

Abschlussbericht für die Max-Buchner-Forschungstiftung

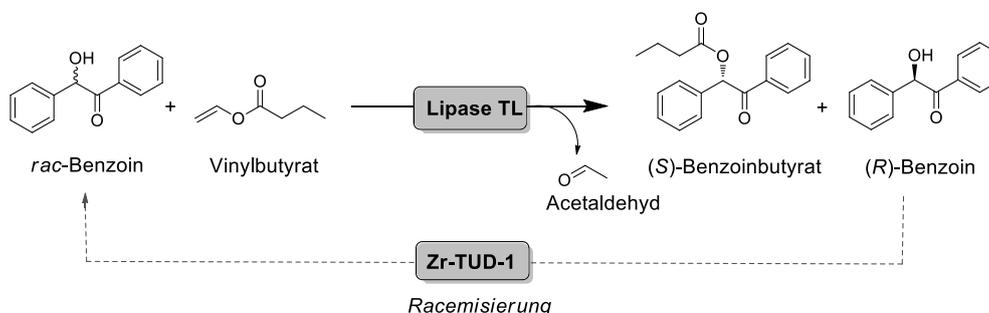
Antragstellerin: Dr. Selin Kara
 Doktorandin: Dipl.-Chem. Annika Petrenz
 Thema: Ein nachhaltiges chemo-enzymatisches Reaktionskonzept: dynamische kinetische Racematspaltung für die Synthese von chiralem Benzoin (Kennziffer 3412)
 Zeitraum: 01.07.2014–01.07.2015

Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Validierung und Optimierung der Prozessparameter der dynamisch kinetischen Racematspaltung (DKR) von Benzoin angestrebt. Dafür wurde der Einfluss verschiedener Immobilisierungsmethoden, Reaktionsmedia und der Wasseraktivität auf die Aktivität und die Stabilität des Biokatalysators, sowie auf den chemischen Katalysator untersucht. Schlussendlich wurde ein kontinuierliches System für die DKR unter optimierten Bedingungen etabliert.

1 Zielsetzung

Ziel der Forschungsarbeit war die Etablierung eines nachhaltigen Prozess für die dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) von Benzoin (Schema 1). Benzoin gehört zur Stoffklasse der α -Hydroxyketone. Diese sind wichtige Grundbausteine für die Synthese von verschiedener Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen [Kara und Liese, 2010].



Schema 1. Lipase TL katalysierte DKR von Benzoin (mit Vinylbutyrat als Acyldonor) und der chemische Katalysator Zr-TUD-1 für Racemisierung von (R)-Benzoin.

Zur Herstellung von verschiedenen enantiomerenreinen α -Hydroxyketonen, hat sich die DKR als eine sehr effektive Möglichkeit gezeigt [Hoyos et al., 2006&2008]. Hierbei wird eine Enantiomer selektiv durch eine Lipase umgesetzt, während das nicht umgesetzte Enantiomer durch einen chemischen Katalysator racemisiert wird. In der vorliegenden Arbeit wird hierfür die Lipase TL aus *Pseudomonas stutzeri* und der Zr-TUD-1 (Si/Zr = 25) verwendet [Nieguth et al., 2014]. Durch die Immobilisierung der Lipase und die Wahl des Reaktionsmediums sollten zunächst die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators optimiert werden. Parallel sollte der chemische Katalysator unter Wahl der gleichen Parameter charakterisiert werden. Schließlich sollte unter den optimierten Bedingungen ein kontinuierliches Reaktorkonzept entwickelt werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Optimierung des Enzyms durch Immobilisierung

Der Standardträger für die Immobilisierung der Lipase TL ist der Accurel MP1001 der Firma Membrana GmbH (Obernburg, Deutschland). Dieser besteht aus einem porösen hydrophoben Polypropylenmaterial. Die Immobilisierungsmethode wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits optimiert [Nieguth et al., 2014]. Im Laufe dieser Forschungsarbeit wurden weitere Träger bezogen, darunter unterschiedliche Materialien für die adsorptive, ionische und kovalente Immobilisierung. Dabei wurden die Parameter Pufferkonzentration und pH-Wert, Inkubationszeiten und –Temperaturen optimiert. Diese Ergebnisse sollen demnächst in einer weiteren Publikation veröffentlicht werden.

2.2 Optimierung des Reaktionsmediums für das Enzympräparat

Zur Optimierung der Enzymperformance wurde der Fokus auf die Wasseraktivität und die Wahl des Reaktionsmediums gelegt. Beide Parameter wurden zum besseren Verständnis einzeln betrachtet. Aus vorherigen Arbeiten wurden 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) und Toluol als geeignete Lösungsmittel für die DKR gefunden [Nieguth et al., 2014]. Daher wurden zunächst in diesen Lösungsmitteln, im Accurel-Immobilisat und im Benzoin festgelegte Wasseraktivitäten (a_w) eingestellt. Es konnte

beobachtet werden, dass in beiden Reaktionssystemen eine Erhöhung der Wasseraktivität zu einer Erniedrigung der Enzymaktivität führte (Abb. 1). Die höchste Aktivität konnte unter annähernd trockenen Bedingungen gemessen werden ($a_w \leq 0,02$). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Lipase TL für eine optimale Performance in der DKR nur eine sehr kleine Menge an Wasser benötigt.

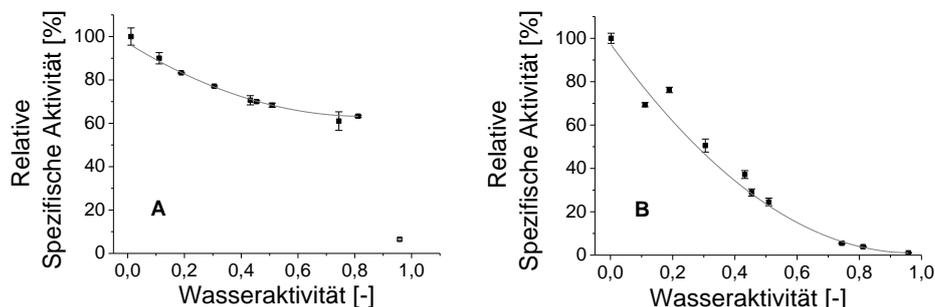


Abb.1. Einfluss von der Wasseraktivität auf die Kinetik Resolution von Benzoin katalysiert durch Lipase TL (A) in Toluol und (B) in 2-MeTHF.

Neben den erwähnten Lösungsmitteln sollten weitere alternative umweltfreundliche Lösungsmittel untersucht werden. Es wurden die organischen Lösungsmittel Cyclopentylmethylether (CPME), 1,3-Dioxolan und Deep-Eutectic-Solvents (DESs) ausgewählt. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde diese Reaktionsmedia ebenfalls in trockener Form eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Enzymaktivität in CPME 1,6-fach höher als in Toluol bzw. 2-MeTHF und 6-fach höher als in 1,3-Dioxolan war. CPME zeigte somit ein vielversprechendes Potenzial als alternatives Lösungsmittel. Wie erwähnt, wurden ebenfalls unterschiedliche DESs untersucht. Als Kationen der DESs wurden Cholinchlorid und Ethylammoniumchlorid ausgewählt. Als Anion Lävulinsäure, Oxalsäure, Glycerin, Harnstoff und Isosorbat. Es zeigte sich, dass alle gebildeten DESs eine hohe Viskosität und geringe Löslichkeit von Benzoin aufwiesen. Im Falle der Löslichkeit bildete Cholinchlorid:Isosorbat (ChCl:Iso) eine Ausnahme. Es konnte nur in diesem DES eine Aktivität der Lipase bestimmt werden. Die zusätzliche Zugabe von 2-Propanol führte zu einer Erniedrigung der Viskosität und einer Erhöhung der Löslichkeit, dennoch konnte keine Steigerung der Aktivität beobachtet werden. Insgesamt war die erreichte Aktivität in ChCl:Iso im Vergleich zu den Ergebnissen in den organischen Lösungsmittel deutlich geringer, so dass die getesteten DESs keine geeigneten Reaktionsmedia für die DKR von Benzoin sind.

2.3 Reaktionstechnische Charakterisierung des Enzympräparats in verschiedenen Reaktionsmedia

Neben der Aktivität spielt auch die Stabilität eines Enzyms für die Entwicklung einer kontinuierlichen Reaktionsführung eine entscheidende Rolle. Zur Bestimmung der Prozessstabilität wurde ein 6 mL Rührkesselreaktor etabliert und ausgelegt. Die Prozessstabilität wurde definiert über die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Umsatzes. Um einen möglichen Einfluss der Eduktabnahme und Zunahme der Produkte auf die Stabilität zu verhindern, sollte der Umsatz der Reaktion $\leq 10\%$ sein. Daher wurde experimentell ein Durchfluss von 0,5–1,0 mL/min bestimmt [Petrenz et al., 2015]. Des Weiteren wurde die Durchmischung bzw. das Verweilzeitverhalten in Abhängigkeit der Umdrehung mittels einer Sprungmarkierung untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse wurde 500 rpm als Rührgeschwindigkeit festgelegt [Petrenz et al., 2015]. Zunächst wurde die Halbwertszeit der immobilisierten Lipase in Toluol und 2-MeTHF in Abhängigkeit der Wasseraktivität bestimmt (Abb. 2). Hierbei wurden nur die a_w -Werte untersucht, die eine Lipasenaktivität von $>70\%$ Restaktivität (bezogen auf den Wert bei $a_w \leq 0,02$) aufwiesen. Es konnte beobachtet werden, dass in Toluol die Halbwertszeit mit steigender Wasseraktivität abnahm. In 2-MeTHF wurde eine um 16% erhöhte Halbwertszeit bei einem a_w -Wert von 0,23 bestimmt werden (Abb. 2). Das bedeutet, die Reaktion könnte, falls nötig, ebenfalls bei einem a_w -Wert von 0,23 durchgeführt werden. Dennoch ergäbe sich in dem Fall eine geringere Aktivität der Lipase.

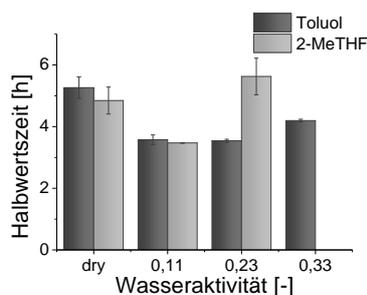


Abb.2. Einfluss von der Wasseraktivität auf die Prozessstabilität.

Für das alternative Lösungsmittel CPME wurde die Halbwertszeit ebenfalls bestimmt. Es ergab sich eine 1,5-fach (im Vergleich zu 2-MeTHF) bzw. 1,3-fach (im Vergleich zum Toluol) höhere Prozessstabilität der Lipase in CPME (Abb. 3). Unter allen getesteten Parameter für die lipasenkatalysierte Teilreaktion der DKR wurde trockenes CPME als erfolgversprechendes Reaktionsmedium für die kontinuierliche Synthese ausgewählt.

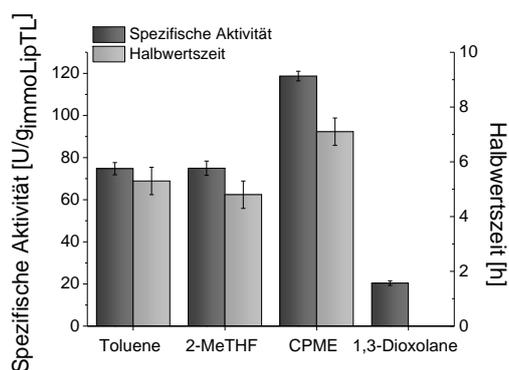


Abb.3. Aktivität und Halbwertszeit des Immobilisiertes Enzyms in verschiedenen trockenen Lösungsmitteln.

2.2 Charakterisierung des Racemisierungskatalysators in verschiedenen Reaktionsmedia

Neben der Aktivität der Lipase wurde ebenfalls die Aktivität des Racemisierungskatalysators Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Parameter Wasseraktivität und Lösungsmittel untersucht. Dafür wurde (*R*)-Benzoin mit dem Zr-TUD-1 racemisiert und die Geschwindigkeit der Abnahme des Enantiomerenüberschusses (*ee*) untersucht. Zunächst wurde wiederum der Einfluss der Wasseraktivität in den Lösungsmitteln Toluol und 2-MeTHF auf die Aktivität des Zr-TUD-1 beobachtet. Die Ergebnisse zeigten im Falle des Toluols keine Änderung der Aktivität mit steigender Wasseraktivität (Abb. 4/A). In 2-MeTHF konnte eine signifikante Abnahme der Racemisierung beobachtet werden (Abb. 4/B). Das bedeutet in 2-MeTHF sollte die DKR nicht bei einem a_w -Wert von 0,23 durchgeführt werden, obwohl für eine leicht erhöhte Enzymstabilität gemessen werden konnte. Diese macht wiederum den Verlust der Aktivitäten der zwei Katalysatoren nicht wett.

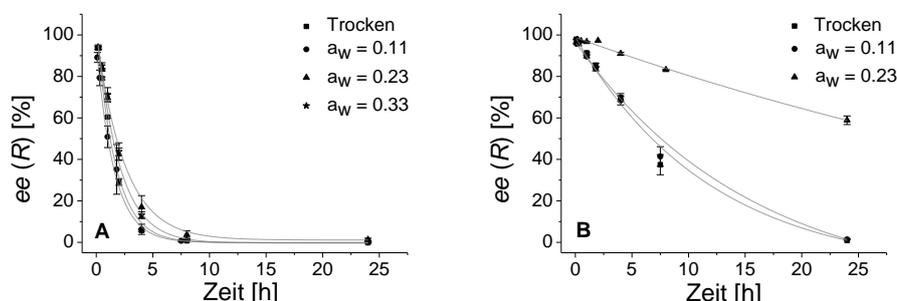


Abb. 4. Einfluss von der Wasseraktivität auf den chemischen Katalysator Zr-TUD-1 (A) in Toluol und (B) in 2-MeTHF.

Der Einfluss der alternativen Lösungsmittel auf die Racemisierung wurde daher weiterhin in trockenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die höchste Aktivität des Zr-TUD-1 wurde in Toluol gemessen (Abb. 5). Dennoch war die Aktivität in CPME nur etwas geringer. Daher ist CPME auch für die Racemisierung ein neues alternatives Lösungsmittel. Vergleichbar mit dem Ergebnis der Lipasenaktivität zeigte auch der

chemische Katalysator in 1,3-Dioxolan eine deutlich schlechtere Aktivität. Das Lösungsmittel wurde entsprechend für weitere Versuche ausgeschlossen.

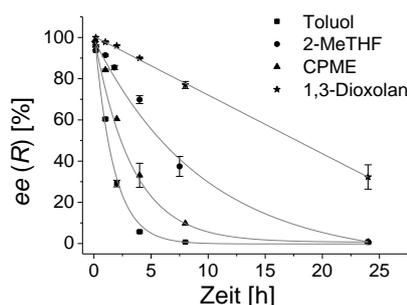


Abb.5. Aktivität des chemischen Katalysators in verschiedenen trockenen Lösungsmitteln.

2.3 Etablierung des kontinuierlichen Reaktorssystems

Wie bereits erwähnt, wurde auf Grundlage der Ergebnisse CPME als geeignetes Lösungsmittel für eine kontinuierliche Synthese von (S)-Benzoinbutyrat ausgewählt. Für die Etablierung wurde der Rührkesselreaktor genutzt, in dem bereits die Stabilitäten der Lipase bestimmt wurden. Hierbei wurde lediglich der Durchfluss auf 0,05 mL/min reduziert zur Erhöhung der Verweilzeit und die Rührgeschwindigkeit auf 900 rpm erhöht zur besseren Dispersion des chemischen Katalysators. In diesem Setup konnte ein maximaler Umsatz von 40% nach 2,5 h gemessen werden. Im Anschluss erniedrigte sich der Umsatz auf einen Wert von 11% nach 76 h. Der ee blieb während der gesamten Messdauer konstant bei $\geq 98\%$ [Petrenz et al., 2015].

3 Wissenschaftliche Beiträge

3.1 Publikationen

A. Petrenz, P. Dominguez de Maria, A. Ramanathan, U. Hanefeld, S. Kara, M. B. Ansorge-Schumacher. *Chem. Ing. Tech.* **86** (9) (2014) 1488.

A. Petrenz, P. Dominguez de Maria, A. Ramanathan, U. Hanefeld, M. B. Ansorge-Schumacher, S. Kara. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **114** (2015) 42–49.

3.2 Vorträge in Tagungen

A. Petrenz*, P. Domínguez de María, A. Ramanathan, U. Hanefeld, S. Kara, M. B. Ansorge-Schumacher, *Chemo-enzymatische heterogenkatalysierte Eintopfsynthese von enantiomerenreinem Benzoin*, ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2014 (Aachen, DE); 30.09.2014–02.10.2014

3.3 Poster Präsentationen in Tagungen

A. Petrenz, S. Kara, P. Dominguez de Maria, A. Ramanathan, U. Hanefeld, M. B. Ansorge-Schumacher, *Heterogeneous chemo-enzymatic catalyzed one-pot synthesis of enantiomerically pure benzoin*, 7th International Congress on Biocatalysis (Hamburg, DE); 30.08.2014–04.09.2014

A. Petrenz, S. Kara, P. Dominguez de Maria, A. Ramanathan, U. Hanefeld, M. B. Ansorge-Schumacher, *Heterogeneous chemo-enzymatic catalyzed one-pot synthesis of enantiomerically pure benzoin*, 7th Green Solvents Conference (Dresden, DE); 19.10.2014–22.10.2014

A. Petrenz, S. Hennig, S. Kara, M. B. Ansorge-Schumacher, *Screening for a stable heterogeneous lipase formulation – immobilization onto covalent, adsorptive and ionic surfaces*, Biotrans 2015 (Vienna, AUT); 26.07.2015–30.07.2015

4 Literatur

S. Kara, A. Liese, in: M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, Wiley-VCH (2010) pp. 2034–2040.

P. Hoyos, M. Fernandez, J. V. Sinisterra, A. R. Alcántara. *J. Org. Chem.* **71** (2006) 7632–7637.

P. Hoyos, A. Buthe, M. B. Ansorge-Schumacher, J. V. Sinisterra, A. R. Alcántara. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **52–53** (2008) 133–139.

R. Nieguth, J. ten Dam, A. Petrenz, A. Ramanathan, U. Hanefeld, M. B. Ansorge-Schumacher. *RSC Adv.* **4** (2014) 45495–45503.

A. Petrenz, P. Dominguez de Maria, A. Ramanathan, U. Hanefeld, M. B. Ansorge-Schumacher, S. Kara. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **114** (2015) 42–49.