz (20 % Substrat) gesammelt. Nach säulenchromatographischer Isolierung konnte das Produkt schließlich mit einer Ausbeute von 17 mg (72 %, RZA 14 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als hellgelbes Öl erhalten werden. Daraus ergab sich für NADPH eine katalytische Produktivität von 128 mol/mol. Die Umsatzbestimmung erfolgte mittels 1H-NMR-Spektroskopie und der Enantiomerenüberschuss wurde mittels HPLC bestimmt. Die absolute Konfiguration wurde zusätzlich über eine Drehwertbestimmung validiert.

$R_f = 0.33$  (PE:EtOAc 8:2);  $[\alpha]_D^{20} = +16$  (c=1.0 in CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.38–7.31 (m, 4H, ArH), 7.31–7.26 (m, 1H, 9-H), 5.11 (s, 1H, 2'b-H), 5.02 (s, 1H, 2'a-H), 4.78 (s, 1H, OH), 4.46 (m, 2H, 5-H), 4.17 (q, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub>=6.8 Hz, 1H, 3-H), 4.01 (q, <sup>3</sup>J<sub>gem</sub>=13.2 Hz, 1H, 1-H), 1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub>=6.5 Hz, 3H, 4-H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 150.4 (C-2), 138.5 (*ipso*-CH), 128.2 (-CH, *m*-CH), 127.4 (*o*-CH), 127.4 (*o*-CH), 109.2 (C-2'), 71.3 (C-5), 69.8 (C-1), 66.7 (C-3), 22.6 (C-4); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu} = 3401, 3030, 2976, 2859, 1652, 1496, 1454, 1366, 1260, 1204, 1070, 1040, 1028, 908, 735, 696, 602, 467$  cm<sup>-1</sup>; **HRMS** (ESI, *m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 215.1043; gefunden: 215.1044 [M+Na]<sup>+</sup>; berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>Na<sup>+</sup>: 216.1076; gefunden: 216.1079; **HPLC**: Säule: Phenomenex Lux Amylose-1, 250x4.60 mm; Wellenlänge: UV 208 nm; Lösungsmittel: *n*-heptane:2-propanol (9:1); Flussrate: 0.5 mL/min; Retentionszeit:  $t_R$  [(*R*)-**85**] = 13.2 min,  $t_R$  [(*S*)-**85**] = 14.9 min,  $t_R$  (Edukt **25a**) = 10.1 min.

4.4.9 (S)-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (**84**)

Die Synthese mit Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf wurde generell nach AAV 6 durchgeführt und wird im Folgenden noch spezifiziert:

Pumpe 1: 0.5 mM NADPNa<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL KP<sub>7</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst.

Pumpe 2: Keton (**83**, 39 mg, 0.20 mmol) wurde in 583  $\mu$ L 2-Propanol gelöst, um eine 300 mM-Lösung zu erhalten.

Flussraten: Pumpe 1: 50  $\mu$ L/min

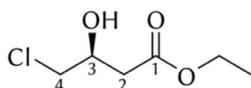
Pumpe 2: 5  $\mu$ L/min

Pumpe 3: 55  $\mu$ L/min

Insgesamt wurden 39 mg Substrat **83**/Produkt **84**-Gemisch mit 97 % Umsatz (3 % Substrat) gesammelt. Nach säulenchromatographischer Isolierung konnte das Produkt schließlich mit einer Ausbeute von 35 mg (89 %, RZA 45 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als hellgelbes Öl erhalten werden. Daraus ergab sich für NADPH eine katalytische Produktivität von 275 mol/mol.

**R<sub>f</sub>** = 0.26 (PE:EtOAc 8:2); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 5.32 (c=1.08 in CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 5.82–5.76 (m, 1H; 8-H), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-trans,8</sub>=17.2 Hz, 1H, 9-trans-H), 4.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>9-cis,8</sub>=10.5 Hz, 1H, 9-cis-H), 4.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>OH,7</sub>=4.80 Hz, 1H, OH), 4.04 (q, <sup>3</sup>J<sub>OCH<sub>2</sub>,CH<sub>3</sub></sub>=7.10 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.89 (m, 1H, 7-H), 2.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub>=7.38 Hz, 2H, 2-H), 1.50 (p, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub>=7.36 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub>=7.38 Hz, 2H, 3-H), 1.38–1.33 (m, 2H, 6-H), 1.33–1.23 (m, 4H, 4-H, 5-H), 1.17 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>,OCH<sub>2</sub></sub>=7.10 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.7 (C-1), 142.5 (C-8), 112.8 (C-9), 70.8 (C-7), 59.5 (OCH<sub>2</sub>), 36.6 (C-6), 33.3 (C-2), 28.3 (C-4), 24.5 (C-3), 24.3 (C-5), 14.0 (CH<sub>3</sub>); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  = 3443, 2987, 2934, 2860, 1733, 1463, 1423, 1373, 1266, 1180, 1119, 1095, 1029, 991, 919, 737, 669, 591 cm<sup>-1</sup>; **GC**: Säule: Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm); Trägergas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar; Lösungsmittel: MTBE; Methode: 113 °C-60 min, 0.1 °C/min auf 116 °C, 10 °C/min auf 150 °C-5 min; Retentionszeit:  $t_R$  [(S)-**84**] = 93.6 min,  $t_R$  [(R)-**84**] = 93.9 min.

#### 4.4.10 (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (**82**)



Die Synthese mit Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf wurde generell nach AAV 6 durchgeführt und wird im Folgenden noch spezifiziert:

Pumpe 1: 0.25 mM NADPNa<sub>2</sub> wurde in 1.0 mL KP<sub>7</sub>-Puffer (100 mM, pH 7, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst.

Pumpe 2: Keton (**81**, 115 mg, 0.70 mmol) wurde in 1.3 mL 2-Propanol gelöst, um eine 500 mM-Lösung zu erhalten.

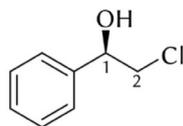
Flussraten: Pumpe 1: 90  $\mu$ L/min

Pumpe 2: 9  $\mu$ L/min

Pumpe 3: 99  $\mu$ L/min

Bei Keton **81** konnte eine vollständige Umsetzung zum Alkohol **82** erzielt werden. Somit war keine weitere säulenchromatographische Aufarbeitung notwendig und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 108 mg (92 %, RZA 117 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) als hellgelbes Öl erhalten werden. Daraus ergab sich für NADPH eine katalytische Produktivität von 2023 mol/mol.

$R_f$  = 0.30 (PE:EtOAc 8:2);  $[\alpha]_D^{20}$  = -26.6 (c=1.25 in CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.28–4.23 (m, 1H, 3-H), 4.19 (q, <sup>3</sup>J<sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></sub>=7.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.64–3.58 (m, 2H, 4-H), 3.12 (d, 1H, OH), 2.67–2.59 (m, 2H, 2-H), 1.28 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub></sub>=7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.2 (C-1), 68.3 (C-3), 61.4 (OCH<sub>2</sub>), 48.5 (C-4), 38.8 (C-2), 14.5 (CH<sub>3</sub>); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  = 3452, 2983, 1722, 1406, 1374, 1304, 1259, 1188, 1151, 1086, 1058, 1030, 951, 894, 850, 803, 756, 709, 557, 473 cm<sup>-1</sup>; **GC** (genaue Methode): Säule: Lipodex G, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm); Trägergas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar; Lösungsmittel: MTBE; Methode: 65 °C-120 min, 5.0 °C/min auf 150 °C-5 min; Retentionszeit:  $t_R$  [(S)-**77**] = 122.5 min,  $t_R$  [(R)-**77**] = 124.5 min; **GC** (schnelle Methode): Säule: Lipodex G, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm); Trägergas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar; Lösungsmittel: MTBE; Methode: 60 °C-5 min, 0.5 °C/min auf 90 °C-1 min, 20 °C/min auf 150 °C-5 min; Retentionszeit:  $t_R$  [(S)-**82**] = 59.4 min,  $t_R$  [(R)-**82**] = 61.8 min,  $t_R$  [Edukt **81**] = 30.9 min.

4.4.11 (*R*)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (**93**)Batch-Synthese

In einem 50 mL Kolben wurde eine Suspension aus 2.2/4.4 U RADH-CatIBs (GFIL8) in 9.9 mL TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) angesetzt. Anschließend wurden unter ständigem langsamen Rühren NADP<sup>+</sup> (0.2 Äq, 18 mg, 23  $\mu$ mol) und für die Kofaktor-Regenerierung Cyclohexanol (5 Äq, 75 mg, 0.75 mmol) oder 2-Propanol (5 Äq, 45 mg, 0.75 mmol) hinzugefügt. Nun wurde  $\omega$ -Chloracetophenon (**96**), 23 mg, 0.15 mmol) in 750  $\mu$ L 2-MeTHF gelöst und zur der Enzymlösung gegeben. Nach 24/48/72 h bzw. 24/96 h wurde je ein Aliquot (~300  $\mu$ L) entnommen, mit MTBE extrahiert und der Umsatz mittels DC (PE:EtOAc 9:1) überprüft. Die genaue Bestimmung des Umsatzes und des *ee* erfolgte gaschromatographisch an chiraler stationärer Phase nach gegebener Methode. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch über Celite® abfiltriert und die wässrige Phase viermal mit EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, einmal mit NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Alkohol **97** wurde säulenschromatographisch (PE:EtOAc 97:3) isoliert und als leicht gelbes Öl in 88 % Ausbeute und 86 % *ee* erhalten (*ee* nahm mit der Zeit ab, siehe Kapitel 3.2.7).

Screening im einfachen Durchfluss

Das Screening im einfachen Durchfluss wurde entsprechend der AAV 5 durchgeführt und wird im Folgenden weiter spezifiziert. Zuerst sollten homogene Lösungen der organischen (Vial 1) und wässrigen (Vial 2) Phase erhalten werden, die anschließend unter ständigem Rühren miteinander vermischt wurden. Der Systemdruck betrug 3.0 mbar und der *CMP* 50 mbar. Variiert wurden hier die Flussraten und die Sammlung des Produkts wurde über 120 min in 20-minütigen Abständen durchgeführt.

Vial 1 (organisch): Das Keton (**96**, 9.3 mg/7  $\mu$ L, 0.06 mmol) wurde in 300  $\mu$ L 2-MeTHF (7.5 %v/v) gelöst.

Vial 2 (wässrig): 15 mM NADPH (53 mg, 0.06 mmol) wurden in 3.7 mL TEA-Puffer (50 mM, pH 7.5, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) gelöst.

Pumpe 1: Reaktionslösung (Mischung aus Vial 1 und 2).

Pumpe 2: Diisopropylether

## Experimenteller Teil

Reaktor: RADH-CatIBs (GFIL8, 55 mg/12 U) in einer 5 x 50 mm Omnifit-Säule

### Screening im geschlossenen Kreislauf

Die Synthese mit Kofaktor-Regenerierung im geschlossenen Kreislauf wurde generell nach der Vorschrift AAV 6 durchgeführt und wird im Folgenden noch spezifiziert. In **Tabelle 20** sind die entsprechenden Ansatzgrößen beschrieben. Der Systemdruck betrug 3.0 mbar und der *CMP* 50 mbar. Variiert wurden hier die Konzentrationen und die Sammlung des Produkts wurde über 360 min in 60-minütigen Abständen durchgeführt.

Pumpe 1: 2.0/10/12.5/15 mM NADPNa<sub>2</sub> wurde in 4.0 mL TEA-Puffer (50 mM, pH 7, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>) gelöst.

Pumpe 2: Das Keton **96** wurde in Cyclohexanol gelöst, um eine 100/125/150 mM Lösung zu erhalten. Die Konzentration im Reaktor beträgt aufgrund des Flussratenverhältnisses 10/12.5/15 mM.

Pumpe 3: Diisopropylether

Reaktor: RADH-CatIBs (GFIL8, 55 mg/12 U) in einer 5 x 50 mm Omnifit-Säule

Flussraten: Pumpe 1: 30  $\mu$ L/min

Pumpe 2: 3  $\mu$ L/min

Pumpe 3: 33  $\mu$ L/min

**Tabelle 20.** Genaue Einwaagen und Mengen der hergestellten Reaktionsmischungen.

Endkonzentration	2.0 mM	10 mM	12.5 mM	15 mM
Keton <b>96</b> [mg  $\mu$ L]	1.2 0.9	6.2 4.7	7.7 5.9	9.3 7.0
Keton <b>96</b> [mmol]	0.01	0.04	0.05	0.06
2-MeTHF [ $\mu$ L]	300	300	300	300
NADPH [mg]	7.1	35	44	53
Puffer [mL]	3.7	3.7	3.7	3.7
Endvolumen [mL]	4.0	4.0	4.0	4.0

### Synthese im geschlossenen Kreislauf

Die Vorschrift für die Synthese entspricht weitestgehend der Vorschrift für das Screening. Die kontinuierliche Synthese des Alkohols **97** wurde mit 2.0 mM NADPNa<sub>2</sub> und 15 mM Substratkonzentration durchgeführt. Zudem wurde, nachdem der

Vorlagekolben von Pumpe 2 leergelaufen war, Cyclohexanol hinzugefügt und das System für 90 min gespült. Die anderen Pumpen liefen unverändert weiter. Nach 120 h wurden alle Sammelgefäße vereint, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die Isolierung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch (PE:EtOAc 97:3). Es konnte eine Ausbeute des Alkohols **97** von 92 % (469 mg, 2.99 mmol) mit 98 %*ee* erzielt werden. Daraus ergab sich eine Raum-Zeit-Ausbeute von 3.6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> und eine auf den Kofaktor bezogene katalytische Produktivität von 374 mol/mol.

Der Lauf wurde anschließend noch für weitere 160 h laufen gelassen, jedoch fand hier nur noch eine Umsatzbestimmung statt.

**R<sub>f</sub>** = 0.25 (PE:EtOAc 9:1); **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.34–7.29 (m, 4H, *o*-CH, *m*-CH), 7.28–7.23 (m, 1H, *p*-CH), 4.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1,2a/b</sub>=8.9 und 3.4 Hz, 1H, 1-H), 3.68 (dd, <sup>2</sup>J<sub>2b,2a</sub>=11.3, <sup>3</sup>J<sub>2b,1</sub>=3.4 Hz, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 3.58 (dd, <sup>2</sup>J<sub>2a,2b</sub>=11.3, <sup>3</sup>J<sub>2a,1</sub> = 8.9 Hz, 1H, 2-H<sub>a</sub>); **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 140.0 (*ipso*-CH), 128.9 (*m*-CH), 128.6 (*p*-CH), 126.2 (*o*-CH), 74.22 (C-1), 52.5 (C-2); **IR** (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  = 3546, 3385 (OH), 1494, 1454, 1427, 1248, 1199, 1085, 1062, 1011, 916, 870, 825, 766, 721, 696, 613, 544, 521 cm<sup>-1</sup>; **GC**: Säule: Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm); Trägergas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar; Lösungsmittel: MTBE; Methode: 60 °C-15 min, 5.0 °C/min auf 150 °C-5 min; Retentionszeit:  $t_R$  [(*R*)-**97**] = 11.5 min,  $t_R$  [(*S*)-**97**] = 12.4 min.

#### 4.4.12 HaloTag™-YqjM - Testversuche

##### Screening im einfachen Durchfluss

Das Screening im einfachen Durchfluss wurde entsprechend der AAV 5 durchgeführt und, wird im Folgenden weiter spezifiziert. Es wurde eine Lösung aus 10 mM Cyclohexenon (**108**) oder Ethyl-(E)-2-methyl-4-oxo-2-enoat (**109**) und 1.0/2.0/10 mM NADPH in  $KP_i$ -Puffer (20 mM pH 6.5) ansetzt. Als Enzymreaktor wurde eine Omnifit-Säule (3 x 50 o. 100 mm) mit auf HaloLink™-Resin immobilisierter CHalo-YqjM verwendet, die (soweit nicht anders angegeben) für 10 min mit einer 1.0 mM Puffer-FMN-Lösung gespült wurde. Die Flussraten variierten von 10–50  $\mu$ L/min.

Der Systemdruck betrug 3.0 mbar und der *CMP* 50 mbar. Es wurden zwei 300  $\mu$ L produktthaltige Fraktionen gesammelt, mit MTBE extrahiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die Umsatzkontrolle erfolgte gaschromatographisch.

##### Kombiniertes System mit HaloTag™-LbADH

Die Vorschrift entsprach im Grunde der AAV 13 für das kombinierte System, in dem die HaloTag™-LbADH für die Kofaktor-Regenerierung verwendet wurde. Das Produkt wurde über 240 min in 30 min-Abständen gesammelt und anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in MTBE gelöst und der Umsatz gaschromatographisch bestimmt. Die Verbindung von Pumpe 2 und Pumpe 3 erfolgte entweder per Mischplatte oder Y-Stück.

Pumpe 1 (Lösung 1, kofaktorhaltige wässrige Phase): 15 mM NADPNa<sub>2</sub> und 1.0 mM FMN wurden in 3 mL  $KP_i$ -Puffer (20 mM, pH 6.5, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst. Anschließend wurden 24  $\mu$ L 2-Propanol zugegeben.

Pumpe 2: (Lösung 2, gesammelte Lösung von Pumpe 1).

Pumpe 3 (Lösung 3, substrathaltige organische Phase): Es wurden 150 mM Substrat **108** oder **109** in 2-Propanol gelöst.

Pumpe 4 (Lösungsmittel zur Extraktion, organische Phase): Für das FLLEX-System wurde Diisopropylether als Extraktionsmittel verwendet.

Reaktoren: HaloTag™-LbADH, CHalo-YqjM.

Flussraten: Pumpe 1: 30  $\mu$ L/min

Pumpe 2: 3  $\mu$ L/min

Pumpe 3: 66  $\mu$ L/min

Pumpe 4: 30  $\mu$ L/min

Cyclohexanon (98)

GC: Säule: Chirasil-DEX-CB, Agilent Technologies (25 m x 0.25 mm)  
Retentionszeit:  $t_R = 10.3$  min  
Trärgas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar  
Lösungsmittel: MTBE  
Methode: 65 °C-5 min, 5.0 °C min<sup>-1</sup> auf 125 °C.

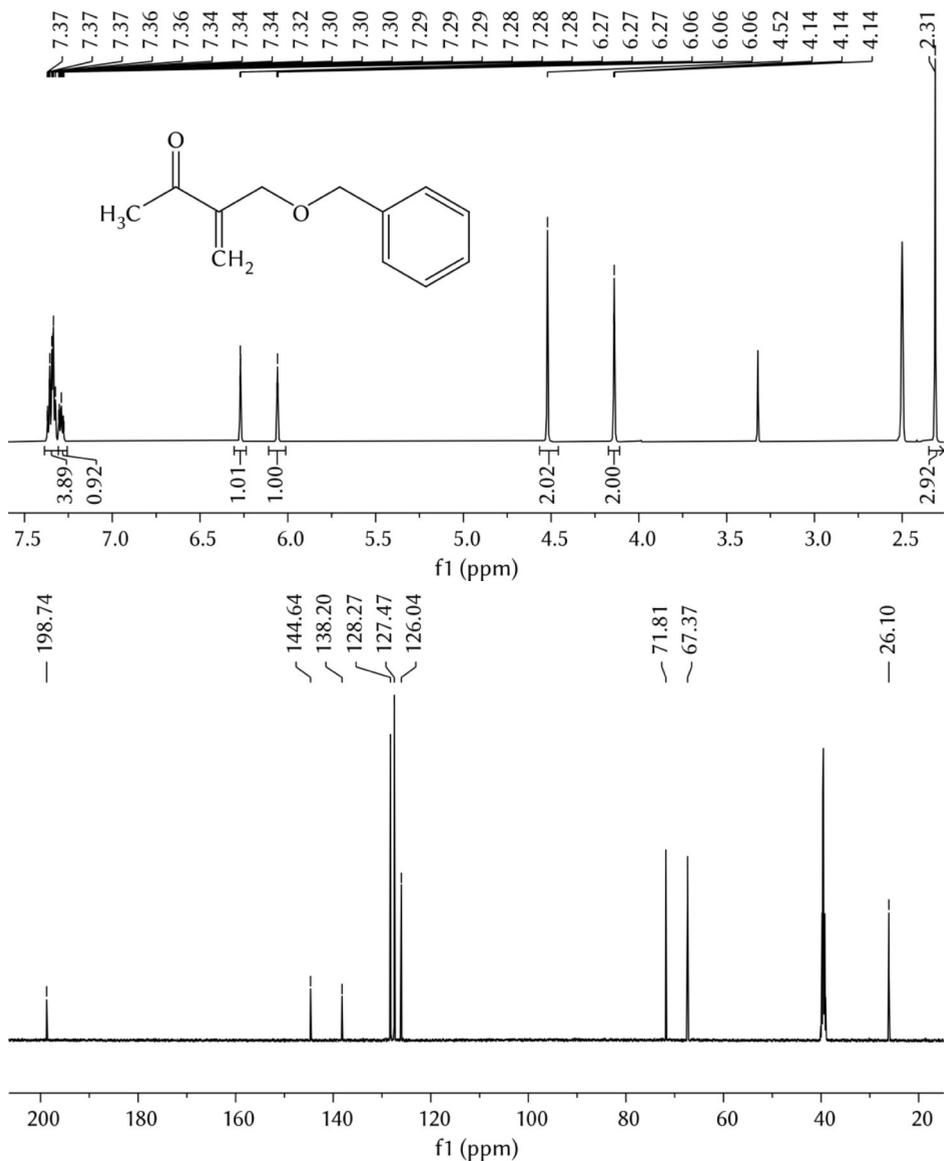
(R)-2-Methyl-4-oxopentansäureethylester (110)

GC: Säule: Lipodex G, Macherey und Nagel (25 m x 0.25 mm)  
Retentionszeit:  $t_R = 10.5$  min  
Trärgas: H<sub>2</sub>, 0.6 bar  
Lösungsmittel: MTBE  
Methode: 90 °C-15 min, 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150-5 min °C.

## 5 ANHÄNGE

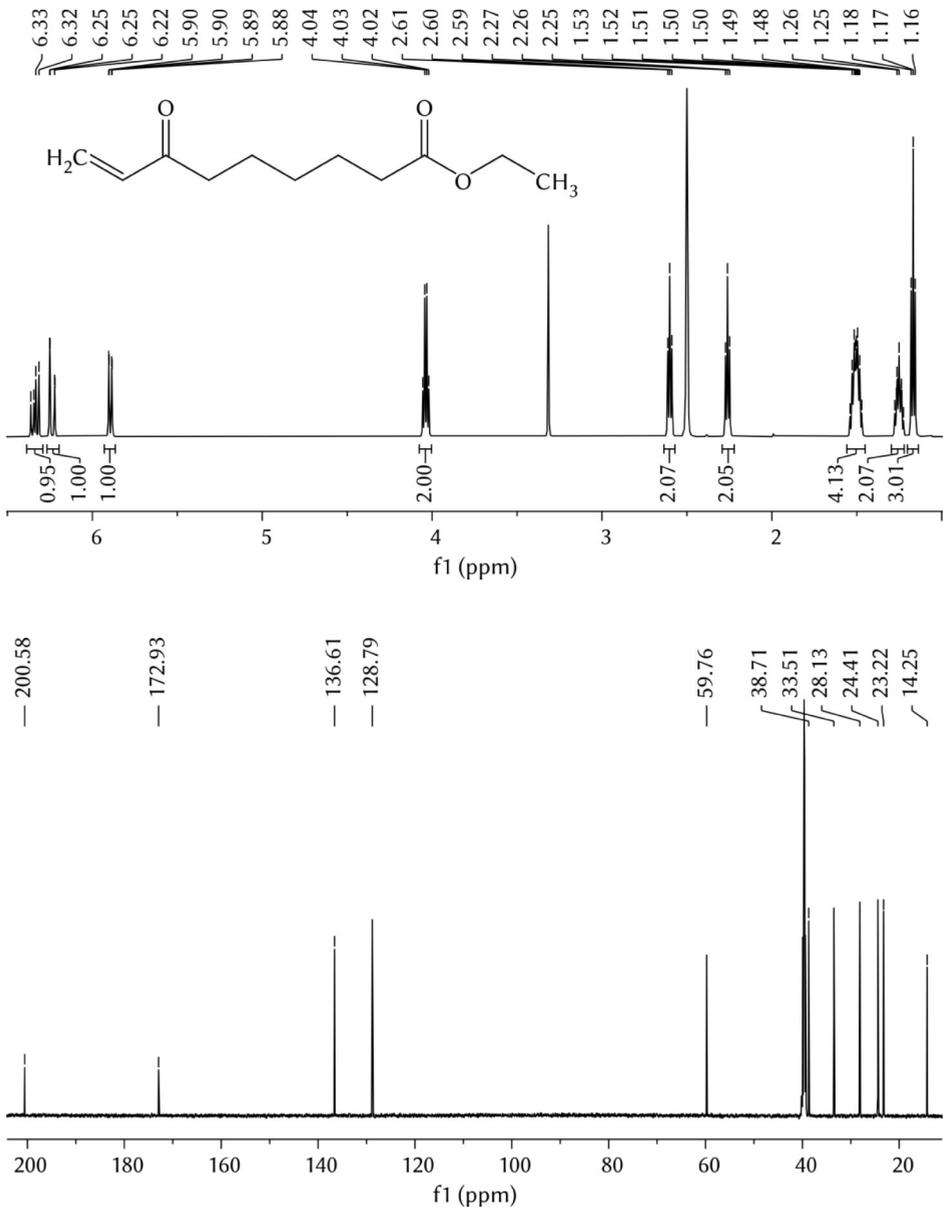
### 5.1 NMR-Spektren

#### 5.1.1 3-[(Benzyloxy)methyl]but-3-en-2-on (25b)

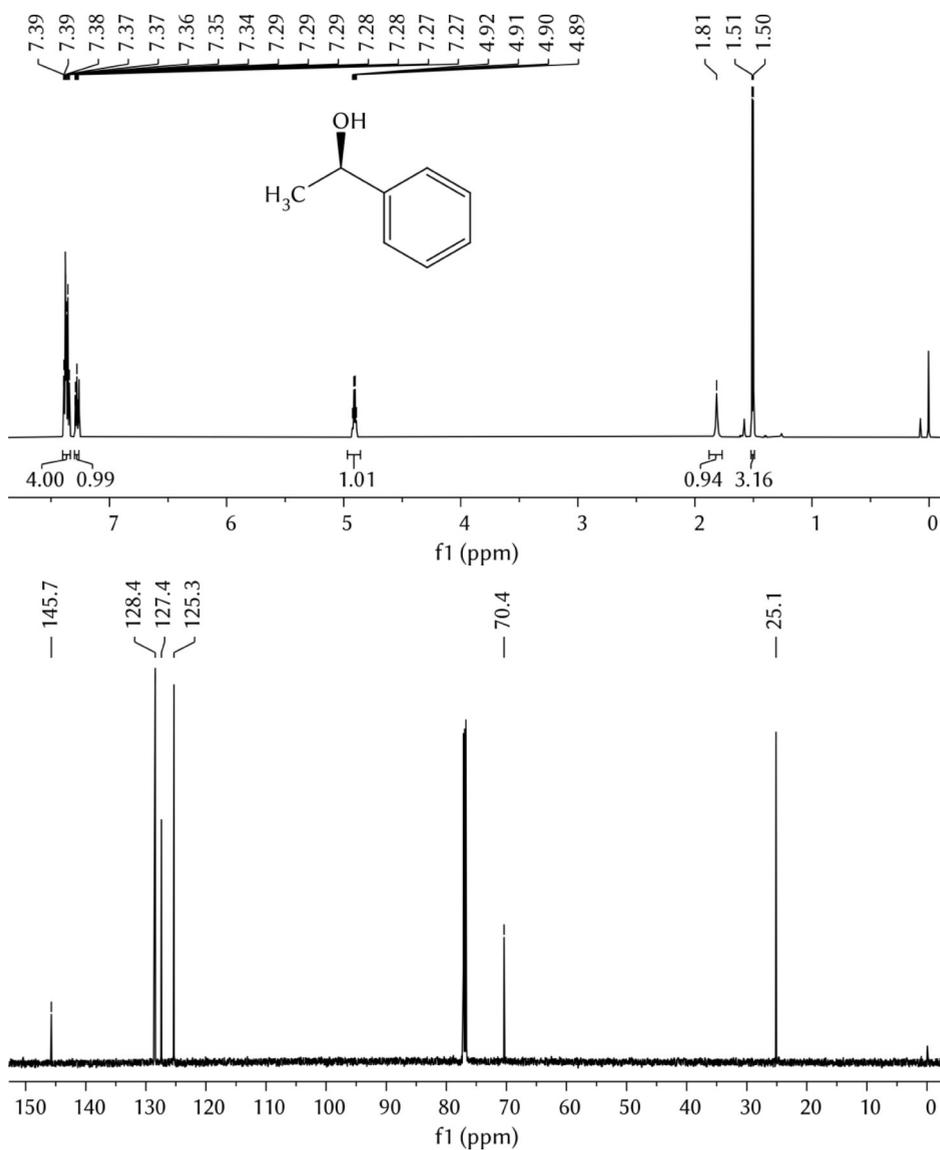


$^1\text{H}$ -/ $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (600/151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der dargestellten Verbindung **25b**.

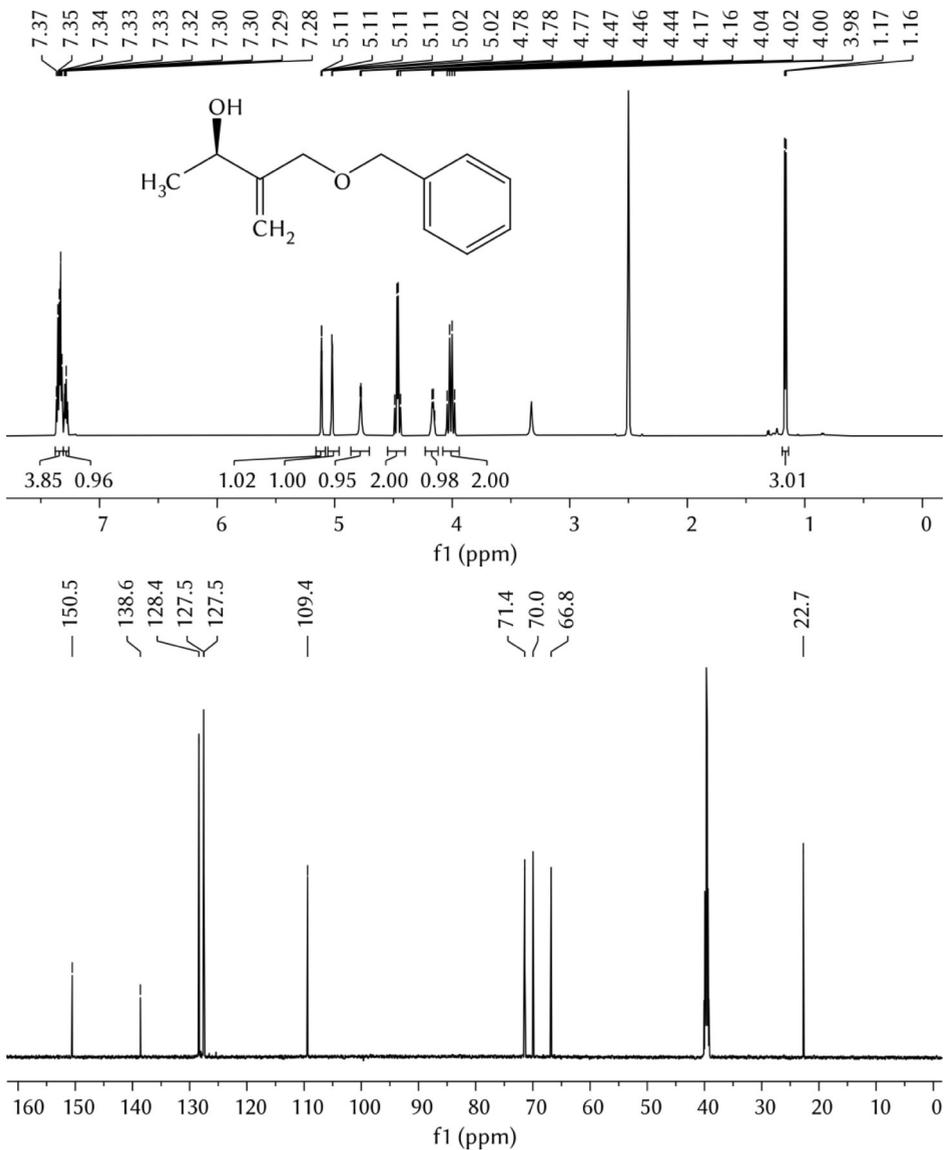
## 5.1.2 7-Oxonon-8-ensäureethylester (83)

<sup>1</sup>H-/<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (600/151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der dargestellten Verbindung **83**.

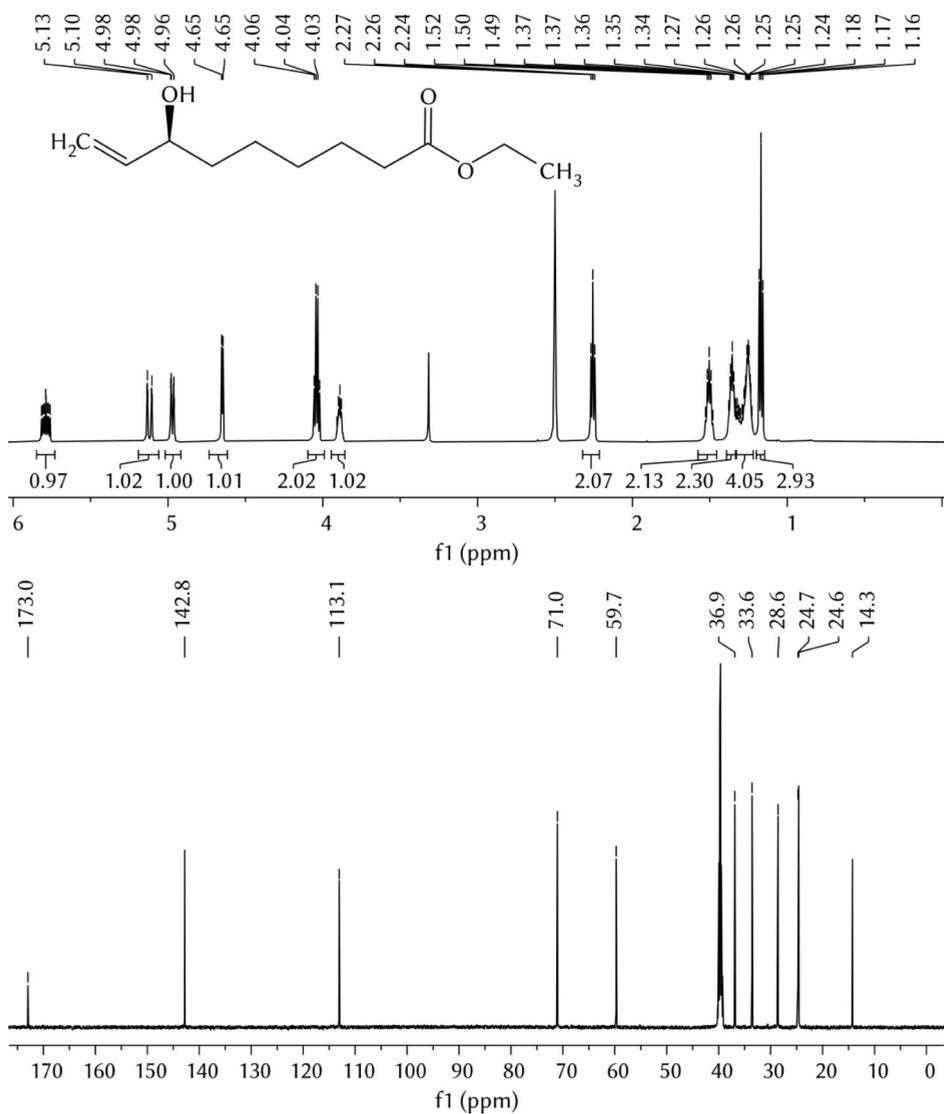
5.1.3 (*R*)-Phenylethan-1-ol (17)



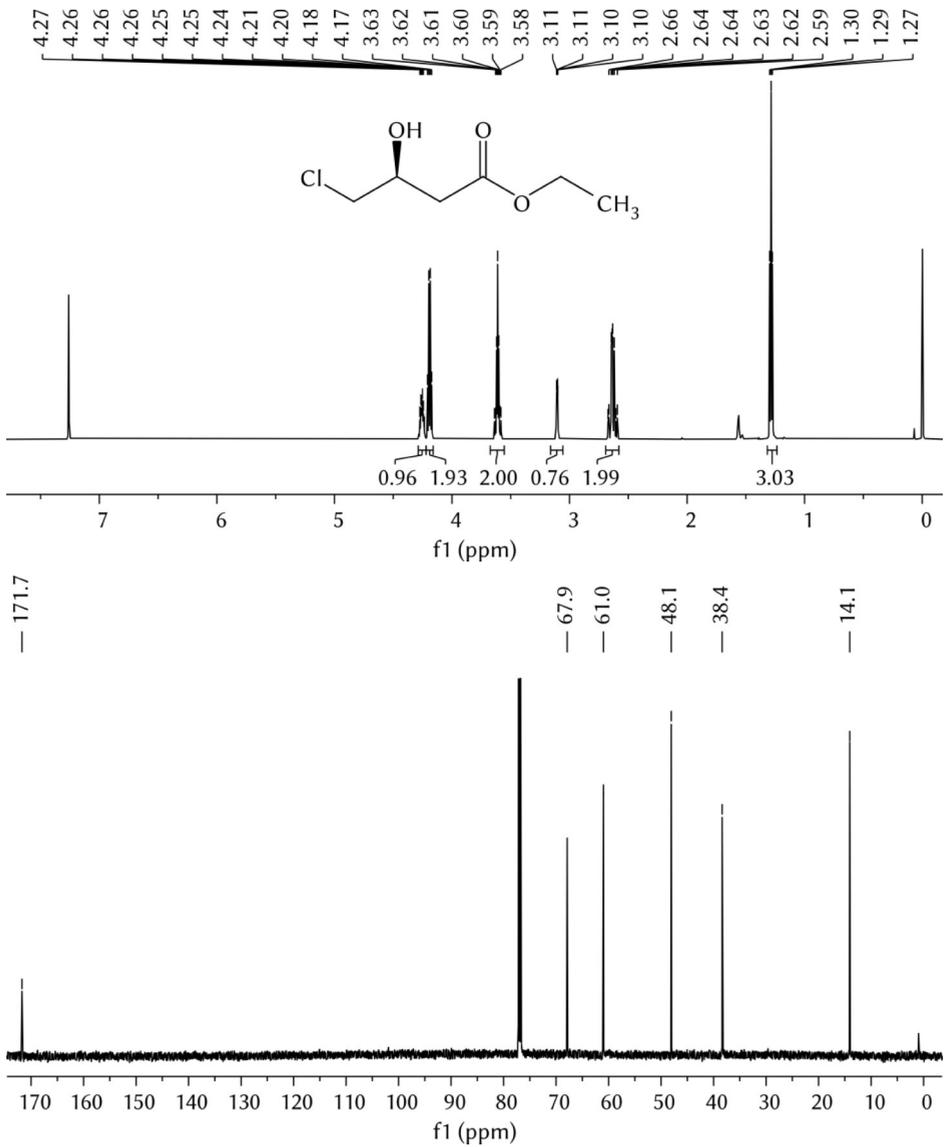
$^1\text{H}$ -/ $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (600/151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) der dargestellten Verbindung 17.

5.1.4 (*R*)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85)<sup>1</sup>H-/<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (600/151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der dargestellten Verbindung 85.

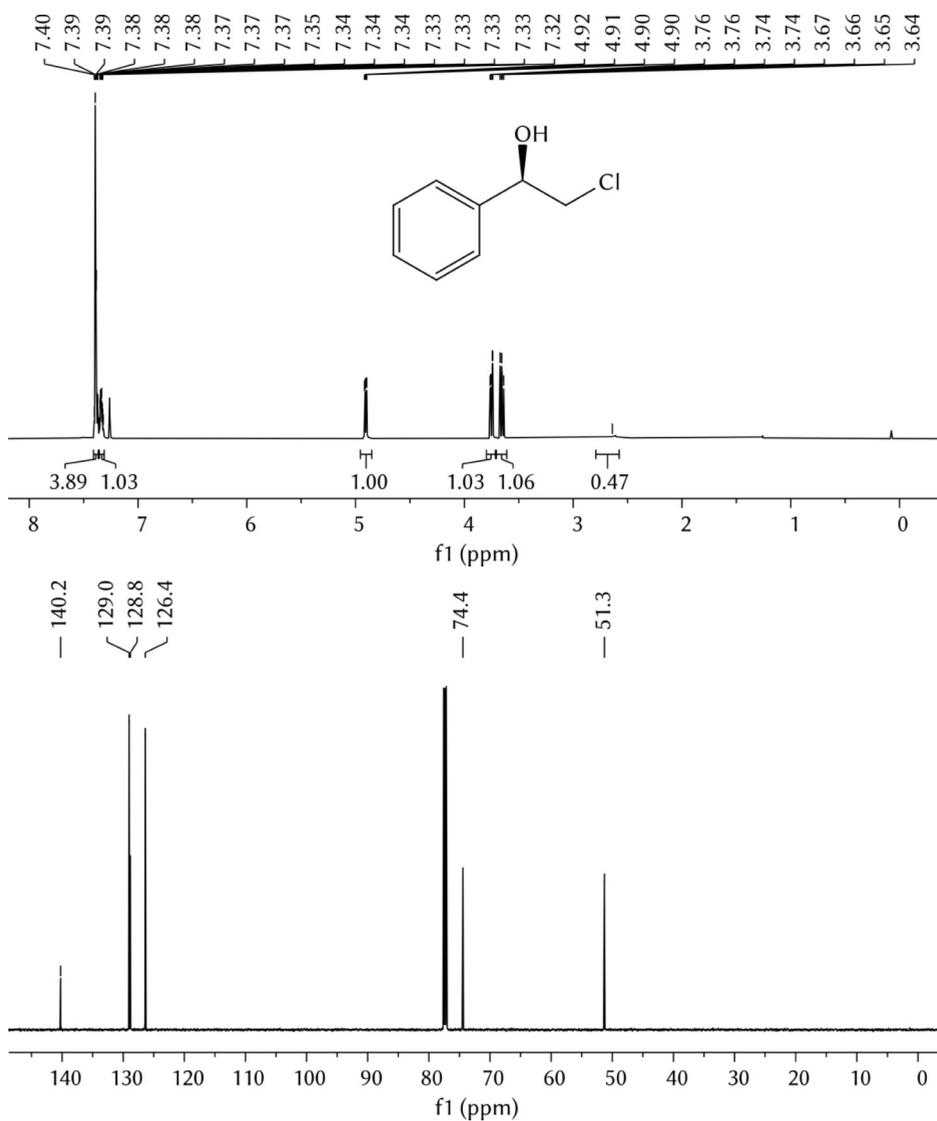
## 5.1.5 (S)-7-Hydroxonon-8-ensäureethylester (84)

 $^1\text{H}$ -/ $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (600/151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der dargestellten Verbindung 84.

## 5.1.6 (S)-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester (82)

<sup>1</sup>H-/<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (600/151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) der dargestellten Verbindung **82**.

5.1.7 (*R*)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97)

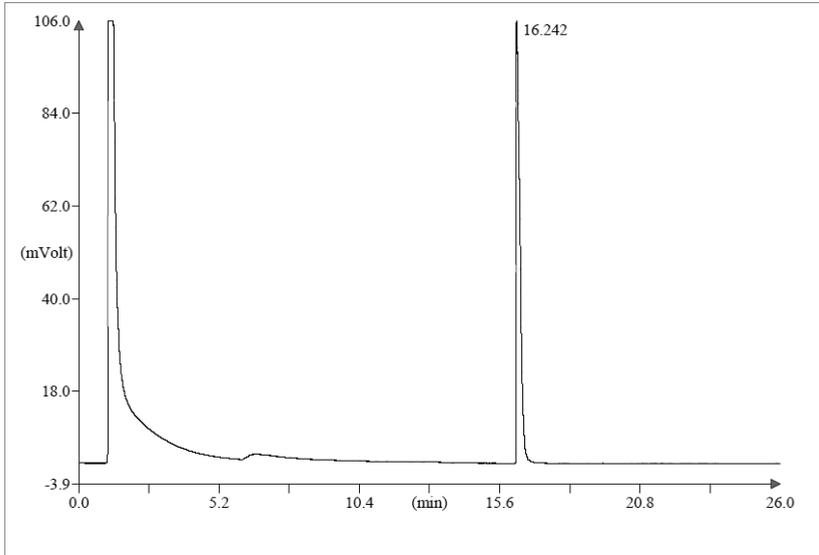


<sup>1</sup>H-/<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (600/151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) der dargestellten Verbindung 97.

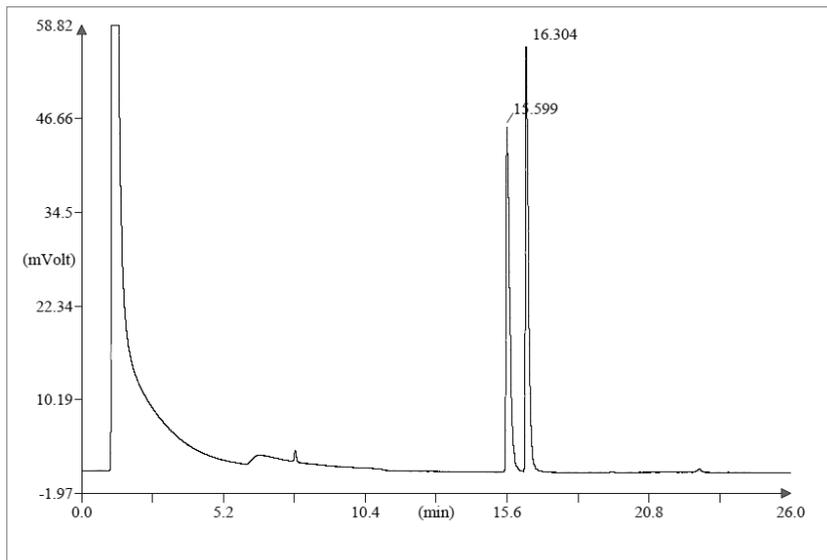
## 5.2 GC-/HPLC-Chromatogramme

### 5.2.1 (*R*)-Phenylethan-1-ol (17)

GC (Lipodex G, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 15 min-90 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);  
 $t_R$  [(*R*)-14] = 16.2 min.

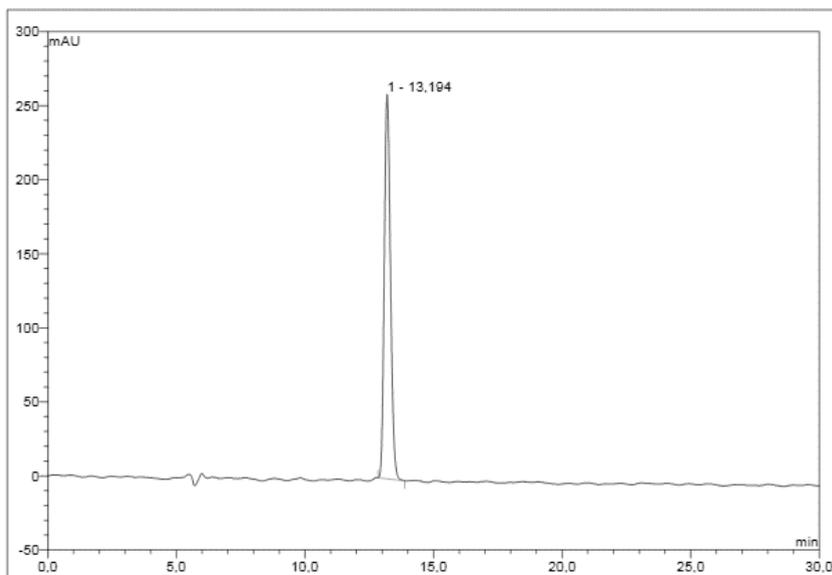


GC - racemischer Alkohol (Lipodex G, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 15 min-90 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(*S*)-17] = 15.6 min,  $t_R$  [(*R*)-17] = 16.3 min.

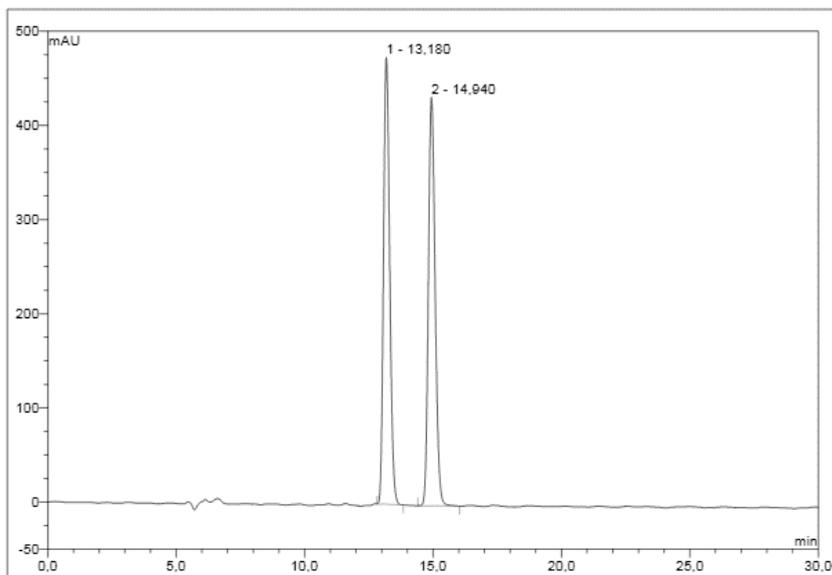


### 5.2.2 (R)-3-[(Benzyloxy)methyl]-but-3-en-2-ol (85)

HPLC (Lux Amylose-1, 250 x 4.6 mm; 0.5 mL min<sup>-1</sup>; UV 208 nm; *n*-Heptan:2-Propanol 9:1);  $t_R$  [(*R*)-85] = 13.2 min.

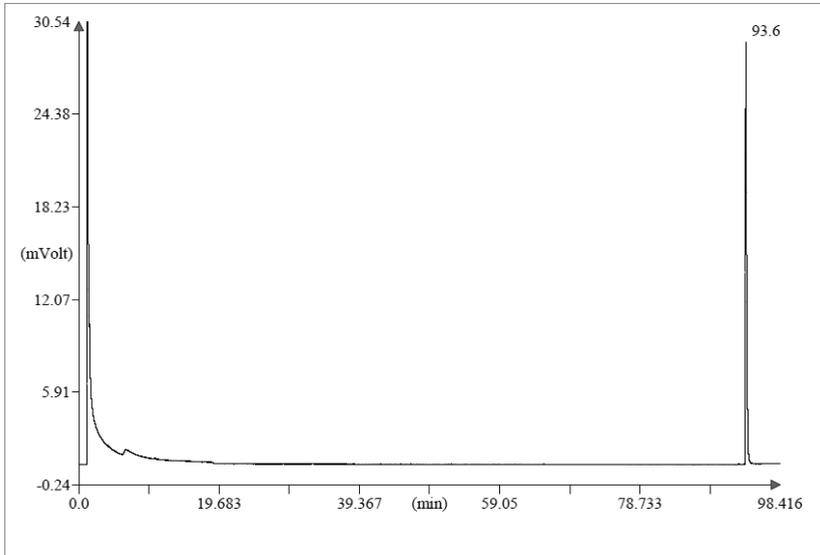


HPLC - racemischer Alkohol (Lux Amylose-1, 250 x 4.6 mm; 0.5 mL min<sup>-1</sup>; UV 208 nm; *n*-Heptan:2-Propanol 9:1);  $t_R$  [(*R*)-85] = 13.2 min,  $t_R$  [(*S*)-85] = 14.9 min.

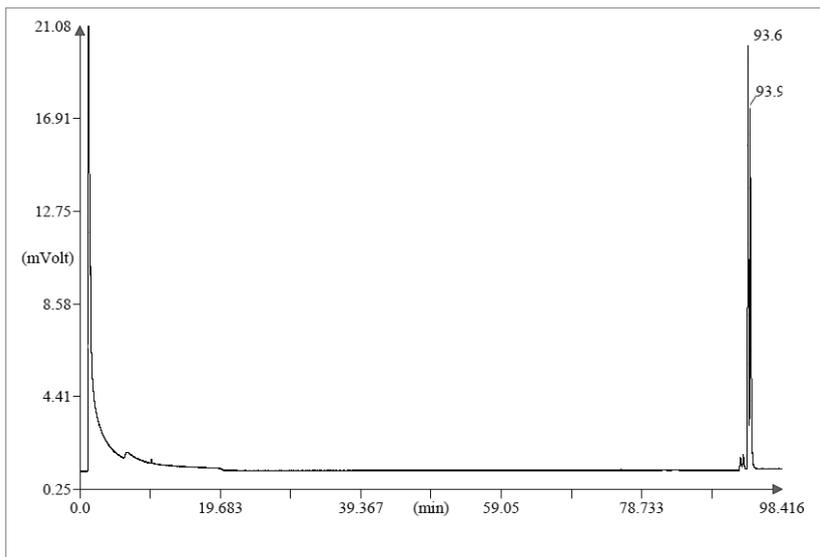


**5.2.3 (S)-7-Hydroxynon-8-ensäureethylester (84)**

GC (Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 60 min-113 °C, 0.1 °C min<sup>-1</sup> auf 116 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(S)-84] = 93.6 min.



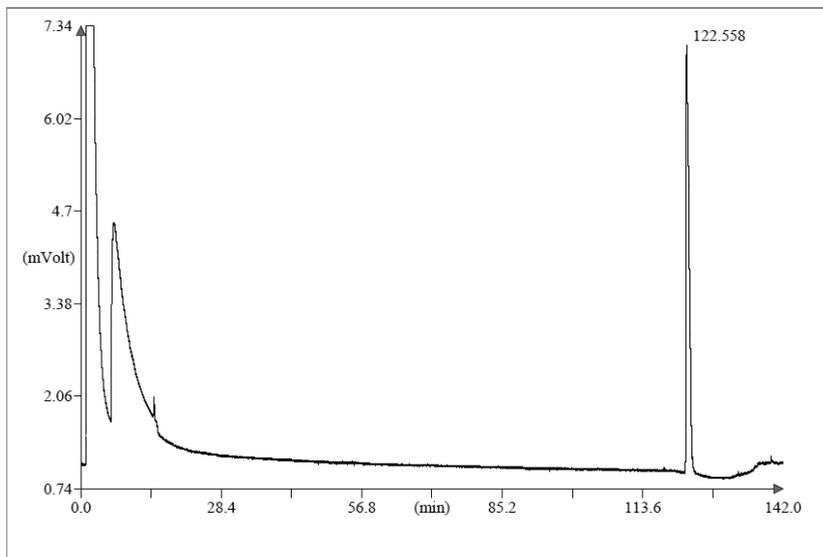
GC - racemischer Alkohol (Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 60 min-113 °C, 0.1 °C min<sup>-1</sup> auf 116 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(S)-84] = 93.6 min,  $t_R$  [(R)-84] = 93.9 min.



5.2.4 (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester (82)

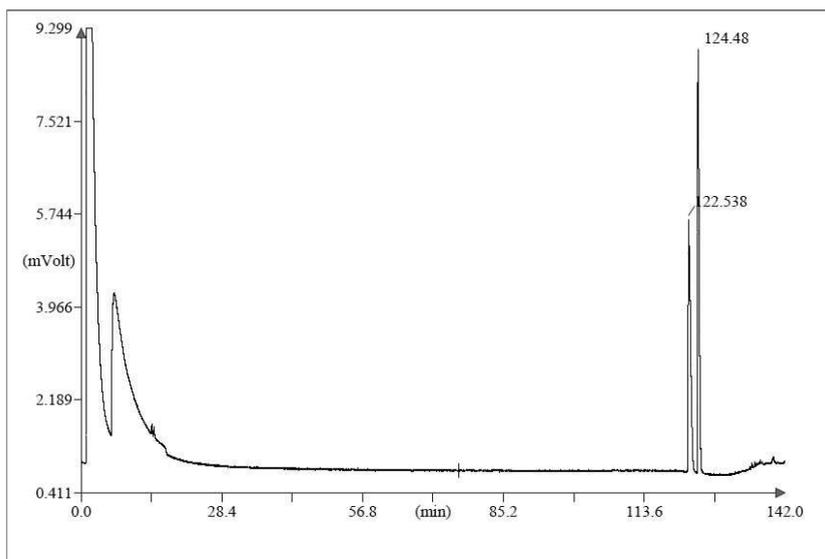
GC (Lipodex G, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 120 min-65 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);

$t_R$  [(S)-77] = 122.6 min.



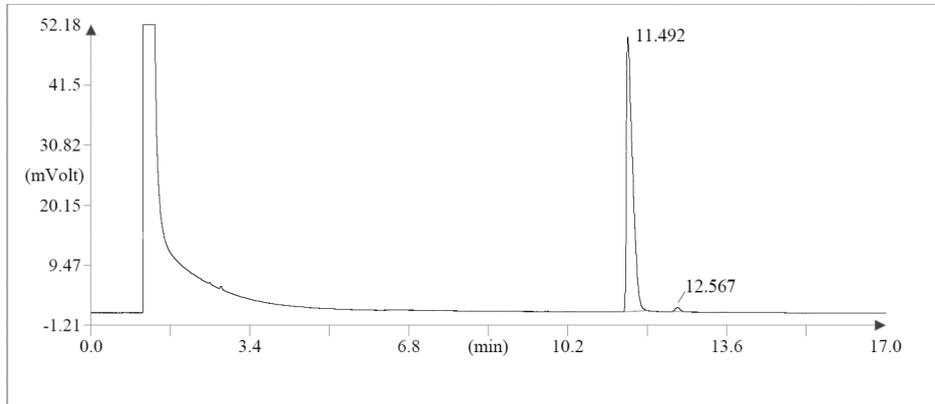
GC – racemischer Alkohol (Lipodex G, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 120 min-65 °C, 5 °C min<sup>-1</sup>

auf 150 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(S)-82] = 122.5 min,  $t_R$  [(R)-82] = 124.5 min.

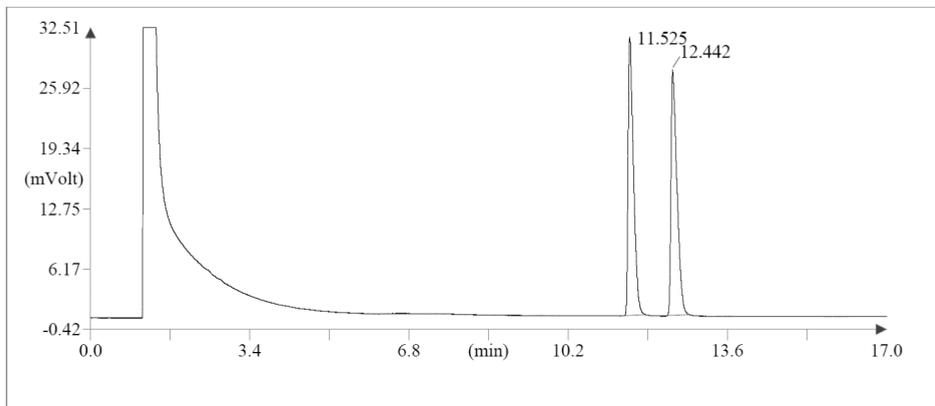


**5.2.5 (R)-2-Chlor-1-phenylethan-1-ol (97)**

GC (Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 15 min-60 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C-5 min; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(R)-97] = 11.5 min,  $t_R$  [(S)-97] = 12.6 min.

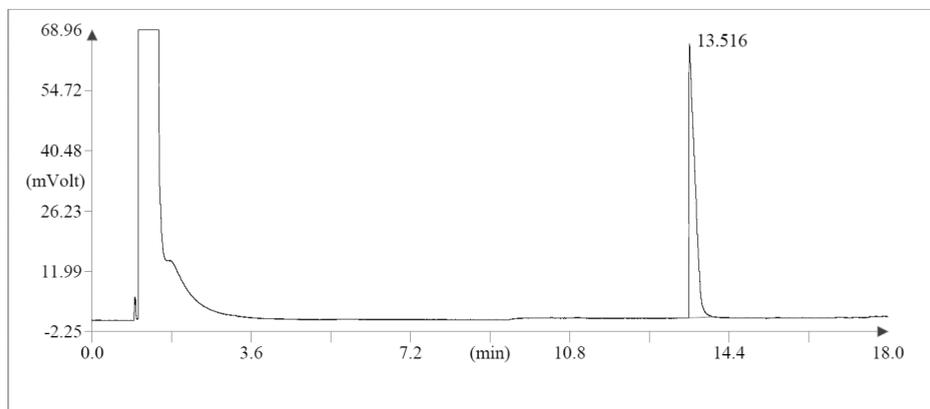


GC – racemischer Alkohol (Hydrodex- $\beta$ -TBDAC, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 15 min-60 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> auf 150 °C-5 min; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  [(R)-97] = 11.5 min,  $t_R$  [(S)-97] = 12.4 min.



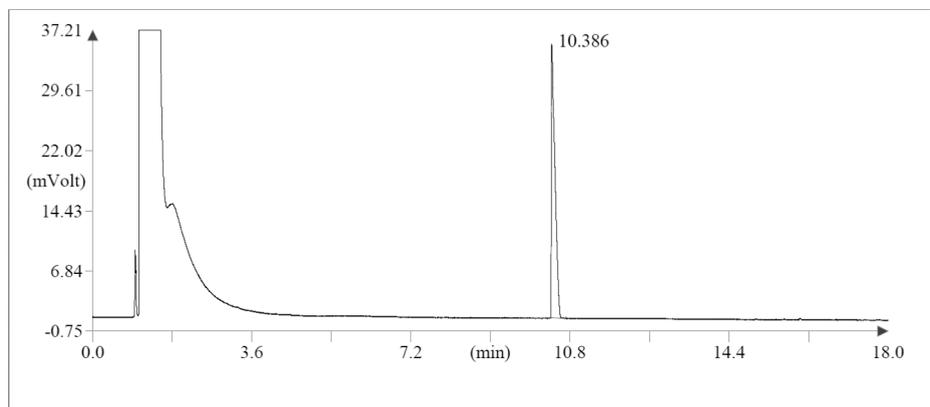
### 5.2.6 Cyclohexanon (98)

GC (Chirasil-DEX CB, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 5 min-60 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> auf 125 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  (98) = 13.5 min.



### 5.2.7 Cyclohexanol (99)

GC (Chirasil-DEX CB, 25 m x 0.25 mm; MTBE; 5 min-60 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> auf 125 °C; H<sub>2</sub>; FID);  $t_R$  (99) = 13.5 min.



## 6 LITERATUR

- [1] B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2894-2901; »Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP(H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1002/adsc.202000058
- [2] G. Ölçücü, B. Baumer, K. Küsters, K. Möllenhoff, M. Oldiges, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 1881-1896; »Catalytically-Active Inclusion Bodies – Benchmarking and Application in Flow Chemistry«. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00035
- [3] S. M. Pauls, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2018**; »Chemie im Fluss – Auf dem Weg zum Einsatz von Immobilisierten Biokatalysatoren«.
- [4] W. Böhmer, A. Volkov, K. Engelmark Cassimjee, F. G. Mutti, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1858-1867; »Continuous Flow Bioamination of Ketones in Organic Solvents at Controlled Water Activity using Immobilized  $\omega$ -Transaminases«. DOI: 10.1002/adsc.201901274
- [5] M. Bickmann, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität **2021**; »Studien zur Enreduktase YqjM in der Flow-Chemie«.
- [6] O. Deutschmann, R. Dittmeyer, J.-D. Grunwaldt, G. Kolb, S. Löbbecke, G. D. Wehinger, *Nachrichten aus der Chemie* **2019**, *67*, 50-58; »Trendbericht Technische Chemie«. DOI: 10.1002/nadc.20194088095
- [7] M. Crotti, M. S. Robescu, J. M. Bolivar, D. Ubiali, L. Wilson, M. L. Contente, *Front. Catal.* **2023**, *3*; »What's New in Flow Biocatalysis? A Snapshot of 2020–2022«. DOI: 10.3389/fctls.2023.1154452
- [8] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, M. Sun, *Molecules* **2014**, *19*, 11465-11486; »Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization«. DOI: 10.3390/molecules190811465
- [9] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468; »Understanding Enzyme Immobilisation«. DOI: 10.1039/b711564b
- [10] S. Simić, E. Zukić, L. Schmermund, K. Faber, C. K. Winkler, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1052-1126; »Shortening Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic Methods«. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00574
- [11] M. Nouaimi-Bachmann, Doctoral, Eberhard-Karls-Universität Tübingen **2003**; »Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervliesen und deren Anwendungen«.

- [12] R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724; »Biocatalysis - Key to Sustainable Industrial Chemistry«. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.09.016
- [13] U. Hanefeld, F. Hollmann, C. E. Paul, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 594-627; »Biocatalysis Making Waves in Organic Chemistry«. DOI: 10.1039/d1cs00100k
- [14] A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241-246; »Improving Enzymes by Using Them in Organic Solvents«. DOI: 10.1038/35051719
- [15] M. Hartmann, X. Kostrov, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277-6289; »Immobilization of Enzymes on Porous Silicas – Benefits and Challenges«. DOI: 10.1039/c3cs60021a
- [16] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 185-205; »Enzyme Immobilization: An Update«. DOI: 10.1007/s12154-013-0102-9
- [17] D.-M. Liu, J. Chen, Y.-P. Shi, *Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 332-342; »Advances on Methods and Easy Separated Support Materials for Enzymes Immobilization«. DOI: 10.1016/j.trac.2018.03.011
- [18] J. M. Guisan, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, D. Moreno-Gamero, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* **2022**, *35*, 100593; »Enzyme Immobilization Strategies for the Design of Robust and Efficient Biocatalysts«. DOI: 10.1016/j.cogsc.2022.100593
- [19] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639; »Advances in Enzyme Immobilisation«. DOI: 10.1007/s10529-009-0076-4
- [20] J. Hindges née Bramski, J. Döbber, M. R. Hayes, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2022**, *14*, e202200390; »Covalently Immobilized 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase (DERA) for Biocatalysis in Flow: Utilization of the 3-Hydroxyaldehyde Intermediate in Reaction Cascades«. DOI: 10.1002/cctc.202200390
- [21] K. T.sriwong, T. Matsuda, *Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 1857-1877; »Recent Advances in Enzyme Immobilization Utilizing Nanotechnology for Biocatalysis«. DOI: 10.1021/acs.oprd.1c00404
- [22] P. B. Poulsen, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1984**, *1*, 121-140; »Current Applications of Immobilized Enzymes for Manufacturing Purposes«. DOI: 10.1080/02648725.1984.10647783
- [23] J. G. Shewale, V. K. Sudhakaran, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 402-410; »Penicillin V Acylase: Its Potential in the Production of 6-Aminopenicillanic Acid«. DOI: 10.1016/s0141-0229(96)00176-7
- [24] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307; »Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance«. DOI: 10.1002/adsc.200700082
- [25] T. A. Singh, A. Jajoo, S. Bhasin, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *29*, 101766; »Optimization of Various Encapsulation Systems for Efficient Immobilization of Actinobacterial Glucose Isomerase«. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101766

- [26] A. Sivo, R. d. S. Galaverna, G. R. Gomes, J. C. Pastre, G. Vilé, *React. Chem. Eng.* **2021**; »From Circular Synthesis to Material Manufacturing: Advances, Challenges, and Future Steps for using Flow Chemistry in Novel Application Area«. DOI: 10.1039/d0re00411a
- [27] N. Adebar, H. Gröger, *Bioengineering* **2019**, *6*, 99; »Flow Process for Ketone Reduction Using a Superabsorber-Immobilized Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* in a Packed-Bed Reactor«. DOI: 10.3390/bioengineering6040099
- [28] M. Baumann, T. S. Moody, M. Smyth, S. Wharry, *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 1802-1813; »A Perspective on Continuous Flow Chemistry in the Pharmaceutical Industry«. DOI: 10.1021/acs.oprd.9b00524
- [29] J. Jiao, W. Nie, T. Yu, F. Yang, Q. Zhang, F. Aihemaiti, T. Yang, X. Liu, J. Wang, P. Li, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 4817-4838; »Multi-Step Continuous-Flow Organic Synthesis: Opportunities and Challenges«. DOI: 10.1002/chem.202004477
- [30] S. P. France, R. D. Lewis, C. A. Martinez, *JACS Au* **2023**, *3*, 715-735; »The Evolving Nature of Biocatalysis in Pharmaceutical Research and Development«. DOI: 10.1021/jacsau.2c00712
- [31] B. Pieber, T. Glasnov, C. O. Kappe, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 4368-4376; »Continuous Flow Reduction of Artemisinic Acid Utilizing Multi-Injection Strategies -Closing the Gap Towards a Fully Continuous Synthesis of Antimalarial Drugs«. DOI: 10.1002/chem.201406439
- [32] A. A. N. de Souza, E. B. A. Paez, F. F. de Assis, T. J. Brocksom, K. T. de Oliveira, in *Flow Chemistry in Drug Discovery* (Eds.: J. Alcazar, A. de la Hoz, A. Díaz-Ortiz), Springer International Publishing, Cham, **2021**, pp. 317-371. DOI: 10.1007/7355\_2021\_117
- [33] M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2450-2452; »A Flow-Based Synthesis of Imatinib: The API of Gleevec«. DOI: 10.1039/c001550d
- [34] R. A. Rocha, A. J. North, R. E. Speight, C. C. Williams, C. Scott, *Catalysts* **2022**, *12*, 1454; »Cofactor and Process Engineering for Nicotinamide Recycling and Retention in Intensified Biocatalysis«. DOI: 10.3390/catal12111454
- [35] J. Coloma, Y. Guiavarc'h, P.-L. Hagedoorn, U. Hanefeld, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 11416-11428; »Immobilisation and Flow Chemistry: Tools for Implementing Biocatalysis«. DOI: 10.1039/d1cc04315c
- [36] J. Döbber, M. Pohl, S. V. Ley, B. Musio, *React. Chem. Eng.* **2018**, *3*, 8-12; »Rapid, Selective and Stable HaloTag-LbADH Immobilization Directly from Crude Cell Extract for the Continuous Biocatalytic Production of Chiral Alcohols and Epoxides«. DOI: 10.1039/c7re00173h

- [37] T. Classen, M. Korpak, M. Schölzel, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1321-1331; »Stereoselective Enzyme Cascades: An Efficient Synthesis of Chiral  $\gamma$ -Butyrolactones«. DOI: 10.1021/cs5000262
- [38] J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 17-57; »Flow Chemistry – A Key Enabling Technology for (Multistep) Organic Synthesis«. DOI: 10.1002/adsc.201100584
- [39] C. Holtze, R. Boehling, *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2022**, *36*, 100798; »Batch or Flow Chemistry? – A Current Industrial Opinion on Process Selection«. DOI: 10.1016/j.coche.2022.100798
- [40] D. Webb, T. F. Jamison, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 675-680; »Continuous Flow Multi-Step Organic Synthesis«. DOI: 10.1039/c0sc00381f
- [41] J. Britton, C. L. Raston, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1250-1271; »Multi-Step Continuous-Flow Synthesis«. DOI: 10.1039/c6cs00830e
- [42] M. B. Plutschack, B. Pieber, K. Gilmore, P. H. Seeberger, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11796-11893; »The Hitchhiker’s Guide to Flow Chemistry«. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00183
- [43] F. M. Akwi, P. Watts, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13894-13928; »Continuous Flow Chemistry: Where Are We Now? Recent Applications, Challenges and Limitations«. DOI: 10.1039/c8cc07427e
- [44] A. Laybourn, K. Robertson, A. G. Slater, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4355-4365; »Quid Pro Flow«. DOI: 10.1021/jacs.2c13670
- [45] L.-E. Meyer, M. Hobisch, S. Kara, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2022**, *78*, 102835; »Process Intensification in Continuous Flow Biocatalysis by Up and Downstream Processing Strategies«. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102835
- [46] K. F. Jensen, *AIChE J.* **2017**, *63*, 858-869; »Flow Chemistry - Microreaction Technology Comes of Age«. DOI: 10.1002/aic.15642
- [47] T. Razzaq, T. N. Glasnov, C. O. Kappe, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1321-1325; »Continuous-Flow Microreactor Chemistry under High-Temperature/Pressure Conditions«. DOI: 10.1002/ejoc.200900077
- [48] C. Yan, J. Fraga-Dubreuil, E. Garcia-Verdugo, P. A. Hamley, M. Poliakoff, I. Pearson, A. S. Coote, *Green Chem.* **2008**, *10*, 98-103; »The Continuous Synthesis of  $\epsilon$ -Caprolactam from 6-Aminocapronitrile in High-Temperature Water«. DOI: 10.1039/b710041h
- [49] P. De Santis, L.-E. Meyer, S. Kara, *React. Chem. Eng.* **2020**, *5*, 2155-2184; »The Rise of Continuous Flow Biocatalysis – Fundamentals, Very Recent Developments and Future Perspectives«. DOI: 10.1039/d0re00335b

- [50] V. Sans, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* **2020**, *25*, 100367; »Emerging Trends in Flow Chemistry Enabled by 3D Printing: Robust Reactors, Biocatalysis and Electrochemistry«. DOI: 10.1016/j.cogsc.2020.100367
- [51] N. C. Neyt, D. L. Riley, *React. Chem. Eng.* **2021**, *6*, 1295-1326; »Application of Reactor Engineering Concepts in Continuous Flow Chemistry: A Review«. DOI: 10.1039/d1re00004g
- [52] B. Gutmann, M. Köckinger, G. Glotz, T. Ciaglia, E. Slama, M. Zadavec, S. Pfanner, M. C. Maier, H. Gruber-Wölfler, C. Oliver Kappe, *React. Chem. Eng.* **2017**, *2*, 919-927; »Design and 3D Printing of a Stainless Steel Reactor for Continuous Difluoromethylations using Fluoroform«. DOI: 10.1039/c7re00176b
- [53] M. Santi, L. Sancineto, V. Nascimento, J. Braun Azeredo, E. V. M. Orozco, L. H. Andrade, H. Gröger, C. Santi, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 990; »Flow Biocatalysis: A Challenging Alternative for the Synthesis of APIs and Natural Compounds«. DOI: 10.3390/ijms22030990
- [54] A. I. Benítez-Mateos, M. L. Contente, D. Roura Padrosa, F. Paradisi, *React. Chem. Eng.* **2021**; »Flow Biocatalysis 101: Design, Development and Applications«. DOI: 10.1039/d0re00483a
- [55] J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4583-4592; »Ten Key Issues in Modern Flow Chemistry«. DOI: 10.1039/c0cc05060a
- [56] A. Bérard, B. Blais, G. S. Patience, *Can. J. Chem. Eng.* **2020**, *98*, 848-867; »Experimental Methods in Chemical Engineering: Residence Time Distribution-RTD«. DOI: 10.1002/cjce.23711
- [57] B. O. Burek, A. W. H. Dawood, F. Hollmann, A. Liese, D. Holtmann, *Front. Catal.* **2022**, *2*; »Process Intensification as Game Changer in Enzyme Catalysis«. DOI: 10.3389/fects.2022.858706
- [58] L. A. Thompson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 324-337; »Recent Applications of Polymer-Supported Reagents and Scavengers in Combinatorial, Parallel, or Multistep Synthesis«. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00096-x
- [59] M. A. Corsello, N. K. Garg, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 359-366; »Synthetic Chemistry Fuels Interdisciplinary Approaches to the Production of Artemisinin«. DOI: 10.1039/c4np00113c
- [60] N. J. White, *Science* **2008**, *320*, 330-334; »Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success«. DOI: 10.1126/science.1155165
- [61] N. J. White, T. T. Hien, F. H. Nosten, *Trends Parasitol.* **2015**, *31*, 607-610; »A Brief History of Qinghaosu«. DOI: 10.1016/j.pt.2015.10.010
- [62] A. C. R. G. Qinghaosu, *Chin. Med. J.* **1979**, *92*, 811-816; »Antimalaria Studies On Qinghaosu«. DOI: 10.5555/cmj.0366-6999.92.12.p811.01

- [63] K. Gilmore, D. Kopetzki, J. W. Lee, Z. Horváth, D. T. McQuade, A. Seidel-Morgenstern, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12652-12655; »Continuous Synthesis of Artemisinin-Derived Medicines«. DOI: 10.1039/c4cc05098c
- [64] B. Pieber, S. T. Martinez, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 10431-10434; B. Pieber, S. T. Martinez, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10241-10244; »In Situ Generation of Diimide from Hydrazine and Oxygen: Continuous-Flow Transfer Hydrogenation of Olefins«. DOI: 10.1002/ange.201303528 & 10.1002/anie.201303528
- [65] Z. Amara, J. F. B. Bellamy, R. Horvath, S. J. Miller, A. Beeby, A. Burgard, K. Rossen, M. Poliakov, M. W. George, *Nat. Chem.* **2015**, 7, 489-495; »Applying Green Chemistry to the Photochemical Route to Artemisinin«. DOI: 10.1038/nchem.2261
- [66] E. Katchalski-Katzir, *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 471-478; »Immobilized Enzymes - Learning from Past Successes and Failures«. DOI: 10.1016/0167-7799(93)90080-S
- [67] H. H. Nguyen, M. Kim, *Appl. Sci. Conver. Technol.* **2017**, 26, 157-163; »An overview of Techniques in Enzyme Immobilization«. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7
- [68] R. A. Sheldon, *Catalysts* **2019**, 9, 261; »CLEAs, Combi-CLEAs and ‘Smart’ Magnetic CLEAs: Biocatalysis in a Bio-Based Economy«. DOI: 10.3390/catal9030261
- [69] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2006**. DOI: 10.1002/3527607668
- [70] J. M. Nelson, E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 1109-1115; »Adsorption of Invertase«. DOI: 10.1021/ja02262a018
- [71] B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera, in *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* (Ed.: J. M. Guisan), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, pp. 15-31. DOI: 10.1007/978-1-62703-550-7\_2
- [72] L. Cao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 217-226; »Immobilised Enzymes: Science or Art?«. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.02.014
- [73] A. Liese, L. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6236-6249; »Evaluation of Immobilized Enzymes for Industrial Applications«. DOI: 10.1039/c3cs35511j
- [74] J. Bié, B. Sepodes, P. C. B. Fernandes, M. H. L. Ribeiro, *Processes* **2022**, 10, 494; »Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications«. DOI: 10.3390/pr10030494
- [75] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6223-6235; »Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How«. DOI: 10.1039/c3cs60075k

- [76] Y. Zhu, Q. Chen, L. Shao, Y. Jia, X. Zhang, *React. Chem. Eng.* **2020**, *5*, 9-32; »Microfluidic Immobilized Enzyme Reactors for Continuous Biocatalysis«. DOI: 10.1039/c9re00217k
- [77] J. C. Quilles Junior, A. L. Ferrarezi, J. P. Borges, R. R. Brito, E. Gomes, R. da Silva, J. M. Guisán, M. Boscolo, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 1933-1943; »Hydrophobic Adsorption in Ionic Medium Improves the Catalytic Properties of Lipases Applied in the Triacylglycerol Hydrolysis by Synergism«. DOI: 10.1007/s00449-016-1667-9
- [78] A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Hugueta, J. M. Guisán, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486-493; »A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports«. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19980605)58:5<486::aid-bit4>3.0.co;2-9
- [79] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, L. Gardossi, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6262-6276; »Efficient Immobilisation of Industrial Biocatalysts: Criteria and Constraints for the Selection of Organic Polymeric Carriers and Immobilisation Methods«. DOI: 10.1039/c3cs35464d
- [80] J. M. Guisan, J. M. Bolivar, F. López-Gallego, J. Rocha-Martín, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Vol. 2100, 4th ed., Humana, New York, NY, **2020**. DOI: 10.1007/978-1-0716-0215-7
- [81] V. Kasche, *Enzyme Microb. Technol.* **1983**, *5*, 2-13; »Correlation of Experimental and Theoretical Data for Artificial and Natural Systems with Immobilized Biocatalysts«. DOI: 10.1016/0141-0229(83)90056-x
- [82] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. A. Wahab, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205-220; »An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes«. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192
- [83] P. Zucca, E. Sanjust, *Molecules* **2014**, *19*, 14139-14194; »Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms«. DOI: 10.3390/molecules190914139
- [84] R. A. Sheldon, P. C. Pereira, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678-2691; »Biocatalysis Engineering: The Big Picture«. DOI: 10.1039/c6cs00854b
- [85] V. L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, in *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 79 (Eds.: S.-K. Kim, F. Toldrá), Academic Press, **2016**, pp. 179-211. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.07.004
- [86] B.-W. Park, D.-Y. Yoon, D.-S. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1-10; »Recent Progress in Bio-Sensing Techniques with Encapsulated Enzymes«. DOI: 10.1016/j.bios.2010.04.033
- [87] A. Dwevedi, in *Enzyme immobilization*, Springer, **2016**, pp. 21-44. DOI: 10.1007/978-3-319-41418-8\_2

- [88] J. M. Guisan, in *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, **2006**, pp. 1-13. DOI: 10.1007/978-1-59745-053-9\_1
- [89] S. C. Tsang, C. H. Yu, X. Gao, K. Tam, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16914-16922; »Silica-Encapsulated Nanomagnetic Particle as a New Recoverable Biocatalyst Carrier«. DOI: 10.1021/jp062275s
- [90] A. López, N. Lázaro, A. M. Marqués, *J. Microbiol. Methods* **1997**, *30*, 231-234; »The Interphase Technique: A Simple Method of Cell Immobilization in Gel-Beads«. DOI: 10.1016/s0167-7012(97)00071-7
- [91] A. Subramanian, S. J. Kennel, P. I. Oden, K. B. Jacobson, J. Woodward, M. J. Doktycz, *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *24*, 26-34; »Comparison of Techniques for Enzyme Immobilization on Silicon Supports«. DOI: 10.1016/s0141-0229(98)00084-2
- [92] K. Won, S. Kim, K.-J. Kim, H. W. Park, S.-J. Moon, *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2149-2154; »Optimization of Lipase Entrapment in Ca-Alginate Gel Beads«. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.08.014
- [93] C.-J. Chiang, L.-T. Hsiau, W.-C. Lee, *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 121-125; »Immobilization of Cell-Associated Enzymes by Entrapment in Polymethacrylamide Beads«. DOI: 10.1023/b:bite.0000034016.43050.22
- [94] J. Meyer, L.-E. Meyer, S. Kara, *Eng. Life Sci.* **2022**, *22*, 165-177; »Enzyme Immobilization in Hydrogels: A Perfect Liaison for Efficient and Sustainable Biocatalysis«. DOI: 10.1002/elsc.202100087
- [95] B. Schmiege, A. Schimek, M. Franzreb, *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 659-667; »Development and Performance of a 3D-Printable Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Hydrogel Suitable for Enzyme Entrapment and Long-Term Biocatalytic Applications«. DOI: 10.1002/elsc.201800030
- [96] B. Schmiege, J. Döbber, F. Kirschhöfer, M. Pohl, M. Franzreb, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *6*; »Advantages of Hydrogel-Based 3D-Printed Enzyme Reactors and their Limitations for Biocatalysis«. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00211
- [97] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chem.* **2017**, *19*, 3927-3937; »Immobilization Engineering – How to Design Advanced Sol–Gel Systems for Biocatalysis?«. DOI: 10.1039/c7gc00896a
- [98] A. L. Margolin, M. A. Navia, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2262-2281; A. L. Margolin, M. A. Navia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2204-2222; »Protein Crystals as Novel Catalytic Materials«. DOI: 10.1002/1521-3757(20010618)113:12<2262::aid-ange2262>3.0.co;2-j & 10.1002/1521-3773(20010618)40:12<2204::aid-anie2204>3.0.co;2-j

- [99] L. Cao, L. v. Langen, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 387-394; »Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free?«. DOI: 10.1016/s0958-1669(03)00096-x
- [100] F. A. Quijoch, F. M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1964**, *52*, 833-839; »Intermolecular Cross Linking of a Protein in the Crystalline State: Carboxypeptidase-A«. DOI: 10.1073/pnas.52.3.833
- [101] F. A. Quijoch, F. M. Richards, *Biochem.* **1966**, *5*, 4062-4076; »The Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-A in the Solid State«. DOI: 10.1021/bi00876a041
- [102] L. Cao, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361-1364; »Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase«. DOI: 10.1021/ol005593x
- [103] L. Cao, L. M. van Langen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 665-670; »Cross-Linked Aggregates of Penicillin Acylase: Robust Catalysts for the Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics«. DOI: 10.1016/s1381-1177(00)00078-3
- [104] K. Ahumada, P. Urrutia, A. Illanes, L. Wilson, *Food Bioprod. Process.* **2015**, *94*, 555-560; »Production of Combi-CLEAs of Glycosidases Utilized for Aroma Enhancement in Wine«. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003
- [105] S. Ba, A. Mialon, H. Cabana, J. Jones, *J. Enzym. Res.* **2012**, *3*, 23-28; »Laccase Insolubilized as Combination of Crosslinked Enzyme Aggregates: Characterization and Potential Application in Wastewater Treatment«. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.08.003
- [106] I. E. Touahar, L. Haroune, S. Ba, J.-P. Bellenger, H. Cabana, *Sci. Total Environ.* **2014**, *481*, 90-99; »Characterization of Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates from Laccase, Versatile Peroxidase and Glucose Oxidase, and their Utilization for the Elimination of Pharmaceuticals«. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.132
- [107] R. Taboada-Puig, C. Junghanns, P. Demarche, M. Moreira, G. Feijoo, J. Lema, S. N. Agathos, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6593-6599; »Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates from Versatile Peroxidase and Glucose Oxidase: Production, Partial Characterization and Application for the Elimination of Endocrine Disruptors«. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.018
- [108] K.-L. Yang, *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, *100*, 52-59; »Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates of Horseradish Peroxidase and Glucose Oxidase for Catalyzing Cascade Chemical Reactions«. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.02.007
- [109] H. Li, W. Xiao, P. Xie, L. Zheng, *Enzyme Microb. Technol.* **2018**, *109*, 66-73; »Co-Immobilization of Enoate Reductase with a Cofactor-Recycling Partner Enzyme«. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.09.013
- [110] R. A. Sheldon, A. Basso, D. Brady, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5850-5862; »New Frontiers in Enzyme Immobilisation: Robust Biocatalysts for a Circular Bio-based Economy«. DOI: 10.1039/d1cs00015b

- [111] T. T. Ngo, H. M. Lenhoff, J. Ivy, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1982**, *7*, 443-454; »Biotinyl-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Preparation, Kinetics, and Modulation by Avidin«. DOI: 10.1007/bf02799175
- [112] F. Kazenwadel, M. Franzreb, B. E. Rapp, *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4030-4037; »Synthetic Enzyme Supercomplexes: Co-Immobilization of Enzyme Cascades«. DOI: 10.1039/c5ay00453e
- [113] P. Fernandes, C. C. C. R. de Carvalho, *Processes* **2021**, *9*, 225; »Multi-Enzyme Systems in Flow Chemistry«. DOI: 10.3390/pr9020225
- [114] M. Plž, T. Petrovičová, M. Rebroš, *Molecules* **2020**, *25*, 4278; »Semi-Continuous Flow Biocatalysis with Affinity Co-Immobilized Ketoreductase and Glucose Dehydrogenase«. DOI: 10.3390/molecules25184278
- [115] T. Peschke, P. Bitterwolf, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Chem. Eng. Technol.* **2019**, *42*, 2009-2017; »Self-Immobilizing Oxidoreductases for Flow Biocatalysis in Miniaturized Packed-Bed Reactors«. DOI: 10.1002/ceat.201900073
- [116] J. Tian, R. Jia, D. Wenge, H. Sun, Y. Wang, Y. Chang, H. Luo, *Biotechnol. Lett.* **2021**, *43*, 1075-1087; »One-Step Purification and Immobilization of Recombinant Proteins using SpyTag/SpyCatcher Chemistry«. DOI: 10.1007/s10529-021-03098-x
- [117] A. A. Caparco, D. R. Dautel, J. A. Champion, *Small* **2022**, *18*, 2106425; »Protein Mediated Enzyme Immobilization«. DOI: 10.1002/smll.202106425
- [118] C. G. England, H. Luo, W. Cai, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 975-986; »HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications«. DOI: 10.1021/acs.bioconjugchem.5b00191
- [119] G. V. Los, A. Darzins, N. Karassina, C. Zimprich, R. Learish, M. G. McDougall, L. P. Encell, R. Friedman-Ohana, M. Wood, G. Vidugiris, K. Zimmerman, P. Otto, D. H. Klaubert, K. V. Wood, *Cell Notes* **2005**, *11*, 2-6; »HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Capture«. DOI: N/A
- [120] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382; »HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis«. DOI: 10.1021/cb800025k
- [121] L. P. Encell, R. Friedman Ohana, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, M. G. Wood, G. V. Los, M. G. McDougall, C. Zimprich, N. Karassina, R. D. Learish, R. Hurst, J. Hartnett, S. Wheeler, P. Stecha, J. English, K. Zhao, J. Mendez, H. A. Benink, N. Murphy, D. L. Daniels, M. R. Slater, M. Urh, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *Curr. Chem. Genomics* **2012**, *6*, 55-71; »Development of a Dehalogenase-Based Protein Fusion Tag Capable of Rapid, Selective and Covalent Attachment to Customizable Ligands«. DOI: 10.2174/1875397301206010055

- [122] G. V. Los, K. Wood, in *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery* (Eds.: D. L. Taylor, J. R. Haskins, K. A. Giuliano), Humana Press, Totowa, NJ, **2006**, pp. 195-208. DOI: 10.1385/1-59745-217-3:195
- [123] J. F. Schindler, P. A. Naranjo, D. A. Honaberger, C.-H. Chang, J. R. Brainard, L. A. Vanderberg, C. J. Unkefer, *Biochem.* **1999**, *38*, 5772-5778; »Haloalkane Dehalogenases: Steady-State Kinetics and Halide Inhibition«. DOI: 10.1021/bi982853y
- [124] D. B. Janssen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 150-159; »Evolving Haloalkane Dehalogenases«. DOI: 10.1016/j.cbpa.2004.02.012
- [125] B. Baumer, Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität **2017**; »Auf dem Weg zur effizienten Immobilisierung HaloTag-gebundener Enzyme: Linker und Matrizen«. DOI: 10.1021/ja00148a003
- [126] P. Weber, D. Ohlendorf, J. Wendoloski, F. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85-88; »Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin«. DOI: 10.1126/science.2911722
- [127] A. Chilkoti, P. S. Stayton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10622-10628; »Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics«. DOI: 10.1021/ja00148a003
- [128] B. Wu, T. Yang, D. Zou, L. Jin, X. Liang, T. Li, G. Huang, J. Zhang, *Int. Dairy J.* **2020**, *102*, 104594; »Nuclear Magnetic Resonance Biosensor Based on Streptavidin–Biotin System and Poly-L-Lysine Macromolecular Targeted Gadolinium Probe for Rapid Detection of Salmonella in Milk«. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104594
- [129] J. Döbber, T. Gerlach, H. Offermann, D. Rother, M. Pohl, *Green Chem.* **2018**, *20*, 544-552; »Closing the Gap for Efficient Immobilization of Biocatalysts in Continuous Processes: HaloTag™ Fusion Enzymes for a Continuous Enzymatic Cascade Towards a Vicinal Chiral Diol«. DOI: 10.1039/c7gc03225k
- [130] D.-H. Zhang, L.-J. Peng, Y. Wang, Y.-Q. Li, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2015**, *129*, 206-210; »Lipase Immobilization on Epoxy-Activated Poly(Vinyl Acetate-Acrylamide) Microspheres«. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.056
- [131] B. Tural, T. Tarhan, S. Tural, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *102*, 188-194; »Covalent Immobilization of Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida* on Magnetic Epoxy Support and its Carbonylation Reactivity«. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.02.016
- [132] A. Grigoletto, A. Mero, H. Yoshioka, O. Schiavon, G. Pasut, *J. Drug Targeting* **2017**, *25*, 856-864; »Covalent Immobilisation of Transglutaminase: Stability and Applications in Protein PEGylation«. DOI: 10.1080/1061186x.2017.1363211
- [133] R. F. Ohana, R. Hurst, J. Vidugiriene, M. R. Slater, K. V. Wood, M. Urh, *Protein Expr. Purif.* **2011**, *76*, 154-164; »HaloTag-Based Purification of Functional Human Kinases from Mammalian Cells«. DOI: 10.1016/j.pep.2010.11.014

- [134] H. Jörnvall, M. Landreh, L. J. Östberg, *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *234*, 75-79; »Alcohol Dehydrogenase, SDR and MDR Structural Stages, Present Update and Altered Era«. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.017
- [135] V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130; »Specification of the Stereospecificity of Some Oxido-reductases by Diamond Lattice Sections«. DOI: 10.1351/pac196409010119
- [136] M. M. Musa, *ChemistryOpen* **2022**, *11*, e202100251; »Alcohol Dehydrogenases with anti-Prelog Stereopreference in Synthesis of Enantiopure Alcohols«. DOI: 10.1002/open.202100251
- [137] J. Döbber, Dissertation, **2018**; »Fusion Tag-based Immobilization Methods for One-Step Purification and Immobilization of Enzymes«.
- [138] M. Hall, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 958-989; »Enzymatic Strategies for Asymmetric Synthesis«. DOI: 10.1039/d1cb00080b
- [139] W. Hummel, in *New enzymes for organic synthesis*, Springer, **1997**, pp. 145-184. DOI: 10.1007/bfb0103304
- [140] K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 317-328; »The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency«. DOI: 10.1016/s0022-2836(03)00081-0
- [141] N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813; »Atomic Resolution Structures of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Provide the Structural Bases of its Substrate and Cosubstrate Specificity«. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.04.029
- [142] S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25*, 267-281; »Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: A Versatile Robust Catalyst for Enantioselective Transformations«. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.196
- [143] R. Machielsen, L. L. Looger, J. Raedts, S. Dijkhuizen, W. Hummel, H.-G. Hennemann, T. Daussmann, J. van der Oost, *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 38-44; »Cofactor Engineering of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase by Computational Design«. DOI: 10.1002/elsc.200800046
- [144] L. Bering, J. Thompson, J. Mickelfield, *Trends Chem.* **2022**, *4*, 392-408; »New Reaction Pathways by Integrating Chemo- and Biocatalysis«. DOI: 10.1016/j.trechm.2022.02.008
- [145] M. Mantel, M. Giesler, M. Guder, E. Rütthlein, L. Hartmann, J. Pietruszka, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 16836-16842; M. Mantel, M. Giesler, M. Guder, E. Rütthlein, L. Hartmann, J. Pietruszka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 16700-16706; »Lewis Base–Brønsted Acid–Enzyme Catalysis in Enantioselective Multistep One-Pot Syntheses«. DOI: 10.1002/ange.202103406 & 10.1002/anie.202103406

- [146] A. V. Fejzagić, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, *24*, 4008; »Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow«. DOI: 10.3390/molecules24214008
- [147] C. M. Harris, R. Kannan, H. Kopecka, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6652-6658; »The Role of the Chlorine Substituents in the Antibiotic Vancomycin: Preparation and Characterization of Mono-and Didechlorovancomycin«. DOI: 10.1021/ja00309a038
- [148] W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7312-7317; »Synthesis of Enantiopure Fluorohydrins Using Alcohol Dehydrogenases at High Substrate Concentrations«. DOI: 10.1021/jo400962c
- [149] F. Z. Ibn Majdoub Hassani, S. Amzazi, J. Kreit, I. Lavandera, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 832-836; »Deep Eutectic Solvents as Media in Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Reductions of Halogenated Ketones«. DOI: 10.1002/cctc.201901582
- [150] J. Kulig, A. Frese, W. Kroutil, M. Pohl, D. Rother, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 1838-1848; »Biochemical Characterization of an Alcohol Dehydrogenase from *Ralstonia sp.*«. DOI: 10.1002/bit.24857
- [151] I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6003-6005; »Stereoselective Bioreduction of Bulky-Bulky Ketones by a Novel ADH from *Ralstonia sp.*«. DOI: 10.1021/jo800849d
- [152] H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 356-365; »Structures of Alcohol Dehydrogenases from *Ralstonia* and *Sphingobium spp.* Reveal the Molecular Basis for Their Recognition of 'Bulky-Bulky' Ketones«. DOI: 10.1007/s11244-013-0191-2
- [153] C. Filling, K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jörnvall, U. Oppermann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25677-25684; »Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases«. DOI: 10.1074/jbc.M202160200
- [154] J. Kulig, R. C. Simon, C. A. Rose, S. M. Husain, M. Häckh, S. Lüdeke, K. Zeitler, W. Kroutil, M. Pohl, D. Rother, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1580-1589; »Stereoselective Synthesis of Bulky 1,2-Diols with Alcohol Dehydrogenases«. DOI: 10.1039/c2cy20120h
- [155] K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1066-1072; »Expanding the Scope of Alcohol Dehydrogenases towards Bulkier Substrates: Stereo- and Enantioselectivity for  $\alpha,\alpha$ -Dihalogenated Ketones«. DOI: 10.1002/cctc.201300834
- [156] S. H. H. Younes, Y. Ni, S. Schmidt, W. Kroutil, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 1389-1392; »Alcohol Dehydrogenases Catalyze the Reduction of Thioesters«. DOI: 10.1002/cctc.201700165

- [157] A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743-1749; »Access to Enantiopure  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -hydroxy Esters through Dynamic Kinetic Resolutions Employing Purified/Overexpressed Alcohol Dehydrogenases«. DOI: 10.1002/adsc.201200139
- [158] J. Y. Gauthier, N. Chauret, W. Cromlish, S. Desmarais, L. T. Duong, J.-P. Falguyret, D. B. Kimmel, S. Lamontagne, S. Léger, T. LeRiche, C. S. Li, F. Massé, D. J. McKay, D. A. Nicoll-Griffith, R. M. Oballa, J. T. Palmer, M. D. Percival, D. Riendeau, J. Robichaud, G. A. Rodan, S. B. Rodan, C. Seto, M. Thérien, V.-L. Truong, M. C. Venuti, G. Wesolowski, R. N. Young, R. Zamboni, W. C. Black, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 923-928; »The Discovery of Odanacatib (MK-0822), a Selective Inhibitor of Cathepsin K«. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.12.047
- [159] D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5800-5807; »Chemoenzymatic Synthesis of an Odanacatib Precursor through a Suzuki-Miyaura Cross-Coupling and Bioreduction Sequence«. DOI: 10.1002/cctc.201901351
- [160] X. Chen, H. Zhang, M. A. Maria-Solano, W. Liu, J. Li, J. Feng, X. Liu, S. Osuna, R.-T. Guo, Q. Wu, D. Zhu, Y. Ma, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 931-941; »Efficient Reductive Desymmetrization of Bulky 1,3-Cyclodiketones Enabled by Structure-Guided Directed Evolution of a Carbonyl Reductase«. DOI: 10.1038/s41929-019-0347-y
- [161] H. Zhang, L. Zhu, J. Feng, X. Liu, X. Chen, Q. Wu, D. Zhu, *Catal. Sci. Technol.* **2022**, *12*, 5841-5849; »Directed Evolution of an Alcohol Dehydrogenase for the Desymmetric Reduction of 2,2-Disubstituted Cyclopenta-1,3-diones by Enzymatic Hydrogen Transfer«. DOI: 10.1039/d2cy00559j
- [162] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 89-123; S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88-119; »Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications«. DOI: 10.1002/ange.202006648 & 10.1002/anie.202006648
- [163] R. Woodyer, J. L. Wheatley, H. A. Relyea, S. Rimkus, W. A. van der Donk, *Biochem.* **2005**, *44*, 4765-4774; »Site-Directed Mutagenesis of Active Site Residues of Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.1021/bi047868c
- [164] W. W. Metcalf, R. S. Wolfe, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5547-5558; »Molecular Genetic Analysis of Phosphite and Hypophosphite Oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88«. DOI: 10.1128/jb.180.21.5547-5558.1998
- [165] A. M. G. Costas, A. K. White, W. W. Metcalf, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17429-17436; »Purification and Characterization of a Novel Phosphorus-oxidizing Enzyme from *Pseudomonas stutzeri* WM88«. DOI: 10.1074/jbc.M011764200
- [166] H. A. Relyea, W. A. van der Donk, *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 171-189; »Mechanism and Applications of Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.1016/j.bioorg.2005.01.003

- [167] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2672-2673; »Phosphite Dehydrogenase: An Unusual Phosphoryl Transfer Reaction«. DOI: 10.1021/ja004301k
- [168] K. E. Ranaghan, J. E. Hung, G. J. Bartlett, T. J. Mooibroek, J. N. Harvey, D. N. Woolfson, W. A. van der Donk, A. J. Mulholland, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2191-2199; »A Catalytic Role for Methionine Revealed by a Combination of Computation and Experiments on Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.1039/c3sc53009d
- [169] R. Woodyer, W. A. van der Donk, H. Zhao, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 237-245; »Optimizing a Biocatalyst for Improved NAD(P)H Regeneration: Directed Evolution of Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.2174/138620706776843246
- [170] G. W. Howe, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 17820-17824; »<sup>18</sup>O Kinetic Isotope Effects Reveal an Associative Transition State for Phosphite Dehydrogenase Catalyzed Phosphoryl Transfer«. DOI: 10.1021/jacs.8b06301
- [171] D. R. Stevens, S. Hammes-Schiffer, *Biochem.* **2020**, *59*, 943-954; »Examining the Mechanism of Phosphite Dehydrogenase with Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Free Energy Simulations«. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b01089
- [172] G. W. Howe, W. A. van der Donk, *Biochem.* **2019**, *58*, 4260-4268; »Temperature-Independent Kinetic Isotope Effects as Evidence for a Marcus-like Model of Hydride Tunneling in Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00732
- [173] T. W. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, **2007**, *96*, 18-26; »Efficient Regeneration of NADPH using an Engineered Phosphite Dehydrogenase«. DOI: 10.1002/bit.21168
- [174] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1377-1380; »A Novel, Efficient Regenerating Method of NADPH using a New Formate Dehydrogenase«. DOI: 10.1016/0040-4039(96)00010-x
- [175] D. Remonatto, R. H. Miotti Jr, R. Monti, J. C. Bassan, A. V. de Paula, *Process Biochem.* **2022**, *114*, 1-20; »Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review«. DOI: 10.1016/j.procbio.2022.01.004
- [176] P. Chandra, Enespa, R. Singh, P. K. Arora, *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 169; »Microbial Lipases and their Industrial Applications: A Comprehensive Review«. DOI: 10.1186/s12934-020-01428-8
- [177] C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380-2420; »Novozym 435: The "Perfect" Lipase Immobilized Biocatalyst?«. DOI: 10.1039/c9cy00415g
- [178] J. K. Poppe, C. R. Matte, V. O. de Freitas, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, M. A. Záchia Ayub, *Biotechnol. Progr.* **2018**, *34*, 952-959; »Enzymatic Synthesis of

- Ethyl Esters from Waste Oil using Mixtures of Lipases in a Plug-Flow Packed-Bed Continuous Reactor«. DOI: 10.1002/btpr.2650
- [179] B. G. Palma, M. A. do Nascimento, R. A. C. Leão, O. G. Pandoli, R. O. M. A. de Souza, in *Biocatalysis for Practitioners*, **2021**, pp. 297-315. DOI: 10.1002/9783527824465.ch11
- [180] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290-6307; »Modifying Enzyme Activity and Selectivity by Immobilization«. DOI: 10.1039/c2cs35231a
- [181] H. M. Salvi, M. P. Kamble, G. D. Yadav, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *184*, 630-643; »Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase: Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling«. DOI: 10.1007/s12010-017-2572-7
- [182] A. R. Aguillón, M. N. Avelar, L. E. Gotardo, S. P. de Souza, R. A. C. Leão, I. Itabaiana, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, *Mol. Catal.* **2019**, *467*, 128-134; »Immobilized Lipase Screening towards Continuous-Flow Kinetic Resolution of (±)-1,2-Propanediol«. DOI: 10.1016/j.mcat.2019.01.034
- [183] E. P. Cipolatti, N. S. Rios, J. S. Sousa, J. d. M. Robert, A. A. T. da Silva, M. C. C. Pinto, A. B. C. Simas, E. Vilarrasa-García, R. Fernandez-Lafuente, L. R. B. Gonçalves, D. M. G. Freire, E. A. Manoel, *Mol. Catal.* **2021**, *505*, 111529; »Synthesis of Lipase/Silica Biocatalysts through the Immobilization of Calb on Porous Sba-15 and their Application on the Resolution of Pharmaceutical Derivatives and on Nutraceutical Enrichment of Natural Oil«. DOI: 10.1016/j.mcat.2021.111529
- [184] B. G. Palma, R. A. C. Leão, R. O. M. A. de Souza, O. G. Pandoli, *Catal. Today* **2021**, *381*, 280-287; »Immobilization of Lipases on Lignocellulosic Bamboo Powder for Biocatalytic Transformations in Batch and Continuous Flow«. DOI: 10.1016/j.cattod.2020.04.041
- [185] B. Kovács, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6873-6877; »*Candida antarctica* Lipase B Catalysed Kinetic Resolution of 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -Carbolines: Substrate Specificity«. DOI: 10.1016/j.tet.2018.10.034
- [186] K. Zhang, Z. Pan, Z. Diao, S. Liang, S. Han, S. Zheng, Y. Lin, *Enzyme Microb. Technol.* **2018**, *110*, 8-13; »Kinetic Resolution of *sec*-Alcohols Catalysed by *Candida antarctica* Lipase B Displaying *Pichia pastoris* Whole-Cell Biocatalyst«. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.11.005
- [187] W. P. Juma, V. Chhiba, D. Brady, M. L. Bode, *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28*, 1169-1174; »Enzymatic Kinetic Resolution of Morita-Baylis-Hillman Acetates«. DOI: 10.1016/j.tetasy.2017.08.001
- [188] X. Tian, S. Zhang, L. Zheng, *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *84*, 32-40; »First Novozym 435 Lipase-Catalyzed Morita-Baylis-Hillman Reaction in the Presence of Amides«. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.12.006

- [189] O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725; »Lipase Catalysed Michael Addition of Secondary Amines to Acrylonitrile«. DOI: 10.1039/b402244k
- [190] C. Wang, N. Wang, X. Liu, P. Wan, X. He, Y. Shang, *Fibers Polym.* **2018**, *19*, 1611-1617; »Expanding Application of Immobilized *Candida antarctica* Lipase B: A Green Enzyme Catalyst for Knoevenagel Condensation Reaction«. DOI: 10.1007/s12221-018-8200-5
- [191] D. J. Strub, A. Garbos, S. Lochynskia, *Arkivoc* **2017**, *2*, 313-323; »Synthesis, Lipase Catalyzed Kinetic Resolution, and Determination of the Absolute Configuration of Enantiomers of the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-methylenebutanenitrile«. DOI: 10.3998/ark.5550190.p009.749
- [192] R. Teng, C. Ang, D. McManus, D. Armstrong, S. Mau, A. Bacic, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1860-1872; »Regioselective Acylation of Ginsenosides by Novozyme 435 to Generate Molecular Diversity«. DOI: 10.1002/hlca.200490165
- [193] T. Holmstrøm, C. M. Pedersen, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 4612-4615; »Enzyme-Catalyzed Regioselective Acetylation of Functionalized Glycosides«. DOI: 10.1002/ejoc.202000696
- [194] L. L. Woodcock, C. Wiles, G. M. Greenway, P. Watts, A. Wells, S. Eyley, *Biocatal. Biotransform.* **2008**, *26*, 466-472; »Enzymatic Synthesis of a Series of Alkyl Esters using Novozyme 435 in a Packed-Bed, Miniaturized, Continuous Flow Reactor«. DOI: 10.1080/10242420802456571
- [195] J. Britton, S. Majumdar, G. A. Weiss, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 5891-5918; »Continuous Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1039/c7cs00906b
- [196] R. A. C. Leão, S. P. de Souza, D. O. Nogueira, G. M. A. Silva, M. V. M. Silva, M. L. E. Gutarra, L. S. M. Miranda, A. M. Castro, I. I. Junior, R. O. M. A. de Souza, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 4743-4748; »Consecutive Lipase Immobilization and Glycerol Carbonate Production under Continuous-Flow Conditions«. DOI: 10.1039/c6cy00295a
- [197] M. A. do Nascimento, L. E. Gotardo, R. A. C. Leão, A. M. de Castro, R. O. M. A. de Souza, I. Itabaiana, *ACS Omega* **2019**, *4*, 860-869; »Enhanced Productivity in Glycerol Carbonate Synthesis under Continuous Flow Conditions: Combination of Immobilized Lipases from Porcine Pancreas and *Candida antarctica* (CalB) on Epoxy Resins«. DOI: 10.1021/acsomega.8b02420
- [198] C. A. A. Adarme, R. A. C. Leão, S. P. de Souza, I. Itabaiana, R. O. M. A. de Souza, C. M. Rezende, *Mol. Catal.* **2018**, *453*, 39-46; »Continuous-Flow Chemo and Enzymatic Synthesis of Monoterpenic Esters with Integrated Purification«. DOI: 10.1016/j.mcat.2018.04.007
- [199] E. Farkas, M. Oláh, A. Földi, J. Kóti, J. Éles, J. Nagy, C. A. Gal, C. Paizs, G. Hornyánszky, L. Poppe, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 8052-8056; »Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Amines in Fully Continuous-Flow Mode«. DOI: 10.1021/acs.orglett.8b03676

- [200] A. D. Clayton, R. Labes, A. J. Blacker, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* **2020**, 100378; »Combination of Chemo- and Bio-Catalysis in Flow«. DOI: 10.1016/j.cogsc.2020.100378
- [201] J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 999-1015; »Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Alcohols and Amines«. DOI: 10.1002/ejoc.200900935
- [202] Y. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *ChemCatChem* **2011**, 3, 271-277; »Dynamic Kinetic Resolution of Amines and Amino Acids by Enzyme–Metal Cocatalysis«. DOI: 10.1002/cctc.201000330
- [203] N. J. Turner, M. D. Truppo, in *Chiral Amine Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**, pp. 431-459. DOI: 10.1002/9783527629541.ch14
- [204] A. S. de Miranda, R. O. M. A. de Souza, L. S. M. Miranda, *RSC Adv.* **2014**, 4, 13620-13625; »Ammonium formate as a Green Hydrogen Source for Clean Semi-continuous Enzymatic Dynamic Kinetic Resolution of (+/-)- $\alpha$ -Methylbenzylamine«. DOI: 10.1039/c4ra00462k
- [205] P. Falus, Z. Boros, G. Hornyánszky, J. Nagy, F. Darvas, L. Ürge, L. Poppe, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 1310-1312; »Reductive Amination of Ketones: Novel One-Step Transfer Hydrogenations in Batch and Continuous-Flow Mode«. DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.01.062
- [206] M. Baumann, A. Leslie, T. S. Moody, M. Smyth, S. Wharry, *Organic Process Research & Development* **2021**, 25, 452-456; »Tandem Continuous Flow Curtius Rearrangement and Subsequent Enzyme-Mediated Impurity Tagging«. DOI: 10.1021/acs.oprd.0c00420
- [207] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, N. Nikbin, C. D. Smith, J. P. Tierney, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1577-1586; »A Modular Flow Reactor for Performing Curtius Rearrangements as a Continuous Flow Process«. DOI: 10.1039/b801631n
- [208] T. Peschke, M. Skoupi, T. Burgahn, S. Gallus, I. Ahmed, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *ACS Catal.* **2017**, 7, 7866-7872; »Self-Immobilizing Fusion Enzymes for Compartmentalized Biocatalysis«. DOI: 10.1021/acscatal.7b02230
- [209] L. Schober, F. Tonin, U. Hanefeld, H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, 2022, e202101035; »Combination of Asymmetric Organo- and Biocatalysis in Flow Processes and Comparison with their Analogous Batch Syntheses«. DOI: 10.1002/ejoc.202101035
- [210] T. Peschke, P. Bitterwolf, S. Gallus, Y. Hu, C. Oelschlaeger, N. Willenbacher, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2018**, 130, 17274-17278; T. Peschke, P. Bitterwolf, S. Gallus, Y. Hu, C. Oelschlaeger, N. Willenbacher, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 17028-17032; »Self-Assembling All-Enzyme Hydrogels for Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1002/ange.201810331 & 10.1002/anie.201810331

- [211] T. Peschke, P. Bitterwolf, S. Hansen, J. Gasmi, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Catalysts* **2019**, *9*, 164; »Self-Immobilizing Biocatalysts Maximize Space–Time Yields in Flow Reactors«. DOI: 10.5445/ir/1000090920
- [212] S. P. Segura, M. C. A. Mate, M. L. Pages, M. d. I. A. C. Torras, 2019, D-Fagomine for the Control of Inflammatory Processes related to an Overactivation of the Humoral Immune Response, Google Patents, EP2767284A1.
- [213] C. J. Hartley, C. C. Williams, J. A. Scoble, Q. I. Churches, A. North, N. G. French, T. Nebl, G. Coia, A. C. Warden, G. Simpson, A. R. Frazer, C. N. Jensen, N. J. Turner, C. Scott, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 1006-1015; »Engineered Enzymes that Retain and Regenerate their Cofactors Enable Continuous-Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1038/s41929-019-0353-0
- [214] A. Šalić, B. Zelić, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 41714-41721; »ADH-Catalysed Hexanol Oxidation with Fully Integrated NADH Regeneration Performed in Microreactors Connected in Series«. DOI: 10.1039/c4ra05421k
- [215] M. L. Contente, F. Paradisi, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 452-459; »Self-Sustaining Closed-Loop Multienzyme-Mediated Conversion of Amines into Alcohols in Continuous Reactions«. DOI: 10.1038/s41929-018-0082-9
- [216] M. Romero-Fernández, F. Paradisi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 1-8; »Protein Immobilization Technology for Flow Biocatalysis«. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.11.008
- [217] H. Zhao, *Biotechnol. Adv.* **2020**, *45*, 107638; »What Do We Learn from Enzyme Behaviors in Organic Solvents? – Structural Functionalization of Ionic Liquids for Enzyme Activation and Stabilization«. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107638
- [218] K. Neufeld, B. Henßen, J. Pietruszka, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13469-13473; K. Neufeld, B. Henßen, J. Pietruszka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13253-13257; »Enantioselective Allylic Hydroxylation of  $\omega$ -Alkenoic Acids and Esters by P450 BM3 Monooxygenase«. DOI: 10.1002/ange.201403537 & 10.1002/anie.201403537
- [219] N. C. Eichenauer, A. C. M. Nordtschild, M. Bischof, D. Schumacher, M. K. W. Mackwitz, R. Tschersich, T. Wilhelm, J. Pietruszka, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 5620-5632; »Total Synthesis of Solandelactones A and B«. DOI: 10.1002/ejoc.201500700
- [220] M. Mantel, M. Guder, J. Pietruszka, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 5442-5450; »Simple Organocatalysts in Multi-Step Reactions: An Efficient One-Pot Morita-Baylis-Hillman-Type  $\alpha$ -Hydroxymethylation of Vinyl Ketones Followed by the Convenient, Temperature-Controlled One-Pot Etherification using Alcohols«. DOI: 10.1016/j.tet.2018.05.026
- [221] V. K. Sharma, J. M. Hutchison, A. M. Allgeier, *ChemSusChem* **2022**, *15*, e202200888; »Redox Biocatalysis: Quantitative Comparisons of Nicotinamide Cofactor Regeneration Methods«. DOI: 10.1002/cssc.202200888

- [222] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6*, 221-270; »Cofactor Regeneration for Enzyme-Catalysed Synthesis«. DOI: 10.1080/02648725.1988.10647849
- [223] A. I. Benítez-Mateos, D. Roura Padrosa, F. Paradisi, *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 489-499; »Multistep Enzyme Cascades as a Route towards Green and Sustainable Pharmaceutical Syntheses«. DOI: 10.1038/s41557-022-00931-2
- [224] F. L. C. Almeida, A. S. Prata, M. B. S. Forte, *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* **2022**, *16*, 587-608; »Enzyme Immobilization: What Have We Learned in the Past Five Years?«. DOI: 10.1002/bbb.2313
- [225] M. Korpak, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1420-1424; »Chemoenzymatic One-Pot Synthesis of  $\gamma$ -Butyrolactones«. DOI: 10.1002/adsc.201100110
- [226] L. Wilson, A. Illanes, O. Romero, C. Ottone, in *Biocatalyst Immobilization* (Ed.: M. L. Ferreira), Academic Press, **2023**, pp. 403-426. DOI: 10.1016/B978-0-323-91317-1.00009-8
- [227] V. D. Jäger, R. Lamm, K. Küsters, G. Ölçücü, M. Oldiges, K.-E. Jaeger, J. Büchs, U. Krauss, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 7313-7329; »Catalytically-Active Inclusion Bodies for Biotechnology - General Concepts, Optimization, and Application«. DOI: 10.1007/s00253-020-10760-3
- [228] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 435-456; »Strategies for the One-Step Immobilization–Purification of Enzymes as Industrial Biocatalysts«. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006
- [229] F. Baneyx, M. Mujacic, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1399-1408; »Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia coli*«. DOI: 10.1038/nbt1029
- [230] V. D. Jäger, R. Kloss, A. Grünberger, S. Seide, D. Hahn, T. Karmainski, M. Piqueray, J. Embruch, S. Longerich, U. Mackfeld, K. E. Jaeger, W. Wiechert, M. Pohl, U. Krauss, *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 33; »Tailoring the Properties of (Catalytically)-Active Inclusion Bodies«. DOI: 10.1186/s12934-019-1081-5
- [231] R. R. Kopito, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 524-530; »Aggresomes, Inclusion Bodies and Protein Aggregation«. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)01852-3
- [232] M. Diener, B. Kopka, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 142-152; »Fusion of a Coiled-Coil Domain Facilitates the High-Level Production of Catalytically Active Enzyme Inclusion Bodies«. DOI: 10.1002/cctc.201501001
- [233] R. Kloss, M. H. Limberg, U. Mackfeld, D. Hahn, A. Grünberger, V. D. Jäger, U. Krauss, M. Oldiges, M. Pohl, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5856; »Catalytically Active Inclusion Bodies of L-Lysine Decarboxylase from *E. coli* for 1,5-Diaminopentane Production«. DOI: 10.1038/s41598-018-24070-2

- [234] V. D. Jäger, R. Lamm, R. Kloß, E. Kaganovitch, A. Grünberger, M. Pohl, J. Büchs, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 2282-2295; »A Synthetic Reaction Cascade Implemented by Colocalization of Two Proteins within Catalytically Active Inclusion Bodies«. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00274
- [235] K. Küsters, M. Pohl, U. Krauss, G. Ölçücü, S. Albert, K.-E. Jaeger, W. Wiechert, M. Oldiges, *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20*, 49; »Construction and Comprehensive Characterization of an EcLDCc-CatIB Set - Varying Linkers and Aggregation Inducing Tags«. DOI: 10.1186/s12934-021-01539-w
- [236] J.-P. Arié, M. Miot, N. Sassoon, J.-M. Betton, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 427-437; »Formation of Active Inclusion Bodies in the Periplasm of *Escherichia coli*«. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05394.x
- [237] S.-L. Choi, S. J. Lee, J.-S. Ha, J. J. Song, Y. H. Rhee, S.-G. Lee, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, *16*, 1173-1179; »Generation of Catalytic Protein Particles in *Escherichia coli* Cells using The Cellulose-Binding Domain from *Cellulomonas fimi* as a Fusion Partner«. DOI: 10.1007/s12257-011-0336-8
- [238] S.-Y. Park, S.-H. Park, S.-K. Choi, *Anal. Biochem.* **2012**, *426*, 63-65; »Active Inclusion Body Formation using *Paenibacillus polymyxa* PoxB as a Fusion Partner in *Escherichia coli*«. DOI: 10.1016/j.ab.2012.04.002
- [239] E. García-Fruitós, N. González-Montalbán, M. Morell, A. Vera, R. M. Ferraz, A. Arís, S. Ventura, A. Villaverde, *Microb. Cell Fact.* **2005**, *4*, 27; »Aggregation as Bacterial Inclusion Bodies Does Not Imply Inactivation of Enzymes and Fluorescent Proteins«. DOI: 10.1186/1475-2859-4-27
- [240] J. Nahalka, B. Nidetzky, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 454-461; »Fusion to a Pull-Down Domain: A Novel Approach of Producing *Trigonopsis variabilis* D-Amino Acid Oxidase as Insoluble Enzyme Aggregates«. DOI: 10.1002/bit.21244
- [241] B. Zhou, L. Xing, W. Wu, X.-E. Zhang, Z. Lin, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 10; »Small Surfactant-Like Peptides Can Drive Soluble Proteins into Active Aggregates«. DOI: 10.1186/1475-2859-11-10
- [242] Z. Lin, B. Zhou, W. Wu, L. Xing, Q. Zhao, *Faraday Discuss.* **2013**, *166*, 243-256; »Self-Assembling Amphipathic *Alpha*-Helical Peptides Induce the Formation of Active Protein Aggregates *in vivo*«. DOI: 10.1039/c3fd00068k
- [243] X. Wang, B. Zhou, W. Hu, Q. Zhao, Z. Lin, *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 88; »Formation of Active Inclusion Bodies Induced by Hydrophobic Self-Assembling Peptide GFIL8«. DOI: 10.1186/s12934-015-0270-0
- [244] L. Ronda, S. Bruno, B. Campanini, A. Mozzarelli, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, A. Cupane, M. Levantino, S. Bettati, *Curr. Org. Chem.* **2015**, *19*, 1653-1668; »Immobilization of Proteins in Silica Gel: Biochemical and Biophysical Properties«. DOI: 10.2174/1385272819666150601211349
- [245] F. Cellesi, N. Tirelli, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *288*, 52-61; »Sol-Gel Synthesis at Neutral pH in W/O Microemulsion: A Method for Enzyme

- Nanoencapsulation in Silica Gel Nanoparticles«. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.05.008
- [246] C. Holec, K. Neufeld, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1810-1819; »P450 BM3 Monooxygenase as an Efficient NAD(P)H-Oxidase for Regeneration of Nicotinamide Cofactors in ADH-Catalysed Preparative Scale Biotransformations«. DOI: 10.1002/adsc.201600241
- [247] J. Iriondo-Alberdi, J. E. Perea-Buceta, M. F. Greaney, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3969-3971; »A Paternò-Büchi Approach to the Synthesis of Merrilactone A«. DOI: 10.1021/ol0514496
- [248] S. D. Knight, L. E. Overman, G. Pairaudeau, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5776-5788; »Asymmetric Total Syntheses of (-)- and (+)-Strychnine and the Wieland-Gumlich Aldehyde«. DOI: 10.1021/ja00126a017
- [249] L. Q. Lu, Y. Li, K. Junge, M. Beller, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8540-8544; L. Q. Lu, Y. Li, K. Junge, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8382-8386 »Iron-Catalyzed Hydrogenation for the *in situ* Regeneration of an NAD(P)H Model: Biomimetic Reduction of  $\alpha$ -Keto-/ $\alpha$ -Iminoesters«. DOI: 10.1002/ange.201301972 & 10.1002/anie.201301972
- [250] K. Nicolaou, P. Heretsch, A. ElMarrouni, C. R. Hale, K. K. Pulukuri, A. K. Kudva, V. Narayan, K. S. Prabhu, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10611-10615; K. Nicolaou, P. Heretsch, A. ElMarrouni, C. R. Hale, K. K. Pulukuri, A. K. Kudva, V. Narayan, K. S. Prabhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10443-10447; »Total Synthesis of  $\Delta$ 12-Prostaglandin J3, a Highly Potent and Selective Antileukemic Agent«. DOI: 10.1002/ange.201404917 & 10.1002/anie.201404917
- [251] Z. Xin, H. Wang, H. He, X. Zhao, S. Gao, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 12917-12922; Z. Xin, H. Wang, H. He, X. Zhao, S. Gao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12807-12812; »Asymmetric Total Synthesis of Norzoanthamine«. DOI: 10.1002/ange.202102643 & 10.1002/anie.202102643
- [252] G. Singh, A. Meyer, J. Aubé, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 452-458; »Stereodivergent Synthesis of Enantioenriched 4-Hydroxy-2-Cyclopentenones«. DOI: 10.1021/jo402539p
- [253] C. Peters, D. Frasson, M. Sievers, R. Buller, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1569-1577; »Novel Old Yellow Enzyme Subclasses«. DOI: 10.1002/cbic.201800770
- [254] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, *20*, 688-688; »Ein Zweites Sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum«. DOI: 10.1007/bf01494406
- [255] H. Theorell, *Experientia* **1957**, *13*, 2-8; »The Nature and Mode of Action of Oxidation Enzymes«. DOI: 10.1007/bf02156937
- [256] R. E. Williams, N. C. Bruce, *Microbiology* **2002**, *148*, 1607-1614; »'New Uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme Family of Flavoenzymes«. DOI: 10.1099/00221287-148-6-1607

- [257] K. M. Fox, P. A. Karplus, *Structure* **1994**, *2*, 1089-1105; »Old Yellow Enzyme at 2 Å Resolution: Overall Structure, Ligand Binding, and Comparison with Related Flavoproteins«. DOI: 10.1016/s0969-2126(94)00111-1
- [258] A. D. N. Vaz, S. Chakraborty, V. Massey, *Biochem.* **1995**, *34*, 4246-4256; »Old Yellow Enzyme: Aromatization of Cyclic Enones and the Mechanism of a Novel Dismutation Reaction«. DOI: 10.1021/bi00013a014
- [259] T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19891-19897; »Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme Homolog from *Bacillus subtilis* Involved in the Oxidative Stress Response«. DOI: 10.1074/jbc.m211778200
- [260] E. Rütthlein, T. Classen, L. Dobnikar, M. Schölzel, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1775-1786; »Finding the Selectivity Switch – A Rational Approach towards Stereocomplementary Variants of the Ene Reductase YqjM«. DOI: 10.1002/adsc.201500149
- [261] T. Kumar Roy, R. Sreedharan, P. Ghosh, T. Gandhi, D. Maiti, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202103949; »Ene-Reductase: A Multifaceted Biocatalyst in Organic Synthesis«. DOI: 10.1002/chem.202103949
- [262] Y. Kawai, M. Hayashi, Y. Inaba, K. Saitou, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5225-5228; »Asymmetric Reduction of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketones with a Carbon-Carbon Double-Bond Reductase from Baker's Yeast«. DOI: 10.1016/s0040-4039(98)01027-2
- [263] T. Reß, W. Hummel, S. P. Hanlon, H. Iding, H. Gröger, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1302-1311; »The Organic-Synthetic Potential of Recombinant Ene Reductases: Substrate-Scope Evaluation and Process Optimization«. DOI: 10.1002/cctc.201402903
- [264] M. Hall, C. Stueckler, H. Ehammer, E. Pointner, G. Oberdorfer, K. Gruber, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 411-418; »Asymmetric Bioreduction of C-C Bonds using Enoate Reductases OPR1, OPR3 and YqjM: Enzyme-Based Stereocontrol«. DOI: 10.1002/adsc.200700458
- [265] B. J. Brown, Z. Deng, P. A. Karplus, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32753-32762; »On the Active Site of Old Yellow Enzyme: Role of Histidine 191 and Asparagine 194«. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32753
- [266] R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32763-32770; »The Oxidative Half-reaction of Old Yellow Enzyme: The Role of Tyrosine 196«. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32763
- [267] T. M. Barna, H. Khan, N. C. Bruce, I. Barsukov, N. S. Scrutton, P. C. E. Moody, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 433-447; »Crystal Structure of Pentaerythritol Tetranitrate Reductase: "Flipped" Binding Geometries for Steroid Substrates in Different Redox States of the Enzyme«. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4779

- [268] C. Breithaupt, J. Strassner, U. Breitingner, R. Huber, P. Macheroux, A. Schaller, T. Clausen, *Structure* **2001**, *9*, 419-429; »X-Ray Structure of 12-Oxophytodienoate Reductase 1 Provides Structural Insight into Substrate Binding and Specificity within the Family of OYE«. DOI: 10.1016/s0969-2126(01)00602-5
- [269] K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27904-27913; »The 1.3 Å Crystal Structure of the Flavoprotein YqjM Reveals a Novel Class of Old Yellow Enzymes«. DOI: 10.1074/jbc.M502587200
- [270] V. R. N. Telis, J. Telis-Romero, H. B. Mazzotti, A. L. Gabas, *Int. J. Food Prop.* **2007**, *10*, 185-195; »Viscosity of Aqueous Carbohydrate Solutions at Different Temperatures and Concentrations«. DOI: 10.1080/10942910600673636
- [271] W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals (Ninth Edition)*, Butterworth-Heinemann, **2022**. DOI: 10.1016/c2020-0-01747-0
- [272] S. Huo, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 423-425; »Highly Efficient, General Procedure for the Preparation of Alkylzinc Reagents from Unactivated Alkyl Bromides and Chlorides«. DOI: 10.1021/ol0272693

## 7 DANKSAGUNG

*After that it's all about the people that you let into your life.*

Barney Stinson  
aus der Serie »How I Met Your Mother« (S03E14)

Jörg, zuallererst möchte ich dir meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, dass du es mir ermöglicht hast, nach einer Bachelor- und Masterarbeit noch eine Doktorarbeit im IBOC anfertigen zu dürfen. Ich möchte mich insbesondere für das Vertrauen bedanken, dass du von Anfang an in mich gesetzt hast, mit der Flow einen thematisch neuen Weg im Institut gehen zu können. Dabei standest du mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat bei. Neben der fachlichen Seite möchte ich hervorheben, wie wichtig dir außerdem das soziale Umfeld innerhalb des IBOC ist. So hat sich das Institut und die Kollegen zu einer zweiten Familie entwickelt, woraus viele Freundschaften hervorgegangen sind. Auch wenn die Zeit sicherlich durch Corona nicht die einfachste war, du hast immer zum Wohle aller entschieden. Danke für alles und dafür, dass du immer für leckere Kaltgetränke gesorgt hast!

An dieser Stelle möchte ich ebenfalls Herr Prof. Dr. Thomas Müller meinen großen Dank aussprechen, der mir über die Zeit des Studiums sehr viel über die organische Chemie gelehrt hat, sowohl in Vorlesungen als auch in verschiedenen Praktika. Außerdem möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Teresa. Ich erinnere mich noch an die ganzen Morgen, als wir um 5:15 Uhr nach Jülich gefahren sind und mit nicht funktionierenden Flow-Geräten begrüßt wurden – und *dafür* sind wir zu unmenschlichen Uhrzeiten aufgestanden, aber im Nachhinein war es doch ziemlich lustig. Die Zeit hat echt zusammengeschweißt und ich bin froh, dass wir das beide so durchgezogen haben. Dazu unsere Weinabende bis tief in die Nacht, die Fahrten im Polo bei 35 °C oder ewig lange Touren in die Schweiz, stundenlange Insta-Sessions und ganz nebenbei hattest und hast du immer ein offenes Ohr für mich. Vielen Dank für die Zeit und dass du immer da bist!

Patrick. Nach über sechs Jahren und unzähligen Nahtoderfahrten beim Autofahren kann ich mit großer Erleichterung sagen - wir leben noch! Aber Spaß beiseite - Ich erinnere mich immer wieder gerne an die schöne Zeit - gemütliche (Wein-)Abende in der

## Danksagung

WG, die genau das waren, was man nach einem anstrengenden Tag brauchte, gemeinsam ins neue Jahr rutschen oder auch jegliche Kulturunternehmungen. Und wenn mir der Stress mal über den Kopf wuchs, hattest du immer einen guten Rat für mich (auch wenn ich es manchmal besser wusste), ob fachlich oder privat und das weiß ich bis heute zu schätzen. Vielen Dank, dass du immer da warst, da bist und mal schauen, was da noch kommt! Fühl dich gedrückt!

Julia. Inken. Schinken. Spag-Bolo. Vor fast 12 Jahren fing das alles im AC-Praktikum an und wenn ich so an die Zeit zurückdenke, gab es viele Höhen und Tiefen, aber was bleibt sind die schönen und lustigen Erinnerungen. Der Knall, wenn jemand vor eine Abzugscheibe läuft; teure Glasgeräte, die mit der Ansage „wenn ich das fallen lasse, ist das bestimmt teuer“ kaputt gehen, die legendäre Gartenparty bei Sebi und ganz besonders der Bromo. Nicht unerwähnt darf natürlich die abendliche Schwimmsession bleiben, die den stressigen Alltag hat ausklingen lassen. Vielen Dank, dass wir diesen herausfordernden Weg zusammen gegangen sind und auf das, was da noch kommt!

Freddy. Wenn mir jemand gezeigt hat, dass man nicht alles zu ernst nehmen sollte und auch mal ein bisschen leben sollte, dann warst du das. Viele spontane Abende im Westside, Partys auf der Opladener und besonders eine echt verrückte und spontane Reise nach Australien. Ich bin froh, dass ich all das mit dir erleben durfte. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Markus MB Brauns. Eigentlich könnte hier auch ein generischer Text stehen, der seinen Zweck mehr als erfüllen würde. Ob auf fachlicher oder persönlicher Ebene, ich habe immer versucht, jegliche Ratschläge von dir zu ignorieren und ich glaube, nur so habe ich den Bachelor damals geschafft. Vielen Dank, dass du mir auch immer wieder gezeigt hast, wie man viele Sachen am besten *nicht* macht. Ansonsten waren die unzähligen *Rick and Morty* und *The Boys Sessions* und ewigen Gespräche, die sowieso nur wir lustig finden, ganz in Ordnung und machen den Alltag ein Stück weit erträglicher. Nicht zu vergessen die gemütlichen Inliner-Touren. Wubba Lubba Dub Dub und vielen Dank!

Mantolo, Lauchinger oder einfach Teresa's Freund (jetzt müsste klar sein, wer gemeint ist). Bei dir ist, wie bei Markus, fraglich, was ich überhaupt schreiben soll, und niemand wird mir diese aufgebrachte Zeit wiedergeben - NIEMAND. Ich frag mich auch, wer dich immer in die Schweiz eingeladen hat, und trotzdem saß du mit im Auto. Das Einzige, was ich zumindest nicht negativ hervorheben kann, ist die ausgiebige Korrektur der Diss

und deine kulinarische Expertise rund um den Tintenfisch. Aber auch sonst ist das hier alles nicht so ernst gemeint. Vielen Dank für alles!

Birgit, Bea und Moni, auch euch gilt ein ganz besonderer Dank, denn ihr habt durch eure stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung vieles erleichtert. Sei es Analytik, organisatorische Aufgaben, die Produktion von Enzymen oder auch einfach die Gespräche zwischendurch. Vielen Dank dafür!

Thomas. Auch dir gebührt mein herzlichster Dank für deine wertvolle Unterstützung vom ersten Tag an. Besonders weiß ich deinen Einsatz für unsere gemeinsame Publikation zu schätzen und natürlich für das hervorragende Deckblatt. Vielen Dank!

Tim Moritz. Irgendwie haben wir das mit den Radtouren zum einen erst viel zu spät gestartet und zum anderen dann trotzdem nicht konsequent durchgezogen. Aber das heißt ja nicht, dass wir das in Zukunft auch so handhaben müssen und vielleicht schaffen wir das ja regelmäßiger. Während der Zeit im Labor war es zumindest ein wunderbarer Ausgleich und ich habe mich immer sehr auf die langen persönlichen und fachlichen Gespräche gefreut. Vielen Dank für alles und auch für deine fantastische Frikandel Spezial.

Lisa, Marisa und Stella. Normalerweise sieht man die Betreuung einer Bachelorarbeit als zusätzliche Last und im Nachhinein kann ich aus voller Überzeugung sagen, dass es stim... nicht stimmt. Die Zeit mit euch hat mir sehr viel Spaß bereitet und ich hätte mir niemanden Besseres wünschen können. Ihr habt maßgeblich zu dem Erfolg der Projekte beigetragen und dafür bin ich euch sehr dankbar.

Lisa, der ultimative Beweis - Ich entschuldige mich offiziell bei dir für die eine ziemlich genervte Reaktion von mir! Ich hoffe, dass du das Trauma irgendwann verarbeiten kannst, auch wenn ich weiß, wie tief der Schmerz sitzt.

Ein ebenso großer Dank gilt Diana-A., Niklas, Hannes und Norman, die mich im Rahmen verschiedener Praktika mit voller Motivation unterstützt haben.

Martin, auch dir möchte ich danke sagen, dass das mit der Betreuung der Abschlussarbeiten so hervorragend funktioniert hat. Außerdem vielen Dank für die wertvollen Fachgespräche!

An dieser Stelle möchte ich auch die weitbekannteren Sport- bzw. Oishii-Gruppe erwähnen, die sich jeden Mittwoch zum Sport mit Stahlsiggi getroffen hat, um

## *Danksagung*

anschließend Sushi oder weihnachtliche Ente essen zu können. Vielen Dank an Moritz, Lisa, Teresa und Mona für die schönen Abende.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Kooperationspartnern danken, ohne die dies hier nie möglich gewesen wäre. Besonders möchte ich Gizem Ölçucu, Johannes Döbber und Ulrich Krauss hervorheben, die die Projekte beispielsweise durch fachliche Kompetenz und die Bereitstellung der benötigten Enzyme ermöglicht haben.

Mama, Papa, Patrick und Melli. Auch wenn ihr bei chemischen Themen nur Bahnhof versteht (noch mehr als ich), konnte ich immer zu euch kommen, wenn mir mal wieder alles zu viel wurde und ich mich einfach nur aussprechen musste. Ich konnte mich immer auf euch verlassen, musste mir um nichts Gedanken machen, sodass ich mich vollkommen auf das Studium konzentrieren konnte. Danke, dass ihr immer für mich da wart und mir das hier ermöglicht habt.

Natürlich muss auch das beste Labor der Welt - 204 - hervorgehoben werden. Ich hätte mir kein besseres Arbeitsumfeld vorstellen. Ihr habt dafür gesorgt, dass man jeden Tag gerne ins Labor kommt und auch dafür, dass der stressige Alltag sehr viel erträglicher wurde.

Zu guter Letzt möchte ich Wiebke noch einen riesengroßen Dank für die abschließende Korrektur aussprechen. Einfach unglaublich, wie du die Arbeit in so wenigen Tagen bis ins kleinste Detail durchgeschaut und korrigiert hast.

## **8 ERKLÄRUNG**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, den

---

Benedikt Baumer



Band 35

**Ammoniumylide in der asymmetrischen Organokatalyse**

L. Öhler (2019), V, 377 pp

ISBN: 978-3-95806-407-2

Band 36

**Enantioselektive Totalsynthese von Altersolanolen**

B. Mechsner (2019), I, V, 311 pp

ISBN: 978-3-95806-412-6

Band 37

**Glycosynthases – tuning glycosidase activity towards glycoside diversification and synthesis**

M. R. Hayes (2019), VI, 225 pp

ISBN: 978-3-95806-441-6

Band 38

**Chemoenzymatische Synthesemethoden –  
Zugang zur duftenden Welt der Chemie und darüber hinaus**

C. Kumru (2019), V, 338 pp

ISBN: 978-3-95806-446-1

Band 39

**Oxidoreduktasen für die Bereitstellung von Schlüsselbausteinen  
der Natur- und Wirkstoffsynthese**

R. Krug (2020), 216 pp

ISBN: 978-3-95806-454-6

Band 40

**Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese  
bioaktiver Naturstoffderivate**

H. U. C. Braß (2021), IX, 349 pp

ISBN: 978-3-95806-523-9

Band 41

**Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren  
bis zum fertigen Naturstoff**

D. Dickmann (2021), 274 pp

ISBN: 978-3-95806-573-4

Band 42

**Chemie ohne Grenzen –  
Biokatalysatoren und Bororganyle als wertvolle Hilfsmittel  
für die zielmolekülorientierte, enantioselektive Synthese**

M. R. Mantel (2021), 487 pp

ISBN: 978-3-95806-585-7

Band 43

**Über tetraolbasierte Allylboronsäureester und deren Potential  
in der stereoselektiven Synthese**

P. Ullrich (2022), xii, 324 pp

ISBN: 978-3-95806-618-2

Band 44

**Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger *photocaged compounds* –  
Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression**

F. Hogenkamp (2022), V, 456 pp

ISBN: 978-3-95806-637-3

Band 45

**Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese  
von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen**

P. Schneider (2023), x, 315 pp

ISBN: 978-3-95806-690-8

Band 46

**Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in  
der organischen Synthese**

A. V. Fejzagić (2023), XI, 264 pp

ISBN: 978-3-95806-728-8

Band 47

**Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen**

N. Huwa (2024), X, 235 pp

ISBN: 978-3-95806-745-5

Band 48

**Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen  
Durchflusssynthese**

B. Baumer (2024), XVIII, 231 pp

ISBN: 978-3-95806-783-7



# Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Wissenschaft und Natur müssen Hand in Hand arbeiten, um eine grünere und effizientere Zukunft zu gestalten. Insbesondere in der Chemie und Biotechnologie erweist sich der Einsatz der Durchflusschemie unter Verwendung von Biokatalysatoren als eine der vielversprechendsten Technologien. Dabei sind eine hohe Effizienz, milde Reaktionsbedingungen, sicherere Handhabung und Prozessautomatisierung nur ein kleiner Auszug der vielfältigen Vorteile. Dennoch gibt es einige Hürden zu bewältigen – Enzyme müssen immobilisiert werden und benötigen teure Kofaktoren, die aus ökologischer und ökonomischer Sicht zu regenerieren sind. Während dies im Batchverfahren bereits auf viele Arten lösbar ist, stellt es im Durchflussverfahren immer noch eine Herausforderung dar.

Dieses Buch bietet einen tiefgehenden Einblick in dieses Thema und zeigt anhand der Entwicklung von Beispielsystemen und verschiedener Methoden mögliche Lösungsstrategien auf.

**Band 48**  
**ISBN 978-3-95806-783-7**