

BiokatalyseZitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 15863–15869

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202015887

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202015887

Segmentierte Flow-Prozesse zur Überwindung von Limitierungen der Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln

Niklas Adebar, Alina Nastke, Jana Löwe und Harald Gröger*

Professor Dr. Shuji Akai zum 60. Geburtstag gewidmet

Abstract: In der modernen Prozessentwicklung spielt Biokatalyse eine immer gewichtiger Rolle, wobei die Benutzung von Ganzzellkatalysatoren häufig eine bevorzugte Form dieser Biokatalysatoren darstellt. Die Anwendung von Ganzzellkatalysatoren in organischen zweiphasigen Batch-Synthesen ist jedoch oft durch Einschränkungen im Hinblick auf Stofftransfer, Emulsionsbildung, aufwändiger Aufarbeitung und damit verbundenen geringen Ausbeuten beeinträchtigt. In diesem Beitrag zeigen wir, dass unter Zuhilfenahme von segmentierten Flow-Prozessen eine effiziente Ganzzellkatalyse in zweiphasigen Medien ermöglicht wird. Die Leistungsfähigkeit solcher segmentierter Flow-Prozesse ist dabei exemplarisch an drei unterschiedlichen Biotransformationen dargestellt. Zum Beispiel wurde in einem solchen Flow-Prozess eine 3-fache Steigerung des Umsatzes von 34 % auf > 99 % verbunden mit einer erheblich vereinfachten Aufarbeitung erzielt, die zu einer 1.5-fachen Steigerung der Ausbeute von 44 % auf 65 % im Vergleich zum analogen Batch-Prozess führte.

Einleitung

Die Anwendung der Biokatalyse im Bereich der organischen Synthese hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte erheblich verbessert und ging einher mit zahlreichen Erfolgen.^[1,2] Allerdings blieben zugleich einige Fragestellungen seit langer Zeit ungelöst. Insbesondere die Inkompatibilität vieler biokatalytischer Systeme mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln stellt noch immer eine erhebliche Einschränkung in der Synthese und Prozessentwicklung dar.^[3,4]

Dieser Herausforderung, einerseits von organischen Lösungsmitteln durch eine verbesserte Substratverfügbarkeit zu profitieren und zugleich die Deaktivierung des Biokatalysators zu vermeiden, haben wir uns mithilfe von Flow-Chemie-Techniken (*Flow*, engl. Fachbegriff für kontinuierliche Fließprozesse) angenommen. In diesem Beitrag beschreiben wir

ein System mit verbesserter Prozessleistung der Ganzzellkatalyse basierend auf flüssig-flüssig segmentierter Flow-Chemie, durch die die bekannten Einschränkungen bei der Verwendung von flüssig-flüssig-Systemen im Batch-Modus (*Batch*, engl. Fachbegriff für Chargenprozess) in erheblichem Maße überwunden werden (Abbildung 1). Im Hinblick auf Flow-Prozesse sei zudem ergänzend hinzugefügt, dass vor einigen Jahren sowohl die U. S. Food and Drug Agency (FDA), als auch die European Medicines Agency (EMA) Empfehlungen zur kontinuierlichen Produktion in ihre Richtlinien mit aufgenommen haben.^[5]

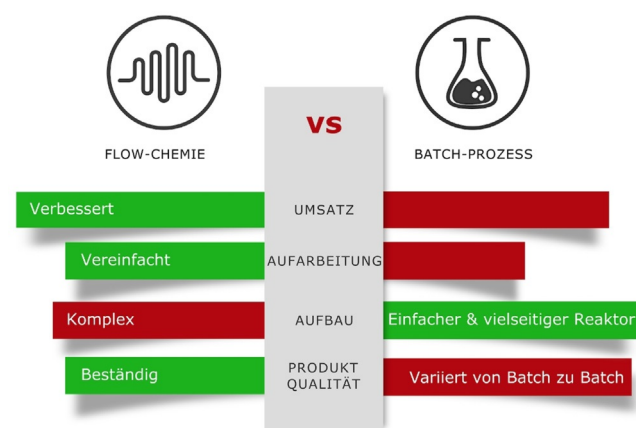




Abbildung 1. Allgemeiner Vergleich von (kontinuierlicher) Flow- versus Batch-Chemie.

Insbesondere die Gewährleistung von konstanter Produktqualität ohne manuelle Eingriffe wurde als wichtiger Faktor für die zukünftige Prozessentwicklung hervorgehoben. Darüber hinaus sind diese Eigenschaften nicht nur in der pharmazeutischen Industrie von Bedeutung,^[6–8] da auch die Produktion von Bulk-Chemikalien durch die Anwendung von Flow-Prozessen profitieren kann. Verbesserter Wärme- und Massetransfer, sowie eine hohe Prozesssicherheit bei der Nutzung toxischer oder explosiver Substanzen sind hierbei nennenswerte Vorteile.^[9,10]

Trotz des enormen Anwendungspotenzials beschränken sich die meisten kontinuierlichen Prozesse unter Einbezug von Biokatalyse bisher jedoch auf den Einsatz von Lipasen oder Alkoholdehydrogenasen (ADHs).^[11–13] Aufgrund ihrer enormen Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen und organischen Lösungsmitteln sowie ihrer kommerziellen Verfügbarkeit in immobilisierter Form wurden viele Prozesse mit Lipasen entwickelt.^[14,15] In letzter Zeit wurden Flow-Prozesse

[*] N. Adebar, A. Nastke, Dr. J. Löwe, Prof. Dr. H. Gröger
 Lehrstuhl für Industrielle Organische Chemie und Biotechnologie,
 Fakultät der Chemie, Universität Bielefeld
 Universitätsstr. 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
 E-Mail: harald.groeger@uni-bielefeld.de

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202015887> zu finden.

 © 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

auch für viele andere biokatalytischen Systeme entwickelt.^[16–18] Allerdings wurden bisher nur wenige Beispiele mit Ganzzellkatalysatoren in kontinuierlichen Flow-Prozessen berichtet.^[19] Nach unserem Kenntnisstand beruhen alle beschriebenen Systeme ausschließlich auf der Kombination von immobilisierten Zellen mit Festbettreaktoren,^[20–24] katalytischen Biofilmen,^[25,26] sowie wandbeschichteten Reaktoren^[27] oder Hydrogel-immobilisierten Zellen in segmentierten Flow-Verfahren.^[28] Diese Konzepte sind in Abbildung 2 dargestellt.

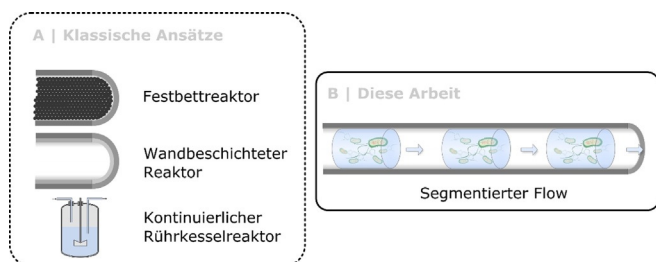
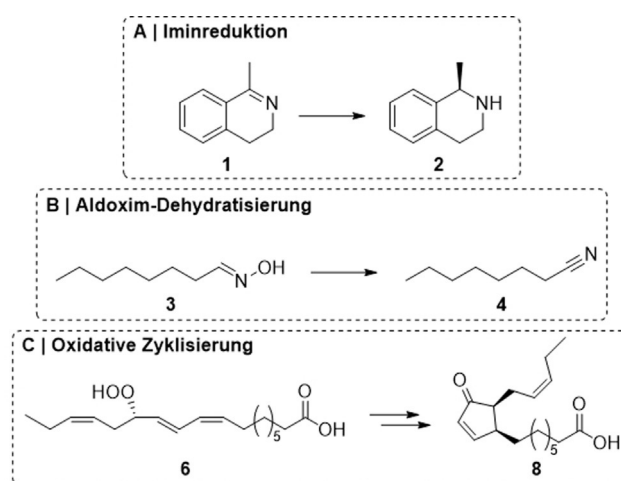


Abbildung 2. Schema des entwickelten organisch/wässrigen segmentierten Flow-Systems unter Verwendung von Ganzzellkatalysatoren im Vergleich zu klassischen Ansätzen der kontinuierlichen Biokatalyse unter Verwendung von ganzen Zellen.

Buehler et al. zeigten, dass Massentransfer-limitierte Reaktionen mit isolierten und aufgereinigten Enzymen von segmentierten Flow-Systemen profitieren können.^[29,30] In dieser Arbeit stand eine ADH aus *Lactobacillus brevis* für die Reduktion von Heptanal zum resultierenden Alkohol im Mittelpunkt.^[29] Darüber hinaus wurde nur über wenige weitere zweiphasige biokatalysierte Flow-Prozesse berichtet.^[31] Erst kürzlich demonstrierte die Arbeitsgruppe um Wirth den erfolgreichen Einsatz von Biokatalyse in einer Hochleistungs-Gegenstromchromatographie-Einheit (HPCCC; engl. *high performance counter current chromatography*), wodurch der Massentransfer immens verbessert werden konnte.^[32]

In der hier vorgestellten Arbeit haben wir die Auswirkungen von solchen segmentierten Flow-Systemen auf verschiedene Ganzzell-basierte Systeme untersucht, wobei verschiedenste Vorteile aufgezeigt werden konnten. Neben der Aldoxim-Dehydratase (Oxd)-katalysierten Synthese von *n*-Octannitril (**4**), die als Bulk-Chemikalie verwendet wird,^[33–35] wurde die Herstellung von 12-Oxophytodiensäure (12-OPDA, **8**), ein komplexes chirales Pflanzenhormon-Zwischenprodukt,^[36] unter Verwendung eines Ganzzellkatalysators untersucht, der eine Allenoxid-Synthase und Zyklase enthält. Neben diesen Beispielen wurde eine Cofaktor-abhängige Iminreduktase (IRED) für die Synthese von chiralen zyklischen Aminen verwendet (siehe Schema 1). Für alle Experimente mit den genannten Ganzzellkatalysatoren wurde ein segmentiertes Flow-System angewendet und mit einem zweiphasigen Batch-Ansatz verglichen. Es sei erwähnt, dass in jedem dieser drei Ganzzellverfahren eine andere aktuelle Herausforderung auf dem Gebiet der Biokatalyse, z. B. die Phasentrennung von Emulsionen sowie Limitierungen beim Massentransfer, erfolgreich bewältigt werden konnten. Im



Schema 1. Untersuchte Modellprozesse mit ganzen Zellen: A) IRED-katalysierte Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) zum entsprechenden Amin (*R*)-**2**, B) OxdB-katalysierte Dehydratisierung von *n*-Octanaloxim (**3**) zu *n*-Octannitril (**4**) und C) Oxidative Zyklisierung zu 12-OPDA (**8**) ausgehend von 13-(*S*)-Hydroperoxylinolensäure (**6**).

Einzelnen wurden für die IRED-katalysierte Reduktion unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten im Batch-Modus und unterschiedliche Flussraten im Flow-Modus untersucht und miteinander verglichen. Der Einfluss von Lösungsmitteladditiven im Batch- versus Flow-Modus wurde für die Oxim-Dehydratisierung unter Verwendung von OxdB als hoch lösungsmittellabilem Biokatalysator untersucht.

Darüber hinaus wurde am Beispiel der 12-OPDA-Synthese die Effizienz der Produktisolierung im Flow-Modus untersucht und mit der im Batch-Modus verglichen. Dieses Beispiel stellte aufgrund der Emulgator-Eigenschaften von 12-OPDA eine besonders anspruchsvolle Herausforderung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Iminreduktion in einem kontinuierlichem segmentiertem Flow-Modus: Einfluss von organischen Lösungsmitteln und Untersuchungen zum Massentransfer

Als erstes Beispiel wählten wir die enantioselektive Reduktion der C=N-Doppelbindung von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) zum entsprechenden Amin (*R*)-**2** als Modellreaktion für die biokatalytische Synthese von zyklischen Aminen. Die Reaktion wurde unter Einsatz einer IRED mit NADPH als Cofaktor durchgeführt. Die resultierende oxidierte Spezies des Cofaktors wurde in situ unter Verwendung von *D*-Glucose und einer Glucosedehydrogenase (GDH) unter Bildung von einem Äquivalent von Gluconolacton, welches sich irreversibel zu Glucosäure öffnet und somit das Gleichgewicht der Reaktion zur Produktseite verschiebt, regeneriert. Für diesen Prozess wurde ein rekombinanter *E. coli*-Ganzzellkatalysator eingesetzt, der eine IRED aus *Streptomyces viridochromogenes* und eine GDH aus *Bacillus subtilis* in überexprimierter Form enthält und kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde.^[37] Zunächst unter-

suchten wir das Reaktionssystem im Batch-Modus, um einen Benchmark zu setzen und um Einblicke in einige wichtige Reaktionsparameter zu erhalten, wie z. B. die Wahl des organischen Lösungsmittels und die Rührgeschwindigkeit. Das Lösungsmittel kann einen enormen Einfluss auf das Reaktionssystem haben, da es sowohl die Löslichkeit und die Verteilung des Substrats als auch die Zell- bzw. Enzymdeaktivierung beeinflusst. Da die Löslichkeit des Substrats und die Zelldeaktivierung nicht miteinander korrelieren, stellte die Vorhersage des am besten geeigneten Lösungsmittels eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Daher wählten wir für die Evaluierung des Einflusses des Lösungsmittels und der Rührgeschwindigkeit auf die Ganzzell-katalysierte Iminreduktion verschiedene mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel, die von Cyclohexan bis zu weniger unpolaren Lösungsmitteln wie Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und 2-Methyltetrahydrofuran (MeTHF) reichten. Dabei haben wir bevorzugt weniger gefährliche Lösungsmittel-Optionen gewählt, z. B. Cyclohexan anstelle von Hexan oder Pentan. Auch haben wir den Einsatz von chlorierten Lösungsmitteln aufgrund ihrer negativen Umweltauswirkungen und der bekannten Inkompatibilität mit Ganzzellkatalysatoren vermieden. Die Experimente wurden mit einer typischen Ganzzellkatalysator-Beladung ($2 \text{ mg}_{\text{TZM}} \text{ mL}^{-1}$ Trockenzellmasse pro Gesamtvolumen) und bei einer Rührgeschwindigkeit von 850 rpm (engl. *revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute) durchgeführt. Zunächst wurde das Substrat (40 mM) im organischen Lösungsmittel gelöst und dann zu einer D-Glucose, NADP⁺, Methanol (2 Vol.-%) und *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit IRED und GDH enthaltenden KP_i-Pufferlösung gegeben.

Die weniger polaren Lösungsmittel erwiesen sich als am besten geeignet mit akzeptablen Umsätzen bei der Verwendung von Cyclohexan, Isooctan und Methylcyclohexan (siehe Hintergrundinformationen). Im Gegensatz dazu führten MTBE, MeTHF und Ethylacetat zur vollständigen Deaktivierung des Biokatalysators, so dass kein Umsatz beobachtet wurde. Für die weiteren Experimente entschieden wir uns, Methylcyclohexan als organisches Lösungsmittel zu verwenden, da es bei diesen einleitenden Experimenten den höchsten Umsatz ergab. Bei der Durchführung von Batch-Experimenten mit einem Magnetrührer bei einer hohen Rührgeschwindigkeit von 1100 rpm zur starken Durchmischung der beiden Phasen wurde ein Umsatz von 36 % innerhalb von 6 h beobachtet (Abbildung 3). Nach einer Optimierung der Katalysatorbeladung auf $10 \text{ mg}_{\text{TZM}} \text{ mL}^{-1}$ stieg die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung des Amins (R)-2 stark an und es wurde ein quantitativer Umsatz innerhalb von nur 2 h Reaktionszeit erreicht.

Da der Massentransfer oft ein limitierender Faktor bei katalytischen Reaktionen ist, interessierte uns, wie empfindlich diese biokatalytische Reaktion in Bezug auf die Rührgeschwindigkeit ist. Daher untersuchten wir die Reaktion unter Verwendung von $10 \text{ mg}_{\text{TZM}} \text{ mL}^{-1}$ von ganzen Zellen im Batch-Modus bei einer niedrigeren Rührgeschwindigkeit von 500 rpm (bei der die Phasen getrennt blieben). Diese Experimente zeigten eine starke Massentransfer-Limitierung der Reaktion auf, da bei höherer Rührgeschwindigkeit ein 6-fach höherer Umsatz innerhalb von 1 h Reaktionszeit erreicht wurde (Abbildung 3).

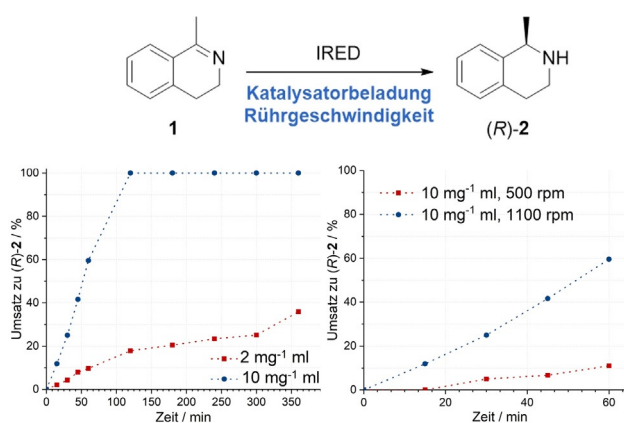


Abbildung 3. Zeit-Umsatz-Messungen für die Umsetzung zum Amin (R)-2 bei einer Ganzzellkatalysator-Beladung von $2 \text{ mg}_{\text{TZM}} \text{ mL}^{-1}$ und $10 \text{ mg}_{\text{TZM}} \text{ mL}^{-1}$ (links) und Untersuchung von verschiedenen Rührgeschwindigkeiten (rechts). Reaktionsbedingungen: Zweiphasiges System mit 40 mM des Substrats **1** in Methylcyclohexan und Ganzzellkatalysator in unterschiedlichen Konzentrationen, 0,2 mM NADP⁺, 240 mM Glucose, 2% MeOH in KP_i-Puffer (50 mM, pH 7); gerührt bei 30°C und 500 rpm oder 1100 rpm.

Ausgehend von diesen Ergebnissen der Biotransformationen im Batch-Modus, untersuchten wir die Reaktion im segmentierten Flow-Modus (Abbildung 4). Wir wählten identische Bedingungen wie bei den Batch-Experimenten,

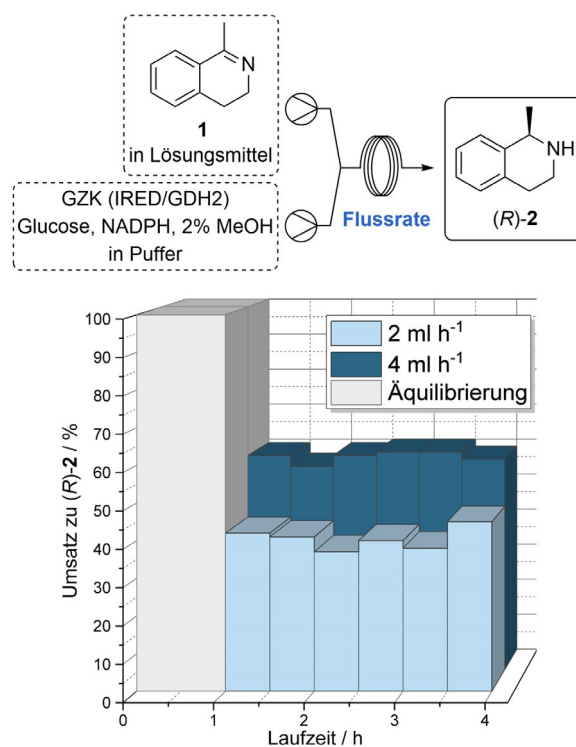


Abbildung 4. Segmentierte Flow-Reaktion von Imin **1** zu Amin (R)-2 in Methylcyclohexan und KP_i-Pufferlösung, mit einer Flussrate von 2 bzw. 4 mL h^{-1} , entsprechend 0,5 h Verweilzeit. Reaktionsbedingungen: Zweiphasiges System mit 40 mM des Substrats **1** in Methylcyclohexan und 10 mg mL^{-1} Ganzzellkatalysator (GZK), 0,2 mM NADP⁺, 240 mM Glucose, 2% MeOH in KP_i-Puffer (50 mM, pH 7) bei 30°C und verschiedene Flussraten.

um die Vergleichbarkeit zwischen den Batch- und Flow-Prozessen zu gewährleisten. So wurde eine organische Lösung mit Substrat **1** (40 mM) in Methylcyclohexan sowie eine wässrige Lösung mit D-Glucose, NADP⁺, *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit IRED und GDH (10 mg_{TRZM} mL⁻¹) und Methanol (2 Vol.-%) in Spritzen gefüllt und über ein Y-Stück zusammengeführt. Daraus resultierte ein segmentiertes Flow-System, welches durch einen Schlauchreaktor (PFE, 0.8 mm innerer Durchmesser) geleitet wurde. Es sei ergänzend angemerkt, dass durch die verwendete (Zweikanal-)Spritzenpumpe ein Aufschluss der Zellen durch die resultierenden Kräfte ausgehend von der Pumpe (hoher Druck oder Scherkräfte) sehr unwahrscheinlich ist. Die Verweilzeit wurde auf 0.5 h eingestellt und eine zweifache Verweilzeit wurde als Äquilibrierungszeitraum zum Einstellen eines stationären Zustands gewählt. Die Fraktionen der Reaktionsmischung wurden dann in Glasgefäßen gesammelt, die eine Quenchlösung (0.4 mL, 2 M wässrige NaOH-Lösung) enthielten. Die Quench-Methode wurde im Vorfeld validiert. Die Größe der Segmente hing stark von der Flussrate, dem Innendurchmesser des Reaktors und dem verwendeten Mischstück (Y- oder T-Stück mit 0.5 bis 1 mm Bohrung) ab. In den hier vorgestellten Experimenten lag die Segmentlänge im Bereich von 0.2 bis 0.8 mm.

Bei der Durchführung der enzymatischen Reduktion von **1** unter diesen (einleitenden) Flow-Bedingungen, konnten wir erfreulicherweise bereits eine signifikante Erhöhung des Umsatzes im Vergleich zum Batch-Prozess feststellen (Abbildung 4). Im Detail stieg der Umsatz von 25 % (nach 0.5 Reaktionszeit im Batch, siehe Abbildung 3) auf 41 % unter diesen nicht-optimierten Flow-Bedingungen (mit einer Verweilzeit von 0.5 h, siehe Abbildung 4).

Als nächstes konzentrierten wir uns auf die Optimierung des Flow-Prozesses. Zur Verbesserung des Massentransfers, welcher sich bereits in den Batch-Experimenten als ein entscheidender Faktor für die Prozesseffizienz herausstellte (Abbildung 3), haben wir die Flussrate erhöht und einen längeren Reaktor verwendet, um die Phasendurchmischung zu intensivieren ohne andere Prozessparameter zu verändern. Entsprechend unseren Erwartungen konnte bei einer erhöhten Flussrate von 4 mLh⁻¹ der Umsatz weiter deutlich gesteigert werden, was zur Bildung des Amins (*R*)-**2** mit 58 % Umsatz führte (Abbildung 4). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese, dass Biotransformationen in zweiphasigen Medien, die durch Massentransfer limitiert sind, von der Durchführung im segmentierten Flow-Modus enorm profitieren können: Selbst im Vergleich zur analogen Reaktion im Batch-Modus bei einer hohen Rührgeschwindigkeit von 1100 rpm konnte im analogen Flow-Prozess der Umsatz mehr als verdoppelt werden (Abbildung 4).

Zur Vervollständigung der Untersuchungen zur Iminreduktion wurden abschließend präparative Experimente mit Produktisolierung sowohl im Batch- als auch im Flow-Modus durchgeführt (für Details, siehe Hintergrundinformationen). In beiden Fällen wurde das gebildete Produkt (*R*)-**2** aus Reaktionsmischungen, die einen vollständigen Umsatz zeigten, isoliert. Im Fall der Batch-Reaktion erwies sich die Isolierung aufgrund der schlechten Phasentrennung als mühsam. Zur besseren Phasentrennung waren deshalb eine Zentrifugation

und eine zusätzliche zweifache Extraktion notwendig. Trotz dieser zeitaufwändigen Aufarbeitung konnten jedoch nur 75 % (> 99 % Reinheit) des Produktes (*R*)-**2** isoliert werden. Im Gegensatz dazu stellte die Phasentrennung beim segmentierten Flow-Ansatz kein Problem dar, sodass 95 % Ausbeute des isolierten Produktes (*R*)-**2** (95 % Reinheit) nach einer einfachen Phasentrennung erhalten wurde.

Aldoxim-Dehydratisierung im kontinuierlichen segmentierten Flow-Modus: Der Einfluss eines Tensids auf die Prozesseffizienz

Ermutigt durch diesen positiven Effekt der segmentierten Flow-Technologie auf Ganzzell-katalysierte Prozesse in zweiphasigen Medien waren wir weiter daran interessiert, die generelle Anwendbarkeit dieser Flow-Methode durch deren Ausdehnung auf weitere biokatalytische Anwendungen aufzuzeigen. Darüber hinaus wollten wir untersuchen, ob die Ganzzellkatalyse im Flow-Modus dem Batch-Modus auch dann überlegen ist (und einen verbesserten Massentransfer ermöglicht), wenn Tenside als Additive eingesetzt werden. Als Modellreaktion für diese Untersuchung wählten wir den enzymatische Schlüsselschritt in einer kürzlich entwickelten Cyanid-freien Route für Nitrile, der aus einer Oxd-katalysierten Dehydratisierung von Oximen zu Nitrilen besteht.^[38–40] Beim Fokus auf aliphatische Nitrile geht diese biokatalytische Methode zudem über den typischen, auf den Gebieten der Feinchemie und Pharma-Wirkstoffe liegenden Anwendungsbereich von Enzymen hinaus, da das entstehende *n*-Octannitril (**4**) als Bulk-Chemikalie genutzt wird.^[41] Die in *E. coli* BL21(DE3) überexprimierte Aldoxim-Dehydratase aus *Bacillus* sp. OxB-1 (OxB)^[42] erwies sich für diese Anwendung als geeigneter Ganzzellkatalysator.^[41]

Als Tensid verwendeten wir für unsere Untersuchungen das nichtionische Polysorbat Tween 20, da diese Verbindung von Buehler et al. in einer anderen früheren Biotransformation bereits erfolgreich eingesetzt wurde.^[30] Auch hier begannen wir mit einleitenden Batch-Experimenten, um einen Benchmark für die nachfolgenden Flow-Experimente zu setzen. Bei der Durchführung der Oxd-katalysierten Dehydratisierung von *n*-Octanaloxim (**3**) im Batch-Modus mit ganzen Zellen bei einer Reaktionszeit von 30 min wurde ohne den Zusatz von Tween 20 als Additiv ein Umsatz von 13 % zum Nitril **4** beobachtet. Unter Zusatz von Tween 20 verläuft die Dehydratisierung in Gegenwart der Oxd-haltigen Zellen dagegen mit einem verbesserten Umsatz von 32 %, was auf den vorteilhaften Einfluss des Tensids im Hinblick auf den Zugang des wasserunlöslichen Substrats zum Enzym hindeutet. Darüber hinaus zeigt das Experiment, dass auch für diesen Reaktionstyp eine Massentransfer-Limitierung vorliegt.

Bei der Durchführung der gleichen Reaktion im segmentierten Flow-Modus stellten wir erneut eine erhebliche Verbesserung des Umsatzes fest (Abbildung 5). Bereits ohne das Additiv konnte ein höherer durchschnittlicher Umsatz zum Nitril **4** von 68 % beobachtet werden, wohingegen mit dem Zusatz von Tween 20 als Additiv dann sogar ein nahezu vollständiger Umsatz (durchschnittlich 96 %) innerhalb einer kurzen Verweilzeit von 30 min erreicht wurde.

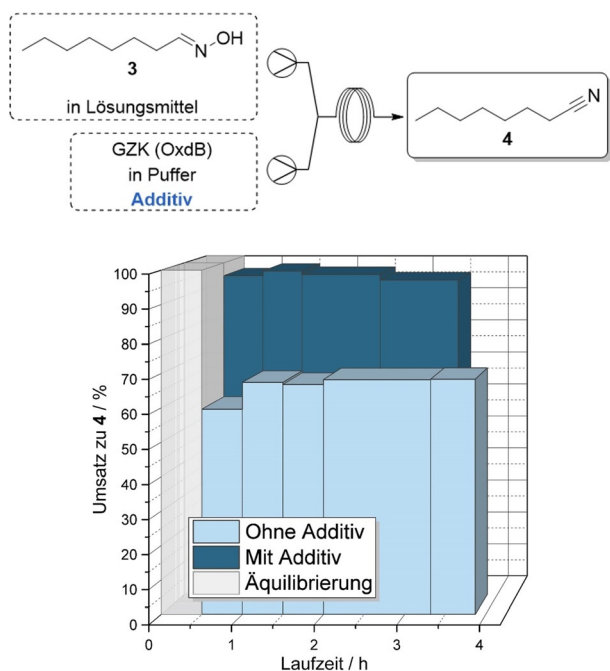


Abbildung 5. Oberer Teil: Schematischer Reaktionsaufbau. Unterer Teil: Umsatz zum Nitril **4** gegen die Laufzeit (beginnend vom Einschalten des Systems) eines segmentierten Flow-Ansatzes in Cyclohexan/ Puffer für die OxdB-katalysierte Dehydratisierung von *n*-Octanaloxim (**3**) mit und ohne Zusatz von Tween 20.

Beim Übergang vom Batch- zum Flow-Modus wurden alle anderen Parameter konstant gehalten, um die Vergleichbarkeit zwischen den Systemen zu erhalten (mit Ausnahme eines durchgeführten Quenching-Schrittes mit 2 M wässriger HCl-Lösung im Falle des Flow-Prozesses).

Es ist beachtenswert, dass im Vergleich zu den entsprechenden Batch-Experimenten die Reaktion im Flow-System deutlich besser verlief (wie in Abbildung 6 gezeigt). So konnte mit dem Flow-Ansatz eine Raum-Zeit-Ausbeute (STY; engl. *space-time yield*) von $12.5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden. Außerdem konnte im Vergleich zu einem vorherigen Ergeb-

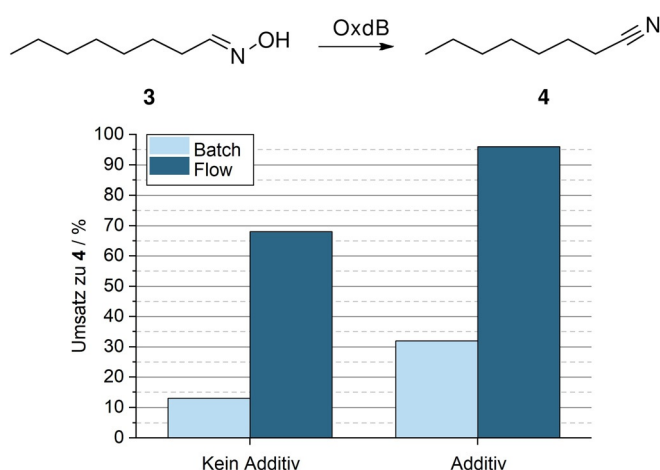


Abbildung 6. Batch- versus Flow-Ansatz für die OxdB-katalysierte Dehydratisierung von *n*-Octanaloxim (**3**) mit und ohne Zusatz von Tween 20 nach 30 min Reaktions-/Verweilzeit.

nis aus der Literatur^[28] die Effizienz des Biokatalysators mehr als verdoppelt werden (0.16 vs. $0.38 \text{ mg}_{\text{Produkt}} \text{ mg}_{\text{FZM}}^{-1}$ Feuchtzellmasse pro Produkt).

Nach der Untersuchung des Umsatzes der Reaktion beschäftigten wir uns dann mit der Produkt-Isolierung in präparativen Experimenten. Zu diesem Zweck haben wir die Produktisolierung und die resultierenden Ausbeuten aus vollständig umgesetzten Reaktionsgemischen einer im Batch- sowie einer im segmentierten Flow-Modus durchgeführten Reaktion verglichen (für Details, siehe Hintergrundinformationen). Für die Reaktion im Flow-Modus wurde das Nitril **4** nach einfacher Phasentrennung und Entfernung des Lösungsmittels in einer Ausbeute von 82% (> 94% Reinheit) erhalten. Bei der Batch-Reaktion hingegen wurde das Produkt **4** trotz einer aufwändigeren Aufarbeitung, bestehend aus Zentrifugation, Phasentrennung sowie zweimaliger Extraktion mit Cyclohexan (und anschließender Zentrifugation) nur in einer verminderten Ausbeute von 64% (> 95% Reinheit) erhalten.

Enzymatische Kaskaden im kontinuierlichen segmentierten Flow-Modus: Einfluss auf die Umsetzung und Produktisolierung des emulgierenden Pflanzenhormon-Zwischenprodukts 12-OPDA

Abschließend haben wir das segmentierte Flow-System für die Synthese von 12-OPDA (**8**) untersucht, welches in Bezug auf die synthetische Komplexität als auch Produktisolierung ein herausforderndes Produkt darstellt. 12-OPDA (**8**) ist ein Prostaglandin-ähnlicher Metabolit in Pflanzen^[43] und eine Vorstufe von Jasmonsäure.^[44] Zugleich besitzt diese Verbindung emulgierende Eigenschaften, was die Produktisolierung bei Batch-Synthesen schwierig machte und zu einer langwierigen Aufarbeitung und nicht-zufriedenstellenden Ausbeuten führte. Darüber hinaus stellen die biosynthetischen Schritte zu diesem Pflanzenhormon-Zwischenprodukt eine Herausforderung dar, da die Reaktionskaskade auf einem sehr instabilen Intermediat basiert.^[45] Andererseits ist die Biosynthese von 12-OPDA (**8**) viel kürzer als alle bisher berichteten chemischen Totalsynthesen,^[43] was diesen Ansatz für synthetische Zwecke wiederum attraktiv macht. Wir haben kürzlich über einen Bioprozess im Batch-Modus berichtet, der auf dieser Biosynthese basiert (Abbildung 7)^[45] und mit der Bildung des Hydroperoxids **6** (HPOT) ausgehend von α -Linolensäure (**5**) mithilfe einer 13-Lipoxygenase beginnt. Anschließend wird durch eine Allenoxid-Synthase die Bildung eines hochlabilen Epoxid-Intermediats (**7**) katalysiert, welches dann in Gegenwart einer Allenoxid-Zyklase zum gewünschten 12-OPDA (**8**) umgesetzt wird.

Zur synthetischen Evaluierung dieses Bioprozesses in einem segmentierten Flow-Modus konzentrierten wir uns auf die abschließende zweistufige Kaskade, bestehend aus der Bildung des hochlabilen Allenoxids **7** und der anschließenden Zyklisierung zu 12-OPDA (**8**). Das erste Zwischenprodukt 13-HPOT (**6**) wurde vorab gemäß unserem berichteten Protokoll synthetisiert.^[45] Ausgehend von 13-HPOT (**6**) führten wir verschiedene Batch-Experimente durch, die als Benchmark für die nachfolgenden segmentierten Flow-Reaktionen

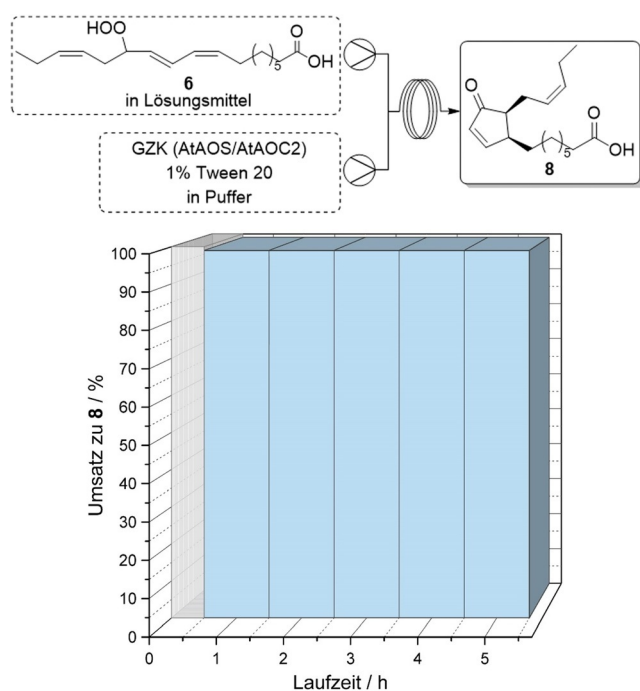
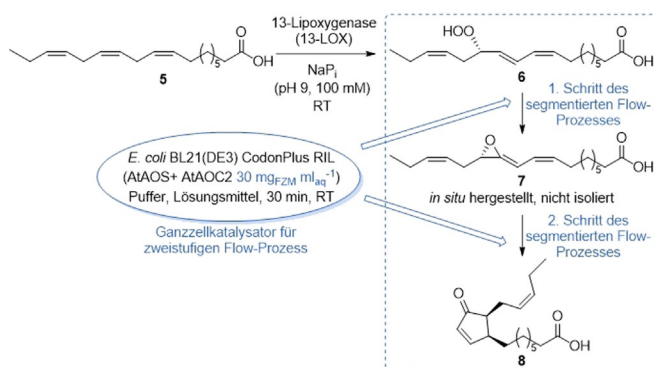


Abbildung 7. Synthese von 12-OPDA (**8**) in einem segmentierten Flow-System mit $20 \text{ mg}_{\text{FZM}} \text{ mL}_{\text{aq}}^{-1}$ ganze Zellen in Natriumphosphat-Puffer (pH 8, 100 mM), 1% Tween 20 und Isooctan mit 13-HPOT (**6**) bei Raumtemperatur und 30 min Laufzeit.

dienten. In den einleitenden Batch-Experimenten evaluierten wir den Einfluss von verschiedenen Puffer-Lösungsmittel-Kombinationen sowie der Menge an Biokatalysator und Additiven. Details zur Optimierung des Batch-Verfahrens sind in den Hintergrundinformationen enthalten. Die Reaktionszeit wurde auf 30 min festgelegt, da wir für den anschließenden Flow-Prozess ebenfalls 30 min Verweilzeit wählten. Bei dieser Reaktionszeit wurde als höchster Umsatz zu 12-OPDA (**8**) im Batch-Modus 34% festgestellt. Im optimierten Batch-Experiment wurden dabei $20 \text{ mg}_{\text{FZM}} \text{ mL}_{\text{aq}}^{-1}$ des Ganzzellkatalysators, 1 Vol.-% Tween 20 und Isooctan als organisches Lösungsmittel verwendet.

Für die Synthese von 12-OPDA (**8**) im segmentierten Flow-Modus wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den Batch-Reaktionen verwendet (Schema 2). Dementsprechend wurde das Hydroperoxid-Substrat **6** in Isooctan



Schema 2. Synthese von 12-OPDA (**8**) ausgehend von 13-HPOT (**6**).

gelöst und der maßgeschneiderte, Allenoxid-Synthase und Allenoxid-Zyklase enthaltende Ganzzellkatalysator wurde in Puffer mit 1 Vol.-% Zusatz von Tween 20 als Tensid suspendiert. Bei der Durchführung dieser Synthese im segmentierten Flow-Modus stellten wir erfreut erneut eine erhebliche Steigerung des Umsatzes fest, welcher im Durchschnitt $> 99\%$ verbunden mit einer hohen Bioprozessstabilität über eine Laufzeit von mindestens 5 h erreichte (Abbildung 7). Im Vergleich zum Batch-Experiment (34%) konnte der Umsatz bei Durchführung dieses Prozesses im segmentierten Flow-Modus somit nahezu verdreifacht werden, wobei alle anderen Parameter unverändert gehalten wurden. Dies unterstreicht die hohe Effizienz von Flow-Prozessen auch bei Ganzzellkatalysierten Transformationen.

Es sei angemerkt, dass die Verwendung von ganzen Zellen, die nur bei 4°C und nicht bei -20°C gelagert wurden, für diesen Prozess entscheidend ist, da mit gefrorenen Zellen keine Umsetzung beobachtet wurde. Dies kann mit einer Permeabilisierung der Zellmembranen begründet werden, die zu einem geringeren Schutz der Enzyme vor den in der Umgebung sich befindenden organischen Lösungsmitteln führt.

Auch nachdem die katalytische Effizienz dieser Kaskade mit ganzen Zellen durch den segmentierten Flow-Prozess deutlich verbessert werden konnte, blieb die Produktisolierung als weitere Herausforderung bestehen. Das Zielmolekül 12-OPDA sowie viele verwandte, von Fettsäuren abgeleitete Verbindungen sind aus der Literatur bekannt dafür, aufgrund ihrer emulgierenden Eigenschaften schwierig aus wässrigen Lösungen isoliert werden zu können.^[45,46,47] Daher waren wir daran interessiert festzustellen, ob die segmentierte Flow-Technologie nicht nur zur erheblichen Steigerung der katalytischen Effizienz führt, sondern auch die Aufarbeitung durch das Ermöglichen einer verbesserten Phasentrennung vereinfacht. Zum besseren Vergleich der Effizienz der Isolierung des Batch-Prozesses gegenüber dem des Flow-Prozesses verglichen wir die Ausbeute an isoliertem 12-OPDA (**8**) aus dem Batch-Modus mit der aus dem segmentierten Flow-Modus, wobei in beiden Fällen Reaktionsmischungen mit vollständigem Umsatz verwendet wurden (Abbildung 8). Bemerkenswert ist, dass es einen deutlichen optischen Unterschied zwischen den beiden Reaktionsmischungen gibt, die aus den Biotransformationen im Batch-Modus (Abbildung 8A) und im segmentierten Flow-Modus (Abbildung 8B) resultierten.

Im Batch-Prozess findet keine klare Phasentrennung statt und es bildet sich eine Zwischenphase, die auf eine Zellen und Fettsäure enthaltende Emulsion zurückgeführt werden kann (Abbildung 8, A1). Außerdem ist nach dem Quenchen die organische Phase fast vollständig mit der Zwischenphase vermischt (A2), wodurch die weitere Aufarbeitung deutlich erschwert wird (Abbildung 8, A2). Es erwies sich daher für diesen Bioprozess im Batch-Modus eine langwierige weitere Aufarbeitung, die z. B. eine Zentrifugation für die Phasentrennung enthält, als zwingend erforderlich.

Im Gegensatz dazu konnten wir im Flow-Experiment eine klare Phasentrennung des Reaktionsgemisches bereits am Ende der Reaktion ohne weitere Behandlung und sogar ohne Zentrifugation beobachten (Abbildung 8, B1). Zudem sedi-

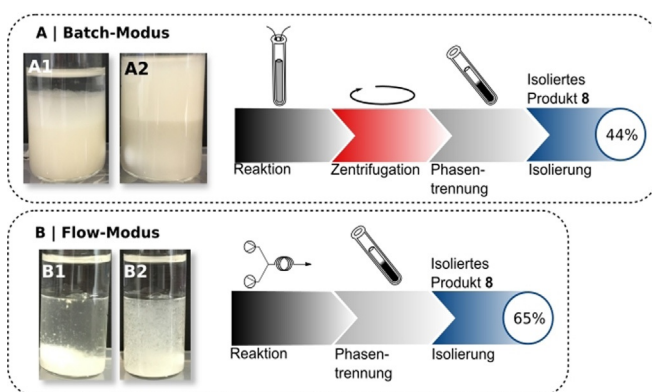


Abbildung 8. Reaktionsmischungen der Synthese von 12-OPDA (**8**) im Batch-Modus (**A**) vor dem Quenchen (links, **A1**) und nach dem Quenchen (rechts, **A2**), sowie im segmentierten Flow-Modus (**B**), direkt nach der Reaktion (links, **B1**) und nach Absetzen der Zellen (rechts, **B2**). Der Pfeil symbolisiert die benötigten Verfahrensschritte zur Isolierung von **8**.

mentierten die Zellen nach einer kurzen Zeit (Abbildung 8, B2) und die organische Phase konnte ohne weitere Prozessschritte leicht abgetrennt werden. Hierfür wurde die organische Phase abdekantiert und das Lösungsmittel entfernt. Während für den Batch-Prozess eine Ausbeute von nur 44 % erreicht werden konnte, führte der Flow-Prozess mit seiner vereinfachten Aufarbeitung zu einer erhöhten, zugleich noch nicht optimierten Ausbeute von 65 %. Diese Verbesserung der Ausbeute unterstreicht den Nutzen der Anwendung der Ganzzellkatalyse in einem segmentierten Flow-System nicht nur zur Steigerung der katalytischen Effizienz selbst, sondern auch zur Vereinfachung und Verbesserung der Produktisolierung.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren im segmentierten Flow-Modus eine effektive und gleichzeitig einfach zu handhabende Methode für die Durchführung hocheffizienter Biotransformationen darstellt und damit bestehende Einschränkungen überwindet, die bisher bei den häufig genutzten Batch-Prozessen auftraten. Neben den bis zu dreifach gesteigerten Umsätzen zu den gewünschten Produkten konnte auch die Aufarbeitung erheblich verbessert werden. Für eine ausgewählte Biotransformation mit bekanntermaßen extrem schwieriger Aufarbeitung aufgrund von Emulsionsbildung und problematischer Phasentrennung wurde mit diesem Flow-Prozess eine 1,5-fach höhere Ausbeute für das isolierte Produkt im Vergleich zum Standard-Batch-Prozess erhalten. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass die Ganzzellkatalyse einfach und ohne spezielle Vorkenntnisse oder benötigte Ausrüstung in einen Flow-Prozess implementiert werden kann. Außerdem kann mit solchen Ganzzell-Prozessen die Produktion im großen Maßstab potenziell einfacher im Flow-Modus sein (durch „Numbering-up“, d.h. parallele Verwendung einer Vielzahl von Reaktoren für den optimierten Prozess), da sich diese Biotransformationen im Batch-Modus

als sehr empfindlich gegenüber Stofftransport und Rührgeschwindigkeit erwiesen haben und das Hochskalieren somit eine Herausforderung darstellt. Ein weiterer Vorteil von Flow-Prozessen ist, dass die Scherkräfte minimiert werden können, was förderlich im Hinblick auf eine höhere Stabilität des Biokatalysators ist. Darüber hinaus kann eine konstante Produktqualität von Batch zu Batch aufgrund der Empfindlichkeit des Systems im Gegensatz zu einem segmentierten Flow-Prozesse nicht zwingend gewährleistet werden. Wir sind überzeugt, dass die beschriebene Ganzzell-Flow-Prozesstechnologie ein breites Reaktionsspektrum hat sowie auf zahlreiche biokatalytische Systeme angewendet werden kann und somit zu einer weiteren Erhöhung der Anzahl an katalytischen Anwendungen mit Ganzzellkatalysatoren in der organischen Synthese beitragen wird.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die großzügige Unterstützung durch die Europäische Union (EU) im Rahmen des EU-Forschungsprojekts ONE-FLOW („Catalyst Cascade Reactions in “One-Flow,, within a Compartmentalized, Green-Solvent “Digital Synthesis Machinery,, – End-to-End Green Process Design for Pharmaceuticals“), Arbeitsprogramm: EU-Antrag 737266. Weiterhin danken wir Manuel Warkentin für die technische Unterstützung und Frau Georgina Willms vom Ellipsis English Writing Support Centre der Universität Bielefeld für die redaktionelle Unterstützung. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Biokatalyse · Flow-Chemie · Ganzzellkatalyse · Segmentierte Flow-Prozesse · Zweiphasige Reaktion

- [1] K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [2] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [3] P. Domínguez de María, F. Hollmann, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1257.
- [4] A. M. Klivanov, *Nature* **2001**, *409*, 241–246.
- [5] S. L. Lee, T. F. O’Connor, X. Yang, C. N. Cruz, S. Chatterjee, R. D. Madurawe, C. M. V. Moore, L. X. Yu, J. Woodcock, *J. Pharm. Innov.* **2015**, *10*, 191–199.
- [6] M. Baumann, I. R. Baxendale, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1194–1219.
- [7] B. Gutmann, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6688–6728; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6788–6832.
- [8] R. Porta, M. Benaglia, A. Puglisi, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 2–25.
- [9] T. Wirth, *Microreactors in Organic Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.

- [10] M. Movsisyan, E. I. P. Delbeke, J. K. E. T. Berton, C. Battilocchio, S. V. Ley, C. V. Stevens, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4892–4928.
- [11] L. Hajba, A. Guttman, *J. Flow Chem.* **2016**, *6*, 8–12.
- [12] E. Laurenti, A. dos Santos Vianna, Jr., *Biocatalysis* **2016**, *1*, 148–165.
- [13] J. Döbber, M. Pohl, S. V. Ley, B. Musio, *React. Chem. Eng.* **2018**, *3*, 8–12.
- [14] I. Denčić, S. De Vaan, T. Noël, J. Meuldijk, M. De Croon, V. Hessel, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 10951–10960.
- [15] A. S. de Miranda, M. V. de M. Silva, F. C. Dias, S. P. de Souza, R. A. C. Leão, R. O. M. A. de Souza, *React. Chem. Eng.* **2017**, *2*, 375–381.
- [16] X. Tang, R. K. Allemann, T. Wirth, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 414–418.
- [17] A. Brahma, B. Musio, U. Ismayilova, N. Nikbin, S. B. Kamptmann, P. Siegert, G. E. Jeromin, S. V. Ley, M. Pohl, *Synlett* **2016**, *27*, 262–266.
- [18] P. De Santis, L.-E. Meyer, S. Kara, *React. Chem. Eng.* **2020**, *5*, 2155–2184.
- [19] A. Pinto, M. L. Contente, L. Tamborini, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* **2020**, *25*, 100343.
- [20] L. H. Andrade, W. Kroutil, T. F. Jamison, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6092–6095.
- [21] G. Stojkovič, P. Žnidaršič-Plazl, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 1102–1107.
- [22] M. Polakovič, J. Švitel, M. Bučko, J. Filip, V. Neděla, M. B. Ansonge-Schumacher, P. Gemeiner, *Biotechnol. Lett.* **2017**, *39*, 667–683.
- [23] P. Zambelli, L. Tamborini, S. Cazzamalli, A. Pinto, S. Arioli, S. Balzaretto, F. J. Plou, L. Fernandez-Arrojo, F. Molinari, P. Conti, D. Romano, *Food Chem.* **2016**, *190*, 607–613.
- [24] D. Valikhani, P. L. Srivastava, R. K. Allemann, T. Wirth, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2194–2197.
- [25] B. Halan, R. Karande, K. Buehler, A. Schmid, *J. Flow Chem.* **2016**, *6*, 39–42.
- [26] R. Gross, K. Buehler, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 424–436.
- [27] N. Miložič, G. Stojkovič, A. Vogel, D. Bouwes, P. Žnidaršič-Plazl, *J. Biotechnol.* **2018**, *47*, 18–24.
- [28] N. Adebar, H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 6062–6067.
- [29] R. Karande, A. Schmid, K. Buehler, *Langmuir* **2010**, *26*, 9152–9159.
- [30] R. Karande, A. Schmid, K. Buehler, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2511–2521.
- [31] R. Karande, A. Schmid, K. Buehler, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 361–370.
- [32] F. Huynh, M. Tailby, A. Finniear, K. Stephens, R. K. Allemann, T. Wirth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 16490–16495; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 16632–16637.
- [33] N. Laurain, S. Zard, PCT Patent Applic. WO 01/02320 A1, **2001**.
- [34] K. Abe, T. Hattori, Y. Matsumori, US Patent US 9742033 B2, **2017**.
- [35] J. Smets, H. R. G. Denuette, A. Pintens, K. Van Aken, F. A. C. Vrielynck, US Patent US 8609603 B2, **2013**.
- [36] K. Floková, K. Feussner, C. Herrfurth, O. Miersch, V. Mik, D. Tarkovská, M. Strnad, I. Feussner, C. Wasternack, O. Novák, *Phytochemistry* **2016**, *122*, 230–237.
- [37] N. Zumbrägel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger, *Heterocycles* **2017**, *95*, 1261–1271.
- [38] T. Betke, P. Rommelmann, K. Oike, Y. Asano, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12361–12366; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12533–12538.
- [39] P. Rommelmann, T. Betke, H. Gröger, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 1521–1527.
- [40] C. Plass, A. Hinzmann, M. Terhorst, W. Brauer, K. Oike, H. Yavuzer, Y. Asano, A. J. Vorholt, T. Betke, H. Gröger, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 5198–5203.
- [41] A. Hinzmann, S. Glinski, M. Worm, H. Gröger, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 4867–4872.
- [42] Y. Kato, K. Nakamura, H. Sakiyama, S. G. Mayhew, Y. Asano, *Biochemistry* **2000**, *39*, 800–809.
- [43] D. Maynard, H. Gröger, T. Dierks, K.-J. Dietz, *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 5341–5354.
- [44] P. Zerbe, E. W. Weiler, F. Schaller, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 229–236.
- [45] J. Löwe, K.-J. Dietz, H. Gröger, *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 1902973.
- [46] G. V. Marinetti, *J. Lipid Res.* **1962**, *3*, 1–20.
- [47] L. Löfgren, M. Stahlman, G.-B. Forsberg, S. Saarinen, R. Nilsson, G. I. Hansson, *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1690–1700.

Manuskript erhalten: 29. November 2020
Veränderte Fassung erhalten: 2. März 2021
Akzeptierte Fassung online: 13. März 2021
Endgültige Fassung online: 10. Juni 2021