

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von β -Ketoestern mit rekombinanten Hefen

Helge Engelking

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing. habil. Johann Stichlmair

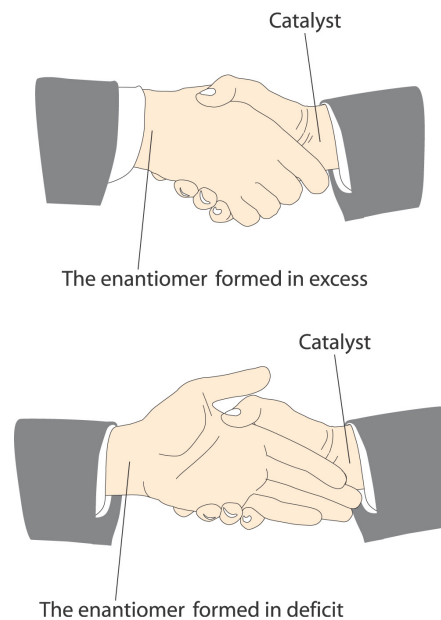
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 22.06.2004 bei der Technischen Universität eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 30.07.2004 angenommen.

„In the beginning there was yeast, and it raised bread, brewed beer, and made wine. After many not days but centuries and even millenia later, it was named *Saccharomyces cerevisiae*..“

(Spencer et al. (2001): Non-conventional yeasts; Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:147-156)

Chirale Katalyse



Aus der Veröffentlichung des Nobelkomitees zur Verleihung der Nobelpreise in Chemie für William Knowles, Ryoji Noyori und Barry Sharpless im Jahr 2001 für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der chiralen Katalyse.

Vorwort

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom Juli 2001 bis Juni 2004 am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt:

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Arbeitsmittel, für die Betreuung, für die Diskussionsbereitschaft und die Hilfestellung sowie für die zügige und kritische Durchsicht dieser Arbeit.
- Herrn Dr. R. Pfaller, Frau Dipl.-Ing. Reutter-Maier und Herrn Dr. G. Wich vom Consortium für elektrochemische Industrie, für die Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit und für die konstruktiven Diskussionen.
- Herrn Prof. Dr. Stichlmair und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Fluidverfahrenstechnik der TU München, für die Möglichkeit, die Labore für Analytik mitnutzen zu können. Insbesondere gilt der Dank Frau D. Styrnik für die Unterstützung bei unterschiedlichen analytischen Fragestellungen.
- den Studenten, die mit ihren Arbeiten am Entstehen beteiligt waren: Herrn B. Agerer, Herrn J. Borsato, Herrn A. Simmonet, Frau H. Späth, Herrn A. Stäbler und Herrn B. Spiegelberger.
- den Mitarbeitern der Werkstätten, Herrn H. Zacher, Herrn N. Werth und Herrn G. Kojro, die bei der zügigen Lösung mancher technischen Fragestellungen geholfen haben, sowie Frau Einsle für den reibungslosen Verlauf aller administrativen Aufgaben.
- den Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Frau J. Hiller und meinem Bruder Herrn O. Engelking für Anregungen und die Durchsicht dieser Arbeit.
- dem Consortium für elektrochemische Industrie für die finanzielle Unterstützung.
- und ganz besonders meiner Lebensgefährtin Sabine für die Anteilnahme und Unterstützung bei der Arbeit.

Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von β -Ketoestern mit rekombinanten Hefen

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Biotransformationen mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3.1.1	Reduktion von β -Ketoestern mit <i>S. cerevisiae</i>	8
3.2	Herstellung von (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE)	11
3.2.1	Stereoselektive Reduktion von 4Cl-ACE mit Mikroorganismen	12
3.2.2	Stereoselektive Reduktion von 4Cl-ACE mit <i>S. cerevisiae</i>	12
3.3	Herstellung von (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)	17
3.3.1	Stereoselektive Reduktion von Ethylbenzoylacetat mit Mikroorganismen	18
3.3.2	Stereoselektive Reduktion von Ethylbenzoylacetat mit <i>S. cerevisiae</i>	19
3.4	Rekombinante Mikroorganismen	20
3.5	Zweiphasensysteme in Bioprozessen	22
3.6	Tenside	25
3.7	Alkohole	25
3.8	Ganzzellreduktionen von Ketoestern im industriellen Maßstab	25
3.9	Biologische Grundlagen verwendeter Biokatalysatoren	26
3.9.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.9.2	<i>Pichia pastoris</i>	27
3.10	Mikrobielles Wachstum	28
3.11	Kultivierung von Mikroorganismen	30
3.11.1	Wachstum im Satzverfahren	30
3.11.2	Wachstum im Zulaufverfahren	31
3.12	Tropfengrößenverteilung	31
3.13	Versuchsplanung	35
4	Material und Methoden	40
4.1	Stämme	40
4.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FasB His6	40
4.1.2	<i>Pichia pastoris</i> GC909	40
4.2	Chemikalien und Reagenzien	40
4.2.1	CSL-Medium (Corn Steep Liquor)	41
4.2.2	BMGY-Medium (Buffered Glycerol-Complex Medium)	41
4.2.3	YNB-Medium	41
4.2.4	YPD-Medium für Platten	42

4.2.5	Basismineralmedium	42
4.2.6	Spurenelementlösung	43
4.2.7	Vitaminlösung	43
4.2.8	Thermolabile Komponenten	43
4.2.9	Stammlösungen für Reaktionspuffer	43
4.2.10	Standardreaktionspuffer	44
4.2.11	Optimiertes Medium	44
4.2.12	Zellaufschlusspuffer	45
4.2.13	Aktivitätspuffer zur Bestimmung der Carbonylreduktase-Aktivität (CR)	45
4.2.14	Aktivitätspuffer zur Bestimmung der Glukosedehydrogenase-Aktivität (GDH)	45
4.3	Stammhaltung	46
4.4	Anzucht im Schüttelkolben	46
4.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
4.4.2	<i>Pichia pastoris</i>	46
4.5	Medienoptimierung im Schüttelkolben	46
4.6	Versuche zur Zellanzucht	47
4.6.1	Bioreaktor	47
4.6.2	Vorkulturen	48
4.6.3	Anzucht im Zulaufverfahren	48
4.6.4	Herstellung lyophilisierter und acetongetrockneter Zellen	50
4.7	Biotransformation	50
4.7.1	Umsetzung im 0,5 mL-Maßstab	51
4.7.2	Gesamtaktivitätsbestimmung	51
4.7.3	Umsetzung im Kleinmaßstab ohne pH-Kontrolle	51
4.7.4	Standardansatz	52
4.7.5	Umsetzung im Kleinmaßstab mit pH-Kontrolle	52
4.7.6	Biotransformationen im Zulaufverfahren	53
4.8	Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einem genetischen Algorithmus	54
4.9	Umsetzungen im Rührkesselreaktor	55
4.10	Stabilitätsversuche	56
4.11	Messgrößen	56
4.12	Bestimmung der Tropfengrößenverteilung	58
4.12.1	Modellanpassung	59
4.12.2	Grenzflächenspannung	59
4.12.3	Dichtebestimmung	60
4.12.4	Viskositätsmessung	60
4.12.5	Messung der Tropfengrößenverteilung im Rührkesselreaktor	61
4.13	Analytische Methoden	64
4.13.1	Biotrockenmasse	64

4.13.2	Optische Dichte	64
4.13.3	Zellaufschluss	65
4.13.4	Aktivitätsbestimmung im Überstand	65
4.13.5	Gesamtproteingehalt	65
4.13.6	Bestimmung der Carbonylreduktase-Aktivität	66
4.13.7	Bestimmung der Glukosedehydrogenase-Aktivität	66
4.13.8	Lebendzellfärbung	67
4.13.9	Probenaufarbeitung für die chirale Gaschromatographie	67
4.13.10	Chirale Gaschromatographie	67
4.13.11	Probenaufarbeitung für die HPLC	69
4.13.12	HPLC	69
4.13.13	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	70
5	Asymmetrische Reduktion von 4Cl-ACE mit <i>S. cerevisiae</i>	71
5.1	Optimierung der Anzuchtbedingungen	71
5.1.1	Wachstum auf CSL-Medium im Schüttelkolben	71
5.1.2	Wachstum auf definierten Medien	73
5.1.3	Wachstum auf definierten Medium mit komplexem Anteil	73
5.1.4	Kohlenstoffquellen	76
5.1.5	Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit CSL-Medium	76
5.1.6	Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit optimiertem Medium	77
5.2	Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen	81
5.2.1	Umsetzungen mit Wildtyp Zellen	81
5.2.2	Biomassenkonzentration und Zellqualität	81
5.2.3	Reaktionstemperatur	84
5.2.4	pH	84
5.2.5	Substratkonzentration	85
5.2.6	Organische Lösungsmittel	87
5.2.7	Alkohole	89
5.2.8	NADP und NAD	90
5.2.9	Glukose- und NaCl-Konzentration	91
5.2.10	Salze	92
5.2.11	Tenside	93
5.2.12	Inhibitoren	95
5.2.13	Nährstoffe	97
5.2.14	Acetongetrocknete und gefriergetrocknete Zellen	97
5.2.15	Vorinkubation	98
5.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen	100
5.3.1	Festlegung der Reaktionsbedingungen	101
5.3.2	Optimierung	104

5.3.3	Charakterisierung der optimierten Reaktionsbedingungen	110
5.3.4	Reduktion mit Substratdosierung	113
5.4	S-CHBE Produktion im Rührkesselreaktor	114
5.4.1	S-CHBE Produktion mit unvollständigem Umsatz	114
5.4.2	Vollständiger Umsatz	117
5.5	Charakterisierung der Biokatalysatorstabilität	121
5.5.1	Organische Lösungsmittel	122
5.5.2	Nährstoffe	124
5.5.3	Triton X-100	126
5.5.4	NADP	127
5.6	Tropfengrößenverteilung	131
5.6.1	Reaktionssystem ohne Tensid	131
5.6.2	System mit Triton X-100	133
6	Asymmetrische Reduktion von Ethylbenzoylacetat	134
6.1	Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen	134
6.1.1	Umsetzungen mit Wildtyp Zellen	134
6.1.2	Biomassenkonzentration	134
6.1.3	pH	135
6.1.4	Substratkonzentration	136
6.1.5	Organische Lösungsmittel	136
6.1.6	Triton X-100	137
6.2	Herstellung von S-HPPE im Rührkesselreaktor	137
6.3	Vergleich der S-CHBE und S-HPPE Produktionen	140
7	Asymmetrische Reduktion 4CI-ACE mit <i>P. pastoris</i>	142
7.1	Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen	142
7.1.1	Substratkonzentration	142
7.1.2	Lösungsmittel	143
7.1.3	Temperatur	144
7.1.4	NAD und NADP	144
7.1.5	Pufferkonzentration	146
7.1.6	Umsetzungen in optimierten Medien	147
7.1.7	Zulaufverfahren	148
7.1.8	Vergleich der Biokatalysatoren <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i>	149
8	Zusammenfassung	151
9	Ausblick	153
10	Anhang	155
10.1	Literaturverzeichnis	155
10.2	Abkürzungsverzeichnis	168

10.3	Substrate und Produkte	170
10.3.1	Physikalische Eigenschaften der verwendeten organischen Lösungsmittel und Alkohole	171
10.3.2	Tenside	172
10.3.3	Sonstige Chemikalien	174
10.4	Abbildungsverzeichnis	176
10.5	Tabellenverzeichnis	180

1 Einleitung

Die Entdeckung der Chiralität gelang Louis Pasteur im Jahr 1844, als er die Kristalle der Weinsäure anhand ihrer Kristallform in zwei Gruppen unterteilte, die sich wie Bild und Spiegelbild zueinander verhielten. Moleküle mit dieser Eigenschaft und gleicher chemischer Zusammensetzung werden als Enantiomere bezeichnet. Der Nachweis, dass Enantiomere unterschiedliche pharmakologische Wirkungen haben können, gelang Cushney um 1900 (Crosby 1991).

Die Bedeutung der Chiralität von Pharmaka erlangte durch den Contergan-Skandal traurige Berühmtheit, als erkannt wurde, dass das S-Enantiomer des Wirkstoffes Thalidomid die gewünschte pharmakologische Wirkung besitzt, während das R-Enantiomer für die schweren Missbildungen verantwortlich ist (Tabelle 1.1.1).

Inzwischen sind die Zulassungsbestimmungen für Arzneimittel deutlich verschärft worden. Bei racemischen Pharmaka, also Medikamenten, die beide Isomere enthalten, muss die Unbedenklichkeit beider Isomere nachgewiesen werden. Infolge der gestiegenen Anforderungen an die Reinheit der pharmakologischen Substanzen nimmt die wirtschaftliche Bedeutung chiraler Intermediate und Pharmaka zu. Der Umsatz von optisch reinen Medikamenten stieg von 45 Mrd. US\$ im Jahr 1994 auf geschätzte 146 Mrd. US\$ im Jahr 2003 an (Stinson 2000). Beispiele für enantiomerenreine Pharmaka sind die als Cholesterinsenker eingesetzten Statine („Atorvastatin“ Fa. Pfizer; „Simvastatin“ Fa. Merck), die mit einem Jahresumsatz von über 20 Mrd. US\$ die umsatzstärksten Medikamente darstellen.

Tabelle 1.1.1: Chirale Pharmaka und Nebenwirkung des unerwünschten Enantiomers (Gaisser et al. 2002)

Substanz	Einsatzgebiet des gewünschten Enantiomers	Nebenwirkung des unerwünschten Enantiomers
Dopa	Parkinson-Erkrankung	Schwere Nebenwirkungen
Ketamin	Anästhesie	halluzinogen
Penicillinamin	Arthritis	mutagen
Ethambutol	Tuberkulose	Erblindung
Thalidomid	Beruhigungsmittel; Lepra, AIDS, Krebs	teratogen

Die wissenschaftliche Würdigung der Chiralität erfolgte durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie im Jahr 2001 an William Knowles, Ryoji Noyori und Barry Sharpless für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der chiralen Katalyse.

Zur Darstellung von chiralen Intermediaten stehen heute eine Reihe von Verfahren zur Verfügung:

- „Chiral Pool“: Optisch aktive Substanzen werden aus einfach zugänglichen Quellen gewonnen und deren natürliche Enantiomerenreinheit ausgenutzt. Ein Beispiel für solche Substanzen sind Aminosäuren.
- Racematspaltung: Die Abtrennung des unerwünschten Enantiomers durch Kristallisationsverfahren oder durch chromatographische Trennmethode.
- Asymmetrische Synthese: Bei diesem chemischen Verfahren werden prochirale Verbindungen mit Übergangsmetallkatalysatoren auf der Basis von Palladium, Platin, Rhodium und Ruthenium enantioselektiv umgesetzt.
- Biokatalytische Prozesse:
Bei der biokatalytischen Racematspaltung wird aus einem Isomerengemisch ein Enantiomer selektiv umgesetzt, während das andere Enantiomer nicht reagiert. Die beiden unterschiedlichen Moleküle können aufgrund ihrer verschiedenen physikochemischen Eigenschaften leicht voneinander getrennt werden.
Bei der biokatalytischen asymmetrischen Synthese werden prochirale Ausgangssubstanzen zu enantiomerenreinen Produkten umgesetzt.

Bei der asymmetrischen Synthese mit chemischen Verfahren sind die Ausbeute und Enantiomerenreinheit oft unzureichend. Der Verbrauch an organischen Lösungsmitteln und Schwermetallkatalysatoren, und der hohe Energiebedarf solcher Prozesse führen zur Suche nach alternativen Verfahren.

Aufgrund der hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität von Enzymen haben biokatalytische Prozesse in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Fortschritte im Bereich des Hochdurchsatzscreenings und der rekombinanten DNA-Technologie haben zur Entwicklung neuer Enzyme mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Aktivität und Stabilität geführt. Der Einsatz von Biokatalysatoren ist nicht auf deren natürliche Substrate beschränkt, und einige enzymatische Reaktionen mit isolierten Enzymen und ganzen Zellen in organischen Lösungsmitteln sind bereits industriell etabliert (Holland 1998; Huisman et al. 2002; Liese et al. 1999; Ogawa et al. 1999; Rasor et al. 2001; Zaks 2001).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Chirale Alkohole sind bedeutende Intermediate zur Herstellung optisch aktiver Pharmaka und Agrochemikalien. Sie können durch die enantioselektive Reduktion von Ketonen wie z.B. β -Ketoestern gewonnen werden. Bei der mikrobiellen Reduktion von prochiralen Ketonen werden die Elektronen vom Cofaktor NAD(P)H bereitgestellt, der in einem weiteren enzymatischen Schritt regeneriert werden muss. Aufgrund der erforderlichen Koppelung zweier enzymatischer Reaktionen werden zur Biokatalyse bevorzugt ganze Zellen eingesetzt.

Mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* steht ein Biokatalysator zur Verfügung, der zum einen über ein breites Substratspektrum und zum anderen über effektive Mechanismen zur Cofaktorregenerierung verfügt. *S. cerevisiae* ist in großen Mengen leicht verfügbar, nicht pathogen und als eukaryotischer Modellorganismus molekularbiologisch gut charakterisiert (Wanner 1996).

Viele β -Ketoester sind schwer wasserlöslich und toxisch für Hefezellen. Dies führt zu niedrigen Reaktionsraten und geringen Ausbeuten. Aufgrund vieler verschiedener aktiver Carbonylreduktasen mit unterschiedlicher Spezifität ist der Enantiomerenüberschuss in solchen Reduktionen häufig gering. So wird beispielsweise bei der stereospezifischen Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (Ethyl-4-Chloracetoacetat, 4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester¹ (S-CHBE) mit *S. cerevisiae* je nach Reaktionsbedingungen ein Enantiomerenüberschuss von 14 – 95 % erreicht, und die Ausbeute ist in der Regel nicht größer als 68 %. Die eingesetzte Substratkonzentration beträgt maximal 1 % v/v. Für pharmazeutische Anwendungen ist ein Enantiomerenüberschuss von >95 % notwendig (Houng et al. 1997). Für die Herstellung von einem Mol S-CHBE sind mindestens 2,5 g Zellen (Trockensubstanz) notwendig (Bertau 2000; Houng et al. 2003; Rotthaus et al. 1997). Bei der enantioselektiven Reduktion von Ethylbenzoylacetat (Benzoylessigsäureethylester, EBA) zu (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester² (S-HPPE) erreicht der Enantiomerenüberschuss 87 – 93 % und die Ausbeute 50 – 63 % bei einer eingesetzten EBA-Konzentration von maximal 0,1 % v/v (Bardot et al. 1996; Chênevert et al. 1992). Für die Herstellung von einem Mol S-HPPE sind jedoch 5 g Zellen (Trockensubstanz) notwendig (Chênevert et al. 1992).

¹ S-CHBE ist der chirale Baustein von Statinen, die in cholesterinsenkenden Medikamenten eingesetzt werden.

² S-HPPE ist das chirale Intermediat für Fluoxetin, das als Antidepressivum Verwendung findet.

Ziel der Untersuchungen ist es, einen Prozess zu entwickeln, bei dem der Enantiomerenüberschuss und die Ausbeute bei der Reduktion von β -Ketoestern mit Hefen im Vergleich zu den bekannten Prozessen gesteigert wird. Dafür sollen Biokatalysatoren mit hoher Aktivität hergestellt und eingesetzt werden. Es sind geeignete Verfahren zur Minimierung der Substrattoxizität zu entwickeln, um die Ausbeute dieser Reduktionen weiter zu erhöhen. Um hohe Umsetzungsraten erzielen zu können, muss die Konzentration des Substrates in der wässrigen Phase ausreichend hoch sein. Bei schwer wasserlöslichen Substraten wird die Reaktionsgeschwindigkeit häufig durch die geringe Löslichkeit beschränkt. Aufgrund ungenügender Durchmischung und Dispergierung und der damit verbundenen Abnahme der Phasengrenzfläche zwischen wässriger Phase und der schwer wasserlöslichen Phase wird der Stofftransport zusätzlich reduziert. Diese Limitierungen sollen minimiert und so die Umsetzungsraten gesteigert werden. Der Prozess ist so auszulegen, dass die Aktivitäten der Carbonylreduktasen mit unerwünschter Stereospezifität im Verhältnis zur Aktivität der Carbonylreduktase mit der gewünschten Stereospezifität vermindert und so der Enantiomerenüberschuss gesteigert werden kann.

Durch den Einsatz rekombinanter Mikroorganismen kann die Ausbeute und der Enantiomerenüberschuss in Ganzzellbiotransformationen im Vergleich zu Wildtypzellen gesteigert werden. Dabei wird zum einen eine Carbonylreduktase überexprimiert, die die asymmetrische Reduktion des Ketons katalysiert. Des Weiteren kann als zusätzliches Enzym ein Regenerierungsenzym überexprimiert werden, das die Regenerierung des Cofaktors NAD(P)H katalysiert. Dieser molekularbiologische Ansatz wurde in Vorarbeiten zu dieser Arbeit realisiert, so dass für die Untersuchungen zwei Hefestämme zur Verfügung standen.

Um dieses Ziel zu erreichen, ist folgende Vorgehensweise geplant:

- Die Anzuchtbedingungen der Biokatalysatoren sollen so optimiert werden, dass bei gleicher Biomassenkonzentration eine höhere Ausbeute und ein höherer Enantiomerenüberschuss erzielt werden kann.
- In Parameterstudien soll der Einfluss unterschiedlicher Reaktionsbedingungen auf die stereoselektive Reduktion von β -Ketoestern untersucht werden.
- Die Reaktionsbedingungen sollen durch eine geeignete Optimierungsstrategie mit Hinblick auf eine Steigerung der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses verbessert werden. Als Grundlage für die Optimierung sollen die Parameterstudien dienen.

-
- Die stereoselektive Reduktion soll in einem Rührkesselreaktor durchgeführt und die industrielle Durchführbarkeit des Prozesses überprüft werden.

Die reaktionstechnischen Untersuchungen sollen vergleichend mit zwei unterschiedlichen β -Ketoestern (4Cl-ACE und EBA) durchgeführt werden. Der entwickelte Prozess soll verfahrenstechnisch charakterisiert und der Einfluss der verschiedenen Variablen auf die Umsetzung ermittelt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biotransformationen mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, ganz unterschiedliche stereospezifische Reduktionen durchzuführen. Sie umfassen die Reduktion von aliphatischen, cyclischen und heterocyclischen Mono- und Dicarbonylverbindungen, α - und β -Ketoestern sowie einer Reihe weiterer Derivate (Csuk et al. 1991). Eine Auswahl an stereospezifischen Reduktionen von Hydroxyverbindungen, von denen einige in pharmazeutischen Produkten Anwendung finden, sind im Folgenden gezeigt.

Reduktion von β -Ketoestern

Beispiele für aliphatische β -Ketoester sind Acetessigsäureethylester (Nr. 2) und 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (Nr. 7, Tabelle 3.1.1).



Tabelle 3.1.1: Beispiele für β -Ketoester, die von *S. cerevisiae* reduziert werden (Bertau 2003; Csuk et al. 1991; Bardot et al. 1997; Zhou et al. 1983)

Nr.	R	R'	Ausbeute [%]	EE [%]	Konfiguration
1	CH ₃	CH ₃	23	87	S
2	CH ₃	C ₂ H ₅	61	91	S
3	C ₂ H ₅	CH ₃	47	54	R
4	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	70	100	S
5	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	65	95	S
6	(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₆	C ₂ H ₅	30	80	R
7	CH ₂ Cl	C ₂ H ₅	30	37	S
8	CH ₂ Cl	C ₈ H ₁₇	nb	>95	R
9	F ₃ C	C ₂ H ₅	32	62	R

Aromatische Ketone

Acetophenon und dessen Derivate sind Beispiele für aromatische Ketone.

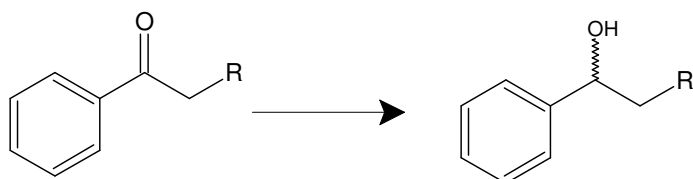
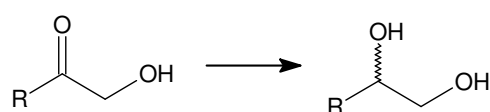


Tabelle 3.1.2: Beispiele für aromatische Ketone, die von *S. cerevisiae* reduziert werden (Nakamura et al. 2003; Pereira 1998)

Nr.	R	Ausbeute [%]	EE [%]	Konfiguration
10	H	90	100	<i>S</i>
11	F	67	97	<i>R</i>
12	Cl	37	90	<i>R</i>
13	CH ₂ Cl	nb	nb	<i>R</i>
14	Br	9	97	<i>R</i>

Hydroxyketone

Tabelle 3.1.3: Beispiele für Hydroxyketone, die von *S. cerevisiae* reduziert werden (Nakamura et al. 2003)

Nr.	R	Ausbeute [%]	EE [%]	Konfiguration
15	Et	58	100	<i>R</i>
16	C ₅ H ₁₁	56	100	<i>R</i>
17	-CH ₂ SO ₂ Ph	42	99	<i>R</i>
18	-(CH ₂) ₃ SO ₂ Ph	74	93	<i>R</i>

Die bei diesen Reduktionen gewonnenen chiralen Alkohole sind Intermediate für verschiedene pharmazeutische und andere chirale Zwischenprodukte (Tabelle 3.1.4).

Tabelle 3.1.4: Chirale Intermediate für pharmazeutische Produkte und Pheromone, die durch Ganzzellbiotransformation aus Ketonen mit *S. cerevisiae* gewonnen werden können (Auswahl)

Nr.	Substrat	Produkt	Endprodukt	Quelle
2	Acetessigsäureethylester	3-Hydroxy-Buttersäureethylester	Carbapenem-Antibiotika ; Sucatol ¹⁾	Oguni et al. (1988); Mori (1989)
5	Ethylbenzoylacetat (EBA)	3-OH-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)	Fluoxetin	Chênevert al. (1992)
7	4Cl-Acetessigsäureethyl-ester (4Cl-ACE)	4Cl-3-Hydroxy-buttersäureethylester (S-CHBE)	Atorvastatin	Pereira et al. (1998)
8	Octyl-4-chloracetoacetat	Octyl-4-Chlor-3-hydroxybutanoat	L-Carnitin	Zhou et al. (1983)
9	4,4,4-Trifluor-Acetessigsäureethylester	Trifluor-3-Hydroxybuttersäureethylester; L-Carbinol	Befloxaton	Bertau (2001); Davoli et al. (1999)
13	3-Chlorpropionphenon	3-Cl-1-Phenylpropan-1-ol	Fluoxetin	Pereira et al. (1998)

¹⁾ Sucatol ist ein Pheromon

3.1.1 Reduktion von β -Ketoestern mit *S. cerevisiae*

Die Reduktion von β -Ketoestern mit ganzen Zellen ist schematisch in Abbildung 3.1.1 dargestellt. Die Reaktion setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: die Aufnahme des Substrates durch die Zelle, die Reduktion des Ketoesters durch eine Carbonylreduktase (CR) und den Transport bzw. die Diffusion des Produktes aus der Zelle hinaus. Bei der Reduktion wird NAD(P)H als Cofaktor verbraucht, der in einer oder in mehreren enzymatischen Reaktionen durch Dehydrogenasen (DH) unter Verbrauch eines Cosubstrates (Glukose, Ethanol, Acetat) wieder regeneriert wird.

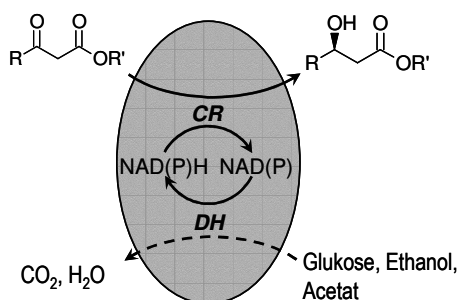


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der Ganzzellbiotransformation von β -Ketoestern mit *S. cerevisiae*; CR: Carbonylreduktase; DH: Dehydrogenase

Carbonylreduktasen in *S. cerevisiae*

Durch DNA-Sequenzvergleich konnten Katz und Mitarbeiter (2003) 49 „open reading frames“ identifizieren, die möglicherweise für Enzyme mit Carbonylreduktase-Aktivität kodieren. Sybesma und Mitarbeiter (1998) haben insgesamt acht β -Ketoester-Reduktasen beschrieben, von denen sechs 4Cl-ACE reduzieren können (Tabelle 3.1.5). Drei Enzyme besitzen S-Spezifität, wobei die Laktatdehydrogenase am bedeutendsten ist (Pereira et al. 1998).

Tabelle 3.1.5: Eigenschaften bekannter β -Ketoester-Reduktasen aus *S. cerevisiae*, die 4Cl-ACE umsetzen können; Aktivität: geschätzte Enzymaktivität bezogen auf die Biomasse; ¹⁾ physiologische Funktion ist nicht bekannt (Nakamura et al. 1991; Pereira et al. 1998; Sybesma et al. 1998; Shieh et al. 1985); nb: nicht bekannt

Enzym	Spezifität	K_m [mmol L ⁻¹]	K_{cat} [s ⁻¹]	Aktivität [μ mol g ⁻¹ min ⁻¹]	pH- Optimum
Fettsäuresynthase	S (> 99 % EE)	1,82	303	3,2	6,7
α -Acetoxyketon Reduktase	R (> 99 % EE)	0,22	5,0	3,3 – 9,3	5,9
D-Enzym ¹⁾	S (> 99 % EE)	1,0	0,21	nb	nb
L-Enzym ¹⁾	R (> 97 % EE)	1,0	6,6	nb	nb
Aldo-Keto Reduktase	R	0,13	6,2	0,7	6,7
Lakton Reduktase	S	nb	nb	0,6	7,0
Alkoholdehydrogenase	R	nb	nb	nb	nb
Laktatdehydrogenase	R	nb	nb	nb	nb

Die Alkoholdehydrogenase und die Laktatdehydrogenase benötigen NAD(H) als Cofaktor, während alle anderen Reduktasen ausschließlich NADP(H)-abhängig sind (Sybesma et al. 1998; Pereira et al. 1998). Nach Lynen (1969) akzeptiert die Fettsäuresynthase auch NADH als Cofaktor, wobei nur 25 % der Aktivität in Gegenwart von NADPH erreicht wird.

Die Bedeutung der Alkoholdehydrogenase bei der Reduktion von β -Ketoestern ist unklar, da die Akzeptanz für diese Substrate niedrig ist (Steward 2000). 4Cl-ACE wird durch die Alkoholdehydrogenase nicht umgesetzt (Shieh et al. 1985). Nach anderen Literaturstellen kann 4Cl-ACE durch die Alkoholdehydrogenase umgesetzt werden, das Enzym wird jedoch durch 4Cl-ACE inhibiert (Dahl et al. 1999).

Aufgrund der unterschiedlichen Affinität der verschiedenen Carbonylreduktasen zu den β -Ketoestern wird durch die Veränderung der Substratstruktur eine Änderung des Enantiomerenüberschusses und der Ausbeute erzielt. Ausgehend von 4Cl-ACE konnten Zhou und Mitarbeiter (1983) durch Verlängerung der Estergruppe den Enantiomerenüberschuss von 55 % für den

S-Alkohol auf über 95 % für den R-Alkohol verändern. Gleichzeitig sank die Ausbeute jedoch stark ab. Die Beeinflussung des Enantiomerenüberschusses ist auch über eine Veränderung der Ketogruppe möglich. So wird mit Acetessigsäureethylester ein Enantiomerenüberschuss von >99 % erreicht, während mit 4-Chlor-Acetessigsäureethylester der Enantiomerenüberschuss 82 - 90 % beträgt (Dahl et al. 1999). Mit zunehmender Größe der Ketogruppe sinkt die Ausbeute stark ab (Athansou et al. 2001).

Cofaktorregenerierung in *S. cerevisiae*

Steht Glukose als Cosubstrat zur Verfügung, so erfolgt die Regenerierung des Cofaktors NADPH über den Hexosemonophosphatweg (Abbildung 3.1.2). Über weitere enzymatische Schritte kann Glukose vollständig zu CO₂ abgebaut werden. Der Abbau von Glukose über den Hexosemonophosphatweg zu Ribulose-5-Phosphat kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen ablaufen. Insgesamt können dabei mit einem Mol Glukose 6 Mol NADPH generiert werden.

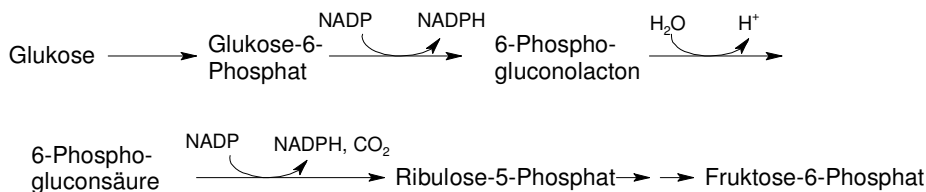


Abbildung 3.1.2: Generierung von NADPH über den Hexosemonophosphatweg (Pentosephosphatweg) in *S. cerevisiae*

Der Kohlenstofffluss durch den Hexosemonophosphatweg und damit die Cofaktorregenerierung wird über den Stickstoffgehalt reguliert. Stickstoff steigert die Expression der 6-Phosphoglyceratdehydrogenase und damit die Generierung von NADPH aus NADP (Thomas et al. 1996).

Weitere an der NADPH-Generierung beteiligte Enzyme sind die Isocitratdehydrogenase im Citratcyclus und die Acetaldehyddehydrogenase. Wird Ethanol als Cosubstrat eingesetzt, erfolgt die NADPH-Generierung über diese beiden Enzyme. Mit Acetat als Cosubstrat kann lediglich die Acetaldehyddehydrogenase als Regenerierungsenzym eingesetzt werden (Sybesma et al. 1998).

3.2 Herstellung von (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE)

(S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE) findet als Intermediat bei der Synthese von Statinen wie Atorvastatin (Abbildung 3.2.1) Verwendung, die als HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wirken. Statine sind Bestandteil vieler cholesterinsenkender Medikamente und gehören zu den so genannten „Blockbustern“, Medikamente, die einen Jahresumsatz von über 1 Mrd. US\$ erzielen.

Die chemische Katalyse von β -Ketoestern erfolgt industriell mit verschiedenen Ruthenium-komplexen (BINAP). Bei der Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE wird ein Umsatz von 100 % bei einem Enantiomerenüberschuss von 99 % erzielt (Lösungsmittel Ethanol-Dichlorethan; 100 bar, 95 °C, 30 min, molares Substrat:Katalysator-Verhältnis: 10 000) (Pavlov et al. 2000). Die Kosten für den Katalysator belaufen sich auf ca. 40 000 US\$/kg (Rozell 1999).

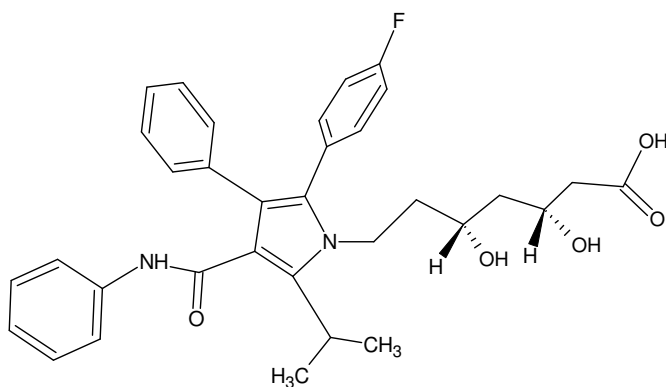


Abbildung 3.2.1: Struktur von Atorvastatin

Zur Herstellung von enantiomerenreinen β -Hydroxyestern wurde die Racematspaltung mit Lipasen beschrieben. Mit der Lipase von *Candida antarctica* konnte R-CHBE mit einem Enantiomerenüberschuss von 96 % bei einem Umsatz von 55 % erzielt werden (García-Uridales et al. 1999). Weitere Hydroxyester in R-Konfiguration, ausgehend von Derivaten von R/S-CHBE, wurden mit einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* hergestellt (Hoff et al. 1999).

Untersucht worden ist der Einsatz von rekombinanten *Escherichia coli* zur enantioselektiven Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester. Als rekombinante Enzyme werden eine Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae* und zur Cofaktorregenerierung eine Glukosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* exprimiert. Dieser Prozess ermöglicht Ausbeuten von 86 % bei einem Enantiomerenüberschuss von 100 % (Kataoka et al. 2003; Shimizu et al. 1998).

3.2.1 Stereoselektive Reduktion von 4Cl-ACE mit Mikroorganismen

Die Fähigkeit β -Ketoester stereoselektiv zu reduzieren ist bei Mikroorganismen weit verbreitet. Aber auch pflanzliche Zellkulturen können enantioselective Reduktionen durchführen. Eine Auswahl an Organismen, für die die Umsetzung von 4Cl-ACE zu R-CHBE bzw. S-CHBE untersucht worden ist, ist in Tabelle 3.2.1 und Tabelle 3.2.2 wiedergegeben.

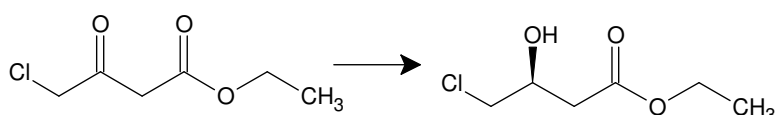


Abbildung 3.2.2: Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4Cl-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE)

Tabelle 3.2.1: Organismen, die 4Cl-ACE zu S-CHBE reduzieren können (Auswahl); nach: Nakamura et al. (2003), ergänzt

Organismus	Ausbeute [%]	EE [%]	Referenz
<i>Geotrichum candidum</i>	83	96	Patel et al. (1992)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28	92	Kita et al. (1999)
<i>Lactobacillus kefir</i>	100	100	Aragozzini et al. (1992)
<i>Candida magnoliae</i>	75	91	Kita et al. (1999)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	97	96	Yamamoto et al. (2002)
<i>Daucus carota</i> (Wurzel)	50	90	Yadav et al. (2002)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	nb	99	Hallinan et al. (1995)

Tabelle 3.2.2: Organismen, die 4Cl-ACE zu R-CHBE reduzieren können (Auswahl); nach: Nakamura et al. (2003)

Organismus	Ausbeute [%]	EE [%]	Referenz
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	51	65	Kita et al. (1999)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	70	98	Aragozzini et al. (1992)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (mit inaktivierter Fettsäuresynthase)	53	90	Shieh et al. (1985)

3.2.2 Stereoselektive Reduktion von 4Cl-ACE mit *S. cerevisiae*

Die stereoselektive Reduktion von β -Ketoestern mit *S. cerevisiae* erfolgt häufig mit einem niedrigen Enantiomerenüberschuss und geringen Ausbeuten. So schwankt der Enantiomeren-

überschuss von S-CHBE bei der Umsetzung von 4Cl-ACE zwischen 17 % (Dahl et al. 1998) und 95 % (Houng et al. 2003). Um ausreichend hohe Ausbeuten zu erzielen, sind große Mengen an Biokatalysator notwendig. Die Instabilität des Substrates in wässrigen Lösungen, die Toxizität und die damit verbundene Deaktivierung des Biokatalysators und die hydrolytische Aktivität der Zellen vermindern dabei die Ausbeute bei der Reaktion.

Die Beeinflussung des Enantiomerenüberschusses durch die Variation der Reaktionsbedingungen ist von zahlreichen Autoren untersucht worden. Beispiele für untersuchte Einflussfaktoren sind die Anzuchtbedingungen der Zellen, Substratkonzentration, Immobilisierung der Zellen, Ionenstärke des Reaktionspuffers, Einsatz von Zweiphasensystemen und das verwendete Cosubstrat. Die Untersuchungen beziehen sich dabei ausschließlich auf die Reduktionen von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester bzw. von Acetessigsäureethylester zum jeweiligen R- bzw. S-Alkohol. Die Einflussfaktoren sind im Folgenden dargestellt.

Anzuchtbedingungen: Dahl et al. (1998) konnten mit Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, eine geringfügige Steigerung des Enantiomerenüberschusses von S-CHBE erzielen. Die Wahl der Kohlenstoffquelle, der Sauerstoffeintrag und das „Aushungern“ der Zellen, indem die Zellen nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte ohne Kohlenstoffquelle weiter inkubiert werden, kann ebenfalls den Enantiomerenüberschuss beeinflussen (Ehrler et al. 1986).

Physiologischer Status der Zellen: Bertau et al. (2003) berichten, dass durch Einsatz ruhender Zellen eine Steigerung des Enantiomerenüberschusses von S-CHBE erzielt werden kann. Bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen und dem Einsatz fermentierender Zellen kann eine Inversion der Stereoselektivität hin zum R-CHBE erreicht werden. Die Qualität des Biokatalysators wird auch durch die Lagerungsdauer beeinträchtigt. Bei Zellen, die über 10 Tage bei +4 °C gelagert werden, sinkt der Enantiomerenüberschuss von S-CHBE im Vergleich zu frischen Zellen (Houng et al. 2003).

Einfluss der Substratkonzentration: Aufgrund des unterschiedlichen K_m der Carbonylreduktasen für das Substrat lässt sich der Enantiomerenüberschuss über die eingesetzte Substratkonzentration beeinflussen. Bei hohen Konzentrationen an 4Cl-ACE ist aufgrund des

hohen K_m für die Fettsäuresynthase mit einer Steigerung des Enantiomerenüberschusses zu rechnen (Shieh et al. 1985).

Immobilisierung: Die Immobilisierung von Hefezellen kann abhängig von der eingesetzten Matrix den Enantiomerenüberschuss beeinflussen. Eine Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei der Umsetzung von 4Cl-ACE zu S-CHBE wurde bei Zellen beobachtet, die in Polyurethan immobilisiert waren (Nakamura et al. 1985). Durch geeignete Immobilisierungsverfahren lässt sich außerdem die Lösungsmittelstabilität der Zellen in Zweiphasensystemen deutlich steigern (Kanda et al. 1998).

Ionenstärke: Hohe Ionenstärken beeinflussen den Enantiomerenüberschuss, wobei der Effekt abhängig von dem verwendeten Salz ist (Nakamura et al. 1989b). In Natriumchloridlösungen tolerieren die Zellen Konzentrationen bis zu 1 mol L^{-1} ohne Abnahme der Viabilität (Blomberg 1997).

pH: Die Literaturangaben für den optimalen pH zur Reduktion von β -Ketoestern variieren sehr stark. Nach Bhalerao et al. (1993) beträgt der optimale pH für die Umsetzung von Acetessigsäureethylester zum S-Alkohol pH 4,5, während Dahl et al. (1998) pH 5,0 als Optimum für die Umsetzung zum R-Alkohol angibt. Für einen hohen Enantiomerenüberschuss bei der Umsetzung von 4Cl-ACE zum S-CHBE liegen die Literaturangaben zwischen pH 4,0 (Dahl et al. 1998), pH 7,5 – 8,5 (Chen et al. 2002) und pH 8,0 – 9,0 (Houng et al. 2003).

Zweiphasensysteme: In Zweiphasensystemen mit organischen Lösungsmitteln kann es zu einer deutlichen Änderung des Enantiomerenüberschusses im Vergleich zu wässrigen Reaktionssystemen kommen. Wird die Umsetzung von 4Cl-ACE in Toluol, Hexan, Diethylether oder Ethylacetat durchgeführt, so wird anstatt S-CHBE der R-Alkohol gebildet (Rotthaus et al. 1997). Die verwendeten Lösungsmittel haben zwei Effekte. Zum einen wirken sie als Reservoir für das Substrat und senken so die effektive Konzentration in der wässrigen Phase. Zum anderen wirken sie als spezifische Enzyminhibitoren und wirken sich so positiv auf den Enantiomerenüberschuss aus.

Glukose: Durch Zugabe von Glukose in das Reaktionsmedium wird die Selektivität in Richtung S-CHBE verschoben. Vermutlich werden die an der Reaktion beteiligten Enzyme durch die

Glukose aktiviert (Nakamura et al. 1989a). Einige Autoren verzichten auf die Zugabe von Cosubstrat und nutzen den vorhandenen NADPH-Pool der Zellen, um die Reaktion in der gewünschten Stereospezifität laufen zu lassen (Bertau 2002; Boccù et al. 1990). Andere Cosubstrate wie Acetat oder Ethanol können zu einer Verschiebung der Enantioselektivität führen (Chin-Joe et al. 2001). Werden Hefezellen ohne weitere Nährstoffe in einer Glukoselösung inkubiert, so gehen sie in kurzer Zeit in Apoptose über. Bereits bei Glukosekonzentrationen von 2 % beginnen die Zellen zu schrumpfen (Granot et al. 2003).

Enzyminhibitoren: Durch spezifische Enzyminhibitoren werden die Carbonylreduktasen mit der unerwünschten Spezifität inaktiviert oder zumindest deren Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt.

Zur Steigerung des Enantiomerenüberschusses von S-CHBE wird häufig Allylalkohol eingesetzt (Houng et al. 2003; Dahl et al. 1999; Ushio et al. 1993). Andere untersuchte Enzyminhibitoren sind unter anderem 2-Cyclohexen-1-on, 2-Cyclohexen-1-ol, Butenol, Methylacrylat (Nakamura et al. 1989a), Crotonsäure und Acetat (Ushio et al. 1993). Die Inhibierung der Alkoholdehydrogenase durch das ionische Tensid CTAB wurde von Sekhar (1999) beschrieben.

Die Wirkung der Inhibitoren ist stark von ihrer Konzentration im Reaktionsmedium abhängig (Nakamura et al. 1987; 1989a) und kann über die Dauer der Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor vor Substratzugabe wesentlich beeinflusst werden (Dahl et al. 1999; Houng et al. 2003). Eine deutliche Steigerung des Enantiomerenüberschusses wird besonders dann erreicht, wenn der Enantiomerenüberschuss ohne Inhibitor sehr niedrig ist (Nakamura et al. 1989a). Der Einsatz der Enzyminhibitoren führt jedoch häufig zu einer starken Abnahme der Ausbeute (Houng et al. 2003; Nakamura et al. 1989a).

Die Wirkungsweise der Inhibitoren ist nicht vollständig geklärt. Bei Allylalkohol und anderen ungesättigten Alkoholen wird eine Oxidation des Alkohols durch die Alkoholdehydrogenase vermutet. Das bei der Reaktion gebildete Aldehyd führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, das nachfolgend die Laktatdehydrogenase inaktiviert (Pereira 1998).

Temperatur: Durch eine geeignete Temperaturerhöhung und Inkubationsdauer vor Beginn der Umsetzung kann der Enantiomerenüberschuss gesteigert werden (Cui et al. 1997; 1998; Kawai et al. 1994). Dabei wird die unterschiedliche Temperatursensitivität der R-spezifischen und der S-spezifischen Enzyme ausgenutzt. Da die Degenerierung der Enzyme durch die Temperatur

reversibel ist, kommt es bei niedrigen Temperaturen wieder zu einer Abnahme des Enantiomerenüberschusses.

Acetongetrocknete Zellen: Nakamura und Mitarbeiter (1996, 1998) konnten durch den Einsatz von acetongetrockneten Zellen von *Geotrichum candidum* die Ausbeute und den Enantiomerenüberschuss bei der Reduktion von Acetessigsäureethylester zum S-Alkohol deutlich steigern. Jayasinghe und Mitarbeiter (1993, 1994) setzten gefriergetrocknete Zellen von *S. cerevisiae* zur Biotransformation von Acetessigsäureethylester ein.

Nebenreaktionen: Die Ausbeute bei der Umsetzung von β -Ketoestern wird durch hydrolytische Enzyme in *S. cerevisiae* vermindert (Chin-Joe et al. 2000). Esterasen und Lipasen katalysieren die Hydrolyse der Esterverbindung unter Abspaltung von Ethanol (Abbildung 3.2.3). Als weitere Nebenreaktion wurde die reduktive Dehalogenierung von 4Cl-ACE zum Acetessigsäureethylester beobachtet (Abbildung 3.2.4, Bertau 2002). Das Zielprodukt S-CHBE ist hingegen stabil.

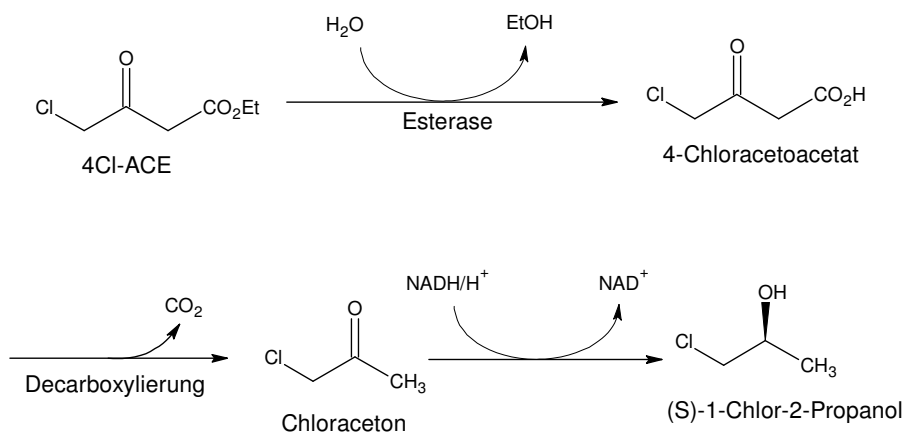


Abbildung 3.2.3: Hydrolyse von 4Cl-ACE in *S. cerevisiae* (Bertau 2002)

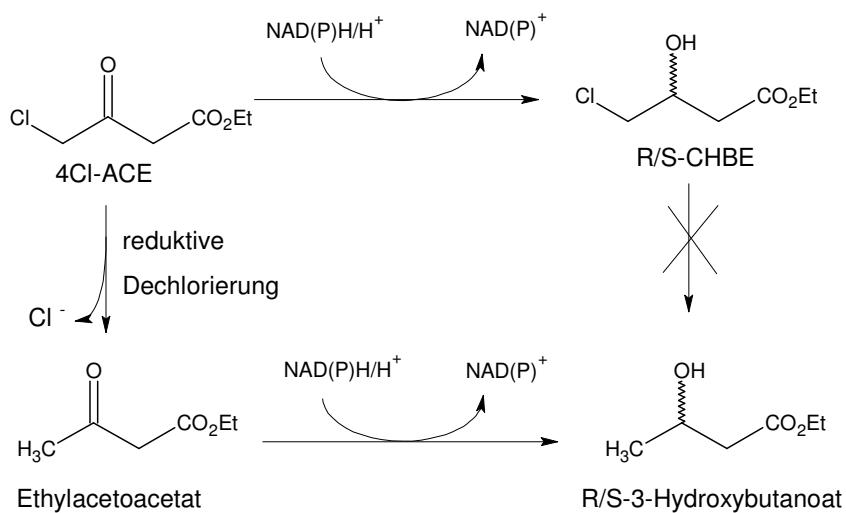


Abbildung 3.2.4: Reduktive Dehalogenierung von 4Cl-ACE in *S. cerevisiae* (Bertau 2002)

Neben dem enzymatischen Abbau des Substrates erfolgt die Hydrolyse des Substrates in wässriger Lösung, wobei die Stabilität mit niedrigem pH zunimmt. 4Cl-ACE erwies sich in Ethylacetat und n-Butylacetat als stabil (Shimizu et al. 1990).

Das Problem der Substratinstabilität in wässriger Lösung und der Substrattoxizität kann reduziert werden, indem die Substratkonzentration in der wässrigen Phase niedrig gehalten wird. Dazu bieten sich Zulaufverfahren an, die eine exakte Einstellung der Substratkonzentration bei bekannter Reaktionsgeschwindigkeit ermöglichen (Bertau 2002; Shieh et al. 1985).

Der Einsatz von Dialysemembranen (Spiliotis et al. 1990), Cyclodextrinen (Nakamura et al. 1994) oder Absorberharzen wie Amberlite XAD (D'Arrigo et al. 1997; Nakamura et al. 2000) als Substratreservoir ist mit Hinblick auf eine technische Realisierung sehr kostenintensiv.

Der Einsatz von mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln ist ein intensiv untersuchter Ansatz (Rotthaus et al. 2002; Shimizu et al. 1990). Solche Zweiphasensysteme bieten sich insbesondere an, wenn auch das Produkt toxisch oder instabil ist und damit eine kontinuierliche Abtrennung des Produktes aus der wässrigen Phase erforderlich ist.

3.3 Herstellung von (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)

(S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester ist ein Intermediat für Fluoxetin, Norfluoxetin, Tomoxetin und Nisoxetin (Abbildung 3.1.1) die zu den bedeutendsten Antidepressiva gehören. Das Anwendungsspektrum von Fluoxetin umfasst darüber hinaus Alkoholismus, chronische Schmerzen, Migräne, Schlafstörungen, Bulimie und Angstzustände (Kamal et al. 2002).

Fluoxetin ist als Racemat Bestandteil des Antidepressivums Prozac, mit dem im Jahr 2002 ein Umsatz von ca. 3 Mrd. US\$ erzielt worden ist. Einige pharmakologische Wirkungen werden bestimmten Enantiomeren des Fluoxetins zugeordnet. So ist das R-Enantiomer von Tomoxetin neun Mal effizienter als das S-Enantiomer.

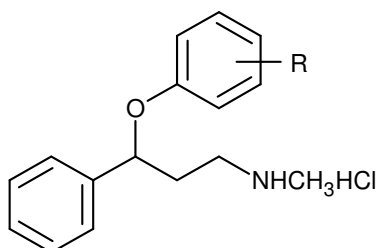


Abbildung 3.3.1: Struktur von Fluoxetin (R = 4-CF₃), Tomoxetin (R = 2-CH₃) und Nisoxetin (R = 2-OCH₃) (Kamal et al. 2002)

Die chemische Synthese von Fluoxetin-Vorstufen erfolgt industriell über die stereospezifische Hydrierung von verschiedenen aromatischen Ketonen mit Katalysatoren aus Boran- oder Lithium-Aluminium-Hydriden (Fronza et al. 1991, Srebnic et al. 1988). Kamal et al. (2002) verwenden eine Lipase aus *Pseudomonas cepacia* zur Racematspaltung für die Herstellung chiraler Intermediate für die Synthese von Fluoxetin (Abbildung 3.3.2).

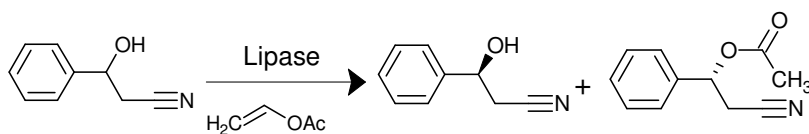


Abbildung 3.3.2: Racematspaltung mit einer Lipase aus *P. cepacia* zur Herstellung chiraler Intermediate für die Fluoxetin-Synthese (Kamal et al. 2002); Ausbeute: 45 %, EE > 99 %

3.3.1 Stereoselektive Reduktion von Ethylbenzoylacetat mit Mikroorganismen

Die mikrobielle Umsetzung von Ethylbenzoylacetat zu (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester ist weit weniger intensiv untersucht worden als bei anderen β -Ketoestern. Einige Mikroorganismen, die Ethylbenzoylacetat umsetzen können, sind in Tabelle 3.3.1 aufgeführt. Dabei wurde nur die Bildung des S-Alkohols beobachtet.

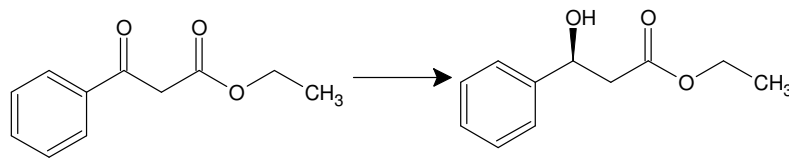


Abbildung 3.3.3: Reduktion von Ethylbenzoylacetat (EBA) zu (*S*)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)

Tabelle 3.3.1: Organismen, die EBA zu S-HPPE reduzieren können (Chênevert et al. 1992)

Organismus	Ausbeute [%]	EE [%]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50 – 63	87 – 93
<i>Beauveria sulfurescens</i>	72	96
<i>Geotrichum candidum</i>	65	97

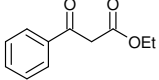
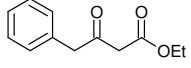
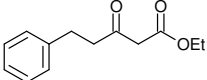
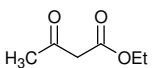
3.3.2 Stereoselektive Reduktion von Ethylbenzoylacetat mit *S. cerevisiae*

Aufgrund der Substratstruktur wird bei der stereoselektiven Reduktion von EBA mit *S. cerevisiae* ein höherer Enantiomerenüberschuss erzielt als bei der Reduktion von 4Cl-ACE. Der Enantiomerenüberschuss von 87 – 93 % (Tabelle 3.3.1) kann durch den Einsatz von spezifischen Enzyminhibitoren wie Allylalkohol oder 2-Cyclohexen-1-on weiter gesteigert werden (Bardot et al. 1997). Mit ruhenden Zellen wird ein geringerer Umsatz und Enantiomerenüberschuss erzielt als beim Einsatz von fermentierenden Zellen.

Als Nebenreaktion kommt es zu einer Dekarboxylierung des Substrates und als Nebenprodukt tritt Acetophenon auf. Diese Nebenreaktion kann durch den Einsatz fermentierender Hefen oder durch die Zugabe von 2-Cyclohexen-1-on oder Sucrose als Cosubstrat minimiert werden (Bardot et al. 1996).

Im Vergleich zu aliphatischen β -Ketoestern erfolgt die Umsetzung von Ethylbenzoylacetat deutlich langsamer und erfordert eine deutlich höhere Biokatalysatorkonzentration, wenn vergleichbare Umsätze erzielt werden sollen (Tabelle 3.3.2). Die Umsetzungsrate wird durch die sterische Hinderung des Phenylrestes reduziert und nimmt mit dem Abstand des Phenylrestes zur Carbonylgruppe zu. Den sehr niedrigen Umsatz von Ethylbenzoylacetat in Reaktionssystemen mit organischen Lösungsmitteln führt North (1996) auch darauf zurück, dass aufgrund der Hydrophobizität kein Substrat in die wässrige Phase und damit in die Zelle gelangt.

Tabelle 3.3.2: Einfluss der Substratstruktur auf die Umsetzung mit *Saccharomyces cerevisiae* in Petrolether; die Hefekonzentration gibt die Einsatzmenge an Biokatalysator an (Athanisou et al. 2001)

Substrat	Hefekonzentration [g mmol L ⁻¹]	Umsatz [%]
	20	21
	20	42
	10	100
	1	100

Aus *S. cerevisiae* ist eine NADPH-abhängige Carbonylreduktase isoliert worden, die Ethylbenzoylacetat zum R-HPPE mit einem Enantiomerenüberschuss von 72 % reduzieren kann. Beim Einsatz ganzer Zellen wird jedoch das S-Enantiomer mit einem Enantiomerenüberschuss von 88 % gebildet (Ema et al. 2001).

3.4 Rekombinante Mikroorganismen

Der Enantiomerenüberschuss bei der Ganzzellbiotransformation von 4Cl-ACE mit Wildtyp *S. cerevisiae* kann durch gezieltes Überexprimieren oder Ausschalten der Gene der einzelnen Carbonylreduktasen beeinflusst werden. Rodríguez und Mitarbeiter (1999) haben mit der Fettsäuresynthase und der Aldo-Keto-Reduktase zwei Enzyme unterschiedlicher Stereoselektivität überexprimiert bzw. ausgeschaltet. Damit konnte bei der Reduktion von Acetessigsäureethylester der Enantiomerenüberschuss des korrespondierenden Alkohols gezielt beeinflusst werden, ohne jedoch den Enantiomerenüberschuss auf über 88 % steigern zu können. Katz et al. (2003b) setzten rekombinante *S. cerevisiae* mit überexprimierten Carbonylreduktasen für die enantioselektive Reduktion von cyclischen Ketonen ein.

In dieser Arbeit wurden zwei rekombinante Hefen eingesetzt. Für die mikrobielle Herstellung von S-CHBE sind zwei Enzyme besonders geeignet, die Fettsäuresynthase aus *S. cerevisiae* (Tabelle 3.1.5) und die Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae* (Tabelle 3.2.1).

Die Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae* wird bereits in *E. coli* zur Herstellung von S-CHBE exprimiert (Kizaki et al. 2001). Das Substratspektrum beschränkt sich jedoch auf Ketoester mit kleinen Substituenten an der Ketogruppe. 4-Brom-Acetessigsäureethylester,

4-Fluor-Acetessigsäureethylester oder Ketone mit aromatischen Substituenten werden nicht umgesetzt. Auch Änderungen der Esterkette führen zu einer starken Abnahme der Aktivität des Enzyms (Shimizu et al. 1998).

Bei *S. cerevisiae* ist die Fettsäuresynthase das Enzym mit der höchsten Aktivität (Tabelle 3.1.5). Darüber hinaus verfügt die Fettsäuresynthase über ein weites Substratspektrum, was sie auch für andere Anwendungen interessant macht (Rodríguez et al. 2001; Shieh et al. 1985).

Tabelle 3.4.1: Kinetische Daten der eingesetzten Carbonylreduktasen (Lynen 1969; Shieh et al. 1985; Shimizu et al. 1998)

	Fettsäuresynthase (<i>S. cerevisiae</i>)	Carbonylreduktase (<i>C. magnoliae</i>)
EE (S-CHBE)	> 99 %	> 99 %
K_m (4Cl-ACE)	1,8 mmol L ⁻¹	4,6 mmol L ⁻¹
K_m (NADP)	0,06 mmol L ⁻¹	0,01 mmol L ⁻¹

Die Carbonylreduktase aus *C. magnoliae* wurde in *P. pastoris* überexprimiert (Wich et al. 2001). Als Regenerierungsenzym wurde die Glukosedehydrogenase (GDH) aus *B. subtilis* verwendet (Yamamoto et al. 2003). Beide Enzyme stehen unter der Kontrolle des methanolinduzierten Alkoholoxidase-Promotors (AOX-Promotor), wodurch eine hohe Expressionsleistung erzielt wird.

Die Überexpression der Fettsäuresynthase erfolgte in *S. cerevisiae* (Wich et al. 2001). Bei diesem Enzym handelt es sich um einen Enzymkomplex aus zwei Untereinheiten, wobei die Reaktion durch die β -Untereinheit katalysiert wird. Das verwendete Plasmid codiert für die β -Untereinheit der Fettsäuresynthase. Die Expression erfolgt konstitutiv unter der Kontrolle des Promotors der Phosphoglyceratkinase. Aufgrund eines regulatorischen Elements innerhalb des Gens für die β -Untereinheit erfolgt die Coexpression der α -Untereinheit (Wenz et al. 2001). Die Expression der Glukosedehydrogenase zur Cofaktorregenerierung erfolgt unter der Kontrolle des Promotors der Alkoholdehydrogenase.

Tabelle 3.4.2: Substrate der Fettsäuresynthase (Auswahl); nicht umgesetzt werden α -substituierte β -Ketoester; nach: Heidlas et al. (1988), Rodríguez et al. (1999), Shieh et al. (1985), Sybesma et al. (1998)

	R = Cl-CH ₂	R' = CH ₃ ; R' = (CH ₂) ₁₋₇ -CH ₃
	R = CH ₃ ; R = CH ₃ (CH ₂) ₁₋₂	
	R'' = (CH ₂) ₁₋₂ COOH	

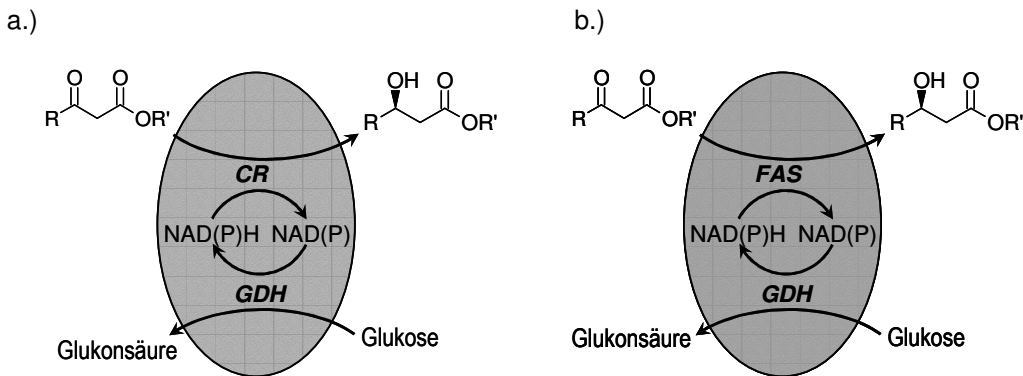


Abbildung 3.4.1: Eingesetzte rekombinante Biokatalysatoren: *P. pastoris* mit überexprimierter Carbonylreduktase (CR) aus *C. magnoliae* und überexprimierter Glukosedehydrogenase (GDH) aus *B. subtilis* a.) *S. cerevisiae* mit überexprimierter hefeeigener Fettsäuresynthase (FAS) und überexprimierter Glukosedehydrogenase aus *B. subtilis* b.). Die Glukonsäure kann zum Teil von den Zellen weiter verstoffwechselt werden

3.5 Zweiphasensysteme in Bioprozessen

Zweiphasensysteme bestehen aus einer wässrigen Phase und einer in Wasser unlöslichen Phase. Bei der in Wasser unlöslichen Phase kann es sich um Feststoffe (Cyclodextrine, Resine) oder um organische Lösungsmittel handeln. Im Folgenden werden nur Zweiphasensysteme mit einer in Wasser unlöslichen flüssigen Phase betrachtet. Einige Vor- und Nachteile von zweiphasigen Biotransformationen sind in Tabelle 3.5.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.5.1: Vor- und Nachteile zweiphasiger Bioprozesse

Vorteile	Nachteile
Höhere Substrat- und Produktmengen bei schlecht wasserlöslichen Substanzen	Toxizität des Lösungsmittels
Reduzierung toxischer oder inhibierender Effekte	Inhibierung durch das Lösungsmittel
Verschiebung von Reaktionsgleichgewichten	Bildung von stabilen Emulsionen
Vereinfachung der Aufarbeitung	Schaumbildung

Einige Beispiele für Ganzzellbiotransformationen mit *S. cerevisiae* und *P. pastoris* in Zweiphasensystemen sind in Tabelle 3.5.2 aufgeführt.

Tabelle 3.5.2: Ganzzellbiotransformationen mit *S. cerevisiae* und *P. pastoris* in Zweiphasensystemen (León et al. 1998; Nikolova et al. 1992)

Katalysator	Reaktion	Lösungsmittel
<i>P. pastoris</i>	Oxidation von hochmolekularen Alkoholen	Hexan
<i>P. pastoris</i> , immobilisiert	Benzylalkohol zu Benzaldehyd	Xylol, Decan
<i>S. cerevisiae</i>	Benzaldehyd und Pyruvat zu Phenylacetyl Carbinol	n-Butylacetat, Ethylacetat, Toluol, Hexan
<i>S. cerevisiae</i>	Ethanolbildung aus Glukose	Dodecanol
<i>S. cerevisiae</i> immobilisiert	Vanillin zu Vanillyl Alkohol	Dodecanol
<i>S. cerevisiae</i> immobilisiert	Benzaldehyd zu Benzylalkohol	Hexan

Werden Zweiphasensysteme in Biotransformationsprozessen eingesetzt, so werden an das Lösungsmittel folgende Anforderungen gestellt (Bruce et al. 1991):

- Geringe Toxizität gegenüber dem eingesetzten Biokatalysator
- Optimaler Verteilungskoeffizient für das Substrat oder Produkt
- Hohe Selektivität
- Geringe Tendenz zur Emulsionsbildung
- Geringe Wasserlöslichkeit
- Hohe chemische und thermische Stabilität
- Optimale Eigenschaften für die Produktaufarbeitung
- Nicht biologisch abbaubar
- Ungiftig
- Preiswert, in großen Mengen verfügbar

Die Biokompatibilität ist eine wesentliche Größe, die über die Einsetzbarkeit eines organischen Lösungsmittels entscheidet. Zur Beschreibung der Biokompatibilität von organischen Lösungsmitteln werden Größen wie Hildebrandt-Parameter, Dielektrizitätskonstante, Dipolmoment oder die Polarisierbarkeit herangezogen. Am weitesten verbreitet ist der „LogP“ (Hansch-Parameter), der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten für das betreffende Lösungsmittel in einem 1-Octanol/Wasser System. Der LogP beschreibt die Hydrophobizität des Lösungsmittels (León et al. 1998). Dabei nimmt die Biokompatibilität des Lösungsmittels mit steigendem LogP zu. Um eine Schädigung von *S. cerevisiae* zu vermeiden, ist ein LogP des Lösungsmittels von mindestens 4 erforderlich (Bruce et al. 1991). Damit die Zellen in Gegen-

wart des Lösungsmittels wachsen können, muss der LogP mindestens 6 betragen (Kawamoto et al. 2001).

Der LogP beschreibt die Biokompatibilität jedoch nur unzureichend, da für das Maß der Zellschädigung die Löslichkeit des organischen Lösungsmittels in der Zellmembran von entscheidender Bedeutung ist. Die Löslichkeit hängt aber auch von der Molekülstruktur ab (Bruce et al. 1991; León et al. 1998; Salter et al. 1995). Organische Lösungsmittel mit hoher Biokompatibilität sind für den Einsatz in Zweiphasensystemen jedoch häufig wenig geeignet, da die Substrate und Produkte darin schlecht löslich und die Reaktionsraten häufig niedrig sind (Salter et al. 1995).

Nikolova et al. (1992) haben den Einfluss verschiedener mit Wasser nicht mischbarer Lösungsmittel auf *S. cerevisiae* untersucht. Dabei haben Hexan (LogP = 4,1), Decan (LogP = 6,6) und Toluol (LogP = 2,5) keinen zellschädigenden Effekt gezeigt. Mit n-Butylacetat (LogP = 1,7) als organischem Lösungsmittel waren die Zellen nach bis zu 2 h, mit Ethylacetat (LogP = 0,7) nach bis zu 6 h intakt. Die Aktivität des Biokatalysators korreliert dabei aber nicht mit dem Grad der Zellschädigung oder der Viabilität der Zellen (Nikolova et al. 1992; Salter et al. 1995).

In einem System mit isolierter Glukosedehydrogenase aus *B. megaterium* und einer Aldehydreduktase aus *S. salmonicolor* haben Shimizu und Mitarbeiter (1990) nach dem optimalen Lösungsmittel für die Umsetzung von 4Cl-ACE gesucht. Dabei wurde der Verteilungskoeffizient für die Lösungsmittel Ethylacetat, n-Butylacetat, 1-Octanol, Chloroform, Dichlormethan, Tetrachlorkohlenstoff, Dichlorethan, Benzylchlorid und 2-Butanol untersucht. Von den getesteten Lösungsmitteln war der Verteilungskoeffizient von 4Cl-ACE und R-CHBE mit Ethylacetat am höchsten ($k = 16,2$ bzw. $23,5$). Gleichzeitig wurden aber die Enzyme schnell inaktiviert. Die Verteilungskoeffizienten sind mit n-Butylacetat etwas niedriger ($k = 10,6$ und $15,8$), die Enzyme werden jedoch praktisch nicht geschädigt. Alle anderen Lösungsmittel hatten schlechtere Extraktionseigenschaften oder führten zu einer sehr schnellen Inaktivierung der Enzyme.

Aufgrund der Vielzahl an Variablen, die die Wahl des Lösungsmittels für Biotransformationen beeinflussen können, ist eine theoretische Vorhersage für das optimale Lösungsmittel nicht möglich, sondern muss für jeden Anwendungsfall experimentell bestimmt werden.

3.6 Tenside

Tenside werden in Biotransformationen zur Steigerung der Ausbeute und der Reaktionsraten eingesetzt. Dabei spielen drei Effekte eine Rolle: die Permeabilisierung der Zellmembran bei Ganzzellbiotransformationen, die verbesserte Löslichkeit von schwer wasserlöslichen Substanzen und die Aktivitätssteigerung von Enzymen.

Durch die Permeabilisierung kann der diffusive Stofftransport durch die Zellmembran erhöht und so die Aktivität der Biokatalysatoren gesteigert werden. Eine effektive Permeabilisierung von *S. cerevisiae*, bestimmt aus der Messung intrazellulärer Enzymaktivitäten, wurde mit Triton X-100, Pluronic L-35, Pluronic F-68 und Pluronic F-38 (Laouar et al. 1992) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB; Gowda et al. 1992) beobachtet. Dabei wurde mit 1 % v/v Triton X-100 die maximale Wirkung erzielt. Bis zu einer maximal getesteten Konzentration von 1,5 % v/v Triton X-100 war keine zellschädigende Wirkung bei Hefen festzustellen (Laouar et al. 1996).

Werden Tenside in Zweiphasensystemen eingesetzt, so bilden sich durch die Verringerung der Grenzflächenspannung Mikrotropfen aus. Durch die vergrößerte spezifische Phasengrenzfläche werden Stofftransportlimitierungen reduziert (León et al. 1998).

Tenside können auf Enzyme stabilisierend wirken, wie für eine Hydrolase in Gegenwart von Tween 80 gezeigt wurde (Gong et al. 2003). Eine Steigerung der Aktivität von Enzymen wurde durch Triton X-100 beobachtet (Roughan 1997).

3.7 Alkohole

Neben der Funktion als spezifische Enzyminhibitoren einiger kurzkettiger Alkohole (Kapitel 3.2.2) können Alkohole als Löslichkeitsvermittler von schwer wasserlöslichen Substraten eingesetzt werden (Léon et al. 1998). Mit Methanol, Ethanol und 2-Propanol kann die Zellmembran permeabilisiert, und damit die Aktivität der Zellen gesteigert werden (Flores et al. 1994; Kondo et al. 2000; Liu et al. 1999, 2001).

3.8 Ganzzellreduktionen von Ketoestern im industriellen Maßstab

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Herstellung von chiralen Alkoholen mittels Ganzzellbiotransformation sind nur wenige industriell eingesetzte Verfahren bekannt. Die Ausbeuten in den

Prozessen sind in der Regel sehr niedrig, und häufig erreicht die Produktreinheit nicht die notwendige Qualität. Eine Auswahl an industriell eingesetzten Ganzzellbiotransformationen ist in Tabelle 3.8.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.8.1: Industriell eingesetzte enantioselektive Reduktionen von Ketoestern

Hersteller	Substrat	Katalysator	Ausbeute [%]	EE [%]	Maßstab	Quelle
Bristol-Myers Squibb, USA	4-Chlor-Acetessigsäure-ethylester	Ganzzellbiotransformation mit <i>G. candidum</i>	95	99	750 L	Liese et al. (2000)
Kaneka, Japan	4-Chlor-Acetessigsäure-ethylester	Ganzzellbiotransformation mit rek. <i>E. coli</i>	89	100	nb	Kataoka et al. (2003)
Rohner AG, Schweiz	Acetessigsäure-ethylester	Ganzzellbiotransformation mit <i>S. cerevisiae</i>	60 - 75	> 98	nb	Bertau et al. (2000)

3.9 Biologische Grundlagen verwendeter Biokatalysatoren

3.9.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* ist als Bäcker- oder Bierhefe der am längsten vom Menschen genutzte Mikroorganismus. *S. cerevisiae* kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen Katabolismus durchführen. Unter aeroben Bedingungen wird Glukose über die Glykolyse und den Citratcyclus zu CO₂ abgebaut. Unter anaeroben Bedingungen werden neben CO₂ noch Acetat und Ethanol als Endprodukte gebildet. Die Energie, die die Zelle aus diesem Prozess gewinnen kann, ist gegenüber dem aeroben Katabolismus deutlich niedriger und das Wachstum ist stark verlangsamt.

Um einen hohen Zuwachs an Biomasse zu erzielen, ist die Aufrechterhaltung von aeroben Bedingungen bei der Anzucht zu gewährleisten. Bei Überschreiten von niedrigen Glukosekonzentrationen von ca. 0,6 mmol L⁻¹ (100 mg L⁻¹) ist die vollständige Oxidation zu CO₂ und H₂O auch unter aeroben Bedingungen nicht mehr möglich (Überschussmetabolismus, Crabtree-Effekt). Dabei tritt eine Absättigung der Pyruvatdehydrogenase auf und Pyruvat wird zu Ethanol, Acetaldehyd und Acetat abgebaut (Abbildung 3.9.1, Walker 1999). Wird der Grenzwert von 0,6 mmol L⁻¹ unterschritten, kann die Zelle die Metaboliten Ethanol und Acetat aerob zu CO₂ veratmen.

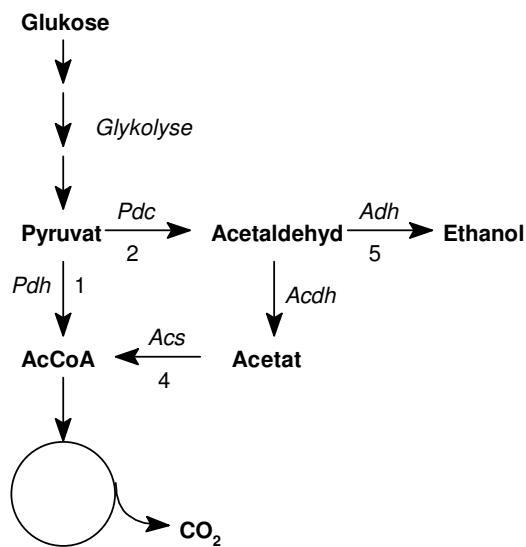


Abbildung 3.9.1: Abbauwege von Pyruvat in *S. cerevisiae*. Pdc: Pyruvatdecarboxylase; Adh: Alkoholdehydrogenase; Pdh: Pyruvatdehydrogenase; Acs: Acetyl-CoA Synthase; Nummern geben die Anzahl an Enzymen an, die am jeweiligen Reaktionsschritt beteiligt sind (Lei et al. 2001)

Aufgrund der Inhibierung des Zellstoffwechsels durch Ethanol sollte durch eine geeignete Prozessführung die Ethanolbildung vermieden werden. Hierfür werden Zulaufverfahren eingesetzt, die ein genaues Einstellen der Glukosekonzentration in dem Anzuchtmedium ermöglicht.

3.9.2 *Pichia pastoris*

P. pastoris gehört zu den Hefen, die in der Lage sind, Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde sie zuerst für die Herstellung von Einzellerprotein eingesetzt (Curvers 2001). Stehen andere Kohlenstoffquellen zu Verfügung, so entspricht der Stoffwechsel im Wesentlichen dem anderer aerob wachsender Mikroorganismen.

Die Bedeutung als Wirtssystem für die Herstellung rekombinanter Proteine hat *P. pastoris* durch die Entdeckung sehr starker Promotoren erlangt. Inzwischen steht ein kommerziell vertriebenes Expressionssystem, basierend auf dem durch Methanol induzierten AOX-Promotor, zur Verfügung. Daher ist *P. pastoris* besonders für die Expression von rekombinanten Proteinen geeignet.

3.10 Mikrobielles Wachstum

Das Wachstum von Mikroorganismen beschreibt die Zunahme der Zellzahl und die damit verbundene Zunahme der Biomasse. Für Mikroorganismen kann das Wachstum durch die Wachstumsrate μ über die Zunahme der Biomassenkonzentration c_X und die Verdoppelungszeit t_D der Zellen beschrieben werden:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad t_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1, 2)$$

Wird eine bestimmte Anzahl von Mikroorganismen zum Zeitpunkt $t = 0$ in ein Nährmedium überführt, so wird mit fortlaufender Reaktionszeit eine Zunahme der Biomasse beobachtet. Der Verlauf der Biomassenkonzentration kann in mehrere Wachstumsphasen eingeteilt werden (Abbildung 3.10.1):

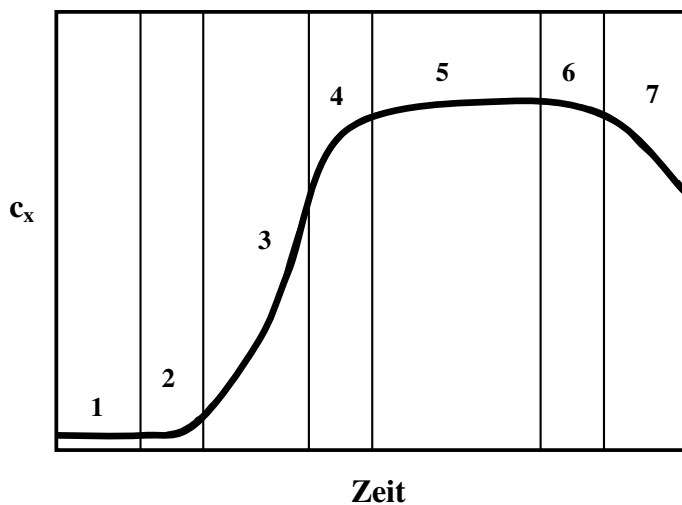


Abbildung 3.10.1: Wachstumskurve in einer Satzkultur; Änderung der Biomassenkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit

In der Verzögerungsphase (Lag-Phase, 1) adaptiert sich der Stoffwechsel der Zellen an die neuen Wachstumsbedingungen und es ist kein Wachstum festzustellen. Mit der Übergangsphase (2) setzt das Wachstum langsam ein. Die exponentielle Wachstumsphase (3) ist durch die exponentielle Zunahme der Biomasse charakterisiert. Keine für das Wachstum notwendige Komponente ist limitierend. In der Substratlimitierungs-Phase (4) geht die Biomassenzunahme langsam zurück, da eine oder mehrere Medienkomponenten limitierend wirken. Die maximale Biomassenkonzentration wird in der stationären Phase (5) erreicht. Wachstum und Absterben der

Zellen stehen im Gleichgewicht. Mit Ende der stationären Phase übersteigt die Absterberate die Wachstumsrate (6, 7).

Analog zur Definition der Wachstumsrate μ können die spezifische Substrataufnahmerate q_S und die spezifische Produktbildungsrate q_P definiert werden:

$$q_S \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_S}{dt} \quad q_P \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt} \quad (3, 4)$$

Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ verknüpft die gebildete Biomasse mit der verbrauchten Substratkonzentration:

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad (5)$$

Die Sauerstoffaufnahmerate OUR gibt an, wie viel Sauerstoff die Hefezellen beim Wachstum veratmen:

$$\text{OUR} \left[\text{mol} \cdot (\text{L h})^{-1} \right] = \dot{V}_{\text{ges}} (c_{\text{O}_2, \text{in}} - c_{\text{O}_2, \text{out}}) \cdot \frac{1}{22,414 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \cdot \frac{1}{V_R} \quad (6)$$

wobei \dot{V}_{ges} die Begasungsrate darstellt.

Die Berechnung der Kohlendioxidbildungsrate CER erfolgt analog zur Sauerstoffaufnahmerate:

$$\text{CER} \left[\text{mol} \cdot (\text{L h})^{-1} \right] = \dot{V}_{\text{ges}} (c_{\text{CO}_2, \text{in}} - c_{\text{CO}_2, \text{out}}) \cdot \frac{1}{22,414 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \cdot \frac{1}{V_R} \quad (7)$$

Der Respirationskoeffizient RQ ist das Verhältnis aus der Kohlendioxidbildungsrate und der Sauerstoffaufnahmerate:

$$\text{RQ} = \frac{\text{CER}}{\text{OUR}} \quad (8)$$

Wird als Kohlenstoffquelle Glukose eingesetzt, so hat der RQ unter aeroben Bedingungen bei vollständiger Veratmung zu CO_2 und H_2O den Wert 1. Ein Wert größer als eins zeigt die Bildung

von Gärungsprodukten wie Ethanol oder Acetat an. Wird Ethanol oder Acetat als einzige Kohlenstoffquelle verbraucht, sinkt der Respirationskoeffizient auf Werte unter eins.

3.11 Kultivierung von Mikroorganismen

Für die Kultivierung von Mikroorganismen sind drei Verfahren von Bedeutung: das Satzverfahren, das Zulaufverfahren und das kontinuierliche Verfahren.

3.11.1 Wachstum im Satzverfahren

Kultivierungen im Schüttelkolben sind ein typisches Beispiel für Satzverfahren. Im Satzverfahren werden alle notwendigen Nährstoffe vorgelegt. Die ständig zunehmende Biomasse verbraucht die Nährstoffe, bis eine Limitierung auftritt. Bei sehr hohen Biomassenkonzentrationen kann die Sauerstoffversorgung limitierend wirken, so dass trotz ausreichender Versorgung der Zellen mit Nährstoffen das Wachstum zum Erliegen kommt. Bei hohen Substrat- und Biomassenkonzentrationen und mangelnder Sauerstoffversorgung kommt es häufig zur Bildung von Gärungsprodukten wie Ethanol oder Acetat, die ein weiteres Wachstum inhibieren. Aufgrund dieser Einschränkungen kann mit Satzverfahren nur eine begrenzte Biomassenkonzentration erzielt werden. Die Stoffbilanz einer Komponente c_i und der spezifischen Reaktionsrate r_i für einen „idealen“ Rührkesselreaktor wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \cdot c_X \quad (9)$$

Wird die Biomasse als Komponente c_i betrachtet, so geht Gleichung (9) in Gleichung (1) mit $r_i = \mu$ über. Für den Konzentrationsverlauf eines Substrates c_S gilt:

$$\frac{dc_S}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S \right) \cdot c_X \quad (10)$$

mit dem Erhaltungsstoffwechsel der Zellen m_S .

3.11.2 Wachstum im Zulaufverfahren

Das Zulaufverfahren kann als ein verlängertes Satzverfahren betrachtet werden. Nach Erreichen eines definierten Zustandes eines Satzverfahrens, in der Regel der Verbrauch von vorgelegten Nährstoffen, erfolgt die Zudosierung der limitierenden Nährstoffe über einen Zulauf. Zulaufverfahren werden eingesetzt, wenn hohe Produktausbeuten erzielt werden sollen. Kontinuierliches Zudosieren von Nährstoffen verhindert das Auftreten vom Überschussmetabolismus. Gleichzeitig wird die Produktionsphase im Vergleich zum Satzverfahren verlängert. Die Stoffbilanz für die Komponente c_i ergibt sich im Zulaufverfahren nach:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = c_{i0} \cdot F_{ein} + r_i \cdot c_X \cdot V_R \quad (11)$$

mit dem Reaktionsvolumen V_R und dem Zulaufstrom F_{ein} . Der Konzentrationsverlauf der Biomasse c_X und der Komponente c_i ergibt sich damit nach:

$$V_R \cdot \frac{dc_X}{dt} = -c_X \cdot F_{ein} + \mu \cdot c_X \cdot V_R \quad (12)$$

$$V_R \cdot \frac{dc_S}{dt} = (c_{S0} - c_S) \cdot F_{ein} - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S \right) \cdot c_X \cdot V_R \quad (13)$$

3.12 Tropfengrößenverteilung

Bei dem Einsatz gering wasserlöslicher Substrate oder in Zweiphasensystemen mit einer wasserunlöslichen Komponente, entsteht häufig das Problem der Stofftransportlimitierung und daraus resultierend niedrige Reaktionsraten aufgrund ungenügender Durchmischung. Eine wesentliche Aufgabe bei der Auslegung solcher Prozesse ist die Reduzierung der Stofftransportlimitierung. Diese kann im Wesentlichen durch die Erhöhung der spezifischen Phasengrenzfläche zwischen der wässrigen und der wasserunlöslichen Phase erreicht werden.

In einem gerührten System haben die sich ausbildenden Tropfen keine einheitliche Größe, sondern sind durch eine Tropfengrößenverteilung charakterisiert. Die Tropfengrößenverteilung hängt sowohl vom Stoffsystem als auch von der Art der Durchmischung ab. Zur Beschreibung der Verteilungen können zwei unterschiedliche Funktionen herangezogen werden: die Verteilungsdichtefunktion $q_x(d)$ und die Verteilungssummenfunktion $Q_x(d)$. Die Verteilungs-

summenfunktion gibt den Anteil der Tropfen an der Gesamtanzahl an, der kleiner als eine bestimmte Tropfengröße ist. Die Verteilungssumme kann somit Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Die Verteilungsdichte beschreibt den Anteil der Tropfen an der Gesamtanzahl, der in ein bestimmtes Größenintervall fällt.

Beim Dispergieren wird nach einer bestimmten Dispergierdauer ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem sich die Tropfengrößenverteilung nicht mehr ändert. Dieser Gleichgewichtszustand wird auch als Beharrungszustand bezeichnet. Eine Größe, mit der die sich ausbildende Tropfengröße beschrieben werden kann, ist der Sauterdurchmesser d_{32} :

$$d_{32} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (14)$$

mit n_i der Anzahl der Tropfen innerhalb eines Intervalls und d_i dem Durchmesser der Tropfen innerhalb eines Intervalls. Der Sauterdurchmesser ist als Verhältnis der Summe der Volumina der Tropfen dividiert durch deren Oberfläche definiert.

Aus dem Volumen der dispersen Phase und dem Sauterdurchmesser lässt sich, unter der Voraussetzung, dass die Tropfen ideal kugelförmig sind, die spezifische Phasengrenzfläche a ableiten:

$$a = \frac{A}{V} = \frac{\sum \pi \cdot d_i^2}{\sum \pi \cdot d_i^3 / 6} = \frac{6 \cdot \varphi_v}{d_{32}} \quad (15)$$

wobei φ_v den Phasenanteil der dispersen Phase (wasserunlösliche Phase) darstellt. Da der Sauterdurchmesser auch für bimodale Verteilungen der Tropfengröße angegeben werden kann, ist zur vollständigen Beschreibung des Dispersionsvorganges immer auch die Darstellung der Verteilungsdichtefunktion notwendig.

Leistungseintrag im Rührkesselreaktor

Zur Dispergierung der dispersen Phase muss mechanische Energie in den Rührkesselreaktor eingebracht werden. Im turbulenten Strömungsbereich bei Reynoldszahlen $Re > 10^4$ gilt für den Leistungseintrag des Rührers folgender Zusammenhang:

$$Re = \frac{n \cdot d^2}{\mu} \quad (16)$$

$$P = Ne \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d^5 \quad (17)$$

Mit P der Rührerleistung, Ne der Newton-Zahl, ρ der Dichte des Mediums, n der Drehzahl des Rührers, d dem Rührerspitzenradius und μ der dynamischen Viskosität.

Die Newton-Zahl (Leistungskennzahl) ist eine Funktion der Gasdurchsatzkennzahl Q , der Reynoldszahl Re und der Froude-Zahl Fr :

$$Q = \frac{q}{n \cdot d^3} \quad (18)$$

$$Fr = \frac{n^2 \cdot d}{g} \quad (19)$$

$$Ne = f(Q, Re, Fr) \quad (20)$$

mit q der Begasungsrate und g der Erdbeschleunigung.

Modellierung des Dispergiervorganges

Für die Beschreibung der Tropfengröße in Abhängigkeit vom Leistungseintrag und den physikalischen Eigenschaften der beteiligten Phasen existieren in der Literatur zahlreiche Modelle, die sich aufgrund der Komplexität häufig nur auf bestimmte Stoffsysteme beschränken. Für die mathematische Beschreibung der Dispergiervorgänge sind zwei Kennzahlen von Bedeutung. Die erste ist die Viskositäts-Kennzahl V_1 :

$$V_i = \frac{\mu_d}{(\rho_d \sigma)^{-0,5}} \quad (21)$$

wobei μ_d die dynamische Viskosität der dispersen Phase, ρ_d die Dichte der dispersen Phase und σ die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen ist.

Die zweite wichtige Kennzahl ist die Weber-Zahl We :

$$We = \frac{n^2 d^3 \rho}{\sigma} \quad (22)$$

Hinze (1955) hat für stark verdünnte Dispersionen, in denen die Viskosität der beteiligten Phasen vernachlässigt werden kann, folgende Beziehung aufgestellt:

$$\frac{d_{\max}}{d} = c_1 \cdot (We)^{-0,6} \quad (23)$$

mit d_{\max} dem maximalen Tropfendurchmesser, d dem Rührerspitzendurchmesser und einer stoffspezifischen Konstanten c_1 .

Diese Gleichung kann für die Berücksichtigung von Koaleszenzvorgängen mit den Konstanten c_2 und c_3 erweitert werden:

$$\frac{d_{\max}}{d} = c_2 \cdot (1 + c_3 \cdot \varphi_v) \cdot (We)^{-0,6} \quad (24)$$

Dabei wird die Annahme gemacht, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem Phasenanteil der wasserunlöslichen, dispersen Phase und dem maximalen Tropfendurchmesser besteht. Diese Beziehungen gelten für den Fall vollständiger turbulenter Durchmischung (Reynolds-Zahl $Re > 10^4$) und für geringe Dichte- und Viskositätsunterschiede der Phasen. Für Stoffsysteme, bei denen die Viskosität nicht vernachlässigt werden kann, erfolgt eine zusätzliche Korrektur über die Viskositäts-Kennzahl.

Von den in der Literatur beschriebenen Modellen wurden zwei exemplarisch für die Berechnung der mittleren Tropfengröße aus den physikalischen Daten der untersuchten Phasen ausgewählt.

Das Modell von Brown et al. (Zhou 1998) basiert auf Gleichung 24 und gilt für einen Volumenanteil der dispersen Phase von 0,05 – 0,3:

$$\frac{d_{32}}{d} = 0,051 \cdot (1 + 1,314 \cdot \varphi_v) \cdot (We)^{-0,6} \quad (25)$$

Bei stark verdünnten Lösungen geht der Term $(1 + 1,314 \cdot \varphi_v)$ gegen 1, und die Gleichung vereinfacht sich entsprechend Gleichung 23 (mit $c_1 = 0,051$).

Das Modell nach Calabrese (Zhou 1998) vernachlässigt die Koaleszenzvorgänge, gilt also hauptsächlich für stark verdünnte Lösungen. Zusätzlich berücksichtigt das Modell jedoch die Viskosität:

$$\frac{d_{32}}{d} = 0,053 (We)^{-0,6} \cdot (1 + 0,91 V_i^{0,84})^{3/5} \quad (26)$$

Bei niedrigen Viskositäten geht der Term $(1 + 0,91 V_i^{0,84})^{3/5}$ gegen 1, und das Modell vereinfacht sich entsprechend Gleichung 23 (mit $c_1 = 0,053$). Andere publizierte Modellgleichungen basieren im Wesentlichen auf diesen beiden Gleichungen. Eine Gesamtübersicht über die verschiedenen publizierten Korrelationen ist in Zhou (1998) zusammengestellt.

3.13 Versuchsplanung

Die Reduktion von β -Ketoestern durch ganze Zellen wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Reaktionsbedingungen beeinflusst: Zusammensetzung des Mediums mit unterschiedlichen Medienkomponenten (Puffer, Salze, Cosubstrat), Substratkonzentration, pH, Temperatur, eingesetzte Biokatalysatorkonzentration und andere. Trotz der großen Anzahl an Einflussvariablen wird bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen häufig nur der Einfluss einer Größe untersucht, während alle anderen Variablen konstant gehalten werden („One-at-a-Time“ Ansatz). Interaktionen der einzelnen Größen werden nicht berücksichtigt. Bei diesen eindimensionalen Suchstrategien ist es praktisch unmöglich, in einem multivarianten System mit einer begrenzten Anzahl an Experimenten ein Optimum zu finden (Weuster-Botz 2000).

Nur wenige Autoren haben zur Optimierung der Ganzzellbiotransformation von β -Ketoestern mit *S. cerevisiae* eine Versuchsplanung zur Optimierung der Reaktionsbedingungen durch-

geführt. Dies ist umso erstaunlicher, wenn die Anzahl der publizierten Arbeiten zu diesem Thema betrachtet wird. Boccù und Mitarbeiter (1990) verwendeten zur Optimierung der Umsetzung von Acetessigsäureethylester zum S-Alkohol ein faktorielles Design mit vier Variablen (Temperatur, Substratkonzentration, Biokatalysatorkonzentration, Reaktionszeit), um die Ausbeute und den Enantiomerenüberschuss zu steigern. Für jede Variable wurden zwei Niveaus eingesetzt. Houg und Mitarbeiter (2003) verwendeten ein Tagouchi-Design mit acht Variablen mit jeweils drei Konzentrationsniveaus zur Optimierung der Ausbeute und des Umsatzes bei der Reaktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE.

Das Vorgehen bei einer Optimierung lässt sich in vier Abschnitte einteilen:

- 1.) Identifikation der wichtigsten Variablen („Ausgieben“)
- 2.) Identifikation des optimalen Variablenbereiches („Eingrenzen“)
- 3.) Identifikation des Optimums innerhalb des Variablenbereiches durch eine geeignete Suchstrategie
- 4.) Verifikation des gefundenen Optimums

Die Identifikation der wesentlichen Variablen und des optimalen Variablenbereiches erfolgt in Vorversuchen durch Parameterstudien. Für das Auffinden des Optimums muss den Anforderungen entsprechend ein geeigneter Versuchsplan eingesetzt werden. Im Fall der experimentellen Optimierung von Reaktionsbedingungen sind mehrere Randbedingungen zu beachten (Weuster-Botz 1999):

- Berücksichtigung einer großen Anzahl von Variablen
- Die (Konzentrations-) Niveaus der Variablen sollten aufgrund der zu erwartenden Multimodalität der Zielfunktion nicht auf einige wenige beschränkt sein
- Wechselwirkungen der einzelnen Variablen sollten berücksichtigt werden
- Geringer experimenteller Aufwand (Reduktion der Anzahl der Experimente)
- Auffinden des Optimums auch bei hoher Beobachtungsvarianz

Statistische Ansätze mit faktoriellen Versuchsplänen berücksichtigen nur wenige Niveaus der Variablen. In der Regel werden drei nicht überschritten. Bei einer großen Anzahl an zu untersuchenden Einflussvariablen steigt zu dem die Anzahl an durchzuführenden Experimenten schnell an.

Eine Alternative sind stochastische Versuchsplanungen wie z. B. genetische Algorithmen, die die Forderungen nach einer effizienten und robusten Suchstrategie erfüllen. Genetische Algorithmen unterscheiden sich von klassischen Suchverfahren im Wesentlichen in vier Punkten:

- Sie arbeiten mit einer Kodierung (Binärkodierung) der Variablen eines Problems
- Die Suche wird von mehreren Punkten im Variablenraum gleichzeitig gestartet
- Es wird eine Bewertungsfunktion verwendet, die die Tauglichkeit („Fitness“) einer Lösung beurteilt
- Es werden stochastische Regeln verwendet, wodurch die Verfahren robuster als andere Suchverfahren sind

Genetische Algorithmen sind insbesondere für komplexe Optimierungsaufgaben geeignet, da sie einen großen Suchraum abdecken können, keinen Einschränkungen der zu optimierenden Funktion unterliegen (Stetigkeit, Ableitbarkeit), keine Informationen über den Suchraum notwendig sind und das globale Optimum innerhalb eines Variablenraums gesucht wird. Die Einsetzbarkeit dieses Suchverfahrens und die hohe Effizienz im Vergleich zu anderen Verfahren bei der Optimierung von biologischen Aufgabestellungen ist vielfach gezeigt worden (Weuster-Botz 2000; Cheema et al. 2002). Die Optimierung kann für mehrere Zielgrößen gleichzeitig erfolgen, wobei eine Gewichtung der verschiedenen Größen möglich ist.

Das Suchverfahren der genetischen Algorithmen basiert auf den Prinzipien der Evolution, die aus den drei Schritten Selektion, Crossover und Mutation bestehen. Bei der Selektion wird die Fähigkeit eines Individuums bestimmt, die gesetzten Anforderungen zu erfüllen. Diese Fitness bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der sich das Individuum reproduzieren und seine genetischen Informationen weitergeben kann. Beim Crossover werden Erbanlagen unterschiedlicher Individuen neu kombiniert. Bei der Mutation erfolgt eine zufällige und ungerichtete Änderung der Erbinformation und damit der Eigenschaften eines Individuums.

Für die Optimierung von Reaktionsbedingungen werden zuerst die einzelnen Variablen wie beispielsweise die Komponenten eines Mediums binär kodiert. Ein Individuum entspricht einem Versuchsansatz mit einer definierten Medienzusammensetzung. In der Binärkodierung wird die Anzahl der Niveaus einer Variable über deren Bitlänge definiert. Der String, der die

Zusammensetzung eines Versuchsansatzes repräsentiert, setzt sich dann aus den Binärzeichenketten aller Variablen zusammen.

Die Suche nach einem Optimum innerhalb eines Variablenraums mit einem genetischen Algorithmus erfolgt nach folgendem Schema:

- 1.) Die erste Serie an Parallelexperimenten („1. Generation“) wird zufallsverteilt erzeugt
- 2.) Die Versuche werden durchgeführt und die Werte der Zielfunktionen bestimmt
- 3.) Eine neue Generation wird erzeugt
- 4.) Die Werte der Zielfunktionen werden bestimmt und die Fitness berechnet
- 5.) Selektion der Individuen aufgrund ihrer Fitness
- 6.) Crossover
- 7.) Punktmutation
- 8.) Gehe zurück zu Punkt 3.

Dieses Verfahren wird so lange durchlaufen, bis ein Abbruchkriterium erfüllt ist.

Wesentlicher Bestandteil des genetischen Algorithmus ist die Bestimmung der Fitness eines Individuums als ein Maß, wie gut es an die Zielgröße angepasst ist. Die Fitness bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Variablenkombination bei der Selektion ausgewählt und in die nachfolgende Generation übernommen wird. Dabei wird sowohl die Fitness des einzelnen Individuums als auch die Gesamtfitness der Population bestimmt.

Das gebräuchlichste Auswahlkriterium ist die „Roulette Wheel“ Selektion, die auch als „Fitnessproportionale Selektion“ bezeichnet wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Variablenkombination eines Individuums in die Nachfolgegeneration übernommen wird, ergibt sich aus dem Quotienten der Fitness des Individuums und der Gesamtfitness der Population. Um zu verhindern, dass bei der Selektion das Individuum mit der höchsten Fitness nicht übernommen oder der String bei der nachfolgenden Rekombination und Mutation zerstört wird, lässt sich dieser String unverändert in die Nachfolgegeneration übernehmen.

Bei dem nachfolgenden Crossover erfolgt eine Rekombination einzelner Stringabschnitte der zuvor ausgewählten Individuen. Um die Konvergenzeigenschaften des genetischen Algorithmus zu erhalten, wird im Allgemeinen nur ein Einzelcrossover durchgeführt. Für die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Rekombination kommt, werden in der Regel Werte zwischen 90 % und 100 % angewendet.

Um ein vorzeitiges Konvergieren auf ein lokales Optimum zu vermeiden, werden Punktmutationen eingeführt. Hierzu muss die Mutationsrate mindestens umgekehrt proportional zur Bitlänge des Strings sein.

4 Material und Methoden

4.1 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Hefestämme *S. cerevisiae* FasB His6 und *P. pastoris* GC 909 wurden vom Consortium für elektrochemische Industrie, München, zur Verfügung gestellt.

4.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6

Ausgangsstamm für die rekombinante Hefe *S. cerevisiae* FasB His6 ist *S. cerevisiae* CM3260. Eine thermostabile Variante der Glukosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* wird unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-Promotors aus *S. cerevisiae* exprimiert. Die Expression der β -Untereinheit der Fettsäuresynthase steht unter der Kontrolle des *S. cerevisiae* PGK-Promotors (Phosphoglyceratkinase). Ein innerhalb des Gens liegendes regulatorisches Element bewirkt die gleichzeitige Überexpression der α -Untereinheit (Wenz et al. 2001). Für die Transformation beider Gene wurde der Bluescript Vektor verwendet. Die Integration der eingesetzten Plasmide erfolgte durch homologe Rekombination in das Genom der Hefe.

4.1.2 *Pichia pastoris* GC909

Der rekombinante Stamm *P. pastoris* überexprimiert die Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae* sowie die Glukosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*, beide unter der Kontrolle des mit Methanol induzierbaren Alkoholoxidase-Promotors (AOX-Promotor). Die für die Transformation eingesetzten Plasmide (pPICZ, Invitrogen, Carlsbad/USA) wurden durch homologe Rekombination in das Genom von *P. pastoris* integriert.

4.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Bestandteile der komplexen Nährmedien hatten die Qualitätsstufe „Für die Mikrobiologie“. Alle anderen verwendeten Chemikalien hatten die Reinheit „zur Synthese (z.S.)“ oder „zur Analyse (p.A.)“. Eine Auflistung befindet sich im Anhang. Für alle wässrigen Lösungen wurde voll-entsalztes Wasser (VE-Wasser) verwendet.

4.2.1 CSL-Medium (Corn Steep Liquor)

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Maisquellwasser (Corn Steep Liquor, CSL)	2 % v/v
Pepton aus Casein	20 g L ⁻¹
Glukose	20 g L ⁻¹

Glukose und komplexe Medienkomponenten wurden separat autoklaviert und nach Abkühlen vereinigt. Die Medien wurden bei +4 °C gelagert. Das Medium wurde für die Anzucht von *S. cerevisiae* im Schüttelkolben eingesetzt.

4.2.2 BMGY-Medium (Buffered Glycerol-Complex Medium)

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton aus Casein	20 g L ⁻¹
Phosphatpuffer, pH 6,0	0,1 mol L ⁻¹
Yeast Nitrogen Base (YNB)	13,4 g L ⁻¹
Biotin	0,4 mg L ⁻¹
Glycerin	10 g L ⁻¹

Hefeextrakt und Pepton wurden zusammen, Phosphatpuffer und Glycerin wurden separat autoklaviert. Biotin und Yeast Nitrogen Base (YNB) wurden steril filtriert. Alle Lösungen wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen bzw. Sterilfiltrieren vereinigt. Die Medien wurden bei +4 °C gelagert. Das Medium wurde für die Anzucht von *P. pastoris* GC909 eingesetzt.

4.2.3 YNB-Medium

Das Medium zur Anzucht von *S. cerevisiae* wurde aus van Hoek et al. (2000) entnommen.

Yeast Nitrogen Base (YNB)	6,7 g L ⁻¹
Glukose	25 g L ⁻¹

Die Glukose wurde autoklaviert, YNB wurde in Wasser gelöst, steril filtriert und anschließend zur Glukoselösung gegeben.

4.2.4 YPD-Medium für Platten

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton	20 g L ⁻¹
Glukose	20 g L ⁻¹
Agar	20 g L ⁻¹

Die komplexen Komponenten wurden zusammen mit Agar autoklaviert. In das noch flüssige Medium wurde die separat autoklavierte Glukoselösung gegeben. Das Medium wurde in Polystyrol-Petrischalen gegossen, getrocknet und bei +4 °C gelagert.

4.2.5 Basismineralmedium

Das Mineralmedium zur Anzucht von *S. cerevisiae* wurde aus van Hoek et al. (2000) entnommen.

KH ₂ PO ₄	10 g L ⁻¹
MgSO ₄	2,5 g L ⁻¹
Harnstoff	3,0 g L ⁻¹
Glukose	25 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 % v/v
Vitaminlösung	1,5 % v/v

Kaliumdihydrogenphosphat und Magnesiumsulfat wurden zusammen gelöst und vor dem Autoklavieren mit 5 molarer NaOH auf pH 5,0 eingestellt. Harnstoff wurde steril filtriert, Glukose und Spurenelementlösung wurden separat autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt. Die Vitaminlösung wurde steril filtriert und hinzugefügt. Das Medium wurde bei +4 °C gelagert.

4.2.6 Spurenelementlösung

EDTA	15 g L ⁻¹
ZnSO ₄	5,75 g L ⁻¹
MnCl ₂	0,32 g L ⁻¹
CuSO ₄	0,5 g L ⁻¹
CoCl ₂	0,47 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄	0,48 g L ⁻¹
CaCl ₂	2,9 g L ⁻¹
FeSO ₄	2,8 g L ⁻¹

Die Spurenelemente wurden zusammen autoklaviert.

4.2.7 Vitaminlösung

Biotin	0,05 g L ⁻¹
Calcium-Pantothenat	1,0 g L ⁻¹
Myoinositol	25,0 g L ⁻¹
Thiamin-Hydrochlorid	1,0 g L ⁻¹
Pyridoxol-Hydrochlorid	1,0 g L ⁻¹
p-Aminobenzoesäure	0,2 g L ⁻¹

Die Vitaminlösung wurde steril filtriert und bei +4 °C gelagert.

4.2.8 Thermolabile Komponenten

Lysin (2 g L⁻¹), Tryptophan (2 g L⁻¹), Adenin (4 g L⁻¹) und Harnstoff (40 g L⁻¹) wurden als Stammlösungen in VE-Wasser angesetzt und steril filtriert.

4.2.9 Stammlösungen für Reaktionspuffer

Folgende Lösungen wurden als Stammlösungen angesetzt (angegeben ist die Konzentration der Stammlösungen):

Glukose	4 mol L ⁻¹
NaCl	4 mol L ⁻¹
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	3 mol L ⁻¹

Die Lösungen wurden einzeln autoklaviert und bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert.

4.2.10 Standardreaktionspuffer

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	0,1 mol L ⁻¹
Glukose	1,0 mol L ⁻¹
NaCl	0,1 mol L ⁻¹
NADP	0,1 mmol L ⁻¹

Kaliumphosphatpuffer, Glukose und Natriumchlorid wurden aus den Stammlösungen angesetzt. Die Lösungen wurden direkt vor Verwendung unter unsterilen Bedingungen vereinigt und NADP zugegeben.

Bei Experimenten, die zwischen pH 6,0 und 8,0 durchgeführt wurden, wurde ein Kaliumphosphatpuffer mit dem entsprechenden pH eingesetzt.

Für Versuchsreihen bei pH 4,0 bis 7,0 wurde der Kaliumphosphatpuffer durch einen Natriumcitratpuffer (0,16 mol L⁻¹) ersetzt.

4.2.11 Optimiertes Medium

Aus den Optimierungsexperimenten ergab sich folgende optimierte Zusammensetzung des Reaktionsmediums:

Glukose	0,32 mol L ⁻¹
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	0,50 mol L ⁻¹
NaCl	0,19 mol L ⁻¹
Triton X-100	6,5 % v/v
1-Buten-3-ol	0,8 % v/v

Der Puffer wurde vor der Verwendung aus den Stammlösungen für Glukose, Natriumchlorid und Kaliumphosphatpuffer angesetzt. Triton X-100 und 1-Buten-3-ol wurden wie vom Hersteller geliefert verwendet.

4.2.12 Zellaufschlusspuffer

Natriumphosphat (monobasisch)	6 g L ⁻¹
EDTA	0,372 g L ⁻¹
Glycerin	5 % v/v

Die einzelnen Komponenten wurden in 900 mL VE-Wasser gelöst und der pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 1 L Endvolumen aufgefüllt.

4.2.13 Aktivitätspuffer zur Bestimmung der Carbonylreduktase-Aktivität (CR)

Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0	0,1 mol L ⁻¹
4Cl-ACE	50 mmol L ⁻¹

Das 4Cl-ACE wurde durch intensives Rühren im Phosphatpuffer gelöst und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

4.2.14 Aktivitätspuffer zur Bestimmung der Glukosedehydrogenase-Aktivität (GDH)

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	0,1 mol L ⁻¹
Glukose	0,1 mol L ⁻¹

Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

4.3 Stammhaltung

Die Kolonien von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurden auf YPD-Platten vereinzelt und bei 25 °C 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden Schüttelkolben mit einer Einzelkolonie beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 20 angezogen. Von den Kulturen wurden 0,5 mL in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 30 % v/v) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bzw. -80 °C.

4.4 Anzucht im Schüttelkolben

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurden Schüttelkolben ohne Schikane mit 500 mL oder 1 L Gesamtvolumen verwendet. Das Volumen des verwendeten Mediums betrug 20 % vom Gesamtvolumen des verwendeten Schüttelkolbens. Die Kolben wurden bei 28 °C und 250 min⁻¹ in einem Schüttelinkubator (Multitron; Infors, Bottmingen/Schweiz) inkubiert.

4.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Generierung von Biomasse wurden Schüttelkolben mit 1 Liter Gesamtvolumen mit CSL-Medium eingesetzt. Das Medium wurde mit 100 µL einer Stammkultur angeimpft und vier Tage bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 50 – 60 inkubiert.

4.4.2 *Pichia pastoris*

Für die Anzucht von *P. pastoris* wurde BMGY-Medium eingesetzt und mit einer Kolonie von einer YPD-Platte inokuliert. Die Kolben wurden über drei Tage inkubiert. Danach erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 % v/v Methanol einmal pro Tag über weitere drei Tage. Anschließend wurden die Zellen bei +4 °C und 4.800 g abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Zellen für Versuche wurden ausnahmslos im Schüttelkolben angezogen.

4.5 Medienoptimierung im Schüttelkolben

Die Medienoptimierung zur Zellanzucht wurde in 500 mL und 1 Liter Schüttelkolben, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, durchgeführt. Die Ansätze wurden vier bis fünf Tage inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung der OD₆₀₀, der Enzymaktivitäten und der Gesamtaktivität des Ansatzes entnommen.

4.6 Versuche zur Zellanzucht

4.6.1 Bioreaktor

Für die Herstellung größerer Mengen an *S. cerevisiae* wurde ein Laborfermenter Labfors (Infors; Bottmingen/Schweiz) mit einem Fassungsvermögen von 7,5 Litern und einem Arbeitsvolumen von 5 Litern eingesetzt. Die Durchmischung erfolgte mit drei 6-Blattrührern. Die Temperierung des Reaktors erfolgte über einen doppelwandigen Glaszylinder, in dem drei Strombrecher montiert sind.

Für die pH-Messung wurde eine Gelelektrode (Schott Instruments, Mainz) eingesetzt. Als Korrekturmittel wurde 6 normale Phosphorsäure und 25 % v/v Ammoniaklösung verwendet. Als Antischaummittel wurde 25 % v/v Struktol J673 eingesetzt.

Für die Messung des Gelöstsauerstoffgehaltes wurde eine amperometrisch arbeitende pO_2 -Elektrode (Mettler Toledo; Gießen) verwendet. Die Kalibrierung erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums bei einer Temperatur des Mediums von 28 °C. Der Gelöstsauerstoff wurde durch Begasung mit Stickstoff aus dem Reaktionsmedium verdrängt und der Nullpunkt (0 % Gelöstsauerstoff) bestimmt. Die Sauerstoffsättigung ($pO_2 = 100$ %) erfolgte bei Begasung mit Luft bei einer Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} und einer Begasungsrate von 1 vvm bei Umgebungsdruck.

Die Messung des Sauerstoff- und CO_2 -Gehaltes in der Abluft erfolgte mit der Abgasanalytik Easy Line (ABB, Frankfurt). Zur Datenerfassung und Steuerung des Prozesses wurde ein Messrechner mit der Software Iris NT Pro 4.11 eingesetzt.

Zur Einstellung der Dosierrate während des Zulaufverfahrens wurde eine Dosierstrecke IP 65 (Sartorius, Göttingen) verwendet, die einen definierten Massenstrom von einer Waage durch die Ansteuerung einer Kassettenpumpe 205A (Watson-Marlow, Falmouth/Großbritannien) regelt. Das gewünschte Zufütterungsprofil wurde in der Dosierstrecke definiert und nach Ende der Satzphase manuell gestartet. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.6.1 dargestellt.

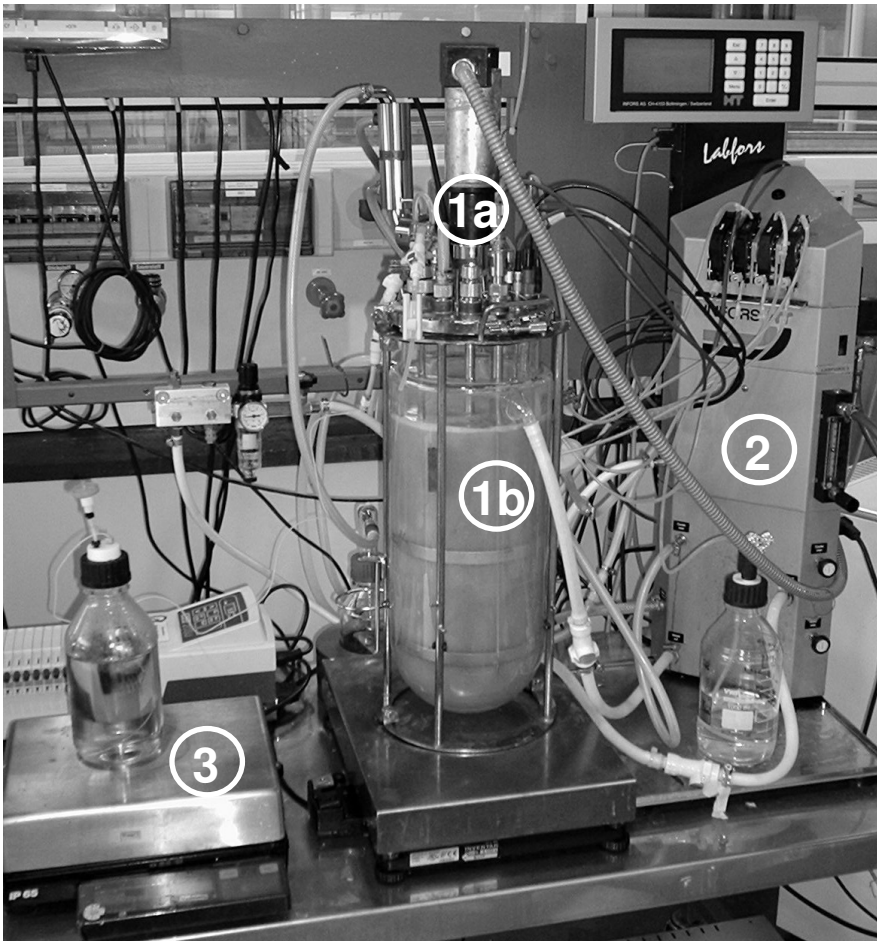


Abbildung 4.6.1: Aufbau des Bioreaktors zur Anzucht von Zellen im 5 L-Maßstab. 1a: Motorantrieb der Rührerwelle; 1b: Doppelmantelreaktor; 2: Steuereinheit mit Schlauchpumpen für die Dosierung von Korrektur- und Antischaummittel; 3: Waage und Dosierpumpe für Zufütterungsprofile

4.6.2 Vorkulturen

Die Herstellung des Inokulums erfolgte in einer zweistufigen Vorkultur mit CSL-Medium. Die erste Kultur wurde wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben über drei Tage bis zu einer OD_{600} von ca. 50 angezogen. Mit 1 mL dieser Vorkultur wurden Kolben mit frischem Medium beimpft, die über 20 h bis zu einer OD_{600} von 20 angezogen wurden. Für das Inokulieren eines Fermenters mit einem Endvolumen von 5 Litern wurden 400 mL Kultur benötigt.

4.6.3 Anzucht im Zulaufverfahren

Im Reaktor wurden die komplexen Medienkomponenten vorgelegt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde eine Reaktionstemperatur von 28 °C und ein pH von 6,0 eingestellt. Anschließend wurden die pO_2 -Elektrode und die Abgasanalytik kalibriert.

Von der Vorkultur wurden 400 mL Zellsuspension mit steriler Glukoselösung vereinigt und mittels einer Schlauchpumpe in den Reaktor gepumpt. Die Glukosekonzentration und die optische Dichte OD_{600} wurden während des Satzverfahrens stündlich gemessen. Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte mit Glukose Messstreifen (Glucoman, Roche-Diagnostics; Mannheim) mit einer unteren Nachweisgrenze von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (2 mmol L^{-1}).

Der Zeitpunkt für den Beginn des Zulaufverfahrens wurde aus dem Absinken der CO_2 -Konzentration in der Abluft und dem vollständigen Verstoffwecheln der vorgelegten Glukose bestimmt. Das Zulaufprofil der Glukose wurde anschließend manuell gestartet. Nach einer Gesamtprozessdauer von 48 h wurden die Zellen bei $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 4.800 g abzentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Während des Prozesses wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Enzymaktivitäten, OD_{600} , der gravimetrisch bestimmten Biotrockenmasse und zur Bestimmung der Gesamtaktivität entnommen. Die Konzentrationen an Ethanol, Glukose und Acetat wurden über HPLC bestimmt. Die Messwerte von pH, $p\text{O}_2$, CO_2 und O_2 sowie die eingestellte Begasungsrate und die Rührerdrehzahl wurden online aufgezeichnet.

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität der Zellen in Biotransformationsexperimenten wurden 50 mL Probe aus dem Reaktor entnommen, bei $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 4.800 g abzentrifugiert und in 20 mL Standardreaktionspuffer resuspendiert. Die Umsetzung erfolgte in Standardansätzen mit n-Butylacetat und 140 mmol L^{-1} 4Cl-ACE bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ über 20 h.

Im Standardverfahren wurde das CSL-Medium mit 25 g L^{-1} Glukose eingesetzt. Die maximal mögliche Dosierrate zu Beginn des Zulaufverfahrens lässt sich aus der Wachstumsrate μ und dem Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ des Satzverfahrens bestimmen. Die Wachstumsrate betrug $\mu = 0,22 \text{ h}^{-1}$ und der Ertragskoeffizient $Y_{X/S} = 0,20$. Damit ergibt sich für die spezifische Substrataufnahmerate q_s :

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X,S}} = \frac{0,22 \text{ h}^{-1}}{0,20 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}} = 1,1 \text{ g}_s \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (27)$$

Die maximale Dosierrate an Glukose berechnet sich dann aus der Biomasse und der spezifischen Substrataufnahmerate:

$$\frac{\dot{m}_{\text{Feed}}(t=0)}{V_R} = c_x \cdot q_s = 5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 1,1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = 5,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (28)$$

Um die im Satzverfahren auftretenden Nebenprodukte Acetat und Ethanol, sowie die im Maisquellwasser enthaltenen Kohlenstoffquellen im Zulaufverfahren vollständig metabolisieren zu können, wurde eine niedrige Anfangsdosierrate von $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glukose eingestellt. Das Dosierprofil verlief linear ansteigend über 32 h bis zu einem Wert von $4,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und wurde anschließend bis zum Ende des Prozesses nach 48 h konstant gehalten. Während des gesamten Zulaufverfahrens konnte mit den eingesetzten Glukosemessstreifen keine Akkumulation von Glukose im Medium nachgewiesen werden. Die Konzentration war somit kleiner als $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (2 mmol L^{-1}).

4.6.4 Herstellung lyophilisierter und acetongetrockneter Zellen

Zwei 15 mL Schüttelkolbenkulturen von *S. cerevisiae* mit einer $\text{OD}_{600} = 43$ wurden abzentrifugiert (10 min, 4.800 g), mit VE-Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Herstellung lyophilisierter Zellen wurde ein Ansatz in 5 mL VE-Wasser resuspendiert. Die Lösung wurde auf zwei Wägeschälchen verteilt und bei -50°C 48 h gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-2 Lyophilisator, Hanau).

Zur Herstellung acetongetrockneter Zellen wurde das Pellet in 15 mL Aceton (-20°C) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mittels einer Wasserstrahlpumpe abgenutscht und zweimal mit 15 mL eiskaltem Aceton und einmal mit 15 mL eiskaltem Diethylether gewaschen (Goodhue et al. 1986). Die Zellen wurden anschließend im Exsikkator getrocknet und bei -20°C zwei Tage bis zur Verwendung gelagert.

4.7 Biotransformation

Für die Biotransformationsversuche wurden die bei -20°C gelagerten Zellen langsam aufgetaut. Das Zellpellet wurde in VE-Wasser resuspendiert und zum Reaktionspuffer hinzu gegeben. Alle Umsetzungsversuche erfolgten unter insterilen Bedingungen.

4.7.1 Umsetzung im 0,5 mL-Maßstab

Für Umsetzungen im 0,5 mL-Maßstab wurden Deepwell Mikrotiterplatten mit quadratischen Vertiefungen („Square Well“) und 2 mL Gesamtvolumen verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 0,5 mL. Der Reaktionspuffer mit den Zellen und den zu testenden Substanzen wurde in den Vertiefungen vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des Substrates 4Cl-ACE gestartet. Die Platten wurden mit einem Deckel gasdicht verschlossen und auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Variomag Monoshake; H+P Labortechnik, Oberschleißheim) 20 h bei 25 °C und einer Schüttelfrequenz von 1500 min⁻¹ inkubiert.

4.7.2 Gesamtaktivitätsbestimmung

Für die Bestimmung der Gesamtaktivität der Zellen aus Schüttelkolben- und Stabilitäts-experimenten wurde 1 mL Zellsuspension abzentrifugiert (15.500 g) und in 0,5 mL Standardreaktionspuffer resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL (140 mmol L⁻¹) 4Cl-ACE und 30 µL n-Butylacetat gestartet. Die Inkubation erfolgte im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg; Abbildung 4.7.1) bei 25 °C über 20 h und einer Schüttelfrequenz von 1400 min⁻¹. Die Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte über eine Endpunktbestimmung.

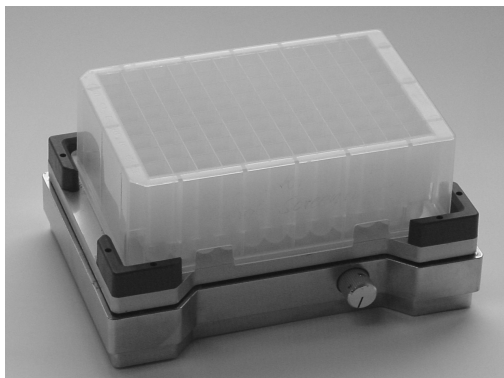


Abbildung 4.7.1: Links: Mikrotiterplattenschüttler mit Deepwell Mikrotiterplatte für parallel durchgeführte Parameterstudien mit 0,5 mL Reaktionsvolumen; während der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte luftdicht verschlossen; rechts: Thermomixer zur Bestimmung der Gesamtaktivität

4.7.3 Umsetzung im Kleinmaßstab ohne pH-Kontrolle

In Glaskolben mit einem Volumen von 20 - 50 mL wurden die Zellen im wässrigen Reaktionspuffer vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. In Experimenten mit

organischen Lösungsmitteln erfolgte die Zugabe von Substrat und Lösungsmittel zeitgleich. Die Kolben wurden mit einem Magnetrührstäbchen versehen und mit einem Glas- oder Kunststoffstopfen verschlossen. Die Inkubation erfolgte auf einem Mehrfachrührplatz mit induktivem Magnetantrieb (Variomag Poly, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) bei 800 min^{-1} . In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur gaschromatographischen Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentration genommen.

4.7.4 Standardansatz

Bei allen Versuchen im 0,5 mL-Maßstab, 20 mL-Maßstab und bei den Optimierungsexperimenten wurde ein Ansatz unter Standardbedingungen als Referenz durchgeführt. Dadurch konnte die Auswirkung der geänderten Parameter auf die Umsetzung unabhängig von der variierenden Qualität der eingesetzten Zellen beurteilt werden. Die Umsetzung erfolgte im Standardreaktionspuffer mit 170 mmol L^{-1} 4Cl-ACE und 10 % v/v n-Butylacetat (Phasenverhältnis¹ $\alpha = 0,1$). Die Inkubation erfolgte auf einem Mehrfachrührplatz mit induktivem Magnetantrieb (Variomag Poly, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) bei 800 min^{-1} . Bei Versuchen mit pH-Regelung wurde ein pH von 7,0 eingestellt.

4.7.5 Umsetzung im Kleinmaßstab mit pH-Kontrolle

Für Umsetzungen unter pH-kontrollierten Bedingungen wurden Glaskolben verwendet, die über einen GL 25 Anschluss zur Aufnahme einer pH-Elektrode und einem GL 14 Anschluss zur Probennahme und Zudosierung von Korrekturmittel verfügten. Der GL 14 Anschluss war dazu mit einem Silikonseptum versehen. Die Inkubation erfolgte wie unter 4.7.3 beschrieben. Die Größe der verwendeten Glaskolben richtete sich nach den experimentellen Rahmenbedingungen. Für die Optimierungsversuche wurden Kolben mit 25 mL Volumen eingesetzt. Für Experimente zur Charakterisierung der Reaktion, die aufgrund vermehrter Probennahme ein größeres Reaktionsvolumen erforderten, wurden Glaskolben mit 250 mL oder 500 mL Gesamtvolumen verwendet. Bei den Experimenten wurden die Zellen zunächst im Reaktionspuffer resuspendiert. Die Reaktion wurde nach Einstellung des gewünschten pH durch die Zugabe des Substrates gestartet.

¹ Das Phasenverhältnis α gibt das Verhältnis der Volumina von organischer Lösungsmittelphase und wässriger Phase an

Die pH-Regelung erfolgte durch das parallele Mikrodosiersystem FedBatch Pro (DASGIP, Jülich; Abbildung 4.7.2) mit 5 molarer NaOH als Korrekturmittel. Das Dosiersystem verfügt über 16 Anschlüsse für pH-Elektroden sowie über zwei Module mit jeweils 16 Kanälen. Die Module sind mit Schlauchquetschventilen bzw. Membranventilen ausgestattet. Da bei den Experimenten eine einseitige pH-Regelung ausreichte, stand die zweite Dosierstrecke zur Dosierung von Substrat zur Verfügung. Die Ansteuerung der einzelnen Kanäle erfolgte sequenziell. Die Dosierung des Titrationsmittels erfolgte über eine Präzisionskolbenpumpe. In einer Steuerungssoftware konnten die Dosierprofile für jeden einzelnen Kanal individuell definiert werden. Die pH-Regelung erfolgte durch die Software, wobei für jeden Kanal ein unterschiedlicher pH gewählt werden konnte.



Abbildung 4.7.2: Inkubationsschrank mit Kühl- und Heizfunktion und Mikrodosiersystem DASGIP FedBatch Pro

4.7.6 Biotransformationen im Zulaufverfahren

Für Biotransformationsexperimente im Zulaufverfahren wurde das parallele Dosiersystem FedBatch Pro verwendet. Mit einer Dosiereinheit wurde der pH geregelt, die zweite Dosiereinheit wurde für die Zugabe von Substratlösung verwendet.

Für Experimente mit Zelldosierung wurden die Zellen im Reaktionspuffer suspendiert und auf Eis gelagert. Über eine Kassettenpumpe 205A (Watson-Marlow) wurde die Lösung in das Reaktionsgefäß gepumpt.

4.8 Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einem genetischen Algorithmus

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden mit einem genetischen Algorithmus durchgeführt. Es wurde die Zusammensetzung von sechs Medienkomponenten (Glukose, Natriumchlorid, Kaliumphosphatpuffer, Triton X-100, 1-Buten-3-ol, n-Butylacetat) optimiert. Die Auswahl der Variablen und die Festlegung des Variablenraumes ist im Ergebnisteil erläutert. Die Optimierung wurde mit dem Programm GALOP (**G**enetic **A**lgorithms for the **O**ptimization of **P**rocesses) (IBT, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

Die Versuche erfolgten, wie unter 4.7.5 beschrieben, unter pH-kontrollierten Bedingungen in Satzversuchen mit 20 mL Reaktionsvolumen (Abbildung 4.8.1).

Pro Generation wurden 14 parallele Versuchsansätze durchgeführt. Ab der fünften Generation wurde ein Referenzansatz unter Standardbedingungen mit n-Butylacetat mitgeführt. Die Bestimmung der S-CHBE-Konzentration und des Enantiomerenüberschusses erfolgte nach 20 h Reaktionszeit durch Doppelbestimmungen.

Jede der sechs untersuchten Medienkomponenten wurde über einen 7 Bit langen String, entsprechend 128 Konzentrationslevels, kodiert. Die Wahrscheinlichkeit für Punktmutationen betrug 5 %, die Wahrscheinlichkeit für ein Einzelpunktcrossover 95 %. Zielfunktionen waren die Steigerung der Produktkonzentration und des Enantiomerenüberschusses, die gleich gewichtet wurden. Unter diesen Bedingungen wurde das Pareto-Optimum gesucht. Bei dem Pareto-Optimum lässt sich keine Zielgröße weiter steigern, ohne dass die jeweils andere Zielgröße negativ beeinflusst wird.

Als Selektionsverfahren wurde „Keep Best, Ball Roulette on Rest“ gewählt. Die Parameterkombination des besten Versuchsansatzes einer jeden Generation wurde unverändert in die Nachfolgeneration übernommen.



Abbildung 4.8.1: Versuchsanordnung bei Optimierungsversuchen in pH-kontrollierten 20 mL Ansätzen; die Durchmischung erfolgte mit Magnetrührstäbchen auf einem induktiven Mehrfachrührplatz (Variomag Poly, H+P); die pH-Regelung erfolgte über das FedBatch Pro System (DASGIP)

4.9 Umsetzungen im Rührkesselreaktor

Für Versuche zur Maßstabsvergrößerung wurde der Laborfermenter KLF 2000 der Firma Bioengineering (Wald/Schweiz) eingesetzt (Abbildung 4.12.2).

Der Reaktor verfügt über einen Glaszylinder mit 2 L Füllvolumen und vier Strombrechern. Die Durchmischung erfolgt mit drei 6-blättrigen Scheibenrührern mit einem Durchmesser von 33 mm. Der Antrieb erfolgte durch einen unterseitig montierten Motor, der Drehzahlen bis 1750 min^{-1} ermöglicht. Im Reaktorboden befinden sich Sterildurchführungen für die Probenahme, Temperaturmessung, einem Heizstab und einem Kühlfinger zur Temperaturkontrolle. Der Deckel verfügt über eine Durchführung für die pH-Elektrode sowie Anschlüsse für die Zugabe von Korrekturmittel. Die Regelung von Temperatur, pH und Motordrehzahl erfolgte über eine externe Steuereinheit.

Für die Umsetzungsversuche wurden die Zellen im wässrigen Reaktionspuffer (Kaliumphosphatpuffer mit Glukose und Natriumchlorid) resuspendiert und in den Reaktor gegeben. Die Lösung wurde im Reaktor auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert und der pH mit 5 molarer Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Cofaktoren NAD und NADP. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Substrat und den restlichen Komponenten (Triton X-100, n-Butylacetat, 1-Buten-3-ol in unterschiedlichen Zusammensetzungen) gestartet. Die genauen Reaktionsbedingungen sind im Ergebnisteil dargestellt.

Die Umsetzung erfolgte ohne Begasung bei geschlossenem Reaktor, um den Verlust an n-Butylacetat zu minimieren.

4.10 Stabilitätsversuche

In Stabilitätsversuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Reaktionsbedingungen und Medienkomponenten in Abwesenheit von Substrat auf die Zellstabilität von *S. cerevisiae* untersucht. Für die Versuche wurden gerührte Versuche im Satzverfahren mit 50 - 100 mL Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Zellen wurden im Reaktionspuffer resuspendiert und bei 25 °C auf einem Magnetrührer inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung der Biotrockenmasse, Proteinkonzentration, Enzymaktivitäten, Vitalfärbung und der katalytischen Gesamtaktivität genommen. Die detaillierten Reaktionsbedingungen sind im Ergebnisteil beschrieben.

4.11 Messgrößen

In den Umsetzungsversuchen wurde in regelmäßigen Abständen die Konzentration an Substrat und Produkt gemessen. Der zeitliche Verlauf der Produktkonzentration kann zur besseren Visualisierung mit einer Sigmoidalfunktion beschrieben werden, für die im Allgemeinen Fall gilt:

$$y = \frac{a - d}{1 + e^{\left(\frac{x-b}{c}\right)}} + d \quad (29)$$

a y-Wert am Kurvenanfang ($x \rightarrow -\infty$)

d y-Wert am Kurvenende ($x \rightarrow \infty$)

b, c y- bzw. x-Koordinate des Wendepunktes

Für den hier betrachteten Fall der Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer ist x die Reaktionszeit, y die Konzentration des Produktes zum jeweiligen Zeitpunkt und d die Produktkonzentration nach unendlicher Reaktionsdauer. Ist die Reaktion innerhalb des Beobachtungszeitraumes abgeschlossen, so ist die Variable d der Produktkonzentration am Ende der Reaktion gleichzusetzen.

Die Schätzung der Kurvenparameter a , b , c und der Produktkonzentration c_{Produkt} erfolgte mit dem in Excel implementierten Solver unter Minimierung der Fehlerquadratsumme zwischen gemessenen und geschätzten Konzentrationen.

Liegt eine Reaktion erster Ordnung vor, so ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeit r nach:

$$r = r_0 \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad (30)$$

mit r_0 der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Die Schätzung der Parameter k_i und r_0 erfolgte durch Minimierung der quadratischen Fehlerabweichung zwischen der nach (29) und (30) geschätzten Reaktionsgeschwindigkeit. Die Überprüfung der Reaktionsordnung erfolgte durch die halblogarithmische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit r gegen die Zeit. Bei einer Reaktion erster Ordnung ergibt sich in dieser Darstellung ein linearer Zusammenhang.

Ist die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf eine Deaktivierung des Biokatalysators zurückzuführen, kann zur Beschreibung der Haltbarkeit des Katalysators die Halbwertszeit verwendet werden. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ gibt die Zeit an, nach der der Biokatalysator über die Hälfte der Anfangsaktivität verfügt (Bommarius et al. 2004):

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_i} \quad (31)$$

Aus den gemessenen Produkt- und Substratkonzentrationen wurde der Enantiomerenüberschuss, Ausbeute, Umsatz, Selektivität, Raumzeitausbeute und die Produktbildungskapazität berechnet.

Der Enantiomerenüberschuss ist ein Maß für die Enantiomerenreinheit des Produktes:

$$EE = \frac{c_{S\text{-Alkohol}} - c_{R\text{-Alkohol}}}{c_{S\text{-Alkohol}} + c_{R\text{-Alkohol}}} \cdot 100 [\%] \quad (32)$$

Die Ausbeute A beschreibt das Verhältnis aus Produkt zum Zeitpunkt t und der Einsatzmenge des Substrates:

$$A = \frac{n_{S\text{-Produkt}, t}}{n_{\text{Substrat}, t=0}} \cdot 100 [\%] \quad (33)$$

Der Umsatz U des Substrates ist das Verhältnis aus umgesetztem Substrat zum Zeitpunkt t und der Einsatzmenge des Substrates:

$$U = \frac{n_{\text{Substrat}, t=0} - n_{\text{Substrat}, t}}{n_{\text{Substrat}, t=0}} \cdot 100 [\%] \quad (34)$$

Wenn Nebenreaktionen auftreten und kein stöchiometrischer Umsatz des Substrates zum gewünschten Produkt vorliegt, reicht die Angabe von Ausbeute und Umsatz nicht aus. Zur Beschreibung wird die Selektivität S verwendet, die sich aus dem Quotienten von Ausbeute und Umsatz zum Zeitpunkt t ergibt:

$$S = \frac{n_{S\text{-Alkohol}, t=t}}{n_{\text{Substrat}, t=0} - n_{\text{Substrat}, t=t}} \cdot 100 [\%] = \frac{A}{U} \cdot 100 [\%] \quad (35)$$

Die Ausbeute und der Umsatz einer Reaktion werden nicht nur durch die eingesetzte Substratkonzentration bestimmt, sondern hängen wesentlich von der eingesetzten Konzentration und Aktivität des Biokatalysators ab. Aus dem Quotienten von Produktkonzentration und Biokatalysatorkonzentration ergibt sich die Produktbildungskapazität PBK der Zellen. Diese ist ein Maß für die Aktivität der Zellen unter den gewählten Reaktionsbedingungen:

$$PBK = \frac{n_{S\text{-Alkohol}}}{m_{BTM}} \left[\text{mmol} \cdot \text{g}_{BTM}^{-1} \right] \quad (36)$$

Die Raumzeitausbeute RZA verbindet die Menge an Produkt n , die innerhalb eines bestimmten Zeitintervalles t in einem Reaktionsvolumen V_R erreicht werden kann:

$$RZA = \frac{n_{S\text{-Alkohol}, t=t}}{V_R \cdot t} \left[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \right] \quad (37)$$

4.12 Bestimmung der Tropfengrößenverteilung

Die Bestimmung der Tropfengrößenverteilung wurde für das optimierte Reaktionsmedium durchgeführt. Der Sauterdurchmesser wurde aus zwei unterschiedlichen Modellen theoretisch abgeleitet. Experimentell wurde die Tropfengrößenverteilung im Rührkesselreaktor bestimmt.

4.12.1 Modellanpassung

Zur Berechnung des Sauterdurchmessers anhand der Modellvorstellungen (Kapitel 3.12) müssen die Viskositäten, Dichten und Grenzflächenspannungen der Phasen bekannt sein. Die Bestimmung der Grenzflächenspannung von Tensidlösungen konnte mit den zur Verfügung stehenden Messapparaturen nicht durchgeführt werden, so dass auf die Berechnung für Reaktionssysteme mit Triton X-100 verzichtet wurde.

Folgende Zweiphasensysteme wurden untersucht:

1. Reaktionspuffer ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$ Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0; $0,19 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl; $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ Glukose; 0,8 % v/v 1-Buten-3-ol) – n-Butylacetat
2. Reaktionspuffer – n-Butylacetat mit 12,4 % v/v 4Cl-ACE

Die beiden Zweiphasensysteme wurden in jeweils einem 100 mL Glaskolben auf einem Magnetrührer mehrere Stunden bei $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ intensiv durchmischt. Anschließend wurden die Proben weitere 20 h bis zur vollständigen Phasentrennung temperiert. Die Inkubationsdauer garantiert das Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichtes. Für die Berechnung des Sauterdurchmesser wurden für diese beiden Systeme die Grenzflächenspannung, die Dichte und die Viskosität bestimmt.

4.12.2 Grenzflächenspannung

Die Bestimmung der Grenzflächenspannung erfolgte nach der Ring-Methode von Du Noüy mit einem Tensiometer K10 der Firma Krüss (Hamburg). Bei diesem Messprinzip wird ein Platinring mit einem definierten Durchmesser in die untere Phase des Zweiphasensystems eingetaucht. Anschließend wird der Ring langsam herausgezogen, wobei sich eine Flüssigkeitslamelle unterhalb des Rings ausbildet. Der dabei aufzuwendenden Kraft wirkt das hydrostatische Gewicht der Flüssigkeitslamelle und die Grenzflächenspannung entgegen. Bei Überschreiten einer kritischen Kraft reißt die Flüssigkeitslamelle ab.

Das Messgerät ist auf Wasser geeicht, so dass für andere Stoffsysteme eine entsprechende Korrektur für die Masse der Flüssigkeitslamelle durchgeführt werden muss. Die Korrektur erfolgte für das verwendete Tensiometer nach folgender Gleichung:

$$F = 0,725 + \left[0,4036 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{\sigma^*}{\Delta\rho} \right) + 0,0128 \right]^{0,5} \quad (38)$$

mit dem Korrekturfaktor F , der Dichtedifferenz $\Delta\rho$ der beiden Phasen und σ^* dem vom Tensiometer angezeigten Messwert. Die Berechnung der tatsächlichen Grenzflächenspannung erfolgt dann über die Beziehung $\sigma = \sigma^* \cdot F$, wobei σ die tatsächliche Grenzflächenspannung darstellt.

Die Messmethode ist für Flüssigkeiten hoher Dichtedifferenz geeignet. Tensidlösungen sind für dieses Messprinzip ungeeignet.

Zur Messung der Grenzflächenspannung wurde aus der unteren wässrigen Phase mit Hilfe einer Pipette vorsichtig Flüssigkeit abgezogen, ohne dabei die Phasengrenzfläche zu zerstören. Die wässrige Phase wurde in ein Glasgefäß zur Messung der Grenzflächenspannung gegeben. Der Platinring wurde vollständig in die flüssige Phase eingetaucht, anschließend wurde die organische Phase über die wässrige Phase geschichtet. Nach Durchführung der Messung wurden die Flüssigkeiten verworfen und der Platinring sowie das Glasgefäß abgeflammt, um Rückstände zu beseitigen. Die Messungen wurden für jedes System mindestens dreifach durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

4.12.3 Dichtebestimmung

Die Bestimmung der Dichte der Phasen erfolgte nach dem Biegeschwingprinzip mit dem Messgerät DMA 35N (Anton Paar, Graz/Österreich). Dabei wird ein hohles Glasrohr mit der Flüssigkeit befüllt, von der die Dichte bestimmt werden soll. Das Glasrohr wird zu Schwingungen angeregt, dessen Frequenz ein Maß für die Dichte der Flüssigkeit ist. Bei der Messung erfolgt eine Temperaturkompensation. Alle Messungen wurden mindestens dreifach durchgeführt.

4.12.4 Viskositätsmessung

Die Messung der Viskosität erfolgte mit einem Kapillarviskosimeter (Ubbelohde-Viskosimeter, Schott Instruments, Mainz). Abhängig vom untersuchten Stoffsystem wurden verschiedene

Kapillaren eingesetzt (Tabelle 4.12.1). Die Durchflusszeit t in Sekunden wurde elektronisch gemessen und der Mittelwert aus drei Messungen bestimmt.

Tabelle 4.12.1: Verwendete Kapillaren und Korrekturfaktoren zur Viskositätsmessung

Stoffsystem	Kapillare	Korrekturfaktor k
Reaktionspuffer	1	$10,09 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$
n-Butylacetat	0a	$4,866 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$
n-Butylacetat/4Cl-ACE	0b	$4,952 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$

Die kinematische Viskosität berechnet sich nach $\eta = \rho \cdot k \cdot t$. Die experimentell bestimmten Stoffdaten für die untersuchten Zweiphasensysteme sind in Tabelle 4.12.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.12.2: Experimentell bestimmte Stoffdaten der untersuchten Zweiphasensysteme bei Umgebungsdruck, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; die Standardabweichungen bei der Dichte waren $< 1 \%$ und bei der Viskositätsbestimmung $< 0,01 \%$

	Puffer - n-Butylacetat		Puffer - n-Butylacetat/4Cl-ACE	
	Wässrige Phase	Organische Phase	Wässrige Phase	Organische Phase
Dichte ρ	$1092,2 \text{ kg m}^{-3}$	$883,3 \text{ kg m}^{-3}$	$1091,0 \text{ kg m}^{-3}$	$924,8 \text{ kg m}^{-3}$
Kin. Viskosität η	$1,218 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$0,787 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$1,218 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$0,927 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
Grenzflächen- spannung σ	$13,6 \text{ mN m}^{-1}$ ($\pm 0,5 \text{ mN m}^{-1}$)		$12,6 \text{ mN m}^{-1}$ ($\pm 0,01 \text{ mN m}^{-1}$)	

4.12.5 Messung der Tropfengrößenverteilung im Rührkesselreaktor

Die Bestimmung der Tropfengrößenverteilung im Rührreaktor erfolgte mit der 3D-ORM Sonde (Optical Reflectance Measurement) der Firma MTS Düsseldorf. Messprinzip dieser Sonde ist die dreidimensionale optische Rückreflexion. Die Konstruktionsweise ermöglicht die *in situ* Online-Messung von Tropfengrößen im Rührreaktor. Die Sonde ist sterilisierbar und kann so auch unter sterilen Bedingungen eingesetzt werden. Der Messbereich der Sonde beträgt $10 \text{ } \mu\text{m}$ bis $1000 \text{ } \mu\text{m}$. Das Messsystem ist in Abbildung 4.12.1 schematisch dargestellt, den verwendeten Rührreaktor mit eingebauter Sonde zeigt Abbildung 4.12.2.

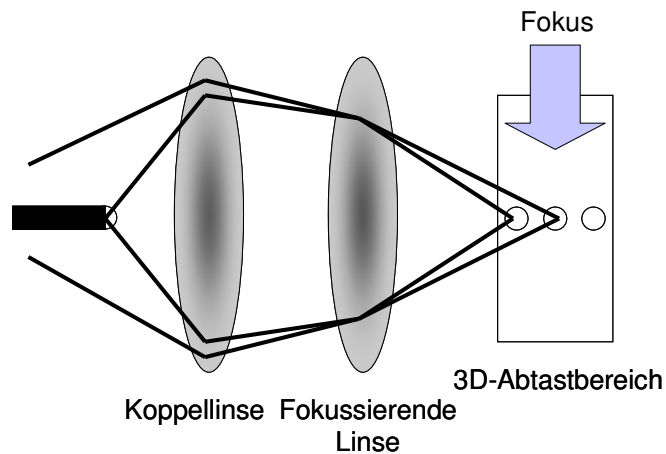


Abbildung 4.12.1: Funktionsweise der 3D-ORM Sonde zur Tropfengrößenbestimmung

Das Licht wird von einer Laserdiode erzeugt und über einen Lichtwellenleiter in den Messsensor geleitet. Das Licht durchläuft eine Koppellinse und nachfolgend eine rotierende Optik, die das Licht fokussiert. Die rotierende Optik ermöglicht ein Verschieben des Fokus in der Messprobe, so dass ein dreidimensionaler Abtastbereich erfasst wird. Befindet sich ein Tropfen im Fokus der Sonde, so wird das Licht reflektiert, der Strahlengang des reflektierten Lichtes folgt dem des eingestrahnten Lichtes und wird von einem in der Optik integrierten Fotosensor erfasst. Befindet sich ein Tropfen außerhalb des Fokus, so geht das reflektierte Licht an der Optik vorbei und kann nicht detektiert werden. Die Tropfengrößenverteilung wird von der Software aufgezeichnet.

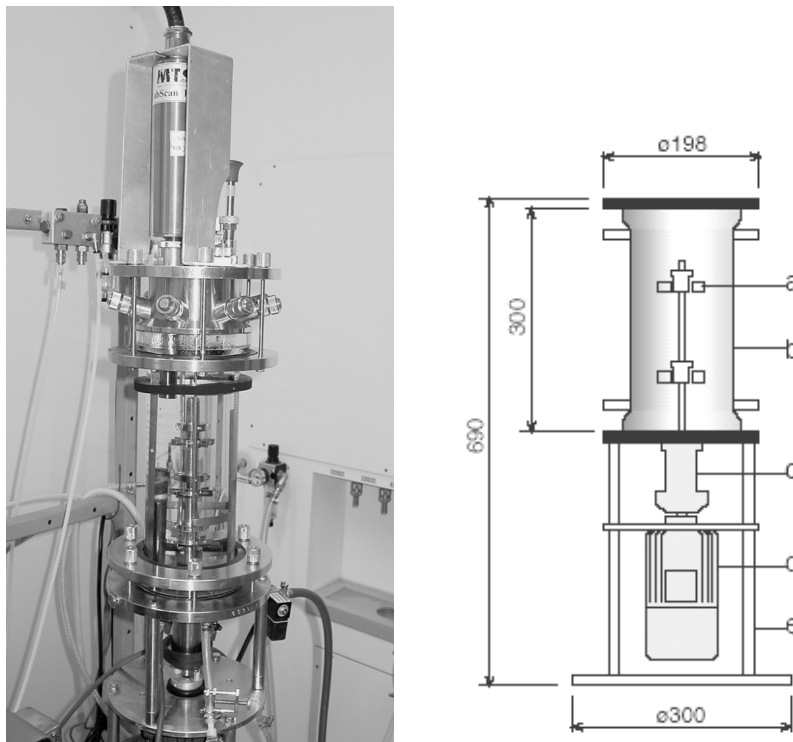


Abbildung 4.12.2: Rührkesselreaktor KLF 2000 mit eingesetzter 3D-ORM Sonde zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilung und für Versuche zur Maßstabsvergrößerung; rechts: Aufbau des KLF 2000 (in mm); a: Scheibenrührer; b: Glaszylinder; c: Kupplung; d: Motor; e: Gestell

Die Tropfengrößenverteilungen wurden im zellfreien System bestimmt, dabei wurden die in Kapitel 4.12 beschriebenen Medien verwendet.

Es wurden 800 mL wässriger Reaktionspuffer und 400 mL organische Lösungsmittelphase (Gesamtvolumen 1,2 Liter, Phasenverhältnis $\alpha = 0,5$) eingesetzt. Die Rührerdrehzahl wurde zwischen 500 min^{-1} ($0,1 \text{ W L}^{-1}$) und 1500 min^{-1} (10 W L^{-1}) variiert. Die Werte für den Leistungseintrag in den Reaktor wurden aus Hünnekes (1994) entnommen. In der ersten Versuchsreihe wurde als organische Lösungsmittelphase reines n-Butylacetat eingesetzt. In der zweiten Versuchsreihe wurden 52 mL 4Cl-ACE zugegeben, in der dritten Versuchsreihe wurden zusätzlich 52 mL Triton X-100 zugegeben. Nach Einstellen einer neuen Rührerdrehzahl wurde 30 – 60 min bis zum Einstellen des Beharrungszustandes abgewartet. Über diesen Zeitraum hinaus wurde keine signifikante Änderung der Tropfengrößenverteilung festgestellt.

Das Messintervall zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilung wurde softwareseitig auf den maximalen Wert von 60 Sekunden eingestellt. Die Verteilungen aus insgesamt mindestens 10 Messintervallen à 60 Sekunden (Gesamtmessdauer 6 min) wurden gemittelt und für die Berechnung des Sauterdurchmessers verwendet.

4.13 Analytische Methoden

4.13.1 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2 mL Zellsuspension in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit bekanntem Leergewicht überführt und 10 min bei 25.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 mL VE-Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen.

4.13.2 Optische Dichte

Die optische Dichte OD_{600} wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm im Küvettenphotometer Spectronic 1001 (Bausch und Lomb, New York/USA) bestimmt. Die Proben wurden mit VE-Wasser so verdünnt, dass die gemessene OD_{600} zwischen 0,1 und 0,4 lag. Für das Verhältnis aus OD_{600} und der gravimetrisch bestimmten Biotrockenmasse gilt: $g_{BTM} (g L^{-1}) = 0,24 \cdot OD_{600}$.

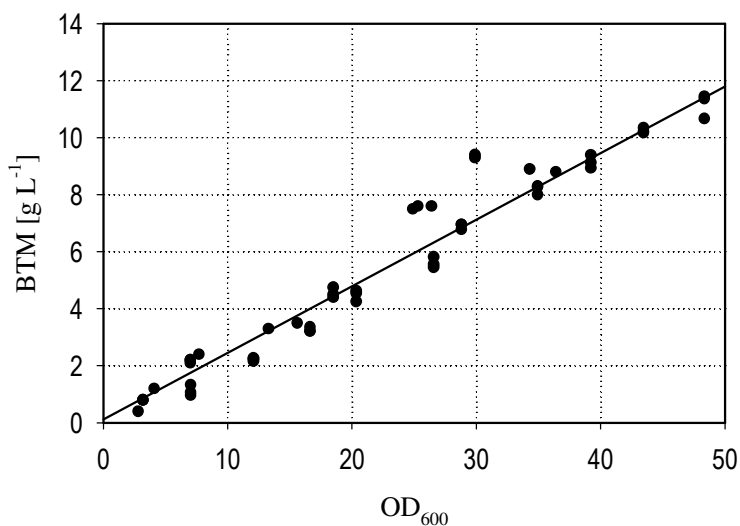


Abbildung 4.13.1: Beziehung zwischen OD_{600} und Biotrockenmasse (in $g L^{-1}$) für *S. cerevisiae* aus vier unabhängigen Experimenten

4.13.3 Zellaufschluss

2 mL einer Zellsuspension wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bei +4 °C und 25.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde einmal mit 1 mL Zellaufschlusspuffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in 1 mL Zellaufschlusspuffer resuspendiert. In das Reaktionsgefäß wurden ca. 500 µL Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,4 – 0,6 mm gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Kugelschwingmühle MM200 (Retsch, Hahn) bei maximaler Schüttelfrequenz von 30 s⁻¹ über 5 min. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und der Enzymaktivitäten eingesetzt.

4.13.4 Aktivitätsbestimmung im Überstand

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Gesamtproteingehaltes im Überstand wurden die Zellen abzentrifugiert und die organische Lösungsmittelphase abgenommen. Für die Messungen wurde die wässrige Phase ohne weitere Behandlung eingesetzt.

4.13.5 Gesamtproteingehalt

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford. Die Messungen wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer in Mikrotiterplatten mit flachem Boden („flat bottom“) durchgeführt. Die Kalibrierung wurde mit Standards aus BSA (Bovines Serum Albumin) mit 0,25 g L⁻¹, 0,5 g L⁻¹, 0,75 g L⁻¹ und 1,0 g L⁻¹ im Zellaufschlusspuffer durchgeführt.

Für die Messungen wurden 200 µL Bradford-Reagenz in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Von der zu vermessenden Probe wurden 10 µL zugegeben, mit der Pipette durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nullwert wurden 10 µL Zellaufschlusspuffer eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

4.13.6 Bestimmung der Carbonylreduktase-Aktivität

Die Reduktion von 4Cl-ACE durch die Carbonylreduktase erfolgt unter Verbrauch von NADPH. Die Konzentration an NADPH kann photometrisch über die Absorption bei 340 nm bestimmt werden. Die Aktivität wurde aus der zeitlichen Änderung der Absorption bestimmt.

Aus dem Extinktionskoeffizienten für NADPH bei 340 nm und dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für die Aktivität aus der Änderung der Absorption:

$$EA_{vol} = 2995 \cdot \frac{\Delta\epsilon}{\Delta t} \quad (39)$$

mit der volumetrischen Aktivität EA_{vol} in $U L^{-1}$, $\Delta\epsilon$ der Änderung der Absorption und Δt der Reaktionszeit in Minuten. Die spezifischen Aktivitäten bezogen auf den Gesamtproteingehalt berechnen sich nach $EA_{spez} = EA_{vol} / c_{Protein}$.

Die Messung erfolgte in Mikrotiterplatten. In jede Vertiefung wurden 20 μL NADPH Puffer und 160 μL Messpuffer vorgelegt. Von der zu vermessenden Probe wurden 20 μL zugegeben, die Probe wurde durchmischt und sofort bei 30 °C vermessen. Die Absorptionsänderung wurde über 10 min alle 30 Sekunden aufgezeichnet. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte aus dem linearen Abschnitt der Absorptionsänderung über der Zeit. Von jeder Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.13.7 Bestimmung der Glukosedehydrogenase-Aktivität

Die Glukosedehydrogenase setzt Glukose zu Glukonolakton unter Bildung von NADPH um. Die Bestimmung der Enzymaktivität basiert auf der photometrischen Bestimmung der zeitlichen Änderung der Absorption bei 340 nm, wobei hier die Zunahme der Absorption in Folge der NADPH-Bildung gemessen wurde.

Von dem GDH Aktivitätspuffer wurden in Mikrotiterplatten 50 μL vorgelegt und die Messung durch Zugabe von 50 μL Probe gestartet. Die Absorption wurde 10 min alle 30 Sekunden aufgezeichnet. Anhand des linearen Abschnittes der Absorptionsänderung über der Zeit wurde die Aktivität gemäß Gleichung (39) berechnet.

4.13.8 Lebendzellfärbung

Die Viabilitätsbestimmung der Zellen erfolgte durch das Anfärben mit Methyleneblau. Vitale Zellen reduzieren das Methyleneblau und sind farblos, während inaktive Zellen blau angefärbt werden.

Gesättigte Methyleneblaulösung (in 96 % Ethanol)	1 % v/v
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2	0,1 mmol L ⁻¹

Die Zellen wurden mit VE-Wasser verdünnt auf einem Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Anfärbung erfolgte durch Zugabe eines Tropfens Methyleneblaulösung am Rande des Deckgläschens. Unter dem Mikroskop wurde das Verhältnis vitaler zu inaktiven Zellen bestimmt.

4.13.9 Probenaufarbeitung für die chirale Gaschromatographie

In ein 2 mL Reaktionsgefäß wurden 100 µL 45 % Phosphorsäure und ca. 200 µL Glasperlen (0,4 – 0,6 mm) vorgelegt und 0,5 mL Probe zugegeben. Die Konzentrationen der Substrate und Produkte wurden immer für den Gesamtansatz bestimmt. Die Extraktion erfolgte mit 1 mL Ethylacetat und intensiver Durchmischung in einer Retsch Kugelschwingmühle bei 30 s⁻¹ für 10 min. Durch das Absenken des pH wird die Reaktion abgestoppt und die Extraktionsleistung gesteigert. Die Glasperlen führen zum Zellaufschluss und zur Freisetzung von intrazellulärem Substrat und Produkt.

Die Proben wurden anschließend zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (15.500 g, 5 min). In einem GC-Vial wurden 400 µL mit Calciumchlorid getrocknetes Ethylacetat vorgelegt und dazu 100 µL Überstand der Probe hinzugegeben. Das Vial wurde gasdicht verschlossen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

4.13.10 Chirale Gaschromatographie

Die Konzentrationen der Ketone und der Alkohole wurden über eine chirale Gaschromatographie gemessen. Als Gaschromatograph wurde der CP-3800 (Varian, Palo Alto, USA) mit dem Autosampler Combi Pal sowie ein Gaschromatograph HP 5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) mit einem Autosampler HP 6890 eingesetzt. Es wurden zwei unterschiedliche chirale

Säulen, die Chiraldex G-TA (Astec, Whippany, USA) mit einer Länge von 20 m, und einem Innendurchmesser von 0,25 mm und die Lipodex E (Macherey Nagel, Düren), Länge 25 m, ID 0,32 mm, jeweils mit einer methyl-deaktivierten Vorsäule (Länge 5 m, ID 0,32 mm) eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung von 4Cl-ACE, S/R-CHBE

Methode 1

Injektor: Split 1:50, 250 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Säule: Chiraldex G-TA
Trägergas: Helium 5.0, 0,7 mL min⁻¹
Temperaturprofil: 80 °C für 1 min → Steigerung auf 115 °C mit 15 °C min⁻¹; 5 min bei 115 °C → Steigerung auf 121 °C mit 2 °C min⁻¹ → Steigerung auf 150 °C mit 15 °C min⁻¹; 20 min bei der Temperatur halten
Detektor: FID, 250 °C

Methode 2

Injektor: Split 1:30, 250 °C
Injektionsvolumen: 0,5 µL
Säule: Lipodex E
Trägergas: Helium 5.0, 0,9 mL min⁻¹
Temperaturprofil: 110 °C für 20 min → Steigerung auf 200 °C mit 15 °C min⁻¹; 10 min bei 200 °C halten
Detektor: FID, 250 °C

Als interner Standard wurden 8,3 mmol L⁻¹ Acetophenon eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung von EBA, S/R-HPPE

Methode 1

Injektor: Split 1:50, 250 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Säule: Chiraldex G-TA

Trärgas:	Helium 5.0, 0,7 mL min ⁻¹
Temperaturprofil:	100 °C für 35 min → Steigerung auf 150 °C mit 15 °C min ⁻¹ ; 10 min bei 150 °C halten
Detektor:	FID, 250 °C

Methode 2

Injektor:	Split 1:30, 250 °C
Injektionsvolumen:	0,5 µL
Säule:	Lipodex E
Trärgas:	Helium 5.0, 5 mL min ⁻¹
Temperaturprofil:	110 °C für 30 min → Steigerung auf 200 °C mit 15 °C min ⁻¹ ; 15 min bei 110 °C halten
Detektor:	FID, 250 °C

Als interner Standard wurden 3,0 mmol L⁻¹ 4-Chlor-Acetophenon eingesetzt.

4.13.11 Probenaufarbeitung für die HPLC

Die Probe wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei +4 °C und 50.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Ausschlussgröße von 0,2 µm filtriert. Die Probe wurde anschließend gegebenenfalls mit VE-Wasser verdünnt, in ein Glasvial gegeben und gasdicht verschlossen.

4.13.12 HPLC

Die Bestimmung von Glukose, Ethanol und Acetat wurden mit einer Agilent 1100 (Agilent, Palo Alto, USA) durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Aminex HPX 87H Ionenausschluss-Säule, 300 mm × 7,8 mm (Biorad, Hercules, Kanada) eingesetzt. Folgende Methode wurde angewendet:

Injektionsvolumen:	10 µL
Eluent:	5 mmol L ⁻¹ H ₂ SO ₄
Flussrate:	0,7 mL min ⁻¹
Temperatur:	50 °C

Detektor: UV/Vis, 190 nm
RI-Detektor, 600 nm

Die Kalibrierung erfolgte mit 0,16 % bis 5 % v/v Ethanol ($27 - 860 \text{ mmol L}^{-1}$) und Acetat ($28 - 880 \text{ mmol L}^{-1}$) sowie mit $0,78 \text{ g L}^{-1}$ bis 25 g L^{-1} ($4 - 140 \text{ mmol L}^{-1}$) Glukose. Glukose und Acetat konnten mit dem UV/Vis-Detektor gemessen werden. Ethanol ergab nur im RI-Detektor ein Signal.

4.13.13 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von 4Cl-ACE und S-CHBE wurden 10 mL des optimierten Reaktionspuffers ohne 1-Buten-3-ol und Triton X-100 mit 10 mL n-Butylacetat und 100 μL 4Cl-ACE bzw. S-CHBE in einen 50 mL Erlenmeyerkolben gegeben und mit einem Glasstopfen gasdicht verschlossen. Die Ansätze wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Rührerdrehzahl von 2000 min^{-1} auf einem Mehrfachrührerplatz Variomag Poly 12 h inkubiert. Damit sich ein Gleichgewicht der Phasen einstellen konnte, wurden die Ansätze ohne Durchmischung für weitere 12 h inkubiert. Aus der n-Butylacetat Phase wurden 100 μL entnommen und in 400 μL getrocknetes n-Butylacetat überführt. Die wässrige Phase wurde mit äquivalentem Volumen n-Butylacetat extrahiert. Anschließend wurde die n-Butylacetat Phase 1:5 v/v in getrocknetem n-Butylacetat verdünnt. Die Konzentrationen wurden gaschromatographisch bestimmt. Die Verteilungskoeffizienten k für die Komponenten ergeben sich aus dem Verhältnis der Konzentration in der organischen Phase zur Konzentration in der wässrigen Phase.

5 Asymmetrische Reduktion von 4Cl-ACE mit *S. cerevisiae*

Die reaktionstechnischen Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester gliedern sich in folgende Abschnitte:

- Optimierung der Anzuchtbedingungen mit Hinblick auf eine hohe Reduktionsaktivität
- Identifikation geeigneter Variablen für die Optimierung
- Optimierung der Reaktionsbedingungen mit einem genetischen Algorithmus zur Maximierung der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses
- Maßstabsvergrößerung vom 150 mL-Kleinansatz in den 0,5 – 1,2 L Rührkesselreaktor
- Charakterisierung von Einflussgrößen auf die Zellstabilität und die Auswirkung auf die Umsetzung

Alle Versuche wurden mit dem rekombinanten Stamm von *S. cerevisiae* durchgeführt.

5.1 Optimierung der Anzuchtbedingungen

Ausgangspunkt für die Optimierung der Anzuchtbedingungen war die unbefriedigende Zellqualität, wenn die Anzucht von rekombinanten *S. cerevisiae* unter Standardbedingungen im CSL-Medium durchgeführt wurde. Mit Zellen aus Schüttelkolbenkulturen betrug der Enantiomerenüberschuss unter Standardbedingungen nur 82 – 84 % bei einer Produktbildungskapazität von 1,7 mmol g⁻¹. Zellen, die mit diesem Medium im 5 L-Maßstab im Zulaufverfahren angezogen wurden, wiesen eine vergleichbare Qualität auf.

Die Anzuchtbedingungen waren so zu wählen, dass die Expression R-spezifischer Enzyme möglichst gering war. Die Expression der Alkoholdehydrogenase sollte sich durch eine Reduzierung der Glukosekonzentration und eine aerobe Reaktionsführung minimieren lassen. Ein weiteres R-spezifisches Enzym ist die Laktatdehydrogenase. Um die Induktion der Laktatdehydrogenase zu reduzieren, sollte das Anzuchtmedium möglichst kein Laktat enthalten. Laktat ist ein wesentlicher Bestandteil des Maisquellwassers (CSL), so dass zuerst der Einfluss von Maisquellwasser im Anzuchtmedium auf den Enantiomerenüberschuss untersucht wurde.

5.1.1 Wachstum auf CSL-Medium im Schüttelkolben

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Maisquellwasser (CSL) auf die Zellqualität untersucht. Bei einer im Vergleich zum

Standardansatz reduzierten Glukosekonzentration von 10 g L^{-1} wurden 0 %, 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % v/v Maisquellwasser eingesetzt. Nach vier Tagen Inkubationsdauer stieg mit zunehmender Konzentration an Maisquellwasser die OD_{600} von 15 auf 30 an. Der Anstieg des Ertragskoeffizienten $Y_{X/S, \text{Glukose}}$ von $0,4 \text{ g g}^{-1}$ auf $0,8 \text{ g g}^{-1}$ ist auf die im Maisquellwasser enthaltenen C-Quellen (Zucker, Laktat) und Nährstoffe (Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente) zurückzuführen.

Bei den anschließend durchgeführten Umsetzungsversuchen zur Bestimmung der Gesamtaktivität zeigte sich, dass die Produktbildungskapazität für alle im CSL-Medium angezogenen Zellen mit $2,0 - 2,2 \text{ mmol g}^{-1}$ annähernd identisch war. Nur bei Zellen aus CSL-freiem Medium war die Produktbildungskapazität deutlich höher (Abbildung 5.1.1). Der Enantiomerenüberschuss nahm mit steigender CSL-Konzentration von 92 % auf 87 % ab.

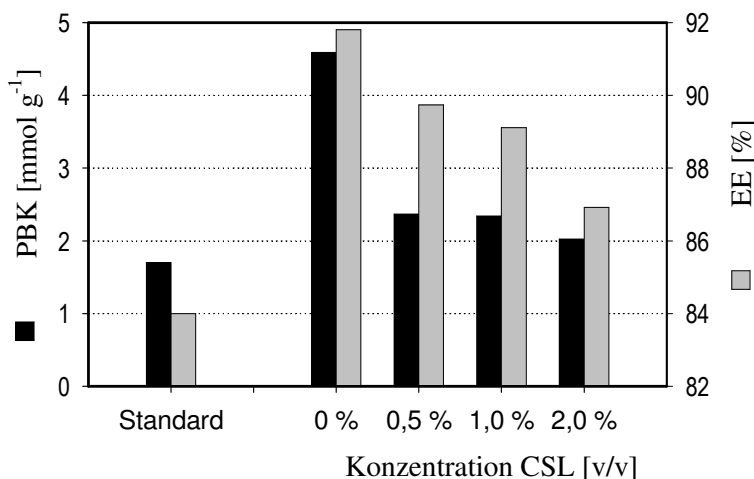


Abbildung 5.1.1: Einfluss der Konzentration von Maisquellwasser (CSL) bei Schüttelkolbenansätzen auf die Produktbildungskapazität PBK und den Enantiomerenüberschuss EE mit 10 g L^{-1} Glukose; Standard: 20 g L^{-1} Glukose, 2 % v/v CSL

Das konstante Verhältnis von S-CHBE-Konzentration zur eingesetzten Biomasse weist auf eine vergleichbare Aktivität der S-spezifischen Carbonylreduktase hin. Die Änderung im Enantiomerenüberschuss ist auf die gesteigerte Aktivität der R-spezifischen Carbonylreduktasen zurückzuführen. Die hohe Laktatkonzentration im Maisquellwasser könnte die Expression der Laktatdehydrogenase induzieren.

Im Standardansatz werden 20 g L^{-1} Glukose und 2 % v/v Corn Steep Liquor eingesetzt. Durch die höhere Glukosekonzentration kann zwar die OD_{600} von 30 auf 60 gesteigert werden, der Enantiomerenüberschuss lag mit 83 % aber deutlich unter dem Wert des Vergleichsansatzes.

5.1.2 Wachstum auf definierten Medien

Da Zellen, die mit CSL-Medium angezogen wurden, in Umsetzungsversuchen einen niedrigen Enantiomerenüberschuss aufwiesen, wurde versucht, auf komplexe Medienkomponenten ganz zu verzichten und die Zellen in definierten Medien anzuziehen.

Es wurden zwei unterschiedliche definierte Medien mit jeweils 25 g L^{-1} Glukose als Kohlenstoffquelle untersucht:

- Mineralmedium für Hefen, bestehend aus Mineralsalzen, Spurenelementen, Vitaminen und Harnstoff als Stickstoffquelle (van Hoek et al. 2000)
- Yeast Nitrogen Base Medium (YNB), eine Nährstoffmischung, die Ammonium, Phosphat, Sulfat, Spurenelemente und Vitamine für die Anzucht von Hefen enthält. Es wurde YNB mit Aminosäuren und ohne Aminosäuren eingesetzt (van Dijken et al. 2000)

Diese Grundmedien wurden zusätzlich mit Tryptophan und Lysin supplementiert, um mögliche Auxotrophien des Stammes auszugleichen. Adenin gilt als ein wachstumslimitierender Faktor bei Hefen (Zhang et al. 2002) und wurde ebenfalls als Supplement untersucht.

Aus den beiden Grundmedien wurden somit sechs verschiedene definierte Medien abgeleitet: i) Basismineralmedium ii) YNB ohne Aminosäuren; iii) YNB mit Aminosäuren; iv) Mineralmedium mit 20 mg L^{-1} Lysin und 20 mg L^{-1} Tryptophan; v) Mineralmedium mit 40 mg L^{-1} Adenin; vi) YNB mit 20 mg L^{-1} Lysin bzw. 20 mg L^{-1} Tryptophan.

In keinem dieser definierten Medien konnte Wachstum der Zellen beobachtet werden.

5.1.3 Wachstum auf definierten Medium mit komplexem Anteil

Erst durch Zugabe von 4 g L^{-1} Hefeextrakt zum Mineralmedium konnte Wachstum der Zellen bis zu einer $OD_{600} = 13$ ($3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$) erzielt werden. Wurden zusätzlich 20 mg L^{-1} Tryptophan in das Medium gegeben, stieg die OD_{600} auf 17 an, während Lysin und Adenin keinen Effekt zeigten.

Um den wachstumslimitierenden Bestandteil identifizieren zu können, wurde das eingesetzte Medium in sechs Hauptkomponenten unterteilt: i) Vitamine, ii) Mineralstoffe und Spurenelemente, iii) C-Quelle Glukose, iv) Harnstoff, v) Hefeextrakt und vi) Tryptophan.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Konzentration von jeweils einer Hauptkomponente verdoppelt. Durch die Verdoppelung der Konzentration von Hefeextrakt konnte die OD_{600} von

17 auf 28 gesteigert werden. Alle anderen Ansätze führten zu keiner Änderung der Biomassenkonzentration. Der Enantiomerenüberschuss variierte in den Ansätzen nur gering (88 % und 90 %). Nur durch die Erhöhung der Glukosekonzentration ging der Enantiomerenüberschuss auf 85 % zurück.

Die wachstumslimitierende Komponente, ein Bestandteil des Hefeextrakts, konnte nicht näher identifiziert werden. In den Folgeexperimenten wurde der Einfluss der Konzentration von Hefeextrakt untersucht. Als zweiter komplexer Bestandteil wurde Pepton verwendet.

Zum Basismineralmedium mit Tryptophan wurden jeweils 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹, bzw. 30 g L⁻¹ Hefeextrakt und Pepton einzeln oder in Kombination zugegeben (Tabelle 5.1.1). Mit zunehmender Konzentration von komplexen Komponenten konnte die Biomasse bis zu einer OD₆₀₀ von 60 – 65 (entsprechend 15 g_{BTM} L⁻¹) gesteigert werden, wobei in Ansätzen mit Pepton bei gleicher Konzentration eine höhere OD₆₀₀ als mit Hefeextrakt gemessen wurde.

In den Versuchsansätzen erwies sich die Zugabe von Basismineralmedium und Tryptophan als vorteilhaft für das Wachstum. So sank im Ansatz mit 10 g L⁻¹ Hefeextrakt die Biomasse um 20 % (Medium H₁₀ und MH₁₀T) und im Ansatz mit 20 g L⁻¹ Pepton sogar um 65 % (Medium P₂₀ und MP₂₀T), wenn kein Basismineralmedium mit Tryptophan zugegeben wurde¹. Der maximale Enantiomerenüberschuss wurde mit 90 % im Ansatz mit 4 g L⁻¹ Hefeextrakt (Medium MH₄T) erzielt, sank in allen anderen Ansätzen aber nur geringfügig auf 88 % ab (Medium M_HP₂₀T).

Im Vergleich zum CSL-Medium konnte bei annähernd gleicher Biomassenkonzentration der Enantiomerenüberschuss von 82 - 84 % auf 88 % gesteigert werden (Tabelle 5.1.2, Abbildung 5.1.2). Gleichzeitig stieg die Produktbildungskapazität. Die Aktivität der Zellen konnte also ebenfalls gesteigert werden.

¹ Zur Beschreibung der Zusammensetzung des Mediums wurde folgende Nomenklatur verwendet: H = Hefeextrakt, P = Pepton; der Zahlenindex gibt die jeweilige Konzentration in g L⁻¹ an; T = Tryptophan, 20 mg L⁻¹; M = Mineralmedium

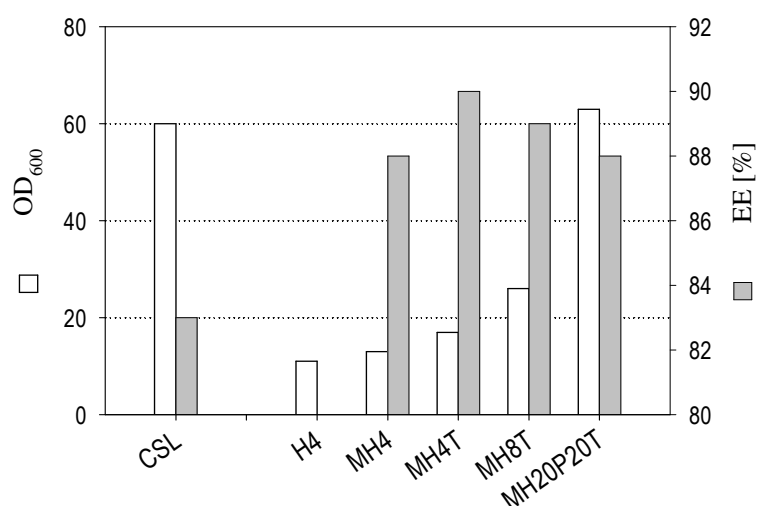


Abbildung 5.1.2: Ergebnis der Medienoptimierung: Einfluss unterschiedlicher Anzuchtbedingungen auf die OD₆₀₀ und den Enantiomerenüberschuss in Biotransformationsexperimenten im 0,5 mL-Maßstab

Tabelle 5.1.1: Eingesetzte Komplexmedien in Schüttelkolbenkulturen von *S. cerevisiae* und die erreichte OD₆₀₀ als Maß für die Biotrockenmasse; die Versuche wurden mit 25 g L⁻¹ Glukose durchgeführt.

M: Basismineralmedium; H: Hefeextrakt; P: Pepton; T: Tryptophan 20 mg L⁻¹

Medium	Zusammensetzung		OD ₆₀₀
	Hefeextrakt [g L ⁻¹]	Pepton [g L ⁻¹]	
H ₁₀	10	--	19
MH ₄ T	4	--	17
MH ₁₀ T	10	--	28
MH ₂₀ T	20	--	42
MH ₃₀ T	30	--	52
P ₂₀	--	20	20
MP ₁₀ T	--	10	39
MP ₂₀ T	--	20	57
MP ₃₀ T	--	30	60
MH ₅ P ₁₀ T	5	10	55
MH ₁₀ P ₂₀ T	10	20	64
MH ₂₀ P ₂₀ T	20	20	63
MH ₂₀ P ₃₀ T	20	30	65

Die Substitution von Maisquellwasser im Medium zur Anzucht von *S. cerevisiae* war durch ein Mineralmedium mit Vitaminen und hohen Konzentrationen an Hefeextrakt und Pepton möglich. Dabei wurden im Schüttelkolben in beiden Medien vergleichbare Biomassenkonzentrationen von

bis zu 16 g L^{-1} erreicht (Tabelle 5.1.2). Durch den Verzicht auf Maisquellwasser konnte der Enantiomerenüberschuss von 83 % im Standardansatz auf 88 – 90 % im optimierten Anzuchtmedium gesteigert werden. Die Aktivitäten der R-spezifischen Carbonylreduktasen wurden reduziert. Gleichzeitig nahm die Produktbildungskapazität zu, die Zellen verfügten über eine höhere spezifische Aktivität.

Tabelle 5.1.2: Einfluss der Medienzusammensetzung auf die OD_{600} , den Enantiomerenüberschuss und die Produktbildungskapazität in Schüttelkolbenkulturen von *S. cerevisiae*; MHT: Mineral-Hefeextrakt-Tryptophan-Medium; MHPT: Mineral-Hefeextrakt-Pepton-Tryptophan-Medium

	CSL-Standard	Medium 1 (MH ₄ T)	Medium 2 (MH ₂₀ P ₂₀ T)
OD_{600}	60	17	63
Biotrockenmasse [g L^{-1}]	15	5	16
Enantiomerenüberschuss [%]	83	90	88
Produktbildungskapazität [mmol g^{-1}]	1,7	2,0	2,9

5.1.4 Kohlenstoffquellen

Der negative Einfluss hoher Glukosekonzentrationen auf den Enantiomerenüberschuss wurde für Medien mit und ohne Maisquellwasser gezeigt. Als Ersatz für Glukose wurde als weitere Kohlenstoffquelle der Einsatz von Glycerin im Medium mit Maisquellwasser untersucht. Der Stamm *S. cerevisiae* FasB His6 zeigte jedoch kein Wachstum.

5.1.5 Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit CSL-Medium

Bei der Zellanzucht im Rührkesselreaktor mit CSL-Medium unter Standardbedingungen wurde nach einer Prozessdauer von 48 h eine Biotrockenmassenkonzentration von 40 g L^{-1} erzielt (Tabelle 5.1.3). Die Qualität des Biokatalysators bei der Reduktion von 4Cl-ACE war vergleichbar mit der von Zellen, die im Schüttelkolben angezogen worden sind. Die Produktbildungskapazität betrug $1,8 \text{ mmol g}^{-1}$, der Enantiomerenüberschuss lag bei 81 % und war damit niedriger als im Schüttelkolbenansatz (83 %).

Der Einfluss der komplexen Komponenten im Medium, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Dem Zulaufmedium wurde Hefeextrakt (10 g L^{-1}), Pepton (20 g L^{-1}) und Maisquellwasser (2 % v/v) zugesetzt. Obwohl die Dosierate von Glukose im Vergleich zum Standardansatz geringfügig gesenkt wurde (Tabelle 5.1.3), betrug die Biotrockenmassenkonzentration am

Ende der Fermentation 38 g L^{-1} . Aufgrund der geringeren Gesamtglukosemenge, die in dem Prozess eingesetzt wurde, stieg der Ertragskoeffizient von $Y_{X/S, \text{Glukose}} = 0,28$ im Standardverfahren auf $Y_{X/S, \text{Glukose}} = 0,34$ an. Die Qualität der Zellen aus diesem Ansatz mit komplexen Medienkomponenten im Zulauf war jedoch deutlich schlechter als bei den Zellen, die im Standardverfahren hergestellt wurden, bei dem nur Glukose zudosiert wurde. Die Produktbildungskapazität ging von $1,8 \text{ mmol g}^{-1}$ auf $1,4 \text{ mmol g}^{-1}$ und der Enantiomerenüberschuss von 81 % auf 77 % zurück.

5.1.6 Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit optimiertem Medium

Für die Anzucht im Zulaufverfahren wurde das in den Schüttelkolbenexperimenten optimierte MH₂₀P₂₀T-Medium (20 g L^{-1} Hefeextrakt, 20 g L^{-1} Pepton, 20 mg L^{-1} Tryptophan, Mineralmedium) eingesetzt. Als Vergleich wurde in einem weiteren Experiment ein Medium ohne Mineralmedium und Tryptophan (H₁₀P₂₀-Medium) verwendet.

Nach einer Prozesszeit von 48 h betrug die Biomassenkonzentration 27 g L^{-1} (MH₂₀P₂₀T-Medium) bzw. 25 g L^{-1} (H₁₀P₂₀-Medium) und war damit deutlich niedriger als bei der Anzucht im Standardverfahren. Entsprechend sank der Ertragskoeffizient der Biomasse von $Y_{X/S, \text{Glukose}} = 0,28$ auf 0,20.

Die Aktivität des Katalysators verbesserte sich im Vergleich zum Standardverfahren leicht. Der Enantiomerenüberschuss stieg von 81 % im Standardverfahren auf 85 % und die Produktbildungskapazität konnte im MH₂₀P₂₀T-Medium von $1,8 \text{ mmol g}^{-1}$ auf $2,0 \text{ mmol g}^{-1}$ gesteigert werden. Die Verbesserung der Katalysatorqualität fiel jedoch geringer aus, als aus den Schüttelkolbenexperimenten zu erwarten gewesen wäre. Insbesondere aufgrund der niedrigen Biomassenkonzentration sank die volumetrische Gesamtaktivität der Zellen um 25 % im Vergleich zum Standardansatz.

Der Verlauf des Prozesses bei der Verwendung von optimiertem MH₂₀P₂₀T-Medium ist in Abbildung 5.1.3 gezeigt. Nach der Satzphase von 8 h betrug die $OD_{600} = 13$. Obwohl eine niedrige Glukosekonzentration von $12,5 \text{ g L}^{-1}$ zu Beginn verwendet wurde und der pO_2 annähernd 100 % betrug, wurden in geringer Konzentration Ethanol (0,5 % v/v) und Acetat (0,16 % v/v) gebildet. Durch die unvollständige Veratmung der Glukose stieg der Respirationsquotient in der Satzphase auf über 1 an und sank zu Beginn des Zulaufverfahrens nach Verbrauch der vorgelegten Glukose auf 0,8 ab. Während dieser Prozessphase konnte mit den

verwendeten Glukosemessstreifen keine Glukose nachgewiesen werden. Die Glukosekonzentration lag somit unterhalb der Nachweisgrenze von $0,3 \text{ g L}^{-1}$. HPLC-Messungen haben bestätigt, dass die Glukosekonzentration maximal $0,27 \text{ g L}^{-1}$ betrug. Durch die niedrige Dosierrate an Glukose wurden die in der Satzphase akkumulierten Nebenprodukte Acetat und Ethanol innerhalb der nachfolgenden 16 h vollständig aufgebraucht. Der Respirationsquotient stieg zu dem Zeitpunkt von 0,8 auf 1,0 an und blieb bis zum Prozessende konstant. Eine Zunahme der Biomassenkonzentration konnte nur innerhalb der ersten 32 h Gesamtprozesszeit gemessen werden, obwohl Glukose noch weitere 16 h zudosiert wurde.

In Versuchen zur Gesamtaktivitätsbestimmung zeigten die Zellen während der ersten 18 h des Prozesses die höchste Aktivität. Bei einer Biotrockenmassenkonzentration von 10 g L^{-1} erreichte die Produktbildungskapazität $4,0 \text{ mmol g}^{-1}$ und der maximale Enantiomerenüberschuss betrug ca. 88 %. Im Prozessverlauf sank die Produktbildungskapazität auf $2,0 \text{ mmol g}^{-1}$ und der Enantiomerenüberschuss auf 85 % ab.

Der maximale Enantiomerenüberschuss wurde mit Zellen in einer Prozessphase erzielt, in der als Nebenprodukte Ethanol und Acetat gebildet worden waren. Eine mögliche Nebenaktivität der Alkoholdehydrogenase mit R-Spezifität hatte zumindest keinen signifikanten Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss. Die Satzphase war aber auch durch eine hohe Wachstumsrate geprägt. Nach Dahl et al. (1998) ist der Enantiomerenüberschuss von S-CHBE am höchsten, wenn Zellen in der Wachstumsphase geerntet werden. Aufgrund der sehr niedrigen Glukosedosierrate wuchsen die Zellen im Zulaufverfahren sehr langsam. Da die Nebenprodukte aus dem Überschussmetabolismus keinen negativen Einfluss auf die Zellqualität hatten, kann eine mit der Steigerung der Dosierrate verbundene höhere Wachstumsrate die Zellqualität möglicherweise weiter verbessern.

Die Ausbeute an Biomasse ist bei Fermentationen im $\text{MH}_{20}\text{P}_{20}\text{T}$ -Medium im Vergleich zum Standardmedium mit Maisquellwasser sehr niedrig. Um eine Stickstofflimitierung auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuch dem Zulaufmedium neben Glukose zusätzlich 10 g L^{-1} Harnstoff mit einer Endkonzentration im Reaktor von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ zugesetzt. Die Biomassenkonzentration sank auf 19 g L^{-1} , gleichzeitig war die Katalysatorqualität deutlich schlechter als bei den Vergleichsfermentationen.

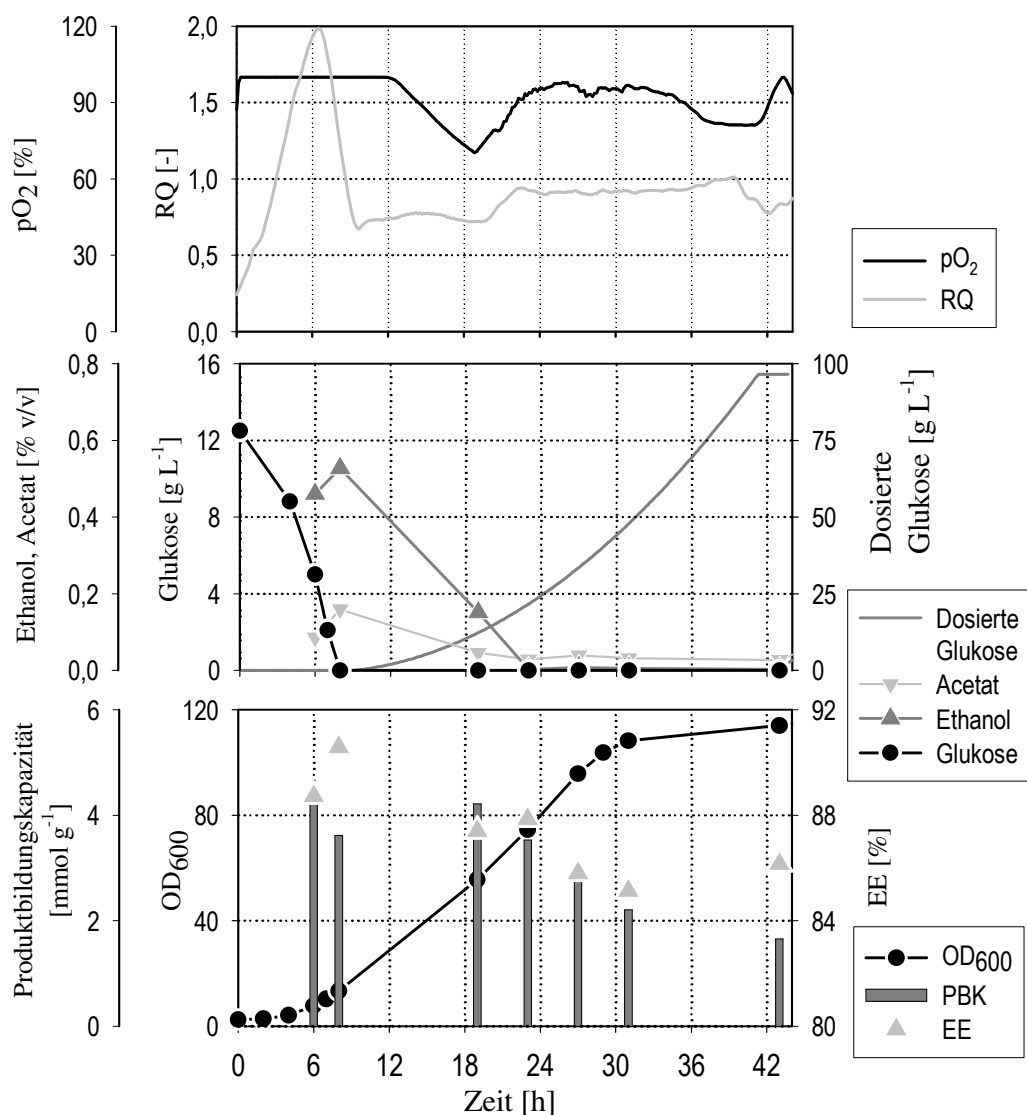


Abbildung 5.1.3: Verlauf der Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit $MH_{20}P_{20}T$ -Medium im 5 Liter-Maßstab. Obere Abbildung: Gelöstsauerstoff und respiratorischer Quotient; mittlere Abbildung: dosierte Gesamtglukosemenge und Konzentration an Ethanol, Acetat und Glukose; untere Abbildung: optische Dichte, Produktbildungskapazität und Enantiomerenüberschuss in Biotransformationen

Durch eine optimierte Medienzusammensetzung (Medium $MH_{20}P_{20}T$) konnte die Qualität der Zellen so gesteigert werden, dass ein höherer Enantiomerenüberschuss und eine höhere Produktbildungskapazität der Zellen erreicht wurde.

Mit den Versuchen zur Optimierung des Mediums für die Anzucht von *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Mediums einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Zellen hat. Insbesondere über die Konzentration an Glukose und Maisquellwasser im Medium konnte bei Schüttelkolbenkulturen die Zellqualität und damit der Enantiomerenüberschuss und die Produktbildungskapazität wesentlich beeinflusst werden. Der negative

Einfluss von Maisquellwasser auf den Enantiomerenüberschuss konnte in Versuchen im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren bestätigt werden.

Tabelle 5.1.3: Ergebnisse aus Versuchen im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit unterschiedlichen Medien

	Zulaufmedium mit komplexen Komponenten	Standard	Medium H₁₀P₂₀	Medium MH₂₀P₂₀T
Medium (Satzverfahren)	10 g L ⁻¹ Hefeextrakt 20 g L ⁻¹ Pepton 20 % v/v CSL 25 g L ⁻¹ Glukose		10 g L ⁻¹ Hefeextrakt 20 g L ⁻¹ Pepton 12,5 g L ⁻¹ Glukose	20 g L ⁻¹ Hefeextrakt 20 g L ⁻¹ Pepton Mineralmedium, 20 mg L ⁻¹ Trp 10,6 g L ⁻¹ Glukose
pH	pH 6,0; Korrekturmittel 6 N H ₃ PO ₄ und 25 % NH ₃			
pO₂	> 80 %			
Wachstumsrate μ Satzverfahren	0,27 h ⁻¹	0,30 h ⁻¹	0,15 h ⁻¹	0,15 h ⁻¹
Zulaufmedium	50 % Glukose, 10 g L ⁻¹ Hefeextr., 20 g L ⁻¹ Pepton, 2 % CSL	60 % w/w Glukose		
Dosierprofil Glukose	0,8 – 4,6 g L ⁻¹ h ⁻¹ , über 34 h	0,5 – 3,4 g L ⁻¹ h ⁻¹ über 32 h		
Konzentration Biotrockenmasse	38 g L ⁻¹	40 g L ⁻¹	25 g L ⁻¹	27 g L ⁻¹
Y_{X/S,Glukose}	0,34 g g ⁻¹	0,28 g g ⁻¹	0,20 g g ⁻¹	0,20 g g ⁻¹
Ergebnisse aus der Bioreduktion				
EE	77 %	81 %	85 %	85 %
Produktbildungskapazität PBK	1,4 mmol g ⁻¹	1,8 mmol g ⁻¹	1,8 mmol g ⁻¹	2,0 mmol g ⁻¹
Volumetrische Produktbildungskapazität	53 mmol L ⁻¹	72 mmol L ⁻¹	45 mmol L ⁻¹	54 mmol L ⁻¹

Neben dem Einfluss des verwendeten Mediums bei der Anzucht der Zellen haben die Versuche zur Zellanzucht im Zulaufverfahren gezeigt, dass sich die Qualität der Zellen über die Prozessdauer ändert. Es bleibt offen, welche Faktoren zu einer Änderung der Zellqualität führen. Die Wachstumsrate und der Stoffwechsel der Zellen (Überschussmetabolismus) bei der Zellernte sind zwei Größen, die sich für eine weitere Verbesserung anbieten.

5.2 Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen

Bei der Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen wurden unterschiedliche Variablen wie Medienkomponenten, Substrat- und Biokatalysatorkonzentration und pH untersucht. Ziel der Experimente war es, die relevanten Größen zu identifizieren, die die Reaktion beeinflussen.

5.2.1 Umsetzungen mit Wildtyp Zellen

Die in der Literatur angegebenen Daten für den Enantiomerenüberschuss und die Ausbeute bei der Umsetzung von 4Cl-ACE zu S-CHBE mit Wildtypzellen schwanken beträchtlich. Um Vergleichsdaten für Umsetzungen mit rekombinanten und Wildtyp Hefen zu erhalten, wurde eine Umsetzung mit dem Wildtypstamm *S. cerevisiae* CBS 8066 im Standardreaktionspuffer mit 7,5 % v/v n-Butylacetat bei 25 °C durchgeführt.

Dabei wurde ein Enantiomerenüberschuss von 44 % bei einer Produktbildungskapazität von 0,2 mmol g⁻¹ beobachtet. Bei einer eingesetzten Biokatalysatorkonzentration von 120 g L⁻¹ und einer 4Cl-ACE-Konzentration von 140 mmol L⁻¹ betrug die Ausbeute 15 %. Die Deaktivierung des Biokatalysators folgte einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit der Katalysatoraktivität von 0,5 h (Abbildung 5.2.2).

5.2.2 Biomassenkonzentration und Zellqualität

In gerührten Ansätzen unter Standardbedingungen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat wurde der Einfluss unterschiedlicher Biokatalysatorkonzentrationen auf die Umsetzung untersucht. Bei einer 4Cl-ACE-Startkonzentration von 170 mmol L⁻¹ und einer Biokatalysatorkonzentration von 0,4 bis 10 g_{BTM} L⁻¹ konnte kein Einfluss der Biokatalysatorkonzentration auf den Enantiomerenüberschuss festgestellt werden. Die Produktbildungskapazität der Zellen betrug in allen Ansätzen 2,0 mmol g⁻¹.

Für die Parameterstudien und Optimierungsversuche wurden Zellen in größerer Menge hergestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Einfluss der Lagerungsdauer erwies sich als ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Biotransformation. Zum Vergleich wurden in Umsetzungsversuchen Zellen unterschiedlichen Alters (1 Woche, 5 Wochen, 5 Monate) eingesetzt. Die Versuche wurden unter Standardbedingungen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat durchgeführt.

Frische Zellen hatten die höchste Aktivität, die sich durch die Lagerung über ca. 1 Woche bei -20 °C nicht wesentlich änderte. Bei einer Lagerungsdauer von 5 Wochen und länger nahm der Enantiomerenüberschuss und die Produktbildungskapazität ab (Tabelle 5.2.1).

Aufgrund der höheren Stabilität frischer Zellen läuft die Reaktion bis zu 10 h, während bei 5 Wochen alten Zellen die Reaktion bereits nach 4 bis 6 h zum Erliegen kommt (Abbildung 5.2.1). Während bei frischen Zellen der Enantiomerenüberschuss über die Versuchsdauer konstant bleibt, nimmt er bei Zellen, die über einen längeren Zeitraum gelagert worden sind, mit der Reaktionsdauer ab.

Die Anfangsaktivität des Biokatalysators wurde durch die Lagerungsdauer nicht wesentlich beeinflusst. In allen Ansätzen betrug die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zwischen 10 und 12 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Die Abnahme der Produktbildungskapazität wurde durch die geringere Stabilität des Biokatalysators verursacht. Die Halbwertzeiten nahmen mit der Lagerungsdauer von 2,7 h bei frischen Zellen auf 0,9 h bei 5 Monate alten Zellen ab (Abbildung 5.2.2).

Tabelle 5.2.1: Einfluss der Lagerungsdauer der Biokatalysatoren bei -20 °C auf die Umsetzung unter Standardbedingungen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat und 170 mmol L^{-1} 4Cl-ACE

Lagerungsdauer (-20 °C)	Produktbildungskapazität	Halbwertzeit $t_{1/2}$	Enantiomerenüberschuss
1 Woche	2,0 mmol g^{-1}	2,7 h	84 %
5 Wochen	0,9 mmol g^{-1}	1,5 h	65 %
5 Monate	0,5 mmol g^{-1}	0,9 h	43 %
Wildtypzellen, 1 Woche	0,2 mmol g^{-1}	0,5 h	44 %

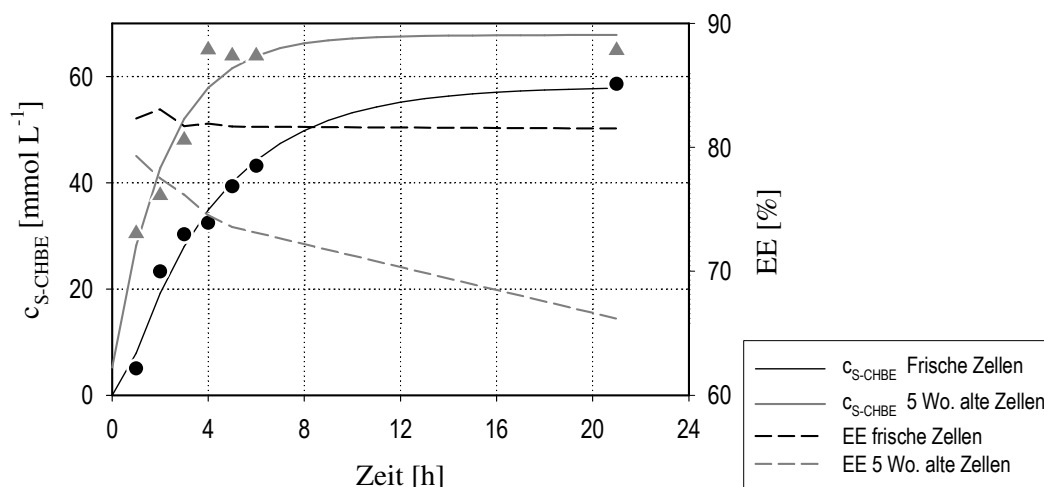


Abbildung 5.2.1: Verlauf der S-CHBE-Konzentration und des Enantiomerenüberschusses in Satzversuchen mit frischen Zellen ($28 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, schwarz) und 5 Wochen alten Zellen ($60 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, grau); gestrichelte Linien: Enantiomerenüberschuss

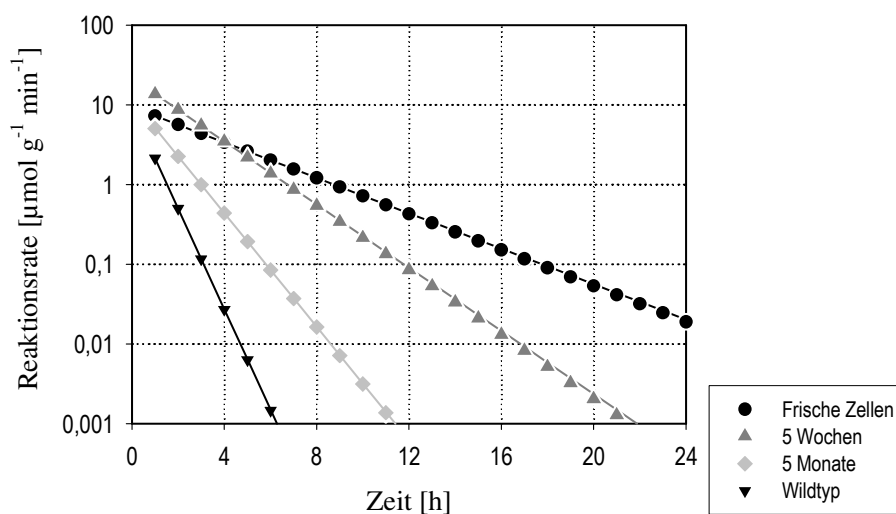


Abbildung 5.2.2: Deaktivierungskinetiken des Biokatalysators nach unterschiedlicher Lagerungsdauer bei -20 °C ; zum Vergleich sind Wildtypzellen dargestellt. Symbole: Reaktionsraten basierend auf Messungen; Linien: Deaktivierung nach Reaktion 1. Ordnung

In den Versuchen konnten nicht immer Zellen identischer Qualität eingesetzt werden. Um den Einfluss geänderter Reaktionsbedingungen auf die Umsetzung messen und quantifizieren zu können, wurde bei jeder Versuchsreihe eine Umsetzung unter Standardbedingungen durchgeführt.

5.2.3 Reaktionstemperatur

Der Einfluss der Reaktionstemperatur wurde in Standardansätzen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat bei 25 °C, 30 °C und 35 °C untersucht.

Die S-CHBE-Konzentration betrug bei 25 °C und 30 °C jeweils 15 mmol L⁻¹ und sank bei 35 °C auf ca. 10 mmol L⁻¹ ab. Der Enantiomerenüberschuss war bei 25 °C mit 78 % maximal und sank bei 30 °C auf 77 % und bei 35 °C auf 76 % ab.

Bei Reaktionstemperaturen von 25 °C und 30 °C bestand kein Unterschied in der Umsetzung. Reaktionstemperaturen von über 30 °C führten zu einer vorzeitigen Deaktivierung des Biokatalysators und damit verbunden zu einer verminderten Ausbeute.

5.2.4 pH

Der Einfluss des pH auf die Umsetzung wurde in zwei Versuchsreihen in pH-geregelten Ansätzen untersucht. Dabei war nicht nur der Einfluss des pH auf die Biokatalysatoraktivität zu berücksichtigen. Der pH beeinflusst außerdem die Stabilität des Substrates. Die Esterbindung wird in wässrigen Lösungen hydrolysiert, wobei die Stabilität mit zunehmenden pH abnimmt (Shimizu et al. 1990).

Zur Abschätzung der Stabilität wurden 180 mmol L⁻¹ 4Cl-ACE in zellfreiem Kaliumphosphatpuffer (0,1 mol L⁻¹) bei pH 6,0, 7,0 und 8,0 und 25 °C inkubiert. Nach 4 h war das Substrat bei pH 6,0 zu 30 % bei pH 7,0 zu 50 % und bei pH 8,0 zu 70 % zerfallen. S-CHBE war hingegen in wässriger Lösung im gesamten pH-Bereich stabil. Um in den Umsetzungsversuchen die Hydrolyse des Substrates zu minimieren, wurde n-Butylacetat als zweite Phase eingesetzt, das als Substratreservoir fungiert und die Konzentration von 4Cl-ACE in der wässrigen Phase gering hält.

In der ersten Versuchsreihe wurde der pH-Einfluss mit Natriumcitratpuffer von 4,0 bis 7,0 in Schritten von einer pH-Einheit untersucht. Mit steigendem pH nahm die S-CHBE-Konzentration um den Faktor 50 und der Enantiomerenüberschuss von 46 % auf 90 % zu. Die Halbwertszeit des Biokatalysators stieg von 0,8 h bei pH 4,0 auf 2,8 h bei pH 7,0.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der getestete pH-Bereich von pH 6,0 bis auf pH 8,0 in Schritten von 0,5 pH-Einheiten ausgedehnt (Abbildung 5.2.3).

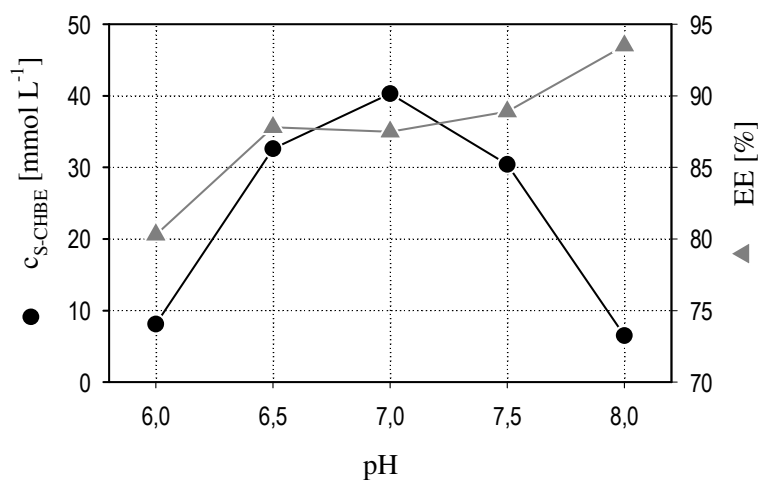


Abbildung 5.2.3: pH-Einfluss auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Zweiphasensystemen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat

Die S-CHBE-Konzentration durchlief bei pH 7,0 ein Maximum und sank bei pH 6,0 und pH 8,0 auf ca. 15 % des Maximalwertes. Der Enantiomerenüberschuss war zwischen pH 6,5 und pH 7,5 annähernd konstant bei 87 %. Der Enantiomerenüberschuss stieg bei pH 8,0 auf ca. 94 %, aufgrund der niedrigen S-CHBE-Konzentration ist dieser pH für Umsetzungen jedoch nicht geeignet. Die niedrige Produktkonzentration bei einem pH über 7,5 ist zum Teil auf die Hydrolyse des Substrates zurückzuführen. Die organische Lösungsmittelphase n-Butylacetat verlangsamt lediglich die Reaktion. Um die Hydrolyse effektiv zu unterbinden, ist die Umsetzung bei niedrigen pH durchzuführen oder der Anteil an n-Butylacetat ist zu erhöhen.

In Experimenten ohne pH-Regelung sinkt der pH im Reaktionsverlauf ab. Bei einer Biokatalysatorkonzentration von 30 g L^{-1} kann der pH ohne Regelung von pH 7,0 auf pH 5,3 abfallen. Insbesondere bei langsamen Reaktionen, bei denen noch nach mehreren Stunden eine hohe Umsatzrate erzielt wird, ist daher eine pH-Regelung erforderlich, um optimale Ausbeuten und einen hohen Enantiomerenüberschuss erzielen zu können.

5.2.5 Substratkonzentration

Der Einfluss unterschiedlicher 4Cl-ACE-Konzentration auf die Produktkonzentration und den Enantiomerenüberschuss wurde in wässrigen Reaktionssystemen ohne n-Butylacetat zunächst in geschüttelten 0,5 mL-Ansätzen untersucht und nachfolgend in gerührten Ansätzen überprüft.

In den 0,5 mL-Ansätzen wurde die 4Cl-ACE-Konzentration zwischen 22 mmol L^{-1} und 590 mmol L^{-1} (0,3 bis 7,5 % v/v) variiert. Das Substrat ist bis zu einer Konzentration von 250 mmol L^{-1} (3,3 % v/v) in Wasser löslich. Die maximale S-CHBE-Konzentration wurde bei einer 4Cl-ACE-Konzentration zwischen 15 und 73 mmol L^{-1} erreicht, der Enantiomerenüberschuss betrug bis zu einer Substratkonzentration von 294 mmol L^{-1} 81 %. Höhere 4Cl-ACE-Konzentrationen führten zu einer Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei gleichzeitiger Abnahme der S-CHBE-Konzentration.

In gerührten Ansätzen mit 20 mL Reaktionsvolumen wurde eine Startkonzentration von 4Cl-ACE zwischen 22 mmol L^{-1} und 334 mmol L^{-1} eingesetzt (Abbildung 5.2.4).

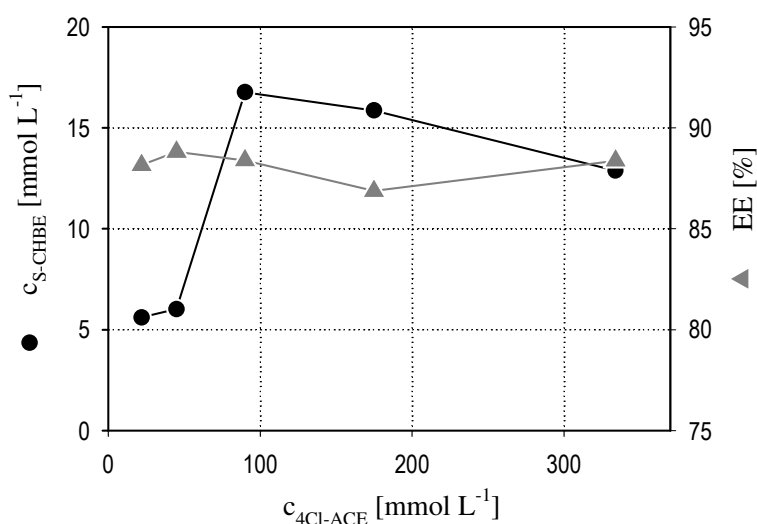


Abbildung 5.2.4: Einfluss der Startkonzentration von 4Cl-ACE auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss gerührten 20 mL-Ansätzen

Die maximale S-CHBE-Konzentration wurde bei einer 4Cl-ACE Startkonzentration von 89 mmol L^{-1} erzielt. Hohe Substratkonzentrationen führten zu einer Hemmung der Reaktion und damit zu einer Abnahme der Produktkonzentration. Der Umsatz von 4Cl-ACE sinkt von 93 % bei 22 mmol L^{-1} 4Cl-ACE auf 7 % bei 334 mmol L^{-1} 4Cl-ACE. Wie auch in den Experimenten im 0,5 mL-Maßstab war der Enantiomerenüberschuss praktisch unabhängig von der eingesetzten Substratkonzentration.

Unter dem Einfluss hoher 4Cl-ACE-Konzentrationen nahm die Stabilität des Biokatalysators ab. Bei einer Startkonzentration von 89 mmol L^{-1} 4Cl-ACE betrug die Halbwertszeit des Biokatalysators 2,1 h, bei einer Startkonzentration von 350 mmol L^{-1} 4Cl-ACE sank die Halbwertszeit auf 0,8 h ab.

Eine Beeinflussung des Enantiomerenüberschusses durch Änderungen in der Substratkonzentration wurde zumindest für den untersuchten Konzentrationsbereich nicht beobachtet. Sehr geringe 4Cl-ACE-Konzentrationen können zu einer Erhöhung der R-CHBE-Konzentration führen (Bertau 2002; Shieh et al. 1985).

5.2.6 Organische Lösungsmittel

In gerührten Ansätzen wurde der Einfluss von Ethylacetat, n-Butylacetat, Hexan, Methyl-tert-Butylether (MTBE), Xylol, Benzol, Toluol und Petrolether (Fraktion mit Siedepunkt 50-70 °C) auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Zweiphasensystemen untersucht. Bei allen Lösungsmitteln wurde 10 % v/v organische Phase eingesetzt.

Durch die Zugabe von n-Butylacetat konnte die S-CHBE-Konzentration im Vergleich zum wässrigen Standardansatz um 70 % gesteigert werden (Abbildung 5.2.5). Bei allen anderen Lösungsmitteln war die Zunahme geringer, während im Ansatz mit MTBE die S-CHBE-Konzentration im Vergleich zu der im Standardansatz ohne Lösungsmittel zurückging. In allen untersuchten Zweiphasensystemen nahm der Enantiomerenüberschuss im Vergleich zum Standardansatz geringfügig ab.

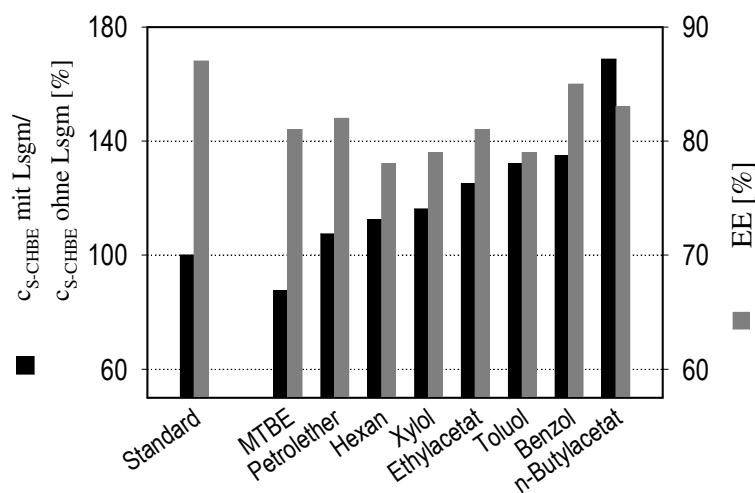


Abbildung 5.2.5: Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in gerührten Ansätzen, nach zunehmender S-CHBE-Konzentration sortiert. MTBE: Methyl-tert-Butylether

Für das Einphasensystem ohne organisches Lösungsmittel und die Zweiphasensysteme mit Ethylacetat, n-Butylacetat, MTBE und Hexan wurden die Inhibierungskinetiken bestimmt. Die Halbwertszeit des Biokatalysators betrug für das Referenzsystem, MTBE und Ethylacetat 2,1 bis 2,3 h. Hier findet eine schnelle Deaktivierung des Biokatalysators durch das Substrat oder das verwendete Lösungsmittel statt. Für die Systeme mit Hexan und n-Butylacetat wurden die

Halbwertszeiten mit jeweils 3,1 h bestimmt. Hexan gilt als biokompatibles Lösungsmittel, in dem die Zellen vergleichsweise stabil bleiben. Allerdings ist es für das eingesetzte Substrat ungeeignet. Im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat wird die effektive 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase herabgesetzt und damit die Substrattoxizität reduziert.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss unterschiedlicher Phasenanteile von n-Butylacetat auf die Reaktion untersucht. Bei einer konstanten Startkonzentration von 170 mmol L^{-1} 4Cl-ACE wurde das Phasenverhältnis n-Butylacetat-Phase zu wässriger Phase zwischen $\alpha = 0, 0,04, 0,06$ und $0,1$ variiert. Bereits durch die Zugabe geringer Mengen n-Butylacetat ($\alpha = 0,04$) konnte die Produktkonzentration um über 50 % gegenüber dem Einphasensystem gesteigert werden. Die maximale S-CHBE-Konzentration wurde bei einem Phasenverhältnis von $\alpha = 0,06$ erzielt. Der Enantiomerenüberschuss wurde durch die unterschiedlichen Konzentrationen an n-Butylacetat nicht beeinflusst.

In einer weiteren Versuchsreihe von Experimenten im 0,5 mL-Maßstab wurde der Phasenanteil an n-Butylacetat konstant gehalten und die Einsatzmenge an Substrat variiert. Zu 0,5 mL Reaktionspuffer wurden $50 \mu\text{L}$ n-Butylacetat ($\alpha = 0,1$) gegeben und die 4Cl-ACE-Konzentrationen betragen zwischen 15 mmol L^{-1} und 590 mmol L^{-1} . Parallel wurden die Versuche mit identischer Substratkonzentration ohne n-Butylacetat durchgeführt (Abbildung 5.2.6). Die S-CHBE-Konzentration wurde für den Gesamtansatz (wässrige und organische Phase) bestimmt.

Im Einphasensystem ohne n-Butylacetat wurden nur bei niedrigen Substratkonzentrationen hohe S-CHBE-Konzentrationen erzielt. Bei 4Cl-ACE-Konzentrationen über 100 mmol L^{-1} wirkt das Substrat auf die Umsetzung inhibierend. Im Zweiphasensystem ist das Maximum der S-CHBE-Konzentration zu höheren 4Cl-ACE-Konzentrationen verschoben. Die S-CHBE-Konzentration durchläuft bei einer Startkonzentration von 100 mmol L^{-1} respektive 147 mmol L^{-1} 4Cl-ACE ein Maximum. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Gleichgewichtskonzentration an 4Cl-ACE in der wässrigen Phase zu gering, um einen ausreichend hohen Umsatz zu ermöglichen. Bei hohen Konzentrationen ist der Anteil an n-Butylacetat am Gesamtreaktionssystem nicht hoch genug, um die Gleichgewichtskonzentration an 4Cl-ACE in der wässrigen Phase ausreichend zu verringern.

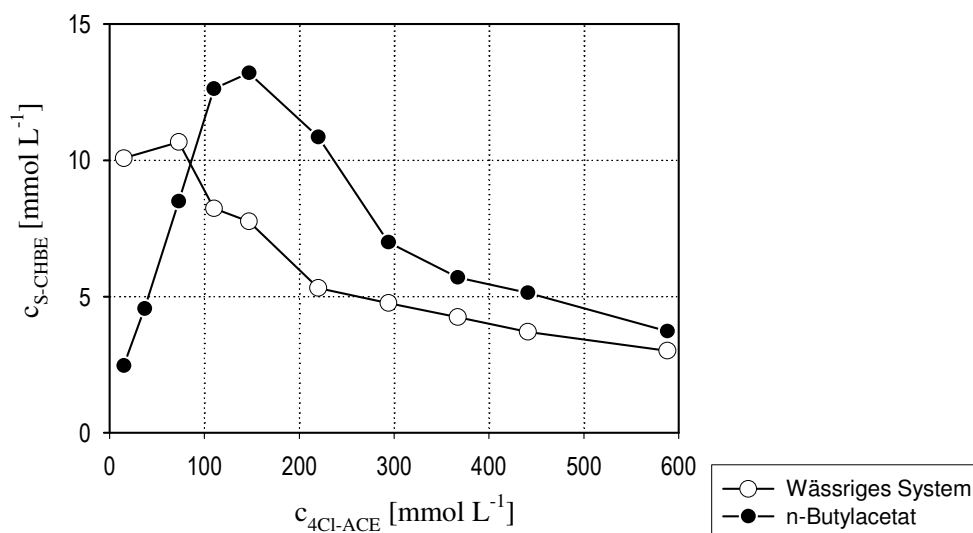


Abbildung 5.2.6: Verlauf der S-CHBE-Konzentration in Abhängigkeit von der 4Cl-ACE-Konzentration in zwei unabhängigen Experimenten im 0,5 mL-Maßstab; hohle Symbole: wässriges System; ausgefüllte Symbole: Ansatz mit n-Butylacetat bei $\alpha = 0,1$

Durch den Einsatz von Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat wird die Hemmung der Reaktion durch das Substrat 4Cl-ACE reduziert und somit werden höhere Produktkonzentrationen erzielt. So können im Vergleich zu Einphasensystemen höhere Startkonzentrationen an 4Cl-ACE eingesetzt werden, ohne dass es zu einer Inhibierung der Reaktion kommt. Dabei reichen bereits geringe Mengen Lösungsmittel aus, um die S-CHBE-Konzentration positiv zu beeinflussen.

5.2.7 Alkohole

In der Literatur ist der Einsatz verschiedener Alkohole zur Steigerung der Reaktionsraten bei Ganzzellbiotransformationen durch Zellpermeabilisierung beschrieben worden. Längerkettige Alkohole sind in Wasser nur schlecht löslich und es kommt bei ausreichend hohen Konzentrationen zur Bildung von Zweiphasensystemen.

In Experimenten im 0,5 mL-Maßstab wurde der Einfluss von Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Butanol und Hexanol in Konzentrationen von 2 %, 10 %, 20 % v/v, 1-Octanol mit 2 % v/v und 10 % v/v untersucht. Bei diesen Konzentrationen ist die maximale Löslichkeit von Butanol, Hexanol und 1-Octanol in Wasser überschritten und es bilden sich Zweiphasensysteme aus. Eine Steigerung der S-CHBE-Konzentration oder des Enantiomerenüberschusses wurde bei keinem der eingesetzten Alkohole erreicht.

5.2.8 NADP und NAD

In geschüttelten Ansätzen mit 0,5 mL Reaktionsvolumen im Einphasensystem wurde der Einfluss von 0,0 / 0,025 / 0,05 / 0,075 / 0,1 / 0,25 und 0,5 mmol L⁻¹ NAD bzw. NADP in jeder möglichen Kombination beider Cofaktoren auf die Umsetzung untersucht. Von allen Ansätzen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der Enantiomerenüberschuss wurde nur unwesentlich von der eingesetzten Cofaktorkonzentration beeinflusst und schwankte zwischen 90 % und 94 % (Abbildung 5.2.7). Die S-CHBE-Konzentration konnte durch NADP-Zugabe um 60 % und durch zusätzlich 0,5 mol L⁻¹ NAD um weitere 20 % gesteigert werden.

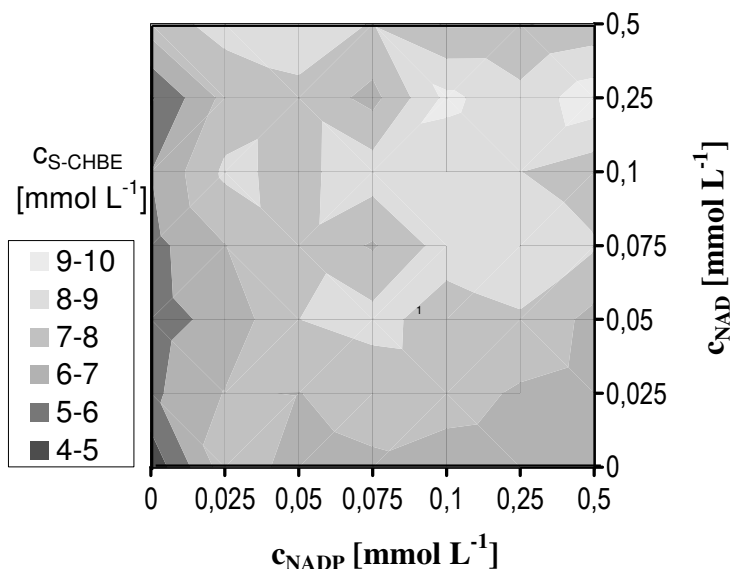


Abbildung 5.2.7: Einfluss von NAD und NADP auf die S-CHBE-Konzentration

Der Einfluss der Cofaktorkonzentration wurde in gerührten Ansätzen mit n-Butylacetat weiter untersucht. In zwei unabhängigen Standardumsetzungen ohne NADP und mit 0,1 mmol L⁻¹ NADP konnte der Enantiomerenüberschuss von 63 % ohne NADP auf 75 % bzw. 88 % gesteigert werden, die S-CHBE-Konzentration stieg in beiden Fällen um den Faktor 5. Die Änderung war abhängig von der Qualität der eingesetzten Zellen.

Wurden in der Umsetzung 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NADP durch die Kombination aus 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NAD und 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NADP ersetzt, so sank die Produktkonzentration auf die Hälfte ab. Um bei der Umsetzung von 4Cl-ACE ausreichend hohe S-CHBE-Konzentrationen und einen hohen Enantiomerenüberschuss erzielen zu können, muss NADP als Cofaktor eingesetzt werden und kann nicht durch den preiswerteren Cofaktor NAD ersetzt werden.

5.2.9 Glukose- und NaCl-Konzentration

Der osmotische Stress auf die Zellen entsteht durch die im Reaktionspuffer enthaltenen Salze und die Glukose. Daher wurde der Einfluss der Glukose- und Natriumchloridkonzentration in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen in einem faktoriellen Versuchsplan untersucht. Es wurden Natriumchloridkonzentrationen $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ und $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ und Glukosekonzentrationen von $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ und $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ eingesetzt. Es wurde jeweils 140 mmol L^{-1} 4Cl-ACE eingesetzt. Alle Ansätze wurden zweifach durchgeführt.

Der Enantiomerenüberschuss nahm mit steigender Salzkonzentration von 82 % auf 95 % zu (Abbildung 5.2.8) und war bei einer Glukosekonzentration von 1 mol L^{-1} maximal. Die S-CHBE-Konzentration sank dagegen bei hohen Salzkonzentrationen auf ein Drittel der Maximalkonzentration im Ansatz ohne NaCl. Eine Glukosekonzentration über $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktkonzentration.

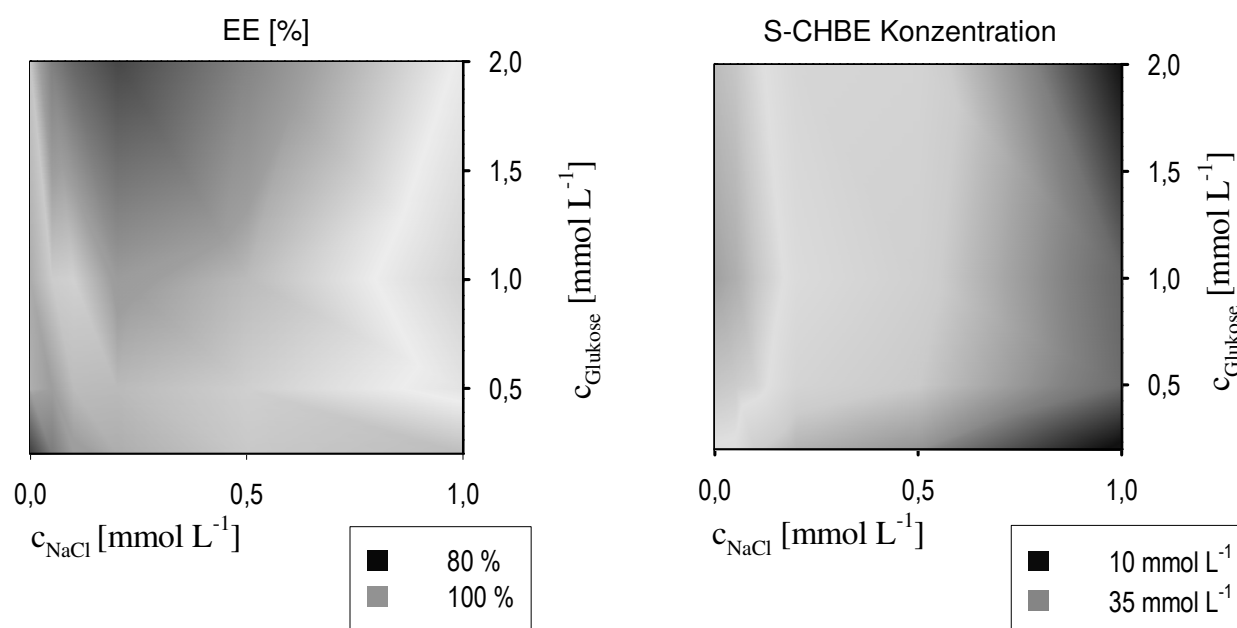


Abbildung 5.2.8: Einfluss der Glukosekonzentration ($0,2$ bis $2,0 \text{ mol L}^{-1}$) und Natriumchloridkonzentration ($0,0$ bis $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) auf die Umsetzung von 4Cl-ACE. Alle Messwerte sind Doppelbestimmungen

5.2.10 Salze

Hohe Natriumchloridkonzentrationen führten zu einer Zunahme des Enantiomerenüberschusses (Kapitel 5.2.9). Der Einfluss von Natriumchlorid und anderen Salzen auf die Umsetzung von 4Cl-ACE wurde in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen durchgeführt. Dabei wurden 1 mol L^{-1} , 2 mol L^{-1} und 4 mol L^{-1} Natriumchlorid, Natriumbromid, Kaliumbromid und Magnesiumchlorid eingesetzt (Nakamura et al. 1989b).

Bei allen Salzkonzentrationen sank die S-CHBE-Konzentration im Vergleich zum Standardansatz ab. Bei 4 mol L^{-1} NaBr und KBr kam die Umsetzung fast vollständig zum Erliegen (Abbildung 5.2.9). Magnesiumchlorid inhibierte die Reaktion ab einer Konzentration von 1 mol L^{-1} fast vollständig.

Mit NaCl konnte bei allen untersuchten Konzentrationen der Enantiomerenüberschuss gesteigert werden. Bei einer Konzentration von 4 mol L^{-1} betrug der Enantiomerenüberschuss 98 %, gleichzeitig sank die S-CHBE-Konzentration auf 10 % vom Standardansatz.

Außer mit Natriumchlorid konnte lediglich mit Natriumbromid bei einer Konzentration von 1 mol L^{-1} der Enantiomerenüberschuss gesteigert werden. Natriumbromid und Kaliumbromid sind in ihrer Wirkung auf die S-CHBE-Konzentration vergleichbar, während die Inhibierung der Reaktion durch Natriumchlorid deutlich geringer ausfällt. Die Reaktion wird bei Zugabe der Salze unter vergleichbaren Konzentrationen überwiegend über das Kation beeinflusst.

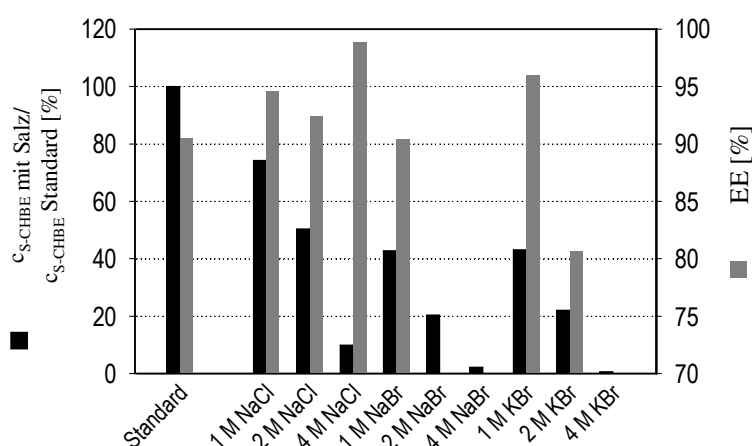


Abbildung 5.2.9: Einfluss von 1 mol L^{-1} , 2 mol L^{-1} und 4 mol L^{-1} NaCl, NaBr und KBr auf die Umsetzung von 4Cl-ACE; MgCl_2 -Konzentrationen ab 1 mol L^{-1} führten zu einer fast vollständigen Inhibierung der Reaktion und sind in der Graphik nicht gezeigt

Von den getesteten Salzen erwies sich Natriumchlorid als am besten geeignet, um den Enantiomerenüberschuss zu steigern. Gleichzeitig nahm die Ausbeute weniger stark ab als bei anderen Salzen bei gleichen Konzentrationen.

5.2.11 Tenside

In Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen wurden nichtionische Tenside in Konzentrationen von 0,2 %, 0,4 %, 1,0 % und 2,0 % im Einphasensystem ohne n-Butylacetat getestet. Die S-CHBE-Konzentration konnte durch Triton X-100 am effektivsten gesteigert werden, gleichzeitig nahm der Enantiomerenüberschuss ab. Bei nur wenigen getesteten Tensiden konnte eine Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei gleichzeitiger Abnahme der Produktkonzentration beobachtet werden.

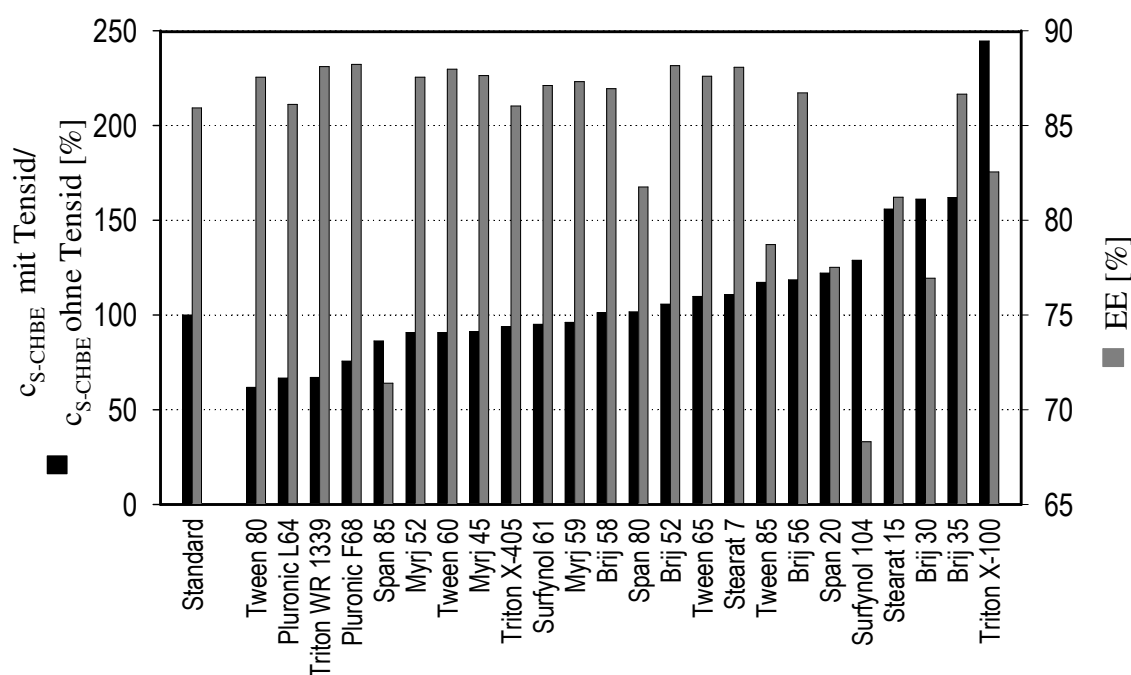


Abbildung 5.2.10: Einfluss nichtionischer Tenside (1 %) auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen, nach steigender S-CHBE-Konzentration geordnet. Stearat: Sucrose-Palmitat Stearat; Dipalmitat: Sucrose-Dipalmitat

Alle untersuchten ionischen Tenside (Triisopropylnaphtalensulfonsäure Na-Salz (TIP), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 2,5-Dimethylbenzenesulfonsäure (DMB), Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), Hyamine 2389[®], Zonyl FSA[®]) führten im getesteten Konzentrationsbereich von 0,25 – 1 % w/v zu einer Abnahme der S-CHBE-Konzentration und des Enantiomerenüberschusses.

Der Einfluss unterschiedlicher Triton X-100-Konzentrationen zwischen 0 % v/v und 2 % v/v auf die Umsetzung ist in Abbildung 5.2.11 dargestellt. Mit 0,5 % v/v Triton X-100 konnte die S-CHBE-Konzentration um 60 %, mit 1 % v/v Triton X-100 um 190 % gesteigert werden. Gleichzeitig sank der Enantiomerenüberschuss von 85 % auf 80 % ab. In gerührten Ansätzen mit 0,5 % v/v Triton X-100 konnte das Ergebnis bestätigt werden. Die Produktkonzentration stieg um 65 %, während der Enantiomerenüberschuss von 87 % auf 80 % abnahm.

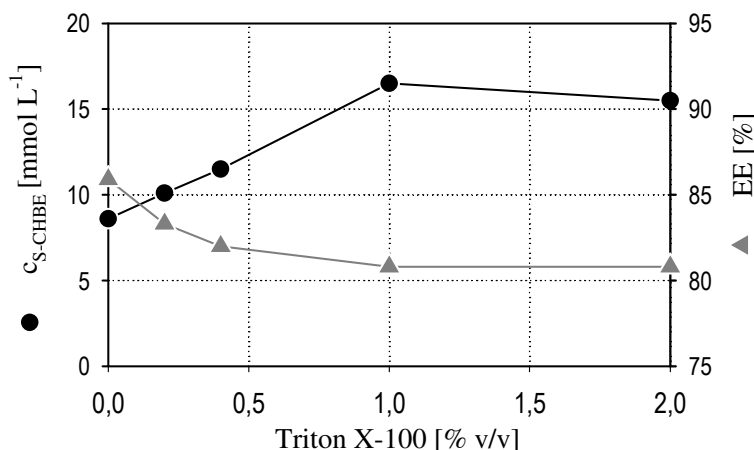


Abbildung 5.2.11: Einfluss von Triton X-100 auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen

Um zu untersuchen, ob die Steigerung der Produktkonzentration in Gegenwart von Triton X-100 auf die Permeabilisierung der Zellen und damit auf die Verringerung der Stofftransportlimitierung von Substrat und Produkt über die Zellmembran zurückzuführen ist, wurden die Zellen vor dem Umsetzungsversuch permeabilisiert.

Die Herstellung permeabilisierter Zellen erfolgte durch die Inkubation mit 0,5 % v/v Triton X-100 für 30 Minuten im Reaktionspuffer. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Reaktionspuffer resuspendiert. Die Umsetzung erfolgte in Standardansätzen im Einphasensystem und im Zweiphasensystem mit 7,5 % v/v n-Butylacetat. Zusätzlich wurden nicht permeabilisierte Zellen im Einphasensystem, im Einphasensystem mit 0,5 % v/v Triton X-100, im Zweiphasensystem mit 7,5 % v/v n-Butylacetat und im Zweiphasensystem mit 7,5 % v/v n-Butylacetat und 0,5 % v/v Triton X-100 untersucht. Damit wurde jede mögliche Kombination untersucht.

Durch Permeabilisierung der Zellen konnte die Produktkonzentration im Standardansatz im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen nur um 20 % gesteigert werden.

Bei nicht permeabilisierten Zellen konnte durch die Kombination von Triton X-100 und n-Butylacetat die S-CHBE-Konzentration um den Faktor 3,3 im Vergleich zum Standardansatz

gesteigert werden. Die Zunahme war gegenüber dem alleinigen Einsatz von Triton X-100 (Faktor 1,7) oder n-Butylacetat (Faktor 2,6) deutlich erhöht (Abbildung 5.2.12). Der Enantiomerenüberschuss sank von 89 % im wässrigen Reaktionssystem auf 85 % in allen anderen Reaktionssystemen.

In Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat bewirkt Triton X-100 die Ausbildung von sehr kleinen Lösungsmitteltropfen. Durch die sich vergrößernde Phasengrenzfläche wird der Stofftransport verbessert. Im Einphasensystem ist aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Substrates die Permeabilisierung der Zellen der Haupteffekt von Triton X-100.

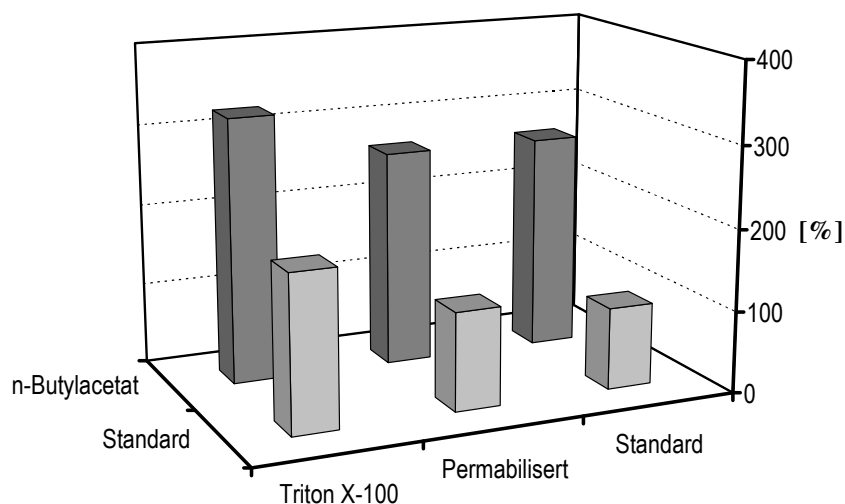


Abbildung 5.2.12: Einfluss von 0,5 % v/v Triton X-100 und 7,5 % v/v n-Butylacetat auf die S-CHBE-Konzentration mit permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen in gerührten Ansätzen; Bezugsgröße ist die S-CHBE-Konzentration im wässrigen Puffer mit nicht permeabilisierten Zellen (100 %)

5.2.12 Inhibitoren

In der Untersuchung von Nakamura (1989a) zur Steigerung des Enantiomerenüberschusses durch die Zugabe verschiedener Alkohole, Ketone und anderer Verbindungen waren Allylalkohol, 1-Buten-3-ol, Methylacrylat, Methylvinylketon und 2-Cyclohexen-1-ol die Verbindungen, die am besten geeignet waren.

Der Einfluss von Enzyminhibitoren wurde zunächst in Einphasensystemen untersucht. Im ersten Experiment mit 0,5 mL Reaktionsvolumen wurden Allylalkohol, 1-Buten-3-ol, Methylacrylat

und Methylvinylketon in Konzentrationen von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ und $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ getestet. Die Zugabe der Inhibitoren und des Substrates erfolgte gleichzeitig. Dabei konnte kein positiver Effekt auf den Enantiomerenüberschuss festgestellt werden.

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen vor Substratzugabe 30 min in Gegenwart von 1 mmol L^{-1} Allylalkohol, 2-Cyclohexen-1-ol und Methylacrylat inkubiert. Auch hier konnte keine Steigerung erzielt werden. Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen entsprachen denen bei Nakamura et al. (1989a), waren aber für die hier gewählten Reaktionsbedingungen zu niedrig.

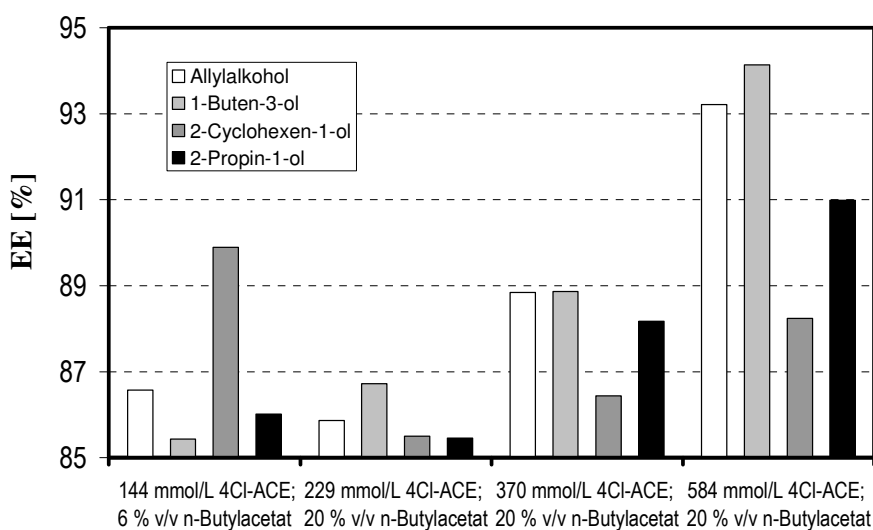


Abbildung 5.2.13: Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren auf den Enantiomerenüberschuss in Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat abhängig von der 4Cl-ACE-Konzentration; es wurden jeweils 4 % v/v Inhibitor eingesetzt; im Standardansatz (140 mmol L^{-1} 4Cl-ACE, 20 % n-Butylacetat) betrug der Enantiomerenüberschuss 85 %

In weiteren Experimenten wurden jeweils 4 % v/v ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) Allylalkohol, 1-Buten-3-ol, 2-Cyclohexen-1-ol und 2-Propin-1-ol bei unterschiedlichen Konzentrationen von 4Cl-ACE und n-Butylacetat untersucht. Die Zugabe der Inhibitoren, des Substrats und von n-Butylacetat erfolgte zeitnah, ohne die Zellen mit dem Inhibitor allein vorher zu inkubieren. Dabei wurden mit Allylalkohol und 1-Buten-3-ol die besten Ergebnisse erzielt (Abbildung 5.2.13).

Als geeignete Enzyminhibitoren erwiesen sich Allylalkohol und 1-Buten-3-ol. Für die weiteren Versuche wurde 1-Buten-3-ol verwendet.

5.2.13 Nährstoffe

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Glukosekonzentrationen von 1 mol L^{-1} negativ auf die Zellviabilität auswirken können (Granot 2003). Um die Viabilität der Zellen zu erhöhen, wurden verschiedene komplexe Medienkomponenten in den Reaktionspuffer gegeben.

Folgende Zusammensetzungen des Reaktionsmediums wurden verwendet:

- Standardreaktionspuffer mit 7,4 % v/v n-Butylacetat (Referenz)
- Supplementierung mit 10 g L^{-1} Hefeextrakt, 20 g L^{-1} Pepton und 1 % v/v Maisquellwasser
- Supplementierung mit 20 g L^{-1} Yeast Nitrogen Base (YNB) mit Aminosäuren
- Supplementierung mit 20 g L^{-1} Yeast Nitrogen Base (YNB) ohne Aminosäuren

Die Supplementierung des Reaktionspuffers mit komplexen Medienkomponenten führte im Vergleich zum Standardansatz zu einer Abnahme der S-CHBE-Konzentration um ca. 50 %. Eine Erhöhung der Stabilität der Zellen wurde offensichtlich nicht erreicht. Die deutliche Abnahme der Produktkonzentration konnte jedoch nicht erklärt werden.

Im Ansatz mit CSL-Medium sank der Enantiomerenüberschuss von 63 % auf 58 %, während er in den anderen Ansätzen ohne Maisquellwasser nicht durch die komplexen Nährmedien beeinflusst wurde. Die Ergebnisse weisen erneut auf den negativen Einfluss von Maisquellwasser auf den Enantiomerenüberschuss hin, wie er schon bei der Optimierung der Anzuchtbedingungen beobachtet worden ist.

5.2.14 Acetongetrocknete und gefriergetrocknete Zellen

Die Trocknung von Zellen durch Gefriertrocknung (Lyophilisieren) oder Acetontrocknung stellt eine Möglichkeit dar, die Stabilität des Biokatalysators zu erhöhen und gleichzeitig den Enantiomerenüberschuss zu steigern (Matsuda et al. 2000). Es wurde untersucht, inwieweit sich die Ergebnisse, die in Ganzzellbiotransformationen mit *Geotrichum candidum* erzielt wurden, auf *S. cerevisiae* übertragen lassen.

Die Herstellung der Zellen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Umsetzung erfolgte unter Standardbedingungen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat. Mit lyophilisierten Zellen wurde eine vergleichbare S-CHBE-Konzentration und ein Enantiomerenüberschuss erzielt wie unter

Standardbedingungen. Mit acetongetrockneten Zellen sank der Enantiomerenüberschuss von 85 % auf 76 % und die S-CHBE-Konzentration um 40 %.

Der Einsatz von gefriergetrockneten oder acetongetrockneten Zellen erbrachte keinen Vorteil im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

5.2.15 Vorinkubation

Die unterschiedliche thermische Stabilität der verschiedenen hefeeigenen Carbonylreduktasen kann zur Steigerung des Enantiomerenüberschusses ausgenutzt werden. Dazu werden die Zellen vor der Umsetzung bei Temperaturen von 40 – 60 °C inkubiert.

In den Versuchen wurden Zellen im Reaktionspuffer ohne Substrat im 1 mL-Maßstab für 0 min bis 30 min bei 50 °C, 55 °C bzw. 60 °C im Thermomixer vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 mmol L⁻¹ NADP, 140 mmol L⁻¹ 4Cl-ACE und 7,5 % v/v n-Butylacetat. Die Ansätze wurden bei 25 °C über 20 h inkubiert.

Temperaturen von 60 °C führten zu einer fast vollständigen Inaktivierung der Enzyme innerhalb von 15 Minuten. Bei 55 °C konnte der Enantiomerenüberschuss durch eine Inkubationsdauer von 20 Minuten von 40 % auf 68 % gesteigert werden, gleichzeitig sank die S-CHBE-Konzentration um 20 % (Abbildung 5.2.14).

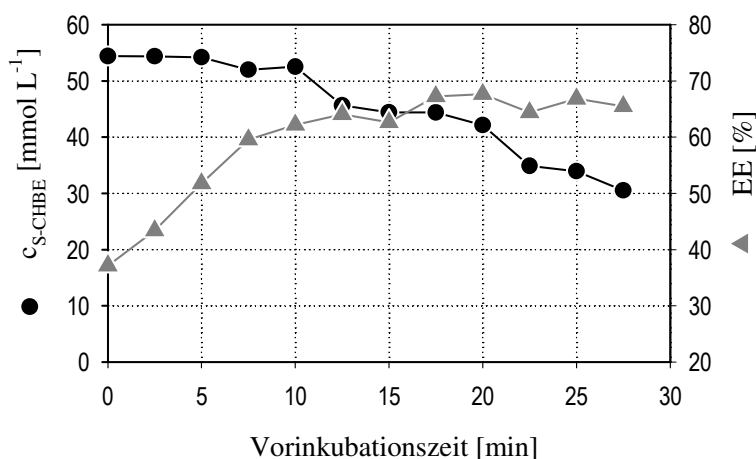


Abbildung 5.2.14: Einfluss der Vorinkubationsdauer bei 55 °C auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in 1 mL Ansätzen

Ein vergleichbarer Verlauf wurde bei einer Vorinkubationstemperatur von 50 °C erzielt. Der Effekt der Vorinkubation hing dabei von der Qualität der eingesetzten Zellen, der Inkubationsdauer und der Temperatur ab. Zusätzlich muss noch die Aufheiz- bzw. Abkühlphase

bei der Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer berücksichtigt werden, die in den Kleinansätzen mit 1 mL Reaktionsvolumen aber nicht relevant sind.

In gerührten 20 mL Ansätzen konnte durch Vorinkubation bei 45 °C für 50 min der Enantiomerenüberschuss von 70 % auf 80 % ohne signifikante Abnahme der S-CHBE-Konzentration gesteigert werden. Durch das größere Reaktionsvolumen und die damit verbundene längere Aufheizphase des Mediums war eine längere Inkubationsdauer notwendig.

5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Ziel der Optimierung war die Steigerung des Enantiomerenüberschusses und der Ausbeute bei der Reaktion. In den Vorversuchen wurde der Einfluss vieler unterschiedlicher Variablen auf den Enantiomerenüberschuss und die Produktkonzentration bei der Umsetzung von 4Cl-ACE zu S-CHBE untersucht (siehe Kapitel 5.2). Für die weitere gezielte Optimierung der Reaktionsbedingungen sollten möglichst viele Variablen berücksichtigt werden. Als geeignete Versuchsplanungsstrategie, die neben einer großen Anzahl an Variablen auch deren Interaktion berücksichtigen kann, wurde ein genetischer Algorithmus ausgewählt.

Bei der experimentellen Optimierung mit einem genetischen Algorithmus muss die Anzahl der parallel durchgeführten Versuche mindestens doppelt so groß sein wie die Anzahl der zu optimierenden Variablen. Aufgrund der starken pH-Abhängigkeit der Umsetzung mussten die Versuche unter pH-kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Das Mikrodosiersystem FedBatch Pro, das für die Versuche eingesetzt wurde, ermöglicht eine 16-fach parallele pH-Kontrolle, wobei die Anzahl der Stellplätze auf dem Mehrfachmagnetrührer jedoch auf 15 begrenzt war. Die maximale Anzahl der zu berücksichtigenden Variablen war daher aufgrund der experimentellen Rahmenbedingungen auf sieben beschränkt.

Zuerst mussten aus allen untersuchten Einflussgrößen die Variablen ausgewählt werden, die in der Optimierung berücksichtigt werden sollten. Für die Optimierung waren die Variablen von Bedeutung, bei deren Änderung zumindest eine der Zielgrößen ein Maximum durchläuft. Außerdem wurden die Variablen berücksichtigt, die einen entgegengesetzten Effekt auf den Enantiomerenüberschuss und die Produktkonzentration hatten, also die den Enantiomerenüberschuss bei gleichzeitiger Abnahme der Produktkonzentration steigerten bzw. die eine Steigerung der Produktkonzentration bewirkten, gleichzeitig aber zu einer Abnahme des Enantiomerenüberschusses führten.

Im zweiten Schritt erfolgte die Definition des Variablenraums, in dem die Optimierung durchgeführt werden sollte. Dieser ist so zu wählen, dass das Optimum gefunden werden kann. Da die Lage des Optimums vor Beginn der Optimierung nicht bekannt ist, ist der Konzentrationsbereich für die einzelnen Komponenten so groß wie möglich zu wählen. Die Grenzen des Variablenraums ergeben sich dabei zum einen aus physikalischen Größen wie z.B. der Löslichkeit einer Komponente. Zum anderen haben die Vorversuche gezeigt, dass ein

Überschreiten einer kritischen Konzentrationsgrenze bei einigen Medienkomponenten nicht sinnvoll war.

5.3.1 Festlegung der Reaktionsbedingungen

Die wesentlichen in den Vorversuchen untersuchten Variablen, die für eine Optimierung in Frage kamen, sind im Folgenden zusammengefasst und mit Hinblick auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bewertet.

Biomassenkonzentration: Der Enantiomerenüberschuss wurde durch die Konzentration des eingesetzten Biokatalysators nicht beeinflusst, während die S-CHBE-Konzentration linear mit der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration anstieg. Die Produktbildungskapazität war bei identischen Reaktionsbedingungen unabhängig von der Katalysatormenge. Die Biomassenkonzentration wurde nicht als Variable berücksichtigt, sondern bei der weiteren Optimierung konstant gehalten.

Zellqualität: Die Aktivität der Zellen hatte einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Umsetzung. Sowohl die Produktkonzentration als auch der Enantiomerenüberschuss nahmen mit abnehmender Biokatalysatoraktivität ab. Eine optimale Umsetzung bezüglich Ausbeute und Enantiomerenüberschuss erforderte eine hohe Qualität der eingesetzten Zellen. Da für die Optimierungsversuche nicht immer Zellen gleicher Qualität zu Verfügung standen, war diese Variable eine Störgröße.

pH: Der pH beeinflusste sowohl die Produktkonzentration als auch den Enantiomerenüberschuss. Bei pH 7,0 war die Ausbeute maximal. Die Erhöhung des pH führte zu einer Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei gleichzeitig starkem Rückgang der Ausbeute. Ein konstanter pH von 7,0 wurde als sinnvoller Kompromiss zur Optimierung beider Zielgrößen gewählt.

Substratkonzentration: Der Enantiomerenüberschuss wurde durch die Substratkonzentration nicht beeinflusst. Hohe Anfangskonzentrationen an 4Cl-ACE führten jedoch zu einer Abnahme der Produktkonzentration. In einem Zweiphasensystem kann die Substratkonzentration über das Phasenverhältnis wässrige/organische Phase eingestellt werden.

Die 4Cl-ACE-Konzentration wurde so gewählt, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte. Eine Steigerung des Umsatzes

durch verbesserte Reaktionsbedingungen war dadurch einfach zu messen. Die Variation der Konzentration an 4Cl-ACE in der wässrigen Phase erfolgte über das eingesetzte Volumen n-Butylacetat.

Organische Lösungsmittel: Die Reaktion wurde im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat als Lösungsmittelphase durchgeführt. Die Steigerung der Produktkonzentration durch Zugabe von n-Butylacetat war abhängig vom Anteil an n-Butylacetat im Reaktionssystem. Über das Phasenverhältnis n-Butylacetat/wässrige Phase wurde die 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase variiert (wie oben beschrieben). In der Optimierung wurde als Obergrenze ein Phasenverhältnis von $\alpha = 0,5$ eingesetzt.

Salze: Hohe Salzkonzentrationen führten zu einer Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei gleichzeitiger Abnahme der Produktkonzentration. Natriumchlorid war dabei das Salz, das die Ausbeute an S-CHBE bei gleichzeitiger maximaler Steigerung des Enantiomerenüberschusses am wenigsten verringerte. Konzentrationen von 1 mol L^{-1} führten zu einer starken Inaktivierung des Katalysators, so dass die obere Konzentrationsgrenze für die Optimierung auf $0,66 \text{ mol L}^{-1}$ festgelegt wurde. Eine Variation der Ionenstärke erfolgte außerdem über die Konzentration des Kaliumphosphatpuffers, wobei der Variablenbereich auf 0 mol L^{-1} bis $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ festgelegt wurde.

Glukose: In den Vorversuchen war der Enantiomerenüberschuss bei einer Glukosekonzentration von 1 mol L^{-1} maximal, der Einfluss auf die Produktkonzentration war gering. Damit war auch die obere Konzentrationsgrenze für die Optimierung definiert. Höhere Glukosekonzentrationen erschienen nicht sinnvoll, da bei der eingesetzten 4Cl-ACE-Konzentration von 450 mmol L^{-1} für eine effektive Cofaktorregenerierung nur die äquivalente Konzentration an Glukose notwendig war. Da *S. cerevisiae* intrazelluläres Glycogen für die Cofaktorregenerierung einsetzen kann, wurde die untere Konzentrationsgrenze auf 0 mol L^{-1} festgelegt (Pereira et al., 1989b).

Inhibitor: In Reaktionssystemen mit n-Butylacetat konnte mit 1-Buten-3-ol eine Steigerung des Enantiomerenüberschusses erreicht werden. Eine effektive Wirkung wurde bei einer Konzentration von 4 % v/v erzielt. Für die Optimierung wurde der zu testende Konzentrationsbereich auf maximal 10 % v/v erweitert.

Tenside: Mit Triton X-100 konnte in Einphasensystemen und in Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat eine Steigerung der Produktkonzentration erzielt werden. Gleichzeitig nahm der Enantiomerenüberschuss geringfügig ab. In den Vorversuchen wurde der maximale Effekt bei einer Konzentration von 1 % v/v erzielt, wobei sich noch höhere Konzentrationen nicht negativ auf den Umsatz oder Enantiomerenüberschuss ausgewirkt haben. Für die Optimierung wurde eine Obergrenze von 10 % v/v festgelegt.

NAD/NADP-Konzentration: Die Zugabe geringer Cofaktorkonzentrationen führten zu einer Verbesserung der Umsetzung. Um eine deutliche Steigerung der Produktkonzentration über die Zugabe von NAD oder NADP zu erreichen, sind jedoch hohe Konzentrationen an Cofaktoren notwendig. Geringe Konzentrationen wurden bei jedem Optimierungsversuch eingesetzt, jedoch nicht als Variable untersucht.

Reaktionstemperatur: Der Enantiomerenüberschuss nahm geringfügig zu, wenn die Umsetzung bei 25 °C anstatt bei 35 °C durchgeführt wurde. Optimal für die S-CHBE-Konzentration waren Reaktionstemperaturen von 30 °C oder weniger. Da die Parallelansätze nur bei einer identischen Temperatur durchgeführt werden konnten, wurden alle Experimente bei 25 °C durchgeführt, um einen maximalen Enantiomerenüberschuss zu erreichen.

In Tabelle 5.3.1 sind die berücksichtigten Variablen und deren Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss und die erzielbare S-CHBE-Konzentration zusammengefasst.

Tabelle 5.3.1: Variablen mit Einfluss auf die Umsetzung von 4Cl-ACE mit *S. cerevisiae*; Fett: wurden als Variablen bei der Optimierung eingesetzt

Variable	Einfluss auf Enantiomerenüberschuss	Einfluss auf S-CHBE-Konzentration
Biomassenkonzentration	Keinen Einfluss	Produktbildungskapazität ist konstant
Zellqualität/Aktivität	Zunahme mit Aktivität	Zunahme mit Aktivität
Reaktionstemperatur	Abnahme mit steigender Temperatur	Abnahme bei Temperaturen über 30 °C
4Cl-ACE-Konzentration	Keinen Einfluss	Maximum bei ca. 100 mmol L ⁻¹
n-Butylacetat-Anteil	Abnahme, unabhängig vom n-Butylacetat Anteil	Zunahme bis $\alpha = 0,06$
pH	Zunahme mit pH	Bei pH 7,0 maximal
NaCl/Salzkonzentration	Zunahme mit steigender NaCl-Konzentration	Abnahme mit steigender NaCl-Konzentration
Glukose	Optimum bei 1 mol L⁻¹	Einfluss gering
Triton X-100	Abnahme mit steigender Triton X-100-Konzentration	Zunahme bis 1 % v/v
1-Buten-3-ol [4 % v/v]	Zunahme	Abnahme
NADP	Zunahme	Zunahme
Vorinkubation bei 50 °C	Zunahme mit Inkubationsdauer	Abnahme mit Inkubationsdauer

5.3.2 Optimierung

Es wurden insgesamt acht Versuchsreihen („Generationen“) mit 14 Parallelansätzen durchgeführt. Der untersuchte Variablenraum ist in Tabelle 5.3.2 gezeigt. In den letzten vier Generationen wurde ein 15. Ansatz unter Standardbedingungen als Referenz durchgeführt.

In der fünften Generation wurde ein Medium gefunden, das in den Folgegenerationen die besten Ergebnisse hinsichtlich der beiden Zielgrößen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute erzielte. In der achten Generation waren vier der 14 Ansätze gleich zusammengesetzt, so dass die Optimierung abgebrochen wurde. In insgesamt 11 der 112 durchgeführten Experimente wurde ein Reaktionsmedium eingesetzt, das der optimierten Zusammensetzung entsprach. Die Zusammensetzung des optimierten Mediums ist in Tabelle 5.3.2 aufgeführt.

Die Änderungen der beiden Zielgrößen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute bezogen auf den Referenzansatz sind in Abbildung 5.3.1 dargestellt. In Tabelle 5.3.2 ist der untersuchte

Variablenraum, die Zusammensetzung des Referenzmediums und die Zusammensetzung des optimierten Mediums angegeben.

Tabelle 5.3.2: Variablenraum für die Optimierung, die Zusammensetzung des Referenzmediums und die Zusammensetzung des optimierten Mediums. Die Konzentrationen beziehen sich auf die wässrige Phase ohne n-Butylacetat; für n-Butylacetat ist das Phasenverhältnis α Lösungsmittel/wässrige Phase angegeben

Variable	Konzentrationsbereich für Optimierung	Referenzansatz	Optimiertes Medium
KPi-Puffer, pH 7,0	0 – 0,60 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,50 mol L ⁻¹
Natriumchlorid	0 – 0,66 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,19 mol L ⁻¹
n-Butylacetat	α : 0 – 0,5	α : 0,2	α : 0,5
Glukose	0 – 1,0 mol L ⁻¹	1,0 mol L ⁻¹	0,32 mol L ⁻¹
Triton X-100	0 – 10 % v/v	0 % v/v	6,5 v/v
Inhibitor 1-Buten-3-ol	0 – 10 % v/v	0 % v/v	0,8 % v/v
Konstante Größen			
Biomassenkonzentration	25 g L ⁻¹ Biotrockenmasse		
4Cl-ACE-Konzentration	6,6 % v/v (450 mmol L ⁻¹)		
pH	7,0		
NADP-Konzentration	10 μ mol L ⁻¹		
NAD-Konzentration	100 μ mol L ⁻¹		
Temperatur	25 °C		

Bezogen auf die Versuchsansätze, die mit dem optimierten Medium durchgeführt wurden, konnte die Ausbeute um 53 % und der Enantiomerenüberschuss um 17 % im Vergleich zum Referenzansatz gesteigert werden. Die Änderung der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses in Ansätzen unter optimierten Reaktionsbedingungen variierte in den einzelnen Generationen sehr stark, was auf die unterschiedliche Qualität des eingesetzten Biokatalysators zurückzuführen ist. Bei Zellen vergleichbarer Qualität betrug die Zunahme der Ausbeute 51 % (± 14 % Standardabweichung). Der Enantiomerenüberschuss konnte von 66 % auf 80 % ($\pm 2,1$ % Standardabweichung) gesteigert werden. Die hohen Standardabweichungen bei der Ausbeute sind auf die niedrigen Konzentrationen von S-CHBE in der Probe zurückzuführen, wodurch sich bei der Analytik Standardabweichungen bei Wiederholungsmessungen gleicher Proben zwischen 5 und 7 % ergeben können.

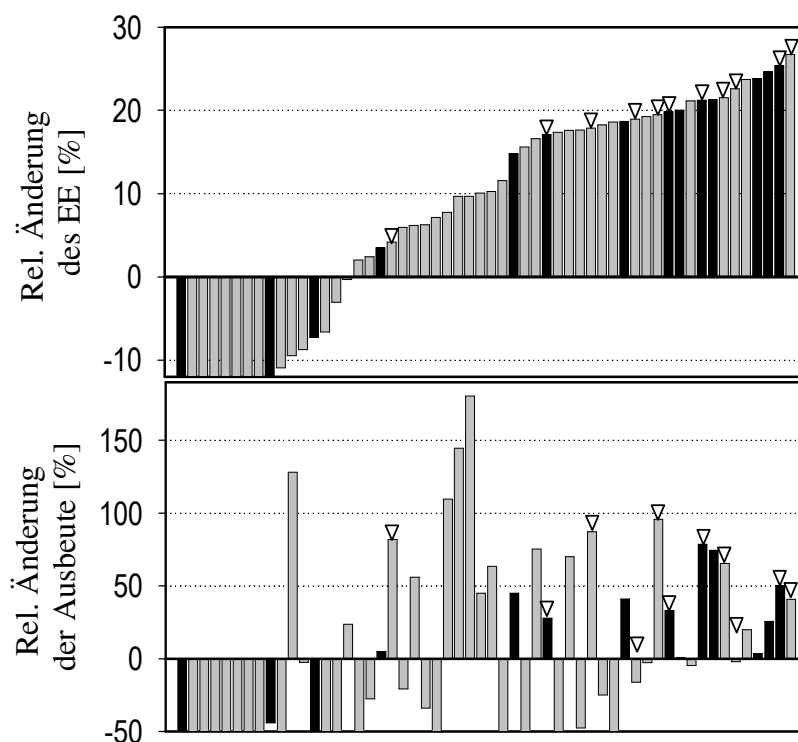


Abbildung 5.3.1: Änderung des Enantiomerenüberschusses und der S-CHBE Ausbeute bezogen auf den Referenzansatz; schwarze Balken: Ergebnisse aus 8. Generation; Dreiecke markieren Versuchsansätze mit optimierter Medienzusammensetzung

In allen Versuchen, bei denen eine deutliche Steigerung des Enantiomerenüberschusses erzielt wurde, war die Zusammensetzung des Reaktionsmediums ähnlich der Zusammensetzung des optimierten Mediums. Nur eine von sechs betrachteten Variablen wich vom optimierten Medium ab. In Versuchsansätzen mit einer Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses wich die Medienzusammensetzung deutlich vom optimierten Medium ab.

Wie aus Abbildung 5.3.1 ersichtlich wird, existiert kein Medium, in dem sowohl der Enantiomerenüberschuss als auch die Ausbeute ihren maximalen Wert erreichten. Wenn nur eine Zielgröße, der Enantiomerenüberschuss oder die Ausbeute maximiert werden sollen, sind unterschiedliche Reaktionsmedien einzusetzen.

Die Wirkungsweise des genetischen Algorithmus ist in Abbildung 5.3.2 dargestellt. In der ersten Generation sind die Konzentrationsniveaus der einzelnen Variablen im Variablenraum weit verteilt. Bis auf NaCl decken alle Niveaus mindestens 80 % des Variablenraums ab, bei NaCl sind es ca. 70 %. Im Zuge der Optimierung konvergiert der genetische Algorithmus, die

Zusammensetzung der Reaktionsansätze wird immer ähnlicher. In Generation 8 ist die Verteilung der Konzentrationsniveaus sehr schmal. Bei allen Variablen wird das Optimum innerhalb des vorgegebenen Variablenraums gefunden, lediglich bei n-Butylacetat liegt das Optimum an der oberen vorgegebenen Konzentrationsgrenze.

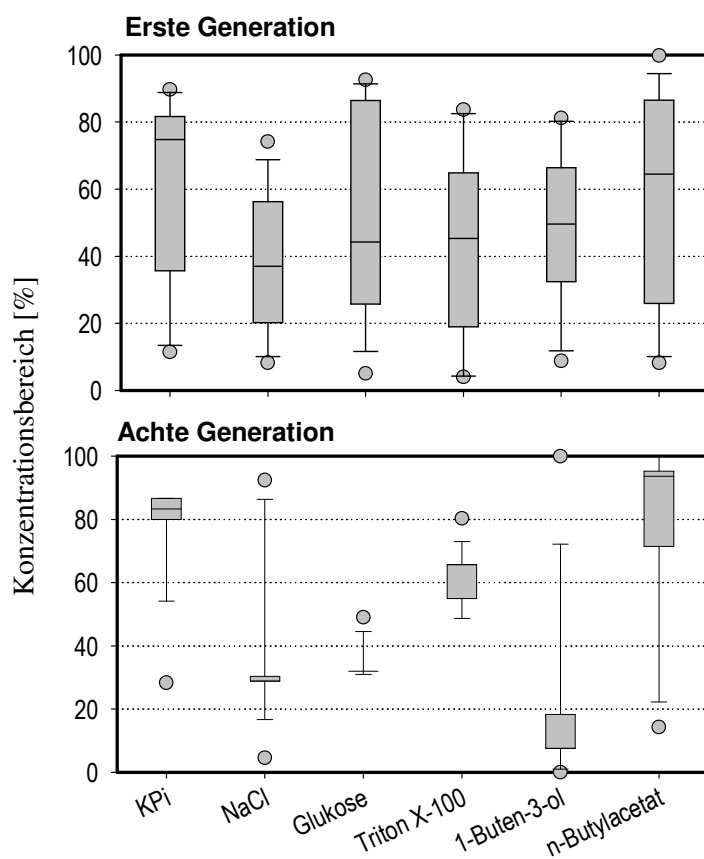


Abbildung 5.3.2: Verteilung der Konzentrationsniveaus der untersuchten Medienkomponenten in der „Box-Plot“ Darstellung; zur besseren Vergleichbarkeit sind die Konzentrationsbereiche auf 100 % normiert; die Box umfasst die mittleren 50 % der Verteilung (entsprechend 7 Versuchsansätzen) und reicht vom unteren bis oberen Viertel („Quartil“). Der Querbalken gibt den Median der Verteilung an; die Fehlerbalken umfassen 80 % der Verteilung (10 % und 90 % Perzentil). Die Punkte stellen die Konzentrationen dar, die außerhalb dieses Bereiches liegen

Die in dem genetischen Algorithmus vorgegebene Mutationsrate bewirkt, dass bei jeder Variable „Ausreißer“ auftreten. Daher wurden auch in der achten Generation noch Konzentrationen im Variablenraum getestet, die stark von der optimierten Zusammensetzung abwichen (Punkte in der „Box-Plot“ Darstellung, Abbildung 5.3.2). Bei diesen Versuchsansätzen wurden Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse gemessen, die zum Teil deutlich schlechter als im Referenzansatz waren.

Der Einfluss der wichtigsten Variablen auf die Umsetzung ist im Folgenden zusammengefasst.

Zellqualität

Die Effektivität der Optimierung hängt stark von der Qualität der eingesetzten Zellen ab. Wurden Biokatalysatoren niedriger Qualität eingesetzt, so war die Steigerung der Ausbeute und des Enantiomerenüberschusses höher als, wenn die Grundaktivität der verwendeten Zellen bereits hoch war (Tabelle 5.3.3). Um hohe Ausbeuten und einen hohen Enantiomerenüberschuss zu erzielen, müssen Zellen hoher Qualität eingesetzt werden. Auch durch die Verwendung des optimierten Reaktionsmediums kann der negative Einfluss wenig aktiver Zellen auf die Umsetzung nicht kompensiert werden.

Tabelle 5.3.3: Einfluss von Zellalter und Reaktionsmedium auf die Umsetzung anhand beispielhaft ausgewählter Biotransformationen

Zellalter		Produktbildungskapazität		Enantiomerenüberschuss	
		mmol g ⁻¹	Zunahme	%	Zunahme
1 Woche	Referenzansatz	2,0	40 %	84	7 %
	Optimiertes Medium	2,8		90	
5 Wochen	Referenzansatz	0,9	70 %	65	20 %
	Optimiertes Medium	1,5		78	

n-Butylacetat

Der hohe Anteil an n-Butylacetat im Medium führt zu einer starken Konzentrationsminderung von 4Cl-ACE und S-CHBE in der wässrigen Phase. Die Verteilungskoeffizienten für das System aus optimiertem Reaktionspuffer und n-Butylacetat sind für 4Cl-ACE $k = 120$ und für S-CHBE $k = 75$. Bei einem Phasenverhältnis von $\alpha = 0,5$ und einer 4Cl-ACE-Konzentration von 450 mmol L^{-1} beträgt die Konzentration in der wässrigen Phase $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Durch die niedrige Gleichgewichtskonzentration wird auch die Hydrolyse von 4Cl-ACE in der wässrigen Phase minimiert, wodurch die Bildung potenziell toxischer Nebenprodukte verhindert wird.

Triton X-100

In den Vorversuchen betrug das Optimum der Triton X-100-Konzentration zur Steigerung der S-CHBE-Konzentration 1 % v/v . Diese Konzentration gilt als ausreichend, um eine effektive Permeabilisierung der Zellen zu gewährleisten (Laouar et al. 1996). Im optimierten Medium ist die Konzentration von Triton X-100 mit $6,5 \text{ % v/v}$ deutlich höher.

Ob unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine so hohe Tensidkonzentration zur Zellpermeabilisierung notwendig war oder für eine effektive Minimierung der Tropfengröße erforderlich ist, bleibt offen.

Salzkonzentration

Als Salze liegen im optimierten Medium Natriumchlorid ($0,19 \text{ mol L}^{-1}$) und Kaliumphosphatpuffer ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) vor. In den Vorversuchen haben hohe Salzkonzentrationen zu einer Steigerung des Enantiomerenüberschusses geführt. Die verwendeten Salzkonzentrationen waren aber noch nicht kritisch für die Viabilität der Zellen (Blomberg 1997).

Die maximale Konzentration an S-CHBE wurde bei den Experimenten erzielt, bei denen sehr geringe NaCl-Konzentrationen eingesetzt wurden, die Zusammensetzung der anderen Medienkomponenten aber der des optimierten Mediums entsprach. So stieg in einer Versuchsreihe (Generation) die Ausbeute bei Reduktionen mit optimiertem Medium im Vergleich zum Referenzansatz um den Faktor 1,8. Wurde bei sonst identischer Zusammensetzung des Reaktionsmediums eine Natriumchloridkonzentration von $0,0 \text{ mol L}^{-1}$ bzw. $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ eingesetzt, stieg die Ausbeute im Vergleich zum Referenzansatz um den Faktor 2,8 bzw. 2,3.

Glukose

Die Glukosekonzentration ist im optimierten Medium mit $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ deutlich geringer als im Referenzansatz unter Standardbedingungen mit 1 mol L^{-1} . Bei allen Versuchsätzen zur Medienoptimierung wurde eine maximale S-CHBE-Konzentration von 50 mmol L^{-1} erzielt. Zur Cofaktorregenerierung reicht ein stöchiometrischer Umsatz von Glukose, so dass im optimierten Medium die Glukose im 6-fachen Überschuss vorliegt.

1-Buten-3-ol

Die Inhibitorkonzentration im optimierten Medium beträgt $0,8 \text{ \% v/v}$ (92 mmol L^{-1}). In Ansätzen mit deutlich höheren Konzentrationen nahm die Ausbeute und der Enantiomerenüberschuss ab. Wurde im optimierten Medium die Inhibitorkonzentration auf $7,6 \text{ \% v/v}$ erhöht, so sank der Enantiomerenüberschuss im Vergleich zum Referenzansatz von 72 \% auf 70 \% und die Ausbeute um 33 \% .

Insgesamt zwei Ansätze mit optimierter Medienzusammensetzung aber ohne 1-Buten-3-ol wurden in der 7. und 8. Generation durchgeführt. In den Versuchen konnte keine signifikante Verringerung des Enantiomerenüberschusses durch das Fehlen des Inhibitors im Vergleich zum Medium mit 1-Buten-3-ol beobachtet werden (Tabelle 5.3.4). Durch die Optimierung der

Reaktionsbedingungen wurde die Aktivität der Carbonylreduktasen mit unerwünschter Stereospezifität soweit reduziert, dass der Enzyminhibitor so gut wie keinen Effekt auf den Enantiomerenüberschuss hat.

Tabelle 5.3.4: Einfluss von 1-Buten-3-ol auf den Enantiomerenüberschuss in Ansätzen mit optimiertem Reaktionsmedium; bei den Ansätzen mit optimiertem Medium ist die Anzahl der Versuche angegeben

		Enantiomeren- überschuss	Rel. Änderung zur Referenz
Generation 7	Referenz	65 %	
	Opt. Medium ohne 1-Buten-3-ol	78 %	20 %
	Opt. Medium mit 1-Buten-3-ol	79 % (n = 4)	21 %
Generation 8	Referenz	68 %	
	Opt. Medium ohne 1-Buten-3-ol	81 %	19 %
	Opt. Medium mit 1-Buten-3-ol	82 % (n = 4)	21 %

5.3.3 Charakterisierung der optimierten Reaktionsbedingungen

Umsetzungen im optimierten Medium wurden mit Umsetzungen im Referenzmedium mit n-Butylacetat in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten verglichen. In einem weiteren Ansatz (Ansatz 1, Tabelle 5.3.5) wurde ein Medium eingesetzt, dessen Zusammensetzung geringfügig vom optimierten Medium abwich ($0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ NaCl, 4,9 % v/v Triton X-100 bei sonst identischer Zusammensetzung). Der Enantiomerenüberschuss und die Ausbeute waren bei Verwendung dieses Mediums und des optimierten Mediums vergleichbar. Alle drei Versuche wurden unter pH-kontrollierten Bedingungen mit 150 mL Reaktionsvolumen durchgeführt.

Bei allen Ansätzen konnte durch den Einsatz der optimierten Reaktionsbedingungen der Enantiomerenüberschuss und die Produktbildungskapazität im Vergleich zum Referenzansatz gesteigert werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen resultieren aus der unterschiedlichen Qualität der eingesetzten Zellen. Der Enantiomerenüberschuss nahm im Mittel um 19 % und die Produktbildungskapazität um 40 % zu. Charakteristisch für alle Versuche war die Zunahme der Halbwertszeit des Biokatalysators, wenn die Umsetzung im

optimierten Medium durchgeführt wurde. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit sank dagegen um 17 – 45 %.

Tabelle 5.3.5: Einfluss des optimierten Mediums auf ausgewählte Größen in Umsetzungsversuchen; Referenz: Referenzansatz mit n-Butylacetat (Standard-Medium); Ansatz 1: Medienzusammensetzung wich in folgenden Punkten vom Optimum ab: NaCl: 0 mmol L⁻¹; Triton X-100: 4,9 % v/v

Ansatz		EE [%]	Produktbildungs- kapazität [mmol g ⁻¹]	t _½ [h]	r ₀ [μmol g ⁻¹ min ⁻¹]
1	Referenz	59	0,75	1,8	4,4
	Optimiertes Medium	71	1,0	3,4	2,6
	Änderung	20 %	33 %	88 %	- 40 %
2	Referenz	63	0,4	1,5	3,6
	Optimiertes Medium	80	0,6	2,0	3,0
	Änderung	27 %	46 %	33 %	- 17 %
3	Referenz	64	0,33	1,0	5,1
	Optimiertes Medium	70	0,50	2,0	2,7
	Änderung	9 %	53 %	100 %	- 45 %

Der Vergleich der Produktbildungsraten aus Ansatz 1 und dem parallel dazu durchgeführten Referenzansatz (Abbildung 5.3.3) beider Reaktionsansätze zeigt, dass im optimierten Medium die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Reaktion deutlich langsamer abläuft als im Referenzansatz. Im Referenzmedium kam die Reaktion nach 8 Stunden zum Erliegen, während sie im optimierten Medium noch deutlich länger ablief. Entsprechend größer war die Halbwertszeit des Biokatalysators im optimierten Reaktionsmedium (Tabelle 5.3.5).

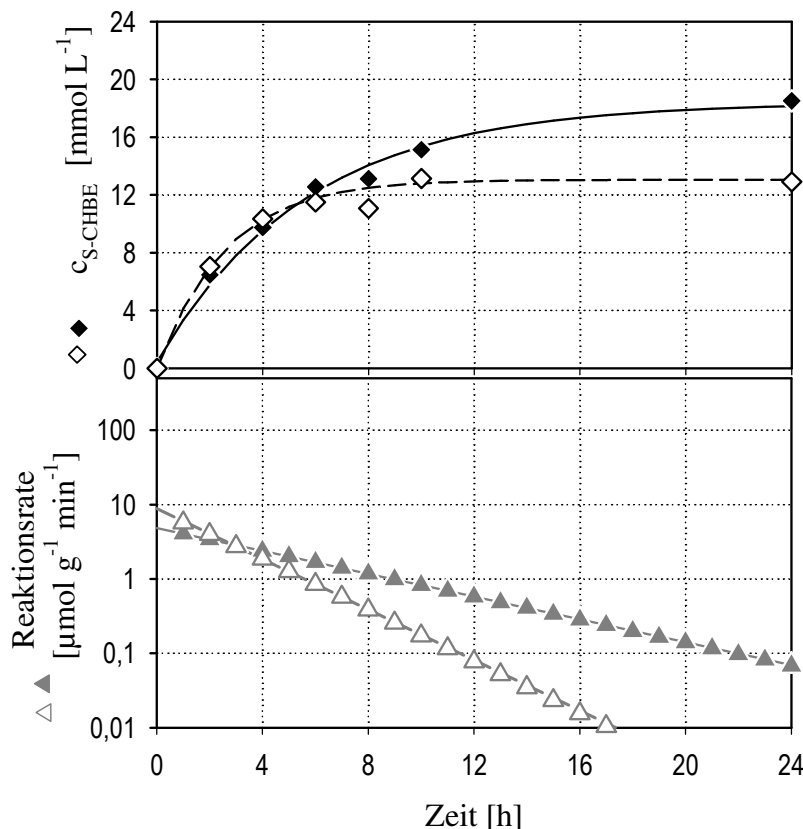


Abbildung 5.3.3: Verlauf der S-CHBE-Konzentration im Ansatz mit optimiertem Reaktionsmedium (ausgefüllte Symbole) und im Standardmedium (hohle Symbole); unten: Inhibierungskinetik 1. Ordnung

Durch den hohen Phasenanteil an n-Butylacetat im Medium ($\alpha = 0,5$) beträgt die 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase ca. $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Im Referenzansatz ist die 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase mehr als doppelt so groß. Die unterschiedlichen Substratkonzentrationen in der wässrigen Phase sind der Grund für die unterschiedlichen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten. Unter den optimierten Reaktionsbedingungen ist die Halbwertszeit des Biokatalysators deutlich höher, so dass trotz geringerer Anfangsreaktionsgeschwindigkeit eine höhere Endkonzentration an S-CHBE erzielt wird.

Die Erhöhung der Halbwertszeit ist das Ergebnis der reduzierten 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase. So führte in Experimenten im Einphasensystem ohne n-Butylacetat die Steigerung der 4Cl-ACE-Konzentration von 22 mmol L^{-1} auf 175 mmol L^{-1} zu einer Abnahme der Halbwertszeit von 2,1 h auf 0,8 h (Kapitel 5.2.5). Bei Versuchen im Referenzansatz mit einer Anfangskonzentration von 170 mmol L^{-1} 4Cl-ACE konnte die Halbwertszeit im Einphasensystem von 2,1 h durch Zugabe von 10 % v/v n-Butylacetat auf 3,1 h gesteigert werden (Kapitel 5.2.6). Im Standardmedium beträgt der Verteilungskoeffizient von 4Cl-ACE im Zweiphasensystem

Puffer/n-Butylacetat $k = 13,5$. Durch die hohe Salzkonzentration im optimierten Medium steigt der Verteilungskoeffizient auf $k = 120$ an, was zusätzlich zu einer Verminderung der 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase führt.

5.3.4 Reduktion mit Substratdosierung

Um toxische Effekte des Substrates auf den Biokatalysator zu reduzieren, kann als alternativer Ansatz ein Zulaufverfahren eingesetzt werden. Dabei wird das Substrat kontinuierlich zum Reaktionsvolumen zudosiert. So kann die Konzentration toxischer Substrate weiter minimiert werden.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob bei Einsatz des optimierten Mediums durch langsames Zudosieren von Substrat und n-Butylacetat über 5 bis 15 h zur vorgelegten Zellsuspension die Ausbeute im Vergleich zum Referenzansatz weiter gesteigert werden kann.

In einem solchen Versuchsansatz unter pH-kontrollierten Bedingungen wurden Zellen zu einer Konzentration von 25 g L^{-1} in 18,5 mL optimiertem Reaktionspuffer ($0,32 \text{ mol L}^{-1}$ Glukose, $0,19 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ KPi-Puffer) im Reaktionsgefäß vorgelegt. In drei Ansätzen wurden jeweils 12 mL Substratlösung (9,2 mL n-Butylacetat, 1,3 mL Triton X-100, 0,2 mL 1-Buten-3-ol und 1,3 mL 4Cl-ACE) zudosiert. Es wurde ein konstantes Dosierprofil verwendet, über das die Substratlösung über 5, 10 und 15 Stunden zudosiert wurde. Daraus ergeben sich Dosierraten zwischen $0,6 \text{ mmol h}^{-1}$ und $1,8 \text{ mmol h}^{-1}$.

Im Vergleich zu Versuchen im Satzverfahren im identischen Reaktionsmedium nahm bei allen drei Feedingprofilen die S-CHBE-Konzentration von 25 mmol L^{-1} auf 21 bis 22 mmol L^{-1} und der Enantiomerenüberschuss von 80 % auf 78 % ab.

Im optimierten Reaktionsmedium wurde eine 4Cl-ACE-Konzentration von $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$ in der wässrigen Phase eingestellt. Wird nun das Substrat und n-Butylacetat langsam und kontinuierlich zudosiert, so sinkt die 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase weiter ab. Die Konzentration ist dann zu niedrig, um eine ausreichend hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu ermöglichen. Gleichzeitig ist von einer Schädigung der Zellen durch das eingesetzte n-Butylacetat und damit von einem Verlust der Zellaktivität auszugehen, so dass insgesamt weniger Produkt gebildet wird. Im optimierten Reaktionsmedium ist die 4Cl-ACE-Konzentration auch im Satzverfahren so gering, dass die Toxizität des Substrates keinen wesentlichen Einfluss auf die Umsetzung hat.

5.4 S-CHBE Produktion im Rührkesselreaktor

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte in gerührten Ansätzen mit 20 mL Reaktionsvolumen. Der optimierte Prozess wurde in den Rührkesselreaktor übertragen. Dabei wurde der Einfluss der Maßstabsvergrößerung auf die Umsetzung untersucht. Aufgrund des einfachen Prozesses im Satzverfahren, der ohne Begasung und unter inerten Bedingungen durchgeführt wird, sind die Reaktionsbedingungen im 20 mL-Maßstab und im 1 Liter Maßstab identisch. Ein wesentlicher Unterschied besteht im höheren Leistungseintrag, der im Rührkesselreaktor realisiert werden kann, dem mit Hinblick auf das eingesetzte Zweiphasensystem eine wesentliche Bedeutung bei der Reduktion von 4Cl-ACE zukommt.

Es wurden zwei Versuche zur Maßstabsvergrößerung durchgeführt. Im ersten Experiment wurde mit einem Überschuss an 4Cl-ACE gearbeitet. Im zweiten Experiment wurden die Reaktionsbedingungen so ausgelegt, dass ein vollständiger Umsatz des Substrates erreicht werden konnte. Beide Versuche wurden bei 25 °C und pH 7,0 durchgeführt. Im Rührkesselreaktor wurde eine Rührerdrehzahl von 750 min⁻¹ (0,6 W L⁻¹) eingestellt.

5.4.1 S-CHBE Produktion mit unvollständigem Umsatz

Für den Versuch mit Substratüberschuss wurde eine Biokatalysatorkonzentration von 27 g L⁻¹ eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsmediums entsprach der optimierten Zusammensetzung. Lediglich die eingesetzte 4Cl-ACE-Konzentration wurde auf die Hälfte reduziert und bezogen auf den Gesamtansatz 2,2 % v/v (163 mmol L⁻¹).

Die Zellen wurden im wässrigen Reaktionspuffer mit einem Gesamtvolumen von 0,91 L suspendiert und in den Reaktor überführt. Bei 25 °C wurden die Zellen 2,5 Stunden ohne Begasung gerührt und der pH mit 5 molarer NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Inkubation ohne Substratzugabe dient der Aktivierung der Zellen. Dabei ist eine Inkubationsdauer von 0,5 bis 3 h üblich (Chen et al. 2002; Houg et al. 2003). Anschließend wurden NAD (100 µmol L⁻¹) und NADP (10 µmol L⁻¹) zugegeben. Von der Lösung wurden 93 mL abgenommen und in ein 500 mL Reaktionsgefäß überführt, das als Referenzansatz unter sonst identischen Reaktionsbedingungen untersucht wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substratgemisches (n-Butylacetat, Triton X-100, 1-Buten-3-ol, 4Cl-ACE) zu beiden Reaktionsansätzen gestartet.

Der Verlauf der S-CHBE-Konzentration war in beiden Versuchsansätzen annähernd identisch (Abbildung 5.4.1). Nach ca. 12 h kam die Reaktion zum Erliegen, obwohl das Substrat im Überschuss vorlag. Die finale S-CHBE-Konzentration im Gesamtansatz betrug im 500 mL Reaktionsgefäß 35 mmol L^{-1} und im 1,2 L Ansatz 36 mmol L^{-1} . Daraus ergibt sich bei einem Verteilungskoeffizienten für S-CHBE im System Reaktionspuffer/n-Butylacetat von $k = 75$ eine Produktkonzentration von $0,46 \text{ mol L}^{-1}$. Der Enantiomerenüberschuss war in beiden Ansätzen mit 86 % identisch. Die Halbwertszeit des Katalysators betrug 3,2 h bei einer Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von $7,2 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Bei der im Vergleich zu den Optimierungsversuchen (Abschnitt 5.3) reduzierten Substratkonzentration aber gleich bleibendem Phasenverhältnis n-Butylacetat zu wässriger Phase von $\alpha = 0,5$ betrug die Gleichgewichtskonzentration von 4Cl-ACE in der wässrigen Phase 4 mmol L^{-1} . Die geringe Konzentration verhinderte eine hohe Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Da gleichzeitig die Deaktivierung der Biokatalysatoren durch das Lösungsmittel eingesetzt hat, wurde eine Produktbildungskapazität der Zellen von nur $1,3 \text{ mmol g}^{-1}$ erreicht. Die lange Inkubation der Zellen vor Substratzugabe zur Aktivierung des Biokatalysators erbrachte keine Verbesserung der Reduktionskapazität der Zellen.

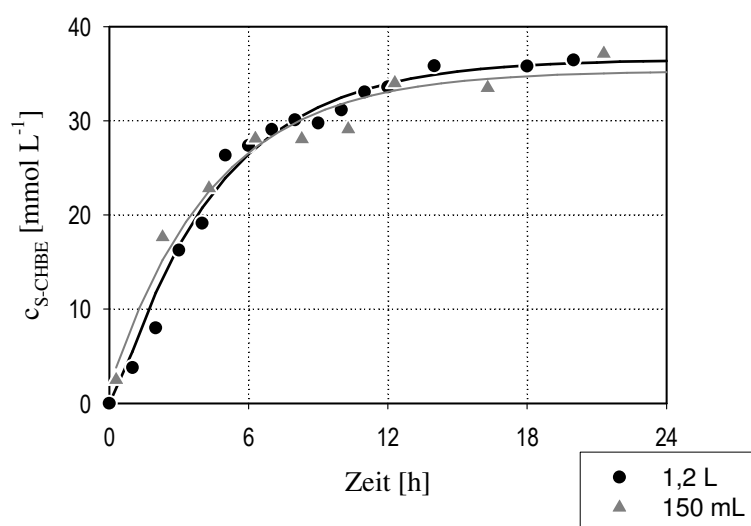


Abbildung 5.4.1: Verlauf der S-CHBE-Konzentration (bezogen auf den Gesamtansatz) im Rührkesselreaktor (Dreifachbestimmung) und im 150 mL Referenzansatz (Einfachbestimmung)

Den Verlauf der Enzymaktivitäten im Rührkesselreaktor zeigt Abbildung 5.4.2. Die Aktivitäten der Carbonylreduktase und der Glukosedehydrogenase wurden getrennt im abzentrifugierten Zellpellet und im Überstand bestimmt. Die Enzymaktivitäten wurden jeweils auf das Reaktions-

volumen bezogen. Aus den beiden Einzelaktivitäten ergibt sich die volumenbezogene Gesamtaktivität im Ansatz.

Da die Zellsuspension vor Substratzugabe ca. 2,5 h unter Rühren inkubiert wurde und die erste Probenahme nach Zugabe des Substrates und intensiver Durchmischung nach 10 min erfolgte, ließ sich bereits zu Beginn der Umsetzung Aktivität für beide Enzyme im Überstand nachweisen. Mit fortlaufender Reaktionsdauer sank die Aktivität der Enzyme im Zellpellet aufgrund der Lyse der Zellen und die Enzymaktivitäten im Überstand steigen an. Die Gesamtaktivität im Ansatz nahm bei der Glukosedehydrogenase nach 4 Stunden, bei der Carbonylreduktase nach 6 Stunden ab. Danach setzte die Deaktivierung der Enzyme ein.

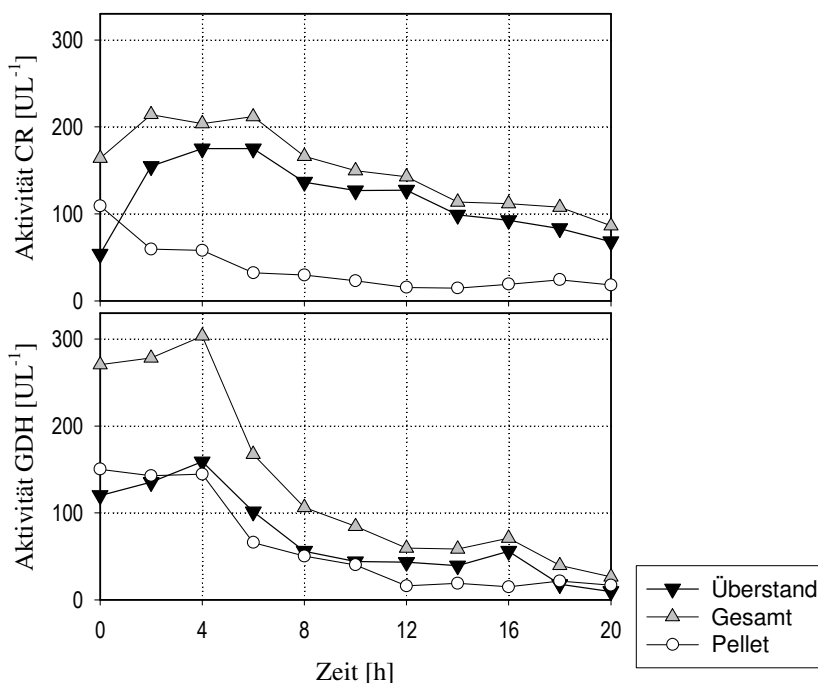


Abbildung 5.4.2: Verlauf der Aktivitäten der Carbonylreduktase (CR) und der Glukosedehydrogenase (GDH) im Rührkesselreaktor; gezeigt sind die Aktivitäten im Zellpellet, im Überstand und die Gesamtaktivität

Sowohl die Produktbildungsrate als auch die Enzymaktivitäten nahmen mit Dauer der Reaktion ab. Jedoch war nach 16 h noch eine Restaktivität der Enzyme messbar, während die Umsetzung trotz Substratüberschuss nicht mehr stattfand.

Der Verlauf der Produktbildungsrate korrelierte mit der Enzymaktivität der Carbonylreduktase im Zellpellet. Die Deaktivierungskinetik der Enzymaktivität im Pellet ließ sich wie die Deaktivierungskinetik der Produktbildungsrate über eine Reaktion 1. Ordnung beschreiben (Abbildung 5.4.3). Aus der Reaktionsrate wurde eine Halbwertszeit von 3,2 h und aus der Enzymaktivität eine Halbwertszeit von 4,0 h berechnet.

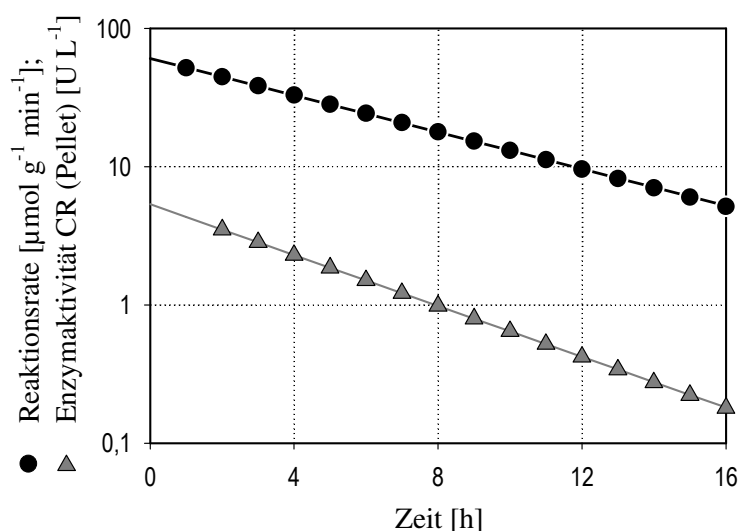


Abbildung 5.4.3: Deaktivierungskinetiken nach einer Reaktion 1. Ordnung; Kreise: Deaktivierung aus der Enzymaktivität der Carbonylreduktase CR im Zellpellet bestimmt; Dreiecke: Deaktivierung aus der Reaktionsrate (Produktbildungsrate) bestimmt

Der Vergleich der beiden Ansätze zeigt, dass der Leistungseintrag bei der Reaktion keine Rolle spielt. Aufgrund der hohen Konzentration an Triton X-100 von 6,5 % v/v bilden sich auch bei einem niedrigen Leistungseintrag feine Tröpfchen mit einer hohen spezifischen Oberfläche aus. Unter diesen Reaktionsbedingungen ist eine problemlose Übertragung von Ergebnissen im Kleinansatz auf den Ansatz im Rührkesselreaktor möglich.

5.4.2 Vollständiger Umsatz

Für den Versuch wurden Zellen aus einer Fermentation im optimierten Anzuchtmedium (MH₂₀P₂₀T-Medium, Kapitel 5.3.2) eingesetzt, die über 36 h angezogen worden waren. Die Zellen waren bei +4 °C drei Tage gelagert worden.

Um bei der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration von 100 g_{BTM} L⁻¹ einen vollständigen Umsatz an Substrat zu erzielen, wurden in dem Versuch 200 mmol L⁻¹ (2,7 % v/v) 4Cl-ACE eingesetzt. Der Phasenanteil an n-Butylacetat wurde soweit reduziert, dass die Gleichgewichtskonzentration von 4Cl-ACE in der wässrigen Phase 8 mmol L⁻¹ betrug. Die Konzentrationen an Triton X-100 und 1-Buten-3-ol wurden der reduzierten n-Butylacetat-Konzentration angepasst (Tabelle 5.4.1). Als Cofaktor wurde 100 µmol L⁻¹ NADP eingesetzt. Die Zellen wurden im wässrigen Reaktionspuffer bis zur Einstellung des pH und der Reaktionstemperatur 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substratgemisches gestartet.

Tabelle 5.4.1: Optimiertes Reaktionsmedium und Reaktionsmedium für den Rührkesselreaktor-Versuch

	Rührkessel- reaktor	Optimiertes Medium
4Cl-ACE	2,7 % v/v	6,6 % v/v
n-Butylacetat	$\alpha = 0,2$	$\alpha = 0,5$
1-Buten-3-ol	0,3 % v/v	0,8 % v/v
Triton X-100	2,7 % v/v	6,5 % v/v
Glukose	0,32 mmol L ⁻¹	
NaCl	0,19 mmol L ⁻¹	
KPi-Puffer, pH 7,0	0,50 mmol L ⁻¹	

Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.4.4 dargestellt. Nach einer Reaktionsdauer von 8 h war das Substrat vollständig umgesetzt (Abbildung 5.4.5). Dabei wurde eine Ausbeute von 94 % erzielt, der Enantiomerenüberschuss betrug über die gesamte Reaktionsdauer 90 % (Tabelle 5.4.2).

Tabelle 5.4.2: Ergebnisse der Umsetzung von 4Cl-ACE im Rührkesselreaktor; die Raumzeitausbeute wurde für die Reaktionsdauer von 8 h berechnet

Umsatz	Ausbeute	Selektivität	EE	Raum-Zeit- Ausbeute	Halbwertszeit	Produktbildungs- kapazität
100 %	94 %	94 %	90 %	44 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	1,8 h	1,8 mmol g ⁻¹

Nebenprodukte, wie das durch Dehalogenierung gebildete Ethylacetoacetat oder durch Hydrolyse des Substrates entstehende Chloracetoacetat oder 1-Chlor-2-Propanol (Bertau 2002) konnten nicht nachgewiesen werden. Der hohe Phasenanteil an n-Butylacetat und die hohe Umsatzrate minimieren die Hydrolyse des Substrates in der wässrigen Phase.

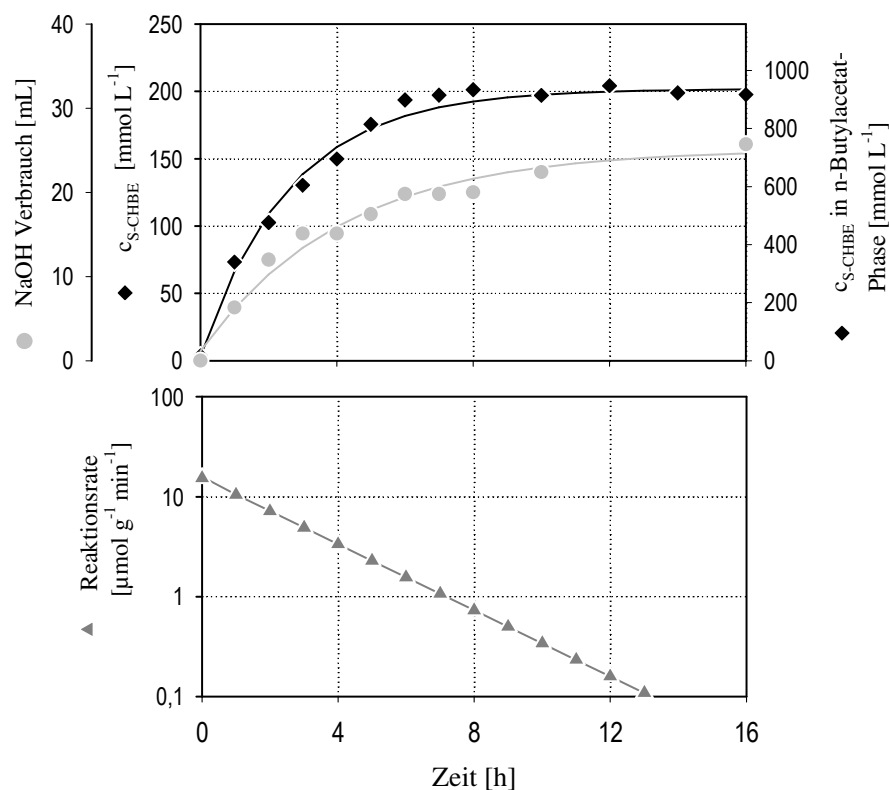


Abbildung 5.4.4: Herstellung von S-CHBE im Rührkesselreaktor bei vollständigem Umsatz; oben: S-CHBE-Konzentration aus Dreifachbestimmung und Laugenverbrauch; unten: Deaktivierungskinetik für eine Reaktion 1. Ordnung

Die Deaktivierung des Biokatalysators erfolgte nach einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit von 1,8 h und einer Anfangsreaktionsgeschwindigkeit von $15,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. In anderen Experimenten mit optimiertem Reaktionsmedium betrug die Halbwertszeit bei Substratüberschuss zwischen 2 und 3,5 h.

Der Verlauf des Verbrauches an Natronlauge war mit dem Verlauf der Produktbildung vergleichbar (Abbildung 5.4.4). Nach 12 h ist der pH stabil. Das Aufzeichnen des pH-Verlaufes bzw. des Verbrauches an Korrekturmittel bietet jedoch keine Möglichkeit zur Online-Prozesskontrolle. Der Verbrauch an NaOH spiegelt die metabolische Aktivität der Zellen und deren Fähigkeit, Säuren bilden zu können, wider. Der Laugenverbrauch ist jedoch von der Reaktionsrate entkoppelt.

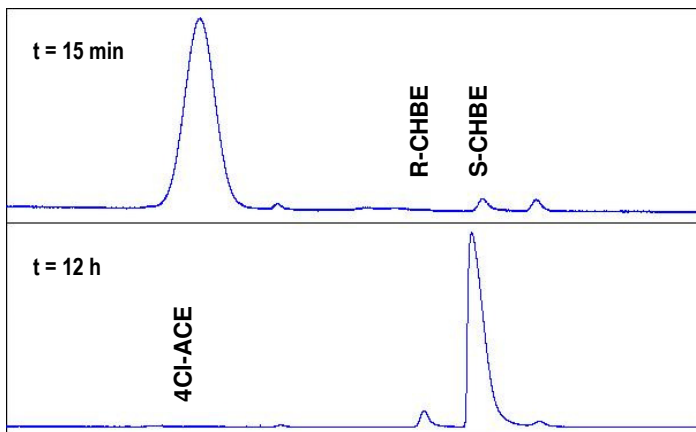


Abbildung 5.4.5: GC-Chromatogramme der Umsetzung von 4Cl-ACE im Rührkesselreaktor; Nebenproduktpeaks sind Verunreinigungen im Substrat

Durch die hohe Biokatalysatorkonzentration erfolgt eine sehr schnelle Umsetzung des Substrates. Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit minimiert die Hydrolyse des Substrates und erhöht die Ausbeute.

Unter geeigneten Reaktionsbedingungen kann die Reaktion mit hohen Ausbeuten und einer hohen Selektivität durchgeführt werden. Die Produktbildungskapazität von $1,8 \text{ mmol g}^{-1}$ zeigt, dass die maximale Produktivität der Zellen nicht ausgeschöpft worden ist.

5.5 Charakterisierung der Biokatalysatorstabilität

Charakteristisch für Umsetzungen von 4Cl-ACE mit *S. cerevisiae* war die begrenzte Reaktionsdauer von ca. 8 bis 12 h. Der Verlauf der Reaktion entsprach einer Reaktion erster Ordnung mit einer Halbwertszeit des Biokatalysators von ungefähr 2 h. Reaktionsdauer und Halbwertszeit waren abhängig von den Reaktionsbedingungen und der Zellqualität. Hohe Ausbeuten an S-CHBE wurden nur unter Reaktionsbedingungen erzielt, bei der die Halbwertszeit des Katalysators vergleichsweise groß war. Die Stabilität des Biokatalysators ist somit eine wesentliche Größe des Reaktionssystems, da die Produktausbeuten wesentlich mit ihr zusammenhängen.

Zur Charakterisierung der Einflussgrößen auf die Zellstabilität wurden Zellen ohne Zugabe von 4Cl-ACE unter Standardbedingungen inkubiert. Zur Beschreibung der Biokatalysatorstabilität wurden folgende Größen herangezogen:

- *Biotrockenmasse*: Die gravimetrisch bestimmte Biotrockenmasse kann zur Beschreibung des Anteiles integraler Zellen im Reaktionsansatz herangezogen werden. Lysierte Zellen wurden unter den gewählten Bedingungen durch die Zentrifugation nicht pelletiert (15.000 g, 5 min) und entsprechend bei der Bestimmung der Biotrockenmasse nicht berücksichtigt.
- *Lebendzellzahl*: Über die Vitalfärbung der Zellen mit Methyleneblau kann der Anteil der geschädigten Zellen an der Gesamtzellzahl abgeschätzt werden.
- *Proteinkonzentration*: In den Versuchen wurde der Proteingehalt der abzentrifugierten Zellen bestimmt. Mit der Abnahme der Biotrockenmasse ist damit eine Abnahme der Proteinkonzentration verbunden. Da unter den gewählten Bedingungen nur integrale Zellen abzentrifugiert wurden, ist über die Bestimmung der Proteinkonzentration eine Aussage über den Anteil integraler Zellen im System möglich.
- *Enzymaktivitäten*: Die volumetrischen und spezifischen Enzymaktivitäten der Glukosedehydrogenase und der Carbonylreduktase wurden aus dem Zellpellet bestimmt. Über die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten ist eine Aussage über die Deaktivierung der Enzyme möglich. Nimmt die spezifische Enzymaktivität ab, ist das ein Maß für die Schädigung der Enzyme. Ist die spezifische Enzymaktivität über den Beobachtungszeitraum konstant, so beschreibt die Abnahme der volumetrischen Aktivität den Verlust integraler Zellen.

- *Katalytische Gesamtaktivität:* Bei der katalytischen Gesamtaktivität wird die Aktivität der Zellen als Gesamtes betrachtet. Als Maß für die katalytische Gesamtaktivität wird die in Umsetzungsexperimenten im Kleinmaßstab erzielte S-CHBE-Konzentration eingesetzt.

5.5.1 Organische Lösungsmittel

Die Versuche zum Einfluss von Lösungsmitteln wurden mit n-Butylacetat, Ethylacetat und Hexan bei einem Phasenanteil von $\alpha = 0,5$ und einem Standardansatz ohne Lösungsmittel durchgeführt. Die Inkubation erfolgte im Standardreaktionspuffer bei 28 °C ohne pH-Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Biotrockenmasse und die Zellviabilität untersucht.

Die Biotrockenmasse ging im System ohne Lösungsmittel auf 70 % des Anfangswertes zurück (Tabelle 5.5.1). In Zweiphasensystemen hängt die Zellintegrität des Biokatalysators vom verwendeten Lösungsmittel ab. Die Abnahme der Biotrockenmassenkonzentration im System mit Hexan betrug ca. 40 % und war vergleichbar mit der Abnahme der Biotrockenmassenkonzentration im wässrigen System. In beiden Systemen konnten nach 24 h Inkubationszeit mit der Vitalfärbung noch 80 – 90 % der Zellen angefärbt und damit metabolische Aktivität nachgewiesen werden. In Ansätzen mit n-Butylacetat und Ethylacetat sank die Biotrockenmasse auf 30 % des Anfangswertes ab, vitale Zellen konnten nicht nachgewiesen werden. Zellen, die noch nicht lysiert sind und als integrale Zellen vorliegen, sind durch die Lösungsmittel stark geschädigt.

In Tabelle 5.5.1 sind die Ergebnisse der Stabilitätsversuche und die der Umsetzungsversuche gegenübergestellt. Wie die Daten zeigen, besteht kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Zellstabilität, Katalysatordeaktivierung und der S-CHBE-Konzentration.

Tabelle 5.5.1: Biokatalysatorstabilität in Ein- und Zweiphasensystemen nach 24 h Inkubationszeit in Standardpuffer ohne Substrat; zum Vergleich sind die Produktkonzentrationen und Halbwertzeiten des Katalysators aus Biotransformationsversuchen angegeben (Kapitel 5.1.6). Biotrockenmasse: Änderung zum Anfangswert; Lebendzellzahl: Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl

Reaktionssystem	LogP [-]	Biotrockenmasse nach 24 h	Lebendzellzahl nach 24 h	S-CHBE Konz.	Halbwertzeit $t_{1/2}$
Wässriges System	-	69 %	82 %	16 mmol L ⁻¹	2,1 h
Ethylacetat	0,7	28 %	0 %	20 mmol L ⁻¹	2,3 h
n-Butylacetat	1,8	27 %	0 %	27 mmol L ⁻¹	3,1 h
Hexan	4,1	61 %	91 %	18 mmol L ⁻¹	3,1 h

Hexan schädigt zwar aufgrund des hohen LogP die Zellen nicht, ist jedoch als zweite organische Phase bei Umsetzungen von 4Cl-ACE nicht geeignet. Wird nur die Stabilität des Biokatalysators betrachtet, so sind sowohl n-Butylacetat als auch Ethylacetat für den Einsatz in Zweiphasensystemen ungeeignet. Für die Umsetzung von 4Cl-ACE ist jedoch n-Butylacetat das bessere Lösungsmittel. Shimizu et al. (1990) haben für freie Enzyme gezeigt, dass Ethylacetat die Enzyme deutlich schneller inaktiviert als n-Butylacetat, was den beobachteten Einfluss des Lösungsmittels auf die Produktkonzentration erklärt.

Die Lebendzellzahl ist jedoch nur bedingt geeignet, um Rückschlüsse auf die katalytische Gesamtaktivität zu ziehen, wie Nikolova et al. (1992) gezeigt haben.

Der Einfluss von n-Butylacetat auf die Zellintegrität und die Aktivität der Zellen wurde in einem weiteren Versuch detaillierter untersucht. Die Zellen wurden ohne Substrat im Standardreaktionspuffer mit 10 % n-Butylacetat und ohne Lösungsmittel in pH-kontrollierten Ansätzen bei 25 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und der katalytischen Gesamtaktivität genommen.

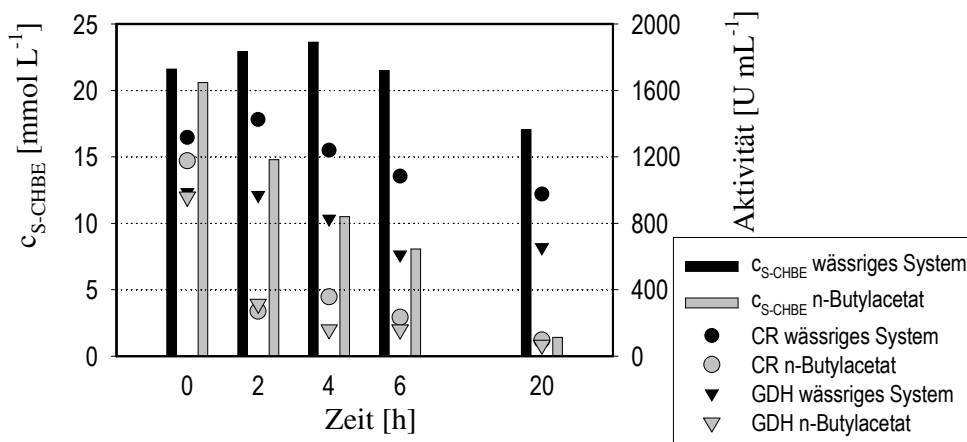


Abbildung 5.5.1: Einfluss von n-Butylacetat auf den Verlauf der Enzymaktivitäten im Zellpellet und katalytischen Gesamtaktivität

Die Zellen waren auch im Einphasensystem ohne n-Butylacetat instabil. Die Aktivität der GDH, CR und die S-CHBE-Konzentration als Maß für katalytische Gesamtaktivität sanken nach 20 h Inkubationszeit auf 60 bis 80 % des Anfangswertes ab (Abbildung 5.5.1).

Im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat nahmen die Enzymaktivitäten und die katalytische Gesamtaktivität innerhalb von 20 h auf 10 % des Anfangswertes ab. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h hatten die Zellen die Hälfte ihrer Anfangsaktivität verloren, was einer Halbwertszeit von ca. 6 h entspricht. In Experimenten in Zweiphasensystemen mit 4Cl-ACE betrug die Halbwertszeit des Biokatalysators bei sonst identischen Bedingungen nur ca. 3 h. Die Halbwertszeit des Biokatalysators wird also nicht nur durch das organische Lösungsmittel sondern zusätzlich durch die Toxizität des Substrates beeinflusst.

5.5.2 Nährstoffe

Auffallend ist die Abnahme der Biokatalysatorstabilität im wässrigen Ansatz, ohne dass ein organisches Lösungsmittel oder Substrat zugesetzt worden war. Eine mögliche Ursache für die abnehmende Aktivität ist die hohe Glukosekonzentration von 1 mol L^{-1} im Standardreaktionspuffer. Aufgrund des osmotischen Stresses nimmt die Viabilität der Zellen bei diesen Glukosekonzentrationen deutlich ab, wenn keine Stickstoffquelle im Medium vorhanden ist (Thomas et al. 1996). Der Mangel an Stickstoff im Standardreaktionspuffer verhindert auch das weitere Wachstum der Zellen.

Es wurde untersucht, inwieweit der Abnahme der Zellstabilität entgegengewirkt werden kann, indem zum Reaktionspuffer komplexe Medienkomponenten (Hefeextrakt, Pepton, Maisquellwasser) hinzugegeben werden.

Die Versuche wurden im Einphasensystem und im Zweiphasensystem mit 10 % v/v n-Butylacetat durchgeführt. Folgende Versuchsbedingungen wurden verwendet:

1. Zellen im Standardreaktionspuffer (Standard)
2. Standardreaktionspuffer mit 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 20 g L⁻¹ Pepton und 1 % v/v Maisquellwasser (CSL/Standard)
3. Standardreaktionspuffer mit 10 % v/v n-Butylacetat
4. Ansatz wie 2.), zusätzlich mit 10 % v/v n-Butylacetat (CSL/nBuAc)

Die Inkubation erfolgte unter pH-geregelten Bedingungen bei pH 7,0 und 25 °C über 20 Stunden.

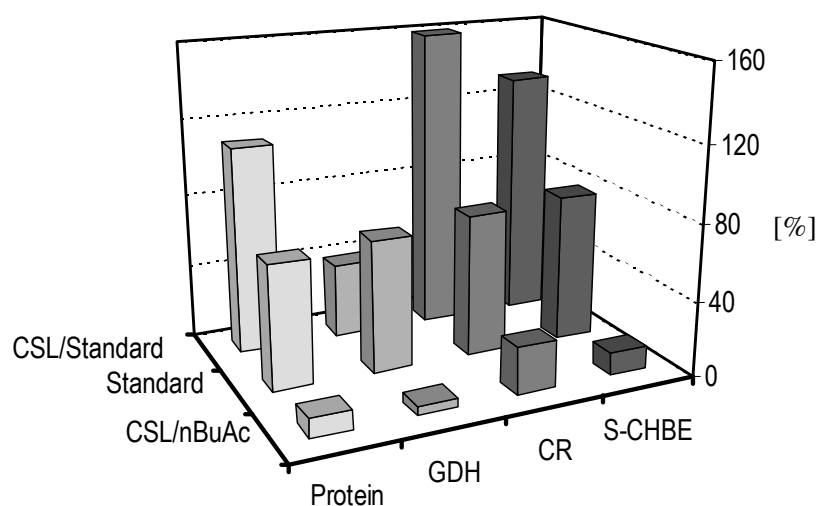


Abbildung 5.5.2: Relative Änderung der Proteinkonzentration, der Enzymaktivitäten und der katalytischen Gesamtaktivität in Ein- und Zweiphasensystemen mit 10 % v/v n-Butylacetat mit komplexen Medienkomponenten nach 20 h Inkubationszeit

Im Standardansatz sanken die Proteinkonzentration, die Enzymaktivitäten und die katalytische Gesamtaktivität nach 20 h Inkubationszeit auf 70 – 80 % des Anfangswertes ab (Tabelle 5.5.2, Abbildung 5.5.2). Durch die Zugabe der komplexen Medienkomponenten zum Standardreaktionspuffer konnte die katalytische Gesamtaktivität um ca. 30 % gesteigert werden. Das wurde hauptsächlich über die Aktivitätssteigerung der Carbonylreduktase um ca. 60 % erreicht. Dagegen nahm die Aktivität der GDH während der Inkubation um ca. 50 % ab.

Im Standardreaktionspuffer mit n-Butylacetat sank die katalytische Gesamtaktivität auf unter 10 % der Ausgangsaktivität ab. Die Zugabe von komplexen Medienkomponenten (CSL/nBuAc, Ansatz 4) bewirkte keine Abschwächung oder Kompensation des Aktivitätsverlustes.

Tabelle 5.5.2: Einfluss von komplexen Nährmedien in Ein- und Zweiphasensystemen auf die Zellstabilität in gerührten Ansätzen ohne Substratzugabe; angegeben sind die relativen Änderungen nach 20 h Inkubationszeit bezogen auf die Anfangsbedingungen.

Reaktionsmedium	Protein-Konzentration	Aktivität GDH	Aktivität CR	Katalytische Gesamtaktivität
Standardreaktionspuffer	66 %	70 %	78 %	79 %
+ 10 g L ⁻¹ Hefeextrakt, CSL; 20 g L ⁻¹ Pepton	110 %	40 %	160 %	130 %
Standardreaktionspuffer mit 10 % v/v n-Butylacetat	10 %	8 %	9 %	9 %
+ 10 g L ⁻¹ Hefeextrakt, CSL; 20 g L ⁻¹ Pepton	10 %	5 %	25 %	12 %

5.5.3 Triton X-100

Detergenzien permeabilisieren Zellen durch Herauslösen von Proteinen aus der Zellmembran. In den Versuchen sollte geklärt werden, ob die Zellen durch Triton X-100 geschädigt werden.

In einer ersten Versuchsreihe hatte Triton X-100 in verschiedenen Konzentrationen (0,1 %, 0,5 %, 1,0 % v/v) keinen Einfluss auf die Viabilität, die Biotrockenmasse oder die intrazelluläre Proteinkonzentration. In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, wie sich deutlich höhere Konzentrationen an Triton X-100 (5 % v/v) in wässrigen Systemen und in Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat auf die intrazelluläre Proteinkonzentration, die Enzymaktivitäten und die katalytische Gesamtaktivität des Ansatzes auswirken.

Im Einphasensystem nahm die Zellintegrität in Gegenwart von 5 % v/v Triton X-100 deutlich stärker ab als im Standardansatz ohne Triton X-100 (Abbildung 5.5.3). Nach 20 h Inkubationsdauer waren die Proteinkonzentration und die Enzymaktivitäten deutlich niedriger als im Vergleichsansatz. Bezogen auf die katalytische Gesamtaktivität zu Beginn der Inkubationsphase sank im Standardansatz die Aktivität auf 79 % und im Ansatz mit 5 % v/v Triton X-100 auf 51 %.

Wie in Kapitel 5.5.1 gezeigt, sinkt im Zweiphasensystem mit 10 % v/v n-Butylacetat die katalytische Gesamtaktivität nach 20 h auf 10 % des Ausgangswertes ab. Durch Zugabe von Triton X-100 konnte die Stabilität der Zellen deutlich gesteigert werden und die katalytische

Gesamtaktivität sank auf nur 46 % des Anfangswertes. Triton X-100 scheint in hohen Konzentrationen einen Schutz der Zellen vor dem Lösungsmittel aufzubauen.

In den Ansätzen mit Triton X-100 sank die Aktivität der GDH auf 10 % der Ausgangsaktivität, bei der CR betrug die Abnahme nur 50 % und entsprach der Abnahme der katalytischen Gesamtaktivität. Das limitierende Enzym in dieser Reaktion ist vermutlich die Carbonylreduktase.

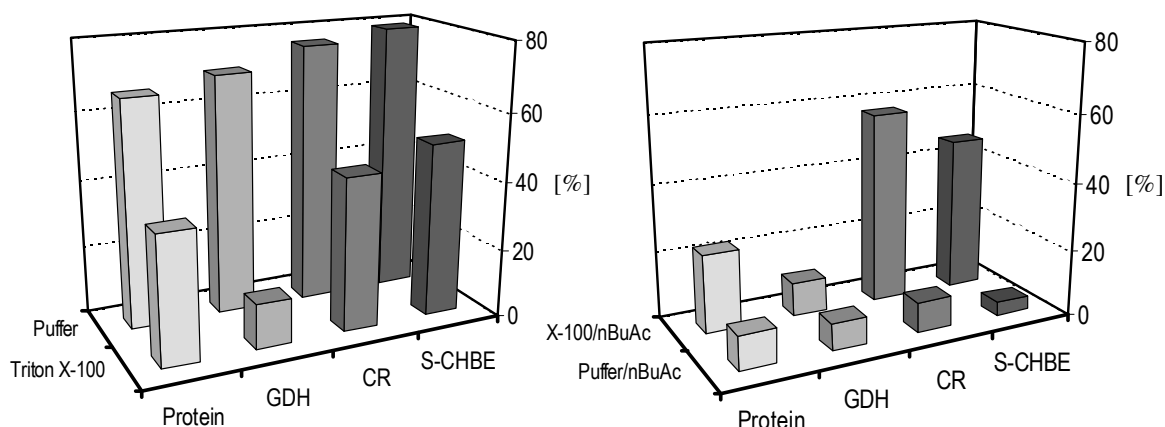


Abbildung 5.5.3: Einfluss von Triton X-100 (5 % v/v) und n-Butylacetat (10 % v/v) auf die intrazelluläre Proteinkonzentration, Enzymaktivitäten und die katalytische Gesamtaktivität (S-CHBE-Konzentration) nach 20 h Inkubationsdauer. Alle Angaben beziehen sich auf die Anfangswerte bei $t = 0$ h

Tabelle 5.5.3: Einfluss von Triton X-100 in Ein- und Zweiphasensystemen auf die Zellstabilität in gerührten Ansätzen ohne Substratzugabe; angegeben sind die relativen Änderungen nach 20 h Inkubationszeit bezogen auf die Anfangsbedingungen. Die Ergebnisse im Standardreaktionspuffer und im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat ohne Triton X-100 sind zum Vergleich dargestellt

Reaktionsmedium	Protein-konzentration	Aktivität GDH	Aktivität CR	Katalytische Gesamtaktivität
Standardreaktionspuffer	66 %	70 %	78 %	79 %
5 % Triton X-100	37 %	13 %	45 %	51 %
10 % n-Butylacetat	10 %	8 %	9 %	9 %
10 % n-Butylacetat, 5 % Triton X-100	23 %	10 %	57 %	46 %

5.5.4 NADP

Die Stabilitätsexperimente haben gezeigt, dass die katalytische Gesamtaktivität der Zellen während der Inkubation abnimmt, aber nach 20 h noch Restaktivität vorhanden ist. Auch in den Umsetzungsexperimenten konnte nach 24 h Reaktionsdauer noch Enzymaktivität gemessen

werden, obwohl keine Reaktion mehr stattfand. Eine Einflussgröße, die noch nicht untersucht worden ist, ist der Cofaktor NADP.

In den Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Ausbeute an S-CHBE mit zunehmender NADP-Startkonzentration gesteigert werden kann. In den nachfolgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob durch Zugabe von NADP im Reaktionsverlauf der Umsatz gesteigert werden kann. Gleichzeitig wurde überprüft, ob eine Substitution von NADP durch NAD möglich ist.

Im ersten Versuch wurden parallel zwei pH-kontrollierte Ansätze im 20 mL-Maßstab mit optimiertem Reaktionsmedium durchgeführt. Zum ersten Ansatz wurden zu Beginn der Reaktion $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP und $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NAD zugegeben. In einem zweiten Ansatz wurde nach 10 h Reaktionszeit ein weiteres Mal NADP zu einer Endkonzentration von $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ zugegeben.

Nach 10 h Reaktionszeit war im Ansatz mit $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP die S-CHBE-Konzentration doppelt so hoch wie im Vergleichsansatz mit $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP und $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NAD (Tabelle 5.5.4). Durch die erneute Zugabe von NADP konnte die Endkonzentration an S-CHBE um den Faktor 2,2 gesteigert werden. Der Enantiomerenüberschuss stieg bei hohen NADP-Konzentrationen leicht von 80 % auf 83 %, gleichzeitig nahm die Halbwertszeit der Biokatalysatoraktivität von 3 h auf annähernd 5 h zu. Die Produktkonzentration hängt ganz wesentlich von der NADP-Konzentration ab. Die Substitution von NADP durch NAD ist nicht bzw. nur sehr eingeschränkt möglich. Insbesondere die Beobachtung, dass sich bei einer Deaktivierungskinetik erster Ordnung die Halbwertszeit des Biokatalysators durch eine hohe Konzentration an Cofaktor signifikant verlängert, weist der NADP-Stabilität eine ganz wesentliche Rolle bei der Katalysatoraktivität zu.

Tabelle 5.5.4: Einfluss unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen auf den Reaktionsverlauf in gerührten 20 mL-Ansätzen mit optimiertem Medium; ¹⁾ die Zugabe von NADP erfolgte zu Beginn der Reaktion und nach 10 h

	Halbwertszeit $t_{1/2}$	S-CHBE-Konzentration		Enantiomeren- überschuss
		Nach 10 h	Nach 24 h	
$10 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NAD	3,1 h	$29,7 \text{ mmol L}^{-1}$	$35,8 \text{ mmol L}^{-1}$	80 %
$2 \times 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP ¹⁾	4,7 h	$59,8 \text{ mmol L}^{-1}$	$80,5 \text{ mmol L}^{-1}$	83 %

In einem weiteren Versuch wurde eine Umsetzung im optimierten Reaktionsmedium mit einer 4Cl-ACE-Startkonzentration von 200 mmol L^{-1} durchgeführt. Bei einer Biokatalysatorkonzentration von 18 g L^{-1} garantierten die Versuchsbedingungen einen unvollständigen Umsatz des Substrates. Nach 6 h Reaktionsdauer wurden dreimal $0,5 \text{ mL}$ Lösung abgenommen, in ein 2 mL -Reaktionsgefäß überführt und für weitere 12 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. Zu einem Ansatz wurde 50 mmol L^{-1} NADP und zu einem weiteren Ansatz 50 mmol L^{-1} NADPH zugegeben. Der dritte Ansatz wurde ohne Zugabe von Cofaktor als Referenz inkubiert.

Im Referenzansatz betrug die Konzentration an S-CHBE nach 20 h Gesamtreaktionsdauer 12 mmol L^{-1} und der Enantiomerenüberschuss 77% . Die S-CHBE-Konzentration in den Ansätzen mit NADP und NADPH betrug jeweils 148 mmol L^{-1} bei einem Enantiomerenüberschuss von 97% . Durch die Cofaktoren nahm nur die Konzentration von S-CHBE zu, während die R-CHBE-Konzentration unbeeinflusst blieb.

Die Zugabe von 50 mmol L^{-1} NADPH oder NADP reichte aus, um die dreifache Menge (148 mmol L^{-1}) S-CHBE bilden zu können. Da der Einfluss von NADP und NADPH identisch war, war sowohl die Cofaktorregenerierung durch die Glukosedehydrogenase als auch die Carbonylreduktase funktionsfähig. Die Abnahme der Gesamtaktivität konnte durch sehr hohe Cofaktorkonzentrationen ausgeglichen werden.

In weiteren Experimenten wurde der Versuch zum einen mit NAD und NADH und zum anderen mit ATP durchgeführt, ohne Effekt auf die Ausbeute oder den Enantiomerenüberschuss feststellen zu können.

Für eine hohe Aktivität der Zellen sind hohe NADP-Konzentrationen notwendig. Durch Zugabe von $0,1$ bis $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP zum Reaktionsmedium kann die Aktivität der Zellen deutlich gesteigert werden. Es ist nicht bekannt, in welcher Form die Zellen den Cofaktor aufnehmen können. Eventuell ermöglicht die Permeabilisierung der Zellen die Aufnahme des Cofaktors.

Die Abnahme der Katalysatoraktivität im Verlauf der Reaktion ist zu einem erheblichen Anteil auf den Verlust integraler Zellen zurückzuführen (Kapitel 5.4). Die Aktivität der gelösten Enzyme ist auch außerhalb integraler Zellen nachweisbar, sie tragen jedoch nicht signifikant zur Umsetzung bei. Durch die Zugabe hoher Konzentrationen an NADP kann der Aktivitätsverlust ausgeglichen werden, wobei Konzentrationen eingesetzt werden müssen, die um ein Vielfaches über dem K_m der isolierten Fettsäuresynthase von $0,06 \text{ mmol L}^{-1}$ liegen (Lynen et al. 1969). Die Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass bei hohen NADP-Konzentrationen die gelösten Enzyme zur Reaktion beitragen.

Eine vollständige Substitution von NADP durch NAD ist nicht möglich, obwohl die Fettsäuresynthase auch NAD als Cofaktor akzeptieren soll (Lynen et al. 1969). Inwieweit *S. cerevisiae* die Reaktion von NAD zu NADP katalysieren kann, ist nicht bekannt. Es konnte eine Kinase isoliert werden, die eine solche Reaktion in Gegenwart von ATP durchführt (Bruinenberg et al., 1983; Kawai et al., 2001), andere Quellen zeigen jedoch, dass diese Reaktion nicht relevant ist (Kataoka et al. 1992; Thomas et al, 1996). Die hier durchgeführten Versuche bestätigen die letzte Aussage. Eine Substitution von NADP durch NAD erscheint auch deshalb problematisch, da es sich bei den NAD-abhängigen Carbonylreduktasen (Laktatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase) um R-spezifische Enzyme handelt.

5.6 Tropfengrößenverteilung

Die Tropfengrößenverteilung wurde mit der 3D-ORM Sonde gemessen. Für die Bestimmung wurde das optimierte Reaktionsmedium bestehend aus einer wässrigen Phase mit Glukose, Natriumchlorid, Kaliumphosphatpuffer, Triton X-100 und 1-Buten-3-ol und einer organischen Phase bestehend aus n-Butylacetat und 4Cl-ACE bei einem Phasenverhältnis von $\alpha = 0,5$ eingesetzt.

Die Messungen erfolgten im zellfreien Medium, wobei in der ersten Versuchsreihe die Messungen ohne Triton X-100 und 4Cl-ACE durchgeführt wurden. In der zweiten Versuchsreihe wurde das Substrat 4Cl-ACE zugeben, in der dritten Versuchsreihe schließlich Triton X-100.

5.6.1 Reaktionssystem ohne Tensid

Die Tropfengrößenverteilung wurde bei einem Drehzahlbereich von 500 min^{-1} ($0,1 \text{ W L}^{-1}$) bis 1750 min^{-1} (10 W L^{-1}) bestimmt. Bei der niedrigsten Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} herrscht im Reaktor noch keine turbulente Strömung vor ($Re < 10^4$), die erst ab einer Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} erreicht wird ($Re > 10^4$).

Die Tropfengrößenverteilungen im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat und mit n-Butylacetat/4Cl-ACE unterschieden sich nur minimal, wobei durch die Zugabe von 4Cl-ACE der Sauterdurchmesser geringfügig abnahm. Die Tropfengrößenverteilung ist beispielhaft für das System Reaktionspuffer – n-Butylacetat/4Cl-ACE für unterschiedliche Rührerdrehzahlen in Abbildung 5.6.1 dargestellt. Mit zunehmender Rührerdrehzahl sank die maximale Tropfengröße von $58 \mu\text{m}$ auf $50 \mu\text{m}$ und der Sauterdurchmesser von $38 \mu\text{m}$ auf $35 \mu\text{m}$. Das Verhältnis maximaler Tropfengröße zum Sauterdurchmesser d_{max}/d_{32} betrug ungefähr 1,5. Obwohl bei der niedrigsten untersuchten Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} noch keine turbulente Strömung im Reaktor vorlag, hatte dies keinen signifikanten Effekt auf die Tropfengrößenverteilung.

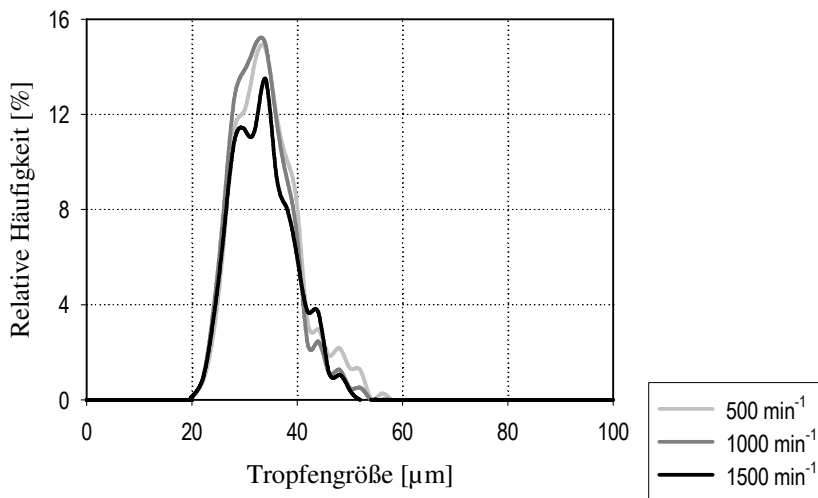


Abbildung 5.6.1: Tropfengrößenverteilung in einem Zweiphasensystem mit n-Butylacetat/12,4 % v/v 4Cl-ACE bei einem Phasenverhältnis von $\alpha = 0,5$

Der experimentell bestimmte Sauterdurchmesser wird vom Leistungseintrag praktisch nicht beeinflusst. In Abbildung 5.6.2 sind die Messergebnisse für den Sauterdurchmesser und den nach den Modellvorstellungen von Calabrese und Brown berechneten Sauterdurchmessern für beide Stoffsysteme gegenübergestellt. Sowohl nach den Modellvorstellungen als auch bei den gemessenen Tropfengrößenverteilungen war der Sauterdurchmesser im Zweiphasensystem mit reinem n-Butylacetat aufgrund der höheren Grenzflächenspannung (Kapitel 4.12) geringfügig größer als im Zweiphasensystem mit dem Gemisch aus n-Butylacetat/4Cl-ACE.

Beide Modellvorstellungen zeigen eine deutliche Abhängigkeit des Sauterdurchmessers von der eingebrachten Rührerleistung. In die Modellvorstellung nach Calabrese gehen Koaleszenzvorgänge nicht ein, was im Vergleich zum Modell nach Brown zu vergleichsweise niedrigeren Sauterdurchmessern führt. Dabei zeigt die Modellvorstellung nach Brown im Drehzahlbereich zwischen 500 und 1000 min^{-1} die stärksten Abweichungen von den Messergebnissen.

Der Verlauf des gemessenen Sauterdurchmessers in Abhängigkeit von der eingebrachten Rührerleistung lässt sich durch die Modellvorstellungen nur unzureichend beschreiben. Sowohl Leistungseintrag als auch Koaleszenzvorgänge haben in dem untersuchten Zweiphasensystem scheinbar keinen Einfluss auf die Tropfengrößenverteilung.

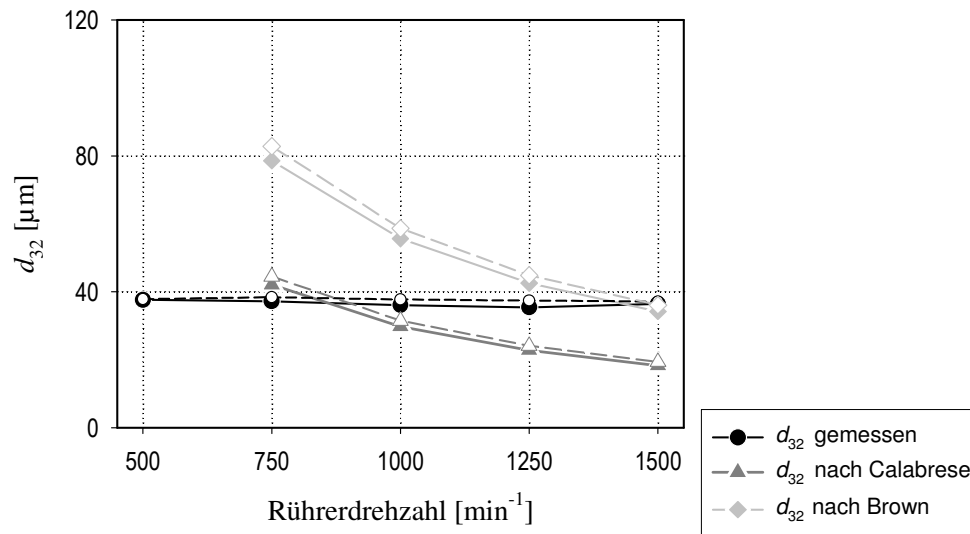


Abbildung 5.6.2: Sauterdurchmesser d_{32} für Systeme mit reinem n-Butylacetat (hohle Symbole) und n-Butylacetat/4Cl-ACE (ausgefüllte Symbole) in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl; dargestellt sind Messergebnisse und die aus den Modellvorstellungen berechneten Sauterdurchmesser

5.6.2 System mit Triton X-100

Nach Zugabe von Triton X-100 konnten mit der 3D-ORM Sonde keine Lösungsmitteltropfen gemessen werden. Aufgrund der Tensideigenschaft von Triton X-100 sank die maximale Tropfengröße unterhalb der Detektionsgrenze der Sonde von $10 \mu\text{m}$. Unter der Annahme, dass weiterhin die Beziehung $d_{\text{max}}/d_{32} \leq 1,5$ mit dem Verhältnis $d_{\text{max}}/d_{32} \approx 1,5$ gilt, ist der Sauterdurchmesser nicht größer als $7 \mu\text{m}$.

Bereits bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} war die organische Phase vollständig dispergiert. Unter diesen Bedingungen konnte auch visuell keine Entmischung der Phasen beobachtet werden.

Durch die sehr feine Verteilung der organischen Lösungsmittelphase im Reaktor werden in Biotransformationsexperimenten die Stofftransportleistungen stark erhöht. Dadurch kann auch in Systemen mit sehr niedrigen Leistungseinträgen, wie beim Rühren mit einem Magnetrührer, eine hohe Dispergierung der organischen Phase erreicht werden. Die problemlose Maßstabsübertragung aus den Kleinansätzen auf den Rührreaktor ist auf diesen Effekt zurückzuführen.

6 Asymmetrische Reduktion von Ethylbenzoylacetat

Mit der Umsetzung von Ethylbenzoylacetat (EBA) zum 3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäure-ethylester (S-HPPE) wurde die stereoselektive Reduktion eines weiteren β -Ketoesters mit dem rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm untersucht.

6.1 Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen

Bei der Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen wurde der Einfluss einiger ausgewählter Parameter auf die Umsetzung untersucht. Dabei sollten sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zur stereoselektiven Reduktion von 4Cl-ACE festgestellt werden.

6.1.1 Umsetzungen mit Wildtyp Zellen

Als Referenz wurde die Umsetzung von Ethylbenzoylacetat mit Wildtyp *S. cerevisiae* CBS 8066 unter Standardbedingungen mit 100 mmol L^{-1} EBA durchgeführt. Nach 20 h Reaktionsdauer betrug der Enantiomerenüberschuss 85 % und die Produktbildungskapazität $0,3 \text{ mmol g}^{-1}$.

6.1.2 Biomassenkonzentration

In Experimenten unter Standardbedingungen wurde der Einfluss der eingesetzten Biokatalysatormenge von rekombinanten *S. cerevisiae* auf die Umsetzung untersucht. Die eingesetzte Katalysatorkonzentration variierte zwischen 1 g L^{-1} und 55 g L^{-1} Biotrockenmasse bei einer EBA Startkonzentration von 100 mmol L^{-1} .

Bis zu einer Biokatalysatorkonzentration von 20 g L^{-1} war die Produktbildungskapazität konstant und betrug nach 24 h Reaktionszeit 0,7 bis $0,8 \text{ mmol g}^{-1}$ (Abbildung 6.1.1). Mit zunehmender Katalysatorkonzentration sank die Produktbildungskapazität auf $0,4 \text{ mmol g}^{-1}$ ab. Bei der maximal verwendeten Katalysatormenge war die Reaktion trotz des Substratüberschusses nach 6 h beendet. In keinem Ansatz wurde eine S-HPPE-Konzentration von 25 mmol L^{-1} überschritten.

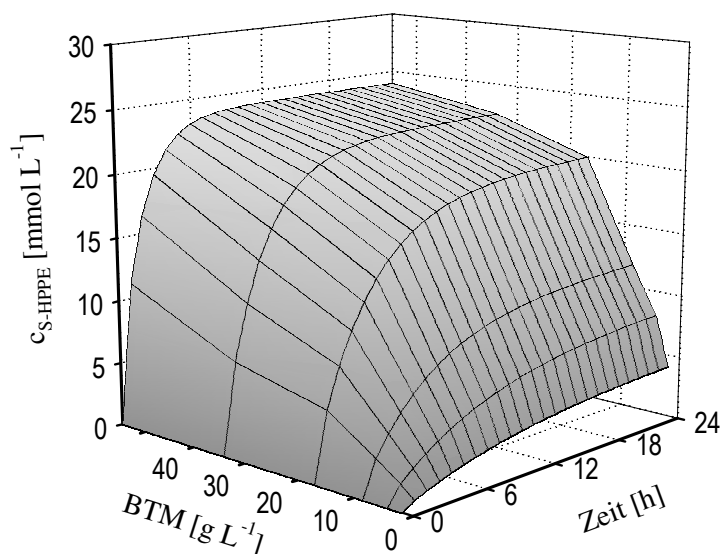


Abbildung 6.1.1: S-HPPE-Konzentration in Abhängigkeit von der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration und der Reaktionsdauer in gerührten 20 mL-Ansätzen ohne pH-Regelung unter Standardbedingungen

Der Verlauf der Umsetzung deutet auf eine Produktinhibierung oder auf eine Limitierung einer für die Umsetzung notwendigen Komponente hin, die bei einer S-HPPE-Konzentration von ca. 25 mmol L^{-1} einsetzt. Durch den Einsatz einer zusätzlichen organischen Phase sollte sich eine Produktinhibierung vermeiden lassen. Eine weitere mögliche Einflussgröße ist der pH, der sich im Reaktionsverlauf ändert. Aus den Experimenten mit 4Cl-ACE ist bekannt, dass der pH stark abnehmen kann, und dass die Umsetzung von 4Cl-ACE bei niedrigem pH zurückgeht. Es bleibt also zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse in pH-geregelten Experimenten reproduzieren lassen.

6.1.3 pH

Die Vorversuche zur Biotransformation von EBA wurden ohne pH-Kontrolle durchgeführt. Wie die Versuche mit 4Cl-ACE gezeigt haben, können die Produktkonzentration und der Enantiomerenüberschuss stark vom pH des Reaktionspuffers abhängen.

In pH-kontrollierten Ansätzen mit Natriumcitratpuffer wurde bei einer Biokatalysatorkonzentration von 80 g L^{-1} und einer Substratkonzentration von 180 mmol L^{-1} der pH-Einfluss auf die Reaktion untersucht. Die S-HPPE-Konzentration stieg von $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ bei pH 4,0 auf 89 mmol L^{-1} bei pH 7,0.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in pH-geregelten Ansätzen Produktkonzentrationen von über 28 mmol L^{-1} erreicht werden können, und dass bei sehr niedrigem pH kaum Substrat umgesetzt wird. Das bei den Versuchen zur Abhängigkeit der Umsetzung von der Biokatalysatorkonzentration gefundene Maximum der S-HPPE-Konzentration ist auf das Absinken des pH während der Umsetzung zurückzuführen. Für eine optimale Reaktionsführung ist, wie bereits für die Umsetzung von 4Cl-ACE gezeigt, eine pH-Regelung notwendig.

6.1.4 Substratkonzentration

Der Einfluss der eingesetzten Anfangskonzentration von EBA wurde in Standardansätzen ohne pH-Regelung untersucht. Die Substratkonzentration wurde zwischen 27 mmol L^{-1} und 480 mmol L^{-1} variiert. Ethylbenzoylacetat ist in Wasser nur bis 13 mmol L^{-1} löslich, so dass sich bei jeder eingesetzten Substratkonzentration ein Zweiphasensystem bildete.

Bei einer Biokatalysatorkonzentration von 20 g L^{-1} betrug die S-HPPE-Konzentration nach 20 h Reaktionsdauer unabhängig von der eingesetzten Substratkonzentration $22 - 23 \text{ mmol L}^{-1}$, der Enantiomerenüberschuss lag bei $96 - 97 \%$. Eine Substratinhibierung des Biokatalysators kann aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

6.1.5 Organische Lösungsmittel

Eine mögliche Produktinhibierung bei der Reaktion sollte durch die Verwendung einer organischen Lösungsmittelphase minimiert werden können. Als organische Lösungsmittelphase wurden n-Butylacetat, Hexan oder Decan verwendet. Außerdem wurden die Alkohole Ethanol, 2-Hexanol und 2-Propanol untersucht. In gerührten Ansätzen wurden jeweils 5% v/v ($\alpha = 0,05$) dieser Komponenten zugegeben. Bis auf Ethanol wurde bei allen eingesetzten Lösungsmitteln die Löslichkeitsgrenze überschritten.

Die S-HPPE-Konzentration und der Enantiomerenüberschuss war bei allen getesteten Lösungsmitteln niedriger als im Standardansatz (Abbildung 6.1.2). Die Verteilungskoeffizienten wurden für n-Butylacetat ($k = 81$), Hexan ($k = 26$) und Decan ($k = 31$) bestimmt. Aufgrund der hohen Hydrophobizität von EBA wird es im Zweiphasensystem so stark in der zweiten organischen Phase gelöst, dass in der wässrigen Phase nicht genügend Substrat für eine ausreichende Umsetzung vorliegt. Dadurch sind die Produktkonzentrationen im Zweiphasensystem mit

n-Butylacetat deutlich niedriger als in Zweiphasensystemen mit Hexan oder Dekan. Im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat wird die Umsetzung von EBA zusätzlich durch die Lyse der Zellen limitiert.

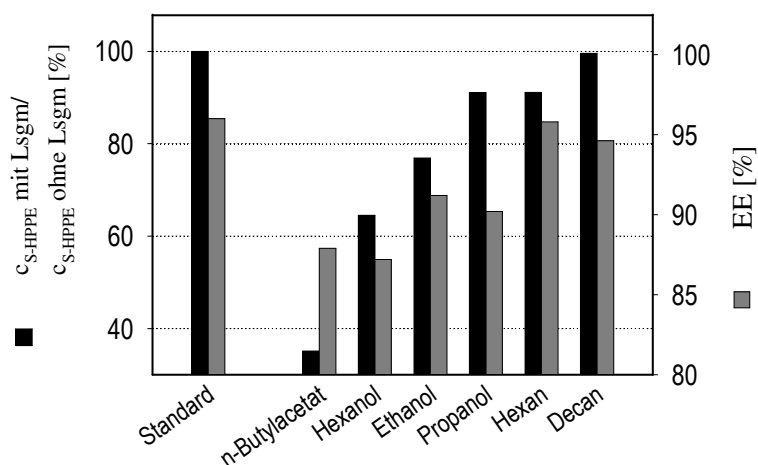


Abbildung 6.1.2: Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel und Alkohole auf die Umsetzung von EBA in gerührten 20 mL-Ansätzen nach zunehmender S-HPPE-Konzentration sortiert

6.1.6 Triton X-100

Mit einer Triton X-100-Konzentration von 1 % v/v konnte bei der Umsetzung von 4Cl-ACE die S-CHBE-Konzentration deutlich gesteigert werden. Der Einfluss von Triton X-100 auf die Umsetzung von EBA wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen untersucht. Bei einer EBA-Startkonzentration von 100 mmol L^{-1} und einer Biokatalysatorkonzentration von 50 g L^{-1} konnte die S-HPPE-Konzentration um 15 % von 23 mmol L^{-1} auf 26 mmol L^{-1} im Vergleich zum Referenzansatz gesteigert werden. Der Enantiomerenüberschuss ging von 96 % auf 95 % zurück.

6.2 Herstellung von S-HPPE im Rührkesselreaktor

Die Umsetzung von EBA wurde im Rührkesselreaktor mit 0,6 L Reaktionsvolumen durchgeführt. Die eingesetzte Biokatalysatorkonzentration betrug 60 g L^{-1} . Die Zellen waren im optimierten Medium (MH₂₀P₂₀T-Medium, Kapitel 5.1.2) über 36 h angezogen worden. Die Zellen wurden direkt aus dem Bioreaktor entnommen, abzentrifugiert und im Reaktionspuffer resuspendiert.

In den Vorversuchen wurde die Produktbildungskapazität der Zellen auf $0,9\text{-}1,1 \text{ mmol g}^{-1}$ bestimmt. Bei der Umsetzung wurden 55 mmol L^{-1} EBA (1 % v/v) eingesetzt, um bei der

verwendeten Biokatalysatorkonzentration einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Der eingesetzte Reaktionspuffer basierte auf dem optimierten Medium mit $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ NADP, es wurde jedoch kein n-Butylacetat und kein 1-Buten-3-ol eingesetzt. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich in diesem Medium die S-HPPE-Konzentration gegenüber dem Standardmedium um ca. 20 % steigern ließ.

Nach einer Reaktionsdauer von 48 h wurde ein Umsatz von 97 % und eine Ausbeute von 83 % erzielt (Tabelle 6.2.1, Abbildung 6.2.2). Es wurde kein bekanntes Nebenprodukt, wie das bei der Hydrolyse der Esterbindung auftretende Acetophenon, gebildet. Die niedrige Ausbeute ist auf die unvollständige Extraktion der Komponenten aus dem Reaktionsmedium zurückzuführen, möglicherweise war das Produkt in den Zellen absorbiert. Der Enantiomerenüberschuss betrug über den gesamten Versuchszeitraum 97,5 % und war damit höher als in den Vorversuchen, wo er bei 95 – 96 % lag.

Tabelle 6.2.1: Ergebnisse der Umsetzung von EBA im Rührkesselreaktor bei einer Biokatalysatorkonzentration von 60 g L^{-1} und einer EBA-Startkonzentration von 55 mmol L^{-1} bei 48 h Reaktionsdauer

Umsatz	Ausbeute	Selektivität	EE	Raum-Zeit-Ausbeute	Halbwertszeit Biokatalysator	Produktbildungskapazität
97 %	83 %	81 %	97,5 %	$0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	8,6 h	$0,7 \text{ mmol g}^{-1}$

Die Produktbildungskapazität der Umsetzung war mit $0,7 \text{ mmol g}^{-1}$ niedriger als in den Vorversuchen. Unter der Annahme, dass sich die geringe Ausbeute auf unzureichende Extraktion von S-HPPE aus dem Reaktionsmedium zurückführen ließ und der EBA ohne nennenswerte Bildung von Nebenprodukten zu S-HPPE reduziert wurde, so ergibt sich aus dem Umsatz von 97 % eine Produktbildungskapazität von $0,9 \text{ mmol g}^{-1}$. Das entspricht bei den eingesetzten Konzentrationen von Biotrockenmasse und EBA der maximal erreichbaren Produktbildungskapazität. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit betrug $0,97 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei einer Halbwertszeit der Zellen von 8,6 Stunden. Das führte bei der Umsetzung von EBA zu einer insgesamt längeren Gesamtreaktionsdauer (Abbildung 6.2.1).

Eine Regelung des pH war nur in den ersten 10 h der Umsetzung notwendig. Danach blieb der pH konstant, obwohl zu dem Zeitpunkt erst die Hälfte der Endkonzentration an S-HPPE gebildet worden war.

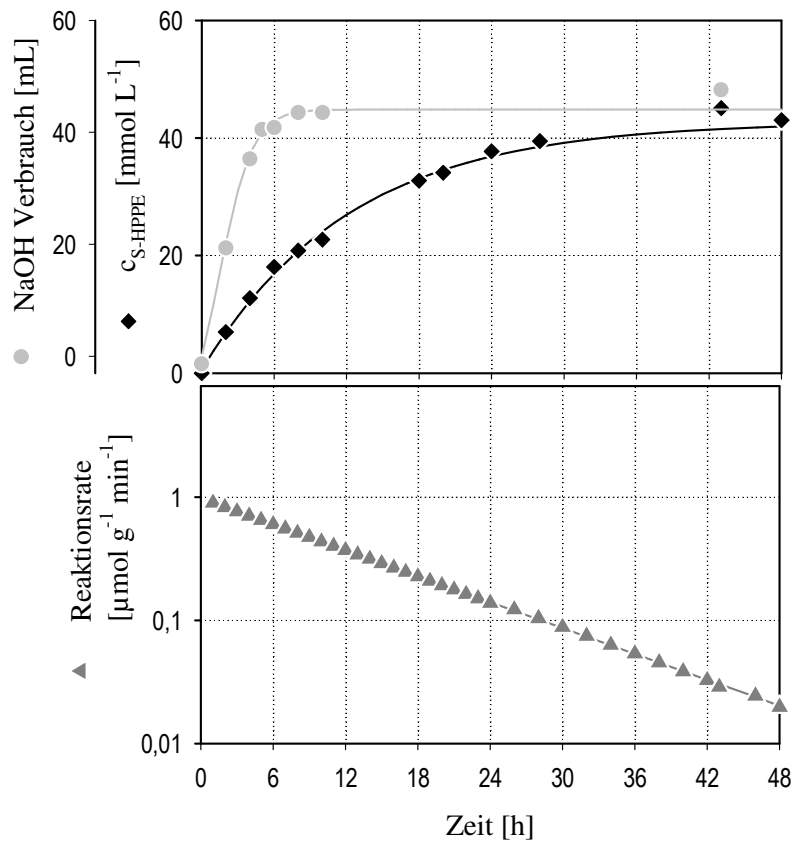


Abbildung 6.2.1: Reaktionsverlauf der Umsetzung von Ethylbenzoylacetat zu S-HPPE; oben: S-HPPE-Konzentration (Dreifachbestimmungen) und NaOH-Verbrauch; unten: Deaktivierungskinetik des Biokatalysators für eine Reaktion 1. Ordnung

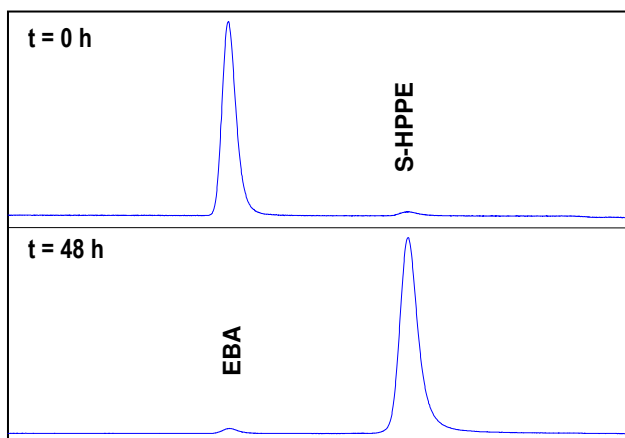


Abbildung 6.2.2: GC-Chromatogramme der Umsetzung von EBA im Rührkesselreaktor

6.3 Vergleich der S-CHBE und S-HPPE Produktionen

In Tabelle 6.3.1 sind die Ergebnisse aus den Experimenten zur Herstellung von S-CHBE und S-HPPE mit rekombinanten *S. cerevisiae* im Rührkesselreaktor zusammengefasst.

Tabelle 6.3.1: Vergleich der Herstellung von S-CHBE und S-HPPE im Rührkesselreaktor mit rekombinanten *S. cerevisiae* bei 25 °C und pH 7,0. Die Reduktion von EBA erfolgte mit 60 g L⁻¹ BTM, 55 mmol L⁻¹ Substrat bei einer Reaktionsdauer von 48 h; die Reduktion von 4Cl-ACE erfolgte mit 100 g L⁻¹, 200 mmol L⁻¹ Substrat und 8 h Reaktionsdauer

Umsatz	Ausbeute	Selektivität	EE	Raum-Zeit-Ausbeute	Halbwertszeit Biokatalysator	Produktbildungs-kapazität
EBA						
97 %	83 %	81 %	97,5 %	0,5 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	8,6 h	0,7 mmol g ⁻¹
4Cl-ACE						
100 %	94 %	94 %	90 %	44 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	1,8 h	1,8 mmol g ⁻¹

Im Vergleich zu den Umsetzungen mit 4Cl-ACE verläuft die Reaktion von EBA um den Faktor 16 langsamer ab, dafür ist die Halbwertszeit des Biokatalysators mit 8,6 h um den Faktor 3 bis 5 höher als üblicherweise bei der Reduktion von 4Cl-ACE, abhängig von den Reaktionsbedingungen, realisiert wurde. Die geringe Reaktionsrate bei gleichzeitig langsamerer Deaktivierung des Biokatalysators führte bei der Reduktion von EBA zu einer insgesamt deutlich längeren Prozesszeit von 48 h.

Weder EBA noch S-HPPE waren für die Reaktion inhibierend, so dass keine zweite organische Lösungsmittelphase eingesetzt werden musste. Dadurch ist die Stabilität des Biokatalysators bei der Reduktion von EBA im Vergleich zur Reduktion von 4Cl-ACE deutlich höher. Die maximale Produktbildungskapazität der Zellen betrug je nach Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von 4Cl-ACE 2,8 mmol g⁻¹ und für EBA 1,1 mmol g⁻¹.

Die Umsetzung von EBA erfolgte mit einem deutlich höheren Enantiomerenüberschuss als die Umsetzung von 4Cl-ACE. Mit Wildtypzellen betrug der Enantiomerenüberschuss von S-HPPE 85 % im Vergleich zu 44 % bei 4Cl-ACE und stieg unter optimierten Reaktionsbedingungen mit rekombinanten *S. cerevisiae* auf 97,5 % im Vergleich zu 90 % an. Damit wird bei der stereoselektiven Reduktion von EBA die für industrielle Anforderungen notwendige optische Reinheit erreicht.

Der Verlauf des NaOH-Verbrauches in Reduktionen im Rührkesselreaktor war für beide untersuchten Substrate identisch. Das zeigt, dass der NaOH-Verbrauch nur von der metabolischen Aktivität der Zellen abhängt, die bei identischen Reaktionsbedingungen

(Reaktionspuffer, Temperatur, Zellqualität) unabhängig vom eingesetzten β -Ketoester ist. Damit bietet der Verlauf der NaOH-Konzentration keine Möglichkeit der Online-Prozesskontrolle.

Der Verlauf der Reaktion wurde stark von der Qualität des eingesetzten Biokatalysators beeinflusst. Die Zellqualität hing von den Anzuchtbedingungen (Kapitel 5.1) und dem Alter der Zellen (Kapitel 5.2, Kapitel 5.3) ab. Da die Versorgung von Zellen mit immer identischer Qualität für die Experimente nicht gewährleistet werden konnte, war eine detaillierte Modellbeschreibung der Bioreduktionen von 4Cl-ACE und EBA nicht möglich.

7 Asymmetrische Reduktion 4Cl-ACE mit *P. pastoris*

Mit einem rekombinanten Stamm von *Pichia pastoris* stand ein zweiter Biokatalysator für die stereospezifische Reduktion von β -Ketoestern zur Verfügung. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* wurde hier eine Carbonylreduktase aus *Candida magnoliae* überexprimiert. Dieser Biokatalysator war nicht in der Lage, Ethylbenzoylacetat zu reduzieren. Daher beschränken sich die Untersuchungen auf die enantioselektive Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester.

7.1 Evaluierung geeigneter Reaktionsbedingungen

7.1.1 Substratkonzentration

In 1 mL Kleinansätzen wurde der Einfluss unterschiedlicher Startkonzentrationen von 4Cl-ACE (20 mmol L^{-1} – 350 mmol L^{-1}) im Standardreaktionspuffer untersucht. Nach einer Reaktionsdauer von 6 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug in den Ansätzen mit 20 mmol L^{-1} und 34 mmol L^{-1} 4Cl-ACE der Umsatz 99 % bei einer Ausbeute von 82 % und 77 %.

In Abbildung 7.1.1 ist die S-CHBE-Konzentration und der Enantiomerenüberschuss nach einer Reaktionsdauer von 4 h bei unvollständigem Umsatz gezeigt. Bei einer Substratkonzentration über 144 mmol L^{-1} sank die Produktkonzentration von 18 mmol L^{-1} auf 12 mmol L^{-1} ab. Die Reaktion wurde durch hohe Substratkonzentrationen inhibiert. Der Enantiomerenüberschuss durchlief in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ein Minimum von 85 %. Ein hoher Enantiomerenüberschuss von 92 % bei gleichzeitig hoher Ausbeute wurde bei niedrigen Startkonzentrationen von 4Cl-ACE erzielt.

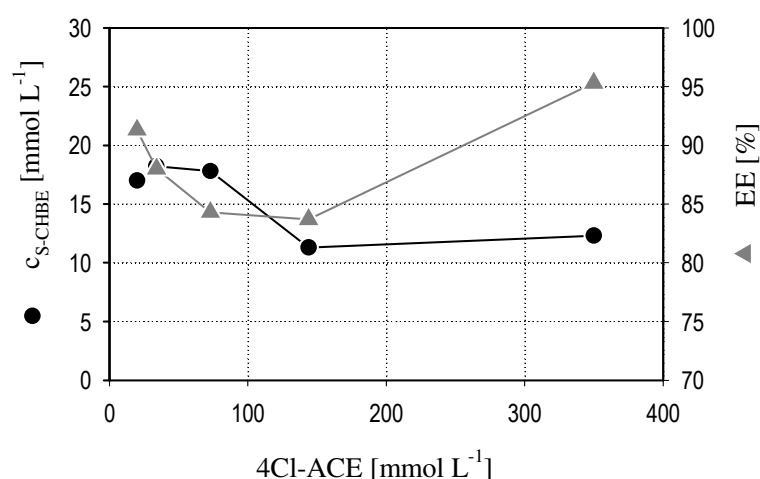


Abbildung 7.1.1: Einfluss der 4Cl-ACE-Konzentrationen auf die Produktkonzentration und den Enantiomerenüberschuss nach 4 h Reaktionsdauer in 0,5 mL-Ansätzen bei unvollständiger Umsetzung

7.1.2 Lösungsmittel

In gerührten Ansätzen wurde der Einfluss von Hexan, MTBE, Ethylacetat und n-Butylacetat bei einem Phasenanteil von $\alpha = 0,1$ unter Standardbedingungen untersucht. Durch die Zugabe von n-Butylacetat konnte die Ausbeute im Vergleich zum Einphasensystem um ca. 40 % gesteigert werden (Abbildung 7.1.2). Der Enantiomerenüberschuss wurde durch n-Butylacetat nur wenig beeinflusst und stieg auf 98 % an. Hexan, MTBE und Ethylacetat hatten nur einen geringen Einfluss auf die S-CHBE-Konzentration.

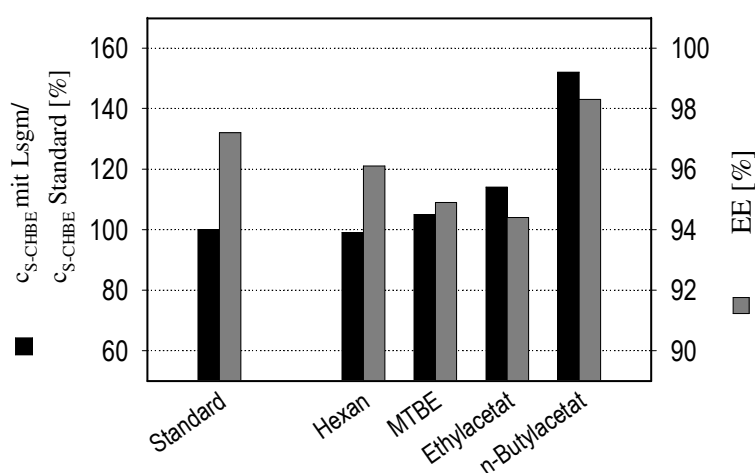


Abbildung 7.1.2: Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss

7.1.3 Temperatur

Der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss wurde in gerührten Ansätzen untersucht. Die Versuche wurden bei 20 °C, 25 °C, 30 °C und 35 °C durchgeführt.

Die maximale Produktkonzentration wurde bei 30 °C erzielt. Der Enantiomerenüberschuss wurde bei Reaktionstemperaturen von 20 °C bis 30 °C nicht beeinflusst und lag bei 94 – 95 %. Reaktionstemperaturen von über 30 °C führten zu einer Inaktivierung des Katalysators bei gleichzeitiger Abnahme des Enantiomerenüberschusses.

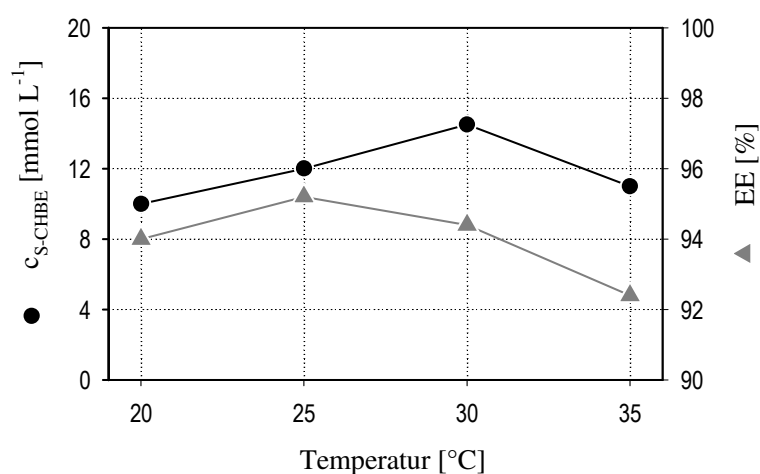


Abbildung 7.1.3: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in gerührten Ansätzen mit *P. pastoris*

7.1.4 NAD und NADP

In Experimenten im 0,5 mL-Maßstab im Einphasensystem wurde der Einfluss von 0,0 / 0,025 / 0,05 / 0,075 / 0,1 / 0,25 und 0,5 mmol L⁻¹ NAD bzw. NADP auf die Umsetzung untersucht, wobei jede mögliche Kombination beider Cofaktoren untersucht wurde. Von allen Ansätzen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Durch Zugabe von 0,5 mmol L⁻¹ NADP konnte im Vergleich zum Ansatz ohne NADP die Produktkonzentration um den Faktor 70 gesteigert werden (Abbildung 7.1.4). NAD hatte nur einen geringen Einfluss auf die Produktkonzentration.

In Ansätzen ohne NAD war der Enantiomerenüberschuss immer > 97 %. Durch die Zugabe von NAD sank der Enantiomerenüberschuss in Abhängigkeit von der Konzentration an NAD und

NADP stark ab. In Ansätzen ohne NADP aber mit $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NAD wurde mehr R-CHBE als S-CHBE gebildet.

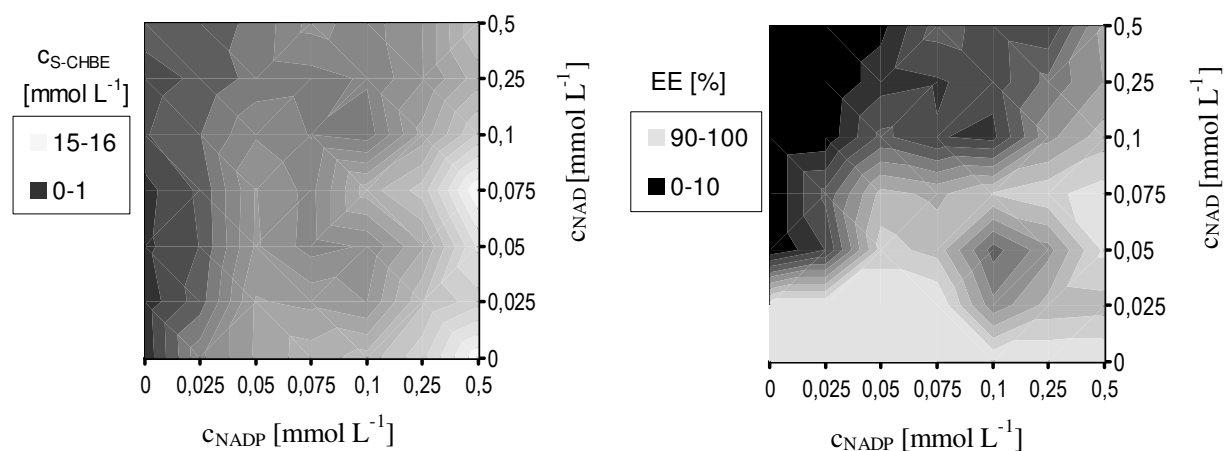


Abbildung 7.1.4: Einfluss unterschiedlicher NAD und NADP-Konzentrationen auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss Experimenten im 0,5 mL-Maßstab

Den Einfluss von NADP auf die Umsetzung zeigt auch folgender Versuch. Dabei wurde in 1 mL Kleinansätzen der Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen (wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben) auf die Umsetzung untersucht. Eine Serie von Experimenten wurde ohne zusätzliche NADP-Zugabe durchgeführt. In einer zweiten Serie wurden zum Reaktionspuffer $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP zugegeben. Ohne NADP betrug die S-CHBE-Konzentration nur 10 % des Vergleichsansatzes (Abbildung 7.1.5), der Enantiomerenüberschuss lag bei 3 % bis 40 %. Die Konzentration an R-CHBE war in Ansätzen mit und ohne NADP vergleichbar, so dass die Abnahme des Enantiomerenüberschusses nur auf die niedrige S-CHBE-Konzentration zurückzuführen ist.

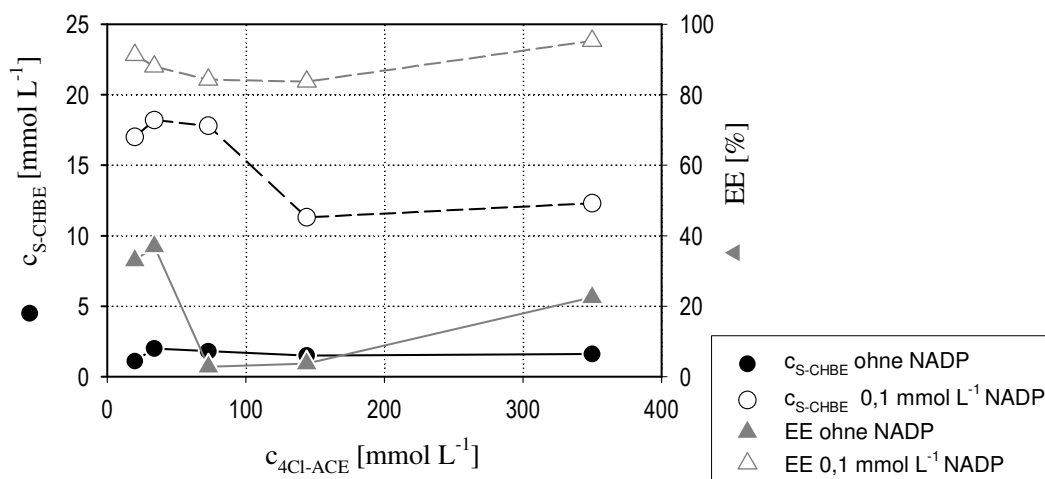


Abbildung 7.1.5: Einfluss der 4Cl-ACE-Konzentration auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in 1 mL Kleinansätzen; ausgefüllte Symbole: ohne NADP; hohle Symbole: mit $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP

Um die Reduktion von 4Cl-ACE mit *P. pastoris* sinnvoll durchführen zu können, muss NADP als Cofaktor zugegeben werden. Geringe Konzentrationen von NADP ($0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) sind ausreichend, da bei einer 10-fachen Steigerung der Cofaktorkonzentration die S-CHBE-Konzentration nur um den Faktor 2 zunimmt.

Eine Substitution von NADP mit NAD ist nicht möglich. Vielmehr muss ein hoher NAD-Level in den Zellen vermieden werden, da bereits geringe NAD-Konzentrationen zu einer starken Abnahme des Enantiomerenüberschusses führen.

7.1.5 Pufferkonzentration

Der Einfluss der Kaliumphosphatpuffer-Konzentration wurde in Experimenten im 0,5 mL-Maßstab bei pH 7,0 und einer Versuchsdauer von 6 h untersucht (Abbildung 7.1.6).

Mit steigender Pufferkonzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bis 1 mol L^{-1} nahm die S-CHBE-Konzentration um 50 % ab und der Enantiomerenüberschuss sank von 92 % auf unter 80 %. Dieser Effekt ist auf die hohe Ionenstärke des Reaktionspuffers zurückzuführen.

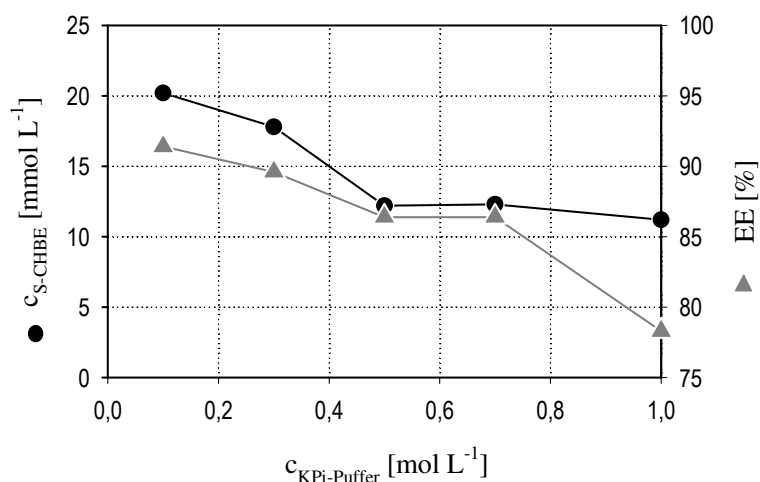


Abbildung 7.1.6: Einfluss der Kaliumphosphatpuffer-Konzentration auf die Umsetzung von 4Cl-ACE mit *P. pastoris*

7.1.6 Umsetzungen in optimierten Medien

In den Versuchen mit *S. cerevisiae* nahm die Ausbeute entsprechend folgender Reihenfolge zu: Einphasensystem < Standard/Zweiphasensystem < Triton X-100 < optimiertes Medium. Für die Umsetzungen mit *P. pastoris* wurden folgende Medien eingesetzt:

- Standard: Standardreaktionspuffer (0,1 mol L⁻¹ NaCl, 0,1 mol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, 1,0 mol L⁻¹ Glukose)
- Zweiphasensystem; Standardreaktionspuffer mit 20 % v/v n-Butylacetat;
- Triton X-100: Zweiphasensystem mit 6,5 % v/v Triton X-100
- Optimiertes Medium ohne 1-Buten-3-ol (Kapitel 5.3)

Die Versuche wurden in pH-kontrollierten Ansätzen bei pH 7,0 durchgeführt. Es wurden 4,7 % v/v 4Cl-ACE (350 mmol L⁻¹) eingesetzt. Durch die Zugabe von n-Butylacetat konnte die Ausbeute um 45 % gegenüber dem Einphasensystem gesteigert werden (Abbildung 7.1.7). Die Zugabe von Triton X-100 zum Zweiphasensystem führte zu einer weiteren Zunahme der Ausbeute um 15 %. Im optimierten Medium konnte die Ausbeute schließlich um 160 % im Vergleich zum Einphasensystem und um 90 % im Vergleich zum Standardansatz gesteigert werden. Auffallend ist insbesondere, dass die hohen Ionenstärken im optimierten Reaktionsmedium nicht zu einer Hemmung der Reaktion führen, wie es die Ergebnisse aus den Versuchen zu unterschiedlichen Pufferkonzentrationen vermuten lassen.

Die Medien unterschieden sich außer in der Ionenstärke auch in der Konzentration der eingesetzten Glukose. In den Experimenten zum Einfluss der Pufferkonzentration war die Glukosekonzentration mit 1 mol L^{-1} deutlich höher als im optimierten Medium mit $0,32 \text{ mmol L}^{-1}$. So führte erst die Kombination von hoher Glukosekonzentration und hoher Ionenstärke zu einer Abnahme der Ausbeute. Der negative Einfluss der hohen Pufferkonzentration im optimierten Medium wird möglicherweise durch den positiven Einfluss anderer Komponenten im Medium ausgeglichen bzw. überkompensiert.

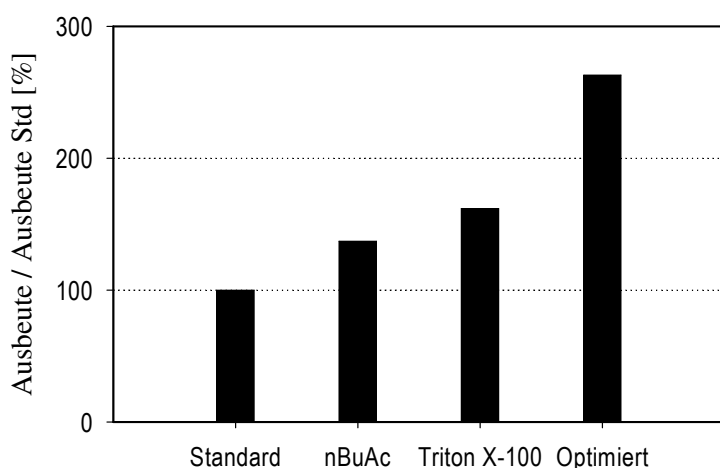


Abbildung 7.1.7: Einfluss verschiedener Reaktionsmedien auf die S-CHBE-Konzentration bei der Reduktion von 4Cl-ACE mit *P. pastoris* in pH-geregelten Ansätzen, nBuAc: n-Butylacetat

7.1.7 Zulaufverfahren

Als Alternative zum Satzverfahren zur Reduktion von 4Cl-ACE wurde mit *P. pastoris* ein Zulaufverfahren eingesetzt.

In diesem Zulaufverfahren wurden sowohl Zellen als auch Substrat kontinuierlich in das Reaktionsgefäß dosiert¹. Diese Reaktionsführung garantiert die kontinuierliche Zufuhr frischer Zellen in das Reaktionsgefäß. Durch die gleichzeitige Dosierung von Substrat und Biokatalysator kann das optimale Verhältnis von Katalysator und Substrat eingestellt werden.

Die Reaktion erfolgte unter pH-kontrollierten Bedingungen bei pH 7,0 und einer Reaktionstemperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei diesem doppelten Zulaufverfahren wurden 30 % der gesamten Zellsuspension im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die verbleibenden 70 % wurden nachfolgend innerhalb

¹ Das Verfahren geht auf einen Vorschlag von Herrn Dr. Pfaller und Herrn Dr. Wich, Consortium für elektrochemische Industrie, zurück

von 22 h kontinuierlich zudosiert. 4Cl-ACE wurde mit einer Endkonzentration im Gesamtansatz von 350 mmol L^{-1} im dreifachen Volumen n-Butylacetat gelöst und über 15 h kontinuierlich zudosiert. Bei einer Gesamtreaktionsdauer von 24 h wurde durch die um 7 h längere Zelldosierung ein vollständiges Abreagieren von akkumuliertem Substrat ermöglicht. Den Reaktionsverlauf einer solchen Umsetzung zeigt Abbildung 7.1.8. Diese Umsetzung wurde mit 180 mL Zellsuspension bei einer Biokatalysatorkonzentration von 60 g L^{-1} durchgeführt. Zu Beginn der Reaktion und nach 6 h wurde jeweils NADP zu einer Endkonzentration von $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ zugegeben.

Die Zulaufprofile bei der Umsetzung waren nicht optimiert, so dass es zur Substratakkumulation während der Reaktion kam. Nach 24 h war das Substrat vollständig umgesetzt. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 91 % bei einem Enantiomerenüberschuss von 95 %. Die Produktbildungskapazität der Zellen betrug $5,8 \text{ mmol g}^{-1}$.

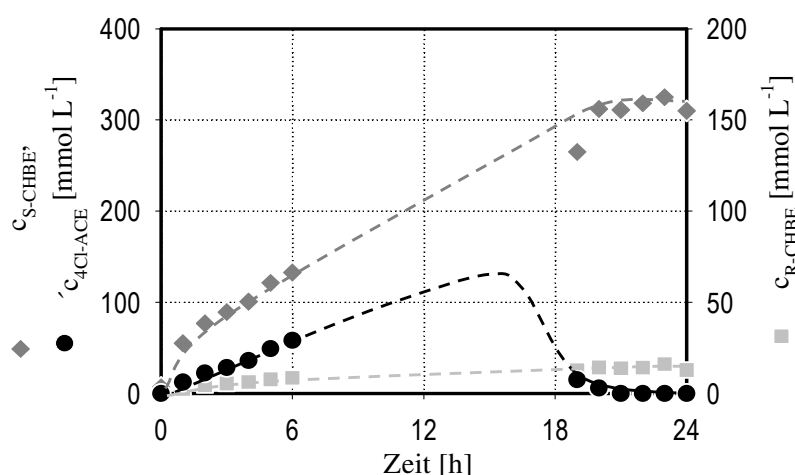


Abbildung 7.1.8: Konzentrationsverlauf von 4Cl-ACE, S-CHBE und R-CHBE im doppelten Zulaufverfahren mit *P. pastoris*; der Enantiomerenüberschuss war über die Reaktionsdauer konstant bei 95 %

7.1.8 Vergleich der Biokatalysatoren *S. cerevisiae* und *P. pastoris*

Die Substratkonzentration beeinflusst in Umsetzungen mit *P. pastoris* sowohl die Produktkonzentration (Substratinhibierung) als auch den Enantiomerenüberschuss. Dadurch wird im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat über die Verringerung der Gleichgewichtskonzentration von 4Cl-ACE in der wässrigen Phase nicht nur die S-CHBE-Konzentration gesteigert, sondern gleichzeitig auch der Enantiomerenüberschuss. Mit *S. cerevisiae* als Katalysator hatte die eingesetzte Substratkonzentration keinen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss.

Für beide Biokatalysatoren war in Zweiphasensystemen n-Butylacetat das effektivste organische Lösungsmittel, während Hexan, Ethylacetat und MTBE für beide Reaktionssysteme ungeeignet waren. Bei beiden Biokatalysatoren war die Zugabe von Cofaktoren notwendig, um eine ausreichend hohe Produktkonzentration zu erzielen.

Bei der Umsetzung von 4Cl-ACE hat die Verwendung von *P. pastoris* einige Vorteile im Vergleich zu *S. cerevisiae*. Die Produktbildungskapazität der Zellen ist um den Faktor 2 höher als bei *S. cerevisiae*, so dass für die Umsetzung weniger Biokatalysator eingesetzt werden muss. Der Enantiomerenüberschuss beträgt bis zu 98 % im Vergleich zu 90 % mit *S. cerevisiae*. Der wesentliche Nachteil von *P. pastoris* liegt in der eingeschränkten Substratakzeptanz. Mit *S. cerevisiae* liegt ein Biokatalysator vor, der für unterschiedliche β -Ketoester eingesetzt werden kann und sich auch für Substrate eignet, die von anderen Mikroorganismen und Enzymen nicht umgesetzt werden können.

Tabelle 7.1.1: Reduktion von 4Cl-ACE mit rekombinanten *S. cerevisiae* und *P. pastoris* unter jeweils optimierten Reaktionsbedingungen

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Verfahren	Satzverfahren	Zulaufverfahren
4Cl-ACE-Konzentration	200 mmol L ⁻¹	350 mmol L ⁻¹
Umsatz	100 %	100 %
Ausbeute	94 %	91 %
Enantiomerenüberschuss	90 %	95 %

8 Zusammenfassung

Die stereoselektive Ganzzellreduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE) und von Ethylbenzoylacetat (EBA) zu (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE) wurde mit zwei rekombinanten Hefen durchgeführt.

Bei der Reduktion von 4Cl-ACE zu S-CHBE mit Wildtyp *S. cerevisiae* wurde im nicht optimierten Ansatz im Zweiphasensystem mit 10 % v/v n-Butylacetat ein Enantiomerenüberschuss von 44 % bei einer Produktbildungskapazität von $0,2 \text{ mmol g}^{-1}$ bezogen auf die eingesetzte Biotrockenmassenkonzentration beobachtet.

Für die weiteren Versuche wurde ein rekombinanter Stamm von *S. cerevisiae* eingesetzt, der die hefeeigene Fettsäuresynthase mit der Funktion der Carbonylreduktase und die Glukosedehydrogenase aus *B. subtilis* zur Steigerung der Cofaktorregenerierung (NADPH) überexprimiert. Mit diesem rekombinanten Stamm konnte unter Standardbedingungen ein Enantiomerenüberschuss von 83 % und eine Produktbildungskapazität von $2,0 \text{ mmol g}^{-1}$ beobachtet werden (Abbildung 8.1.1).

Durch das Herstellungsverfahren des Biokatalysators wird die Produktbildungskapazität und der Enantiomerenüberschuss bei der anschließenden Bioreduktion wesentlich beeinflusst. Bei hohen Konzentrationen an Glukose und Maisquellwasser im Anzuchtmedium betrug der Enantiomerenüberschuss 77 % und die Produktbildungskapazität $1,4 \text{ mmol g}^{-1}$. Durch eine verbesserte Prozessführung wurde der Enantiomerenüberschuss auf bis zu 88 % und die Produktbildungskapazität auf über $2,0 \text{ mmol g}^{-1}$ gesteigert.

Die Ausbeute der Reduktion von 4Cl-ACE konnte durch Triton X-100 und n-Butylacetat wesentlich gesteigert werden. Hohe Salzkonzentrationen bewirken eine Steigerung des Enantiomerenüberschusses bei gleichzeitiger Abnahme der Ausbeute. Nur bei Einsatz von frischen Zellen mit hoher Reduktionskapazität konnten hohe Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse erzielt werden.

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde ein genetischer Algorithmus eingesetzt. In dem optimierten Reaktionsmedium konnte ein Enantiomerenüberschuss von 90 % und eine Produktbildungskapazität von $2,8 \text{ mmol g}^{-1}$ erreicht werden. Dieser Prozess konnte erfolgreich in einen Rührkesselreaktor mit $0,5 \text{ L}$ Reaktionsvolumen übertragen werden. Innerhalb von 8 h konnten 2,7 % v/v (200 mmol L^{-1}) 4Cl-ACE vollständig umgesetzt werden. Das entsprach einer Steigerung um den Faktor 3 im Vergleich zu bisher publizierten Ergebnissen. Dabei wurde eine

Ausbeute von 94 % erzielt. Das Produkt S-CHBE reicherte sich in der n-Butylacetatphase mit einer Endkonzentration von 930 mmol L⁻¹ an. Die Deaktivierung des Biokatalysators folgte einer Reaktion 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit von 1,8 h.

Der Einsatz von n-Butylacetat als organische Lösungsmittelphase führte zu einer Verringerung der 4Cl-ACE-Konzentration in der wässrigen Phase. Dadurch konnte die Substrattoxizität reduziert und die Ausbeute an S-CHBE erhöht werden. Durch die Zugabe von Triton X-100 wurde eine sehr feine Verteilung der organischen Lösungsmittelphase erzielt und so die Stofftransportleistung und damit die Ausbeute erhöht. Unter optimierten Reaktionsbedingungen wird die Stabilität des Biokatalysators durch den Einfluss von n-Butylacetat auf die Zellintegrität bestimmt. Nur integrale Zellen sind in der Lage, wesentlich zur Reduktion von 4Cl-ACE beizutragen.

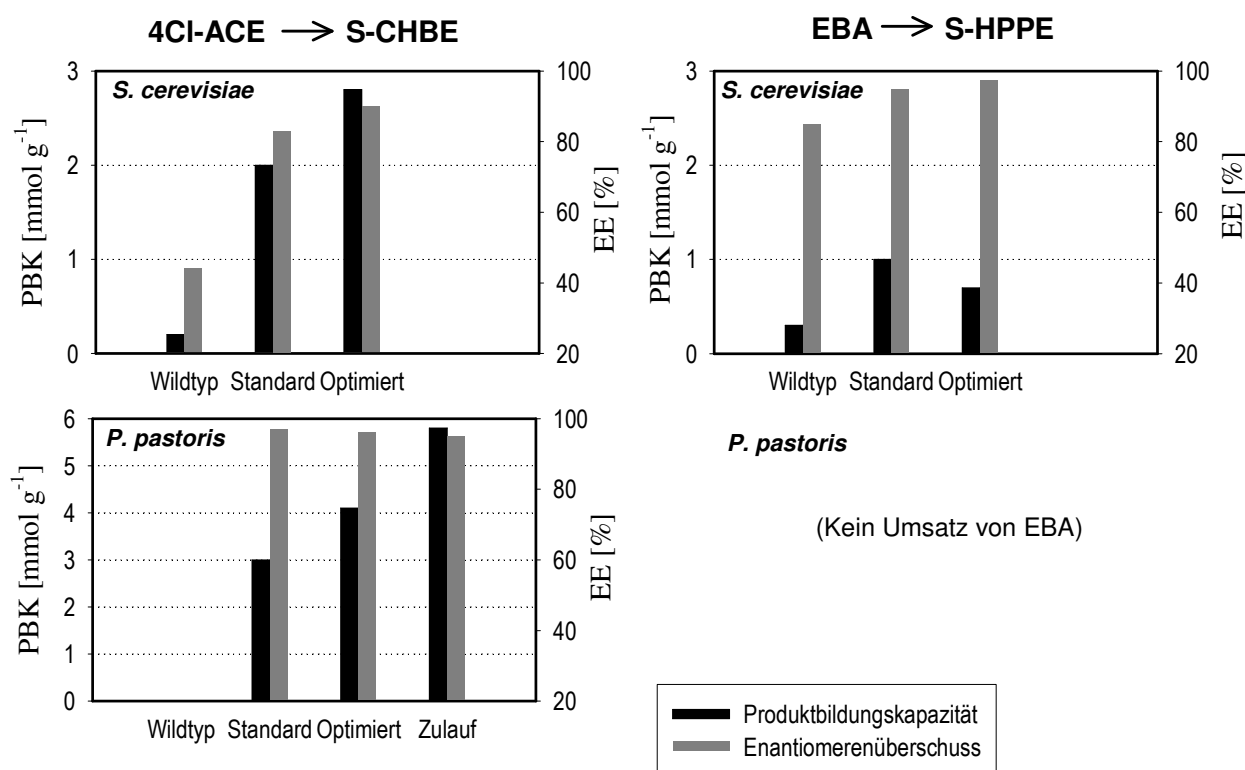


Abbildung 8.1.1: Ergebnisse der stereoselektiven Reduktion von 4Cl-ACE und EBA mit Wildtyp und rekombinanten *S. cerevisiae* und rekombinanten *P. pastoris*; Standard: Reduktion im Satzverfahren im Zweiphasensystem mit n-Butylacetat; Optimiert: optimierte Reaktionsbedingungen; Zulauf: Zulaufverfahren mit gleichzeitiger Dosierung von Zellsuspension und Substrat

Bei der Reduktion von Ethylbenzoylacetat mit Wildtyp-Zellen von *S. cerevisiae* wurde ein Enantiomerenüberschuss von 85 % und eine Produktbildungskapazität von 0,3 mmol g⁻¹ beobachtet. Durch den Einsatz rekombinanter *S. cerevisiae* konnte der Enantiomerenüberschuss

auf 95 % und die Produktbildungskapazität auf $1,0 \text{ mmol g}^{-1}$ gesteigert werden (Abbildung 8.1.1). Der Enantiomerenüberschuss konnte durch den Einsatz eines optimierten Reaktionsmediums auf 97,5 % gesteigert werden. Im Rührkesselreaktor mit 0,6 L Reaktionsvolumen konnte 1 % v/v (55 mmol L^{-1}) EBA innerhalb von 48 h Reaktionsdauer mit einer Ausbeute von 83 % zu S-HPPE reduziert werden. Bei bisher publizierten Ergebnissen lag die Ausbeute bei 50 – 63 % bei einer eingesetzten EBA-Konzentration von 0,1 % v/v. Die Halbwertszeit des Biokatalysators betrug 8,6 h, der Einsatz eines organischen Lösungsmittels war nicht erforderlich. Um vergleichbare Ausbeuten zu erzielen, muss bei der Herstellung von S-HPPE im Vergleich zur Herstellung von S-CHBE die 2,5-fache Biokatalysatorkonzentration eingesetzt werden.

Die stereoselektive Reduktion von 4Cl-ACE konnte mit einem rekombinanten Stamm von *P. pastoris* erfolgreich durchgeführt werden. Diese Zellen exprimieren eine Carbonylreduktase aus *C. magnoliae* und die Glukosedehydrogenase aus *B. subtilis*. Mit diesen Zellen konnte in einem Zweiphasensystem mit n-Butylacetat bei gleichzeitiger Dosierung von Substrat und Zellsuspension 350 mmol L^{-1} 4Cl-ACE innerhalb von 24 h vollständig umgesetzt werden. Dabei wurde eine Ausbeute von 91 % und ein Enantiomerenüberschuss von 95 % beobachtet. Der rekombinante Stamm von *P. pastoris* war nicht in der Lage, EBA zu reduzieren.

Rekombinante *P. pastoris* war als Biokatalysator für die stereospezifische Reduktion von 4Cl-ACE besser geeignet als rekombinante *S. cerevisiae*. Mit dem rekombinanten Stamm von *S. cerevisiae* steht jedoch ein generischer Biokatalysator zu Verfügung, der den Zugang zu einem weiten Spektrum unterschiedlicher enantiomerenreiner Alkohole ermöglicht, die mit der Carbonylreduktase aus *C. magnoliae* nicht zugänglich sind.

9 Ausblick

Bei der stereoselektiven Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester mit rekombinanten *S. cerevisiae* konnte zwar eine hohe Ausbeute erzielt werden, durch den niedrigen Enantiomerenüberschuss von 90 % und den hohen Verbrauch an Biokatalysator ist dieser Prozess jedoch noch nicht industriell einsetzbar.

Bei der Reduktion von Ethylbenzoylacetat ist der Enantiomerenüberschuss mit 97,5 % für industrielle Anforderungen ausreichend. Allerdings müssen auch hier hohe Biokatalysatorkonzentrationen eingesetzt werden, um hohe Produktkonzentrationen zu erreichen.

Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung dieser Prozesse sind:

- Ausschalten der hefeeigenen Reduktasen mit unerwünschter Stereospezifität
- Erhöhung der Expression der Fettsäuresynthase
- Erhöhung der Biokatalysatoraktivität und des Enantiomerenüberschusses durch eine geeignete Prozessführung bei der Herstellung des Katalysators. Hierbei soll die Expression und die Aktivität der an der Reaktion beteiligten Enzyme gezielt beeinflusst werden.
- Verbesserung der Biokatalysatorherstellung, um höhere Biomassenkonzentrationen zu erzielen.

Die Verfahrensentwicklung wurde hauptsächlich am Beispiel der stereoselektiven Reduktion von 4Cl-ACE durchgeführt und die Optimierungsstrategien auf die Biotransformation von EBA übertragen. Da 4Cl-ACE für die Zellen toxisch ist und die Reaktion in einem Zweiphasensystem mit n-Butylacetat durchgeführt wird, können keine wachsenden Zellen eingesetzt werden. Bei der Reduktion von Ethylbenzoylacetat wäre zu prüfen, ob durch den Einsatz wachsender Zellen die Stabilität und Aktivität des Biokatalysators verbessert und die Ausbeuten erhöht werden können.

Ethylbenzoylacetat gehört nicht zum Substratspektrum der Carbonylreduktase aus *C. magnoliae*, wird jedoch von *S. cerevisiae* in hoher optischer Reinheit zum S-Alkohol umgesetzt. In dem Einsatz von Substraten, die von dem rekombinanten Stamm von *P. pastoris* nicht reduziert werden können, ist das größte Anwendungspotential für den rekombinanten Biokatalysator *S. cerevisiae* zu sehen.

10 Anhang

10.1 Literaturverzeichnis

Aragozzini, F., Valenti, M.: *Biocatalytic, Enantioselective Preparations of (R)- and (S)-Ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate, a Useful Chiral Synthone*; *Biocatalysis*; **5** (1992) S. 325-332

Athanasίου, N.; Smallridge, J.; Trehwella, M. A.: *Baker's yeast mediated reduction of β -keto esters and β -keto amides in an organic solvent system*; *Journal of Molecular Catalysis B*; **11** (2001) S. 893-896

Bardot, V., Gelas-Mialhe, Y., Gramain, J. C., Remuson, R.: *Enantioselective synthesis of 2-(2-hydroxyethyl)allylsilanes from chiral β -hydroxyesters*; *Tetrahedron: Asymmetry*; **8** (1996) S. 1111-1114

Bertau, M., Bürli, M.: *Enantioselective Microbial Reduction with Baker's Yeast on an Industrial Scale*; *Chimia*; **54** (2000) S. 503-507

Bertau, M.: *Novel unusual microbial dehalogenation during enantioselective reduction of ethyl 4,4,4-trifluoro acetoacetate with baker's yeast*; *Tetrahedron Letters*; **42** (2001) S. 1267-1268

Bertau, M.: *How Cell Physiology Affects Enantioselectivity of the Biotransformation of Ethyl 4-chloro-acetoacetate with *Saccharomyces cerevisiae**; *Biocatalysis and Biotransformation*; **20** (2002) S. 363-367

Bertau, M., Scheller, D.: *Equilibrium-dependent hydration of ethyl 4,4,4-trifluoro-acetoacetate in aqueous solutions and consequences for the whole-cell biotransformation with *Saccharomyces cerevisiae**; *Enzyme and Microbial Technology*; **32** (2003) S. 491-497

Bhalerao, U. T., Chandraprakash, Y., Luke Babu, R., Fadnavis, N. W.: *β -Ketoester Reduction by Baker's Yeast immobilized in Calcium Alginate: an Examination of pH Effects on Enantioselectivity*; *Synthetic Communications*; **23** (1993) S. 1201-1208

Blomberg, A.: *The Osmotic Hypersensitivity of the Yeast Saccharomyces cerevisiae is Strain and Growth Media Dependent: Quantitative Aspects of the Phenomenon*; Yeast; **13** (1997) S. 529-539

Boccù, E., Ebert, C., Gardossi, L., Gianferrara, T., Linda P.: *Chemometric Optimization of an Asymmetric Reduction Catalyzed by Baker's Yeast*; Biotechnology and Bioengineering; **35** (1990) S. 928-934

Bommarius, A. S., Riebel, B. R.: *Biocatalysis*; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004

Bruce, L. J., Daugulis, A. J.: *Solvent Selection Strategies for Extractive Biocatalysis*; Biotechnology Progress; **7** (1991) S. 116-124

Bruinenberg, P. M., Van Dijken, J., P., Scheffers, W. A.: *A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts*; Journal of General Microbiology; **129** (1983) S. 953-964

Cheema, J. J. S., Sankpal, N. V., Tambe, S. S., Kulkarni, B. D.: *Genetic Programming Assisted Stochastic Optimization Strategies for Optimization of Glucose to Gluconic Acid Fermentation*; Biotechnology Progress; **18** (2002) S. 1256-1365

Chen, J., Wang, K. P.: *Design of the pH Profile for Asymmetric Bioreduction of Ethyl 4-Chloro-3-oxobutyrate on the Basis of a Data-Driven Method*; Biotechnology Progress; **18** (2002) S. 1414-1422

Chênevert, R., Fortier, G., Rhalid R. B.: *Asymmetric Synthesis of Both Enantiomers of Fluoxetine via Microbial Reduction of Ethyl Benzoylacetate*; Tetrahedron; **48** (1992) S. 6769-6776

Chin-Joe, I., Straathof, A. J. J., Pronk, J. T. Jongejan, J. A., Heijnen, J. J.: *Influence of the Ethanol and Glucose Supply Rate on the Rate and Enantioselectivity of 3-Oxo Ester Reduction by Baker's Yeast*; Biotechnology and Bioengineering; **75** (2001) S. 29-38

Crosby, J.: *Synthesis of optically active compounds: A large scale perspective*; Tetrahedron; **47** (1991) S. 4789-4846

Csuk, R., Glänzer, B. I.: *Baker's Yeast Mediated Transformation in Organic Chemistry*; Chemical Reviews; **91** (1991) S. 49-97

Cui, J.-N.; Teraoka, R.; Ema, T.; Sakai, T.; Utaka M.: *Highly Regio- and Enantioselective Reduction of 1-Chloro-2,4-alkanediones Using Baker's Yeast: Effects of Organic Solvents as Additives*; Tetrahedron Letters; **38** (1997) S. 3021-3024

Cui, J.-N., Ema, T., Sakai, T., Utaka, M.: *Control of enantioselectivity in the baker's yeast asymmetric reduction of γ -chloro β -diketones to γ -chloro (S)- β -hydroxy ketones*; Tetrahedron: Asymmetry; **9** (1998) S. 2681-2692

Curvers, S.: *Reaktionstechnische Untersuchungen zur sekretorischen Produktion von rekombinantem, humanem Chymotrypsinogen B mit Pichia pastoris*; (2000) Dissertation, Forschungszentrum Jülich

Dahl, A. C.; Madsen, J. O.: *Baker's Yeast: production of D- and L-3-hydroxy esters*; Tetrahedron: Asymmetry; **9** (1998) S. 4395-4417

Dahl, A. C.; Fjeldberg, M.; Madson, J. O.: *Baker's Yeast: improving the D-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters*; Tetrahedron: Asymmetry; **10** (1999) S. 551-559

D'Arrigo, P., Fantoni, G. P., Servi, S., Strini, A.: *The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction*; Tetrahedron: Asymmetry; **8** (1997) S. 2375-2379

Davoli, P., Forni, A., Moretti, I., Prati, F., Torre, G.: *(R)-(+)* and *(S)-(-)* ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxy butanoate by enantioselective Baker's yeast reduction; Enzyme and Microbial Technology; **25** (1999) S. 149-152

- Ehrler, J., Biovannini, F., Lamatsch, B., Seebach, D.: *Stereoselectivity of Yeast Reductions - an Improved Procedure for the Preparation of Ethyl (S)-3-Hydroxybutanoate and (S)-2-Hydroxymethylbutanoate*; CHIMIA; **40** (1986) S. 172-173
- Ema, T., Moriya, H., Kofukuda, T., Ishida, T., Maehara, K., Utaka, M., Sakai, T.: *High Enantioselectivity and Broad Substrate Specificity of a Carbonyl Reductase: Towards a Versatile Biocatalyst*; Journal of Organic Chemistry; **66** (2001) S. 8682-8684
- Flores, M. V.; Voget, C. E.; Ertola, R. J. J.: *Permeabilization of yeast cells (Kluyveromyces lactis) with organic solvents*; Enzyme and Microbial Technology; **16** (1994) S. 340-346
- Fronza, G., Fuganti, C., Grasselli, P. Mele, A.: *On the Mode of Bakers' Yeast Transformation of 3-Chloropropionphenone and Related Ketones. Synthesis of (2S)-[2-2H]Propiophenone, (R)-Fluoxetine, and (R)- and (S)-Fenfluroamine*; Journal of Organic Chemistry; **56** (1991) S. 6019-6023
- Gaisser, S., Hoogeveen, R., Hüsing, B.: *Überblick über den Stand von Wissenschaft und Technik im produktionsintegrierten Umweltschutz durch Biotechnologie (PIUS-BT)*; http://www.isi.fhg.de/bt/projekte/WuT_PIUS_BT.pdf; Zugriff am 24.05.2004
- García-Urdiales, E., Rebolledo, F., Gotor, V.: *Enzymatic ammonolysis of ethyl (+-)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of pyrrolidin-3-ol and 5-(chloromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one*; Tetrahedron: Asymmetry; **10** (1999) S. 721-726
- Gong, P. F., Xu, J. H., Tang, Y. F., Wu, H. Y.: *Improved Catalytic Performance of Bacillus megaterium Epoxide Hydrolase in a Medium Containing Tween-80*; Biotechnology Progress; **19** (2003) S. 652-654
- Goodhue, C. T., Rosazza, J. P., Peruzzotti, G. P.: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*; Demain, A., Solomon, N. A. (EdS.); American Society for Microbiology, Washington, DC; (1986) S. 97-121

Gowda, L. R., Bachhawat, N., Bhat, S. G.: *Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis*; Enzyme and Microbial Technology; **13** (1992) S. 154-157

Granot, D., Levine, A., Dor-Hefetz, E.: *Sugar-induced apoptosis in yeast cells*; FEMS Yeast Research; **4** (2003) S. 7-13

Hallinan, K. O., Crout, D. H. G.: *Yeast Catalysed Reduction of β -Keto Esters 2: Optimisation of the Stereospecific Reduction by Zygosaccharomyces rouxii*; Biocatalysis and Biotransformation; **12** (1995) S. 179-191

Hoff, B. H., Anthonsen, T.: *Lipase-catalyzed resolution of esters of 4-chloro-3-hydroxy-butanoic acid: effects of alkoxy group and solvent on the enantiomeric ratio*; Tetrahedron: Asymmetry; **10** (1999) S. 1401-1412

Holland, H. L.: *Microbial transformations*; Current Opinion in Chemical Biology; **2** (1998) S. 77-84

Houng, J.-Y., Hsu, H.-F., Liu, Y.-H. Wu, J.-Y.: *Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast*; Journal of Biotechnology; **100** (2003) S. 239-250

Hünnekes: *Untersuchungen an Biorührkesselreaktoren hinsichtlich der Stoffaustauschleistung*; Diplomarbeit an der RWTH Aachen 1994

Huisman, G. W., Gray, D.: *Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries*; Current Opinion in Biotechnology; **13** (2002) S. 352-359

Jayasinghe, L. Y.; Smallridnge, A. J.; Trewhella, M. A.: *The Yeast Mediated Reduction of Ethyl acetoacetate in Petroleum Ether*; Tetrahedron Letters; **34** (1993) S. 3949-3950

Jayasinghe, L. Y., Kodituwakku, D., Smallridge, A. J., Trehwella, M. A.: *The Use of Organic Solvent Systems in the Yeast Mediated Reduction of Ethyl Acetoacetate*; Bulletin of the Chemical Society Japan; **67** (1994) S. 2528-2531

Kamal, A., Khanna, G. B. R., Ramu, R.: *Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase-catalysed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles*; Tetrahedron: Asymmetry; **13** (2003) S. 2039-2051

Kanda, T.; Miyata, N.; Fukui, T.; Kawamoto, T.; Tanaka, A.: *Doubly entrapped baker's yeast survives during long-term stereoselective reduction of ethyl-3-oxobutanoate in an organic solvent*; Applied Microbiology Biotechnology; **14** (1998) S. 377-381

Kataoka, M., Nomura, Y., Shimizu, S., Yamada, H.: *Enzyme Involved in the NADPH Regeneration System Coupled with Asymmetric Reduction of Carbonyl Compounds in Microorganisms*; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry; **5** **56** (1992) S. 820-821

Kataoka, M., Yamamoto, K., Kawabata, H., Wada, M., Kita, K., Yanase, H., Shimizu, S.: *Stereoselective reduction of ethyl-4-chloro-3-oxobutanoate by Escherichia coli transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes*; Applied Microbiology Biotechnology; **5** (1999) S. 486-490

Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Shimizu, S.: *Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols*; Applied Microbiology and Biotechnology; **62** (2003) S. 437-445

Katz, M., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F.: *Screening of two complementary collections of Saccharomyces cerevisiae to identify enzymes involved in stereo-selective reductions of specific carbonyl compounds: an alternative to protein purification*; Enzyme and Microbial Technology; **33** (2003a) S. 163-172

Katz, M., Frejd, T., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F.: *Efficient Anaerobic Whole Cell Stereoselective Bioreduction With Recombinant Saccharomyces cerevisiae*; Biotechnology and Bioengineering; **84** (2003b) S. 573-582

Kawai, Y., Kondo, S., Tsujimoto, M., Nakamura, K., Ohno, A.: *Stereochemical control in Microbial Reduction. XXIII. Thermal Treatment of Bakers' Yeast for controlling the Stereoselectivity of Reductions*; Bulletin of the Chemical Society Japan; **67** (1994) S. 2244-2247

Kawai, S., Suzuki, S., Mori, S., Murata, K.: *Molecular cloning and identification of UTR1 of a yeast Saccharomyces cerevisiae as a gene encoding an NAD kinase*; FEMS Microbiology Letters; **200** (2001) S. 181-184

Kawamoto, T.; Kanda, T.; Tanaka, A.: *Preparation of an organic solvent-tolerant strain from baker's yeast*; Applied Microbiology Biotechnology; **55** (2001) S. 476-479

Kizaki, N., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Wada, M., Kataoka, M., Shimizu, S.: *Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by Escherichia coli transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes*; Applied Microbiology Biotechnology; **5** (2001) S. 590-595

Kondo, A., Liu, Y., Furuta, M., Fujita, Y., Matsumoto, T., Fukuda, H.: *Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol*; Enzyme and Microbial Technology; **27** (2000) S. 806-811

Laouar, L., Mulligan, B. J., Lowe, K. C.: *Yeast Permeabilization With Surfactants*; Biotechnology Letters; **14** (1992) S. 719-720

Laouar, L.; Lowe, K. C.; Mulligan, B. J.: *Yeast responses to nonionic surfactants*; Enzyme and Microbial Technology; **18** (1996) S. 733-438

León, R.; Fernandes, P.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S.: *Whole-cell biocatalysis in organic media*; Enzyme and Microbial Technology; **23** (1998) S. 483-500

León, R., Garbayo, I., Hernández, R., Vígara, J., Vilchez, C.: *Organic solvent toxicity in photoautotrophic unicellular microorganisms*; Enzyme and Microbial Technology; **29** (2001) S. 173-180

- Liese, A., Filho, M. V.: *Production of fine chemicals using biocatalysts*; Current Opinion in Biotechnology; **10** (1999) S. 595-603
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C.: *Industrial Biotransformations*; Wiley-VCH, Weinheim; (2000)
- Liu, Y., Hama, H., Fujita, Y., Kondo, A., Inoue, Y., Kimura, A., Fukuda, H.: *Production of S-Lactoylglutathione by High Activity Whole Cell Biocatalysts Prepared by Permeabilization of Recombinant Saccharomyces cerevisiae with Alcohols*; Biotechnology and Bioengineering; **64** (1999) S. 54-60
- Liu, Y., Fujita, Y., Kondo, A., Fukuda, H.: *Preparation of High-Activity Whole Cell Biocatalysts by Permeabilization of Recombinant Yeasts with Alcohol*; Journal of Bioscience and Bioengineering; **89** (2000) S. 54-558
- Lynen, F.: *Yeast fatty acid synthase*; Methods in Enzymology; **14** (1969) S. 17-33
- Matsuda, T., Harada, T., Nakajima, N., Nakamura K.: *Mechanism for improving stereoselectivity for asymmetric reduction using acetone powder of microorganism*; Tetrahedron Letters; **41** (2000) S. 4135-4138
- Mori, K.: *Synthesis of optically active pheromones*; Tetrahedron; **45** (1989) S. 3233-3298
- Nakamura, K., Higaki, M., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A.: *Stereochemical control of microbial reduction 2.) Reduction of beta-keto Esters by immobilized bakers' yeast*; Tetrahedron Letters; **26** (1985) S. 4213-4213
- Nakamura, K., Inoue, K., Ushi, K., Oka, S., Ohno, A.: *Effect of Allyl Alcohol on Reduction of β -Keto Esters by Bakers' Yeast*; Chemistry Letters; **9** (1987) S. 679-682
- Nakamura, K., Kawai, Y., Oka, S., Ohno, A.: *Stereochemical Control in Microbial Reduction. 8. Stereochemical Control in Microbial Reduction of β -Keto Esters*; Bulletin of the Chemical Society Japan; **62** (1989a) S. 875-879

Nakamura, K., Kawai, Y., Oka, S., Ohno, A.: *A new method for stereochemical control of microbial reduction. Reduction of beta-keto esters with bakers' yeast immobilized by magnesium alginate*; Tetrahedron Letters; **30** (1989b) S. 2245-2246

Nakamura, K., Kawai, Y., Nakajima, N. Ohno, A.: *Stereochemical Control of Microbial Reduction. 17. A Method for Controlling the Enantioselectivity of Reductions with Bakers' Yeast*; Journal of Organic Chemistry; **56** (1991) S. 4778-4783

Nakamura, K., Kondo, S., Ohno, A.: *Effect of Cyclodextrin on Improvement of Enantioselectivity in the Reduction of Ketopantolactone with Baker's Yeast*; Bioorganic & Medicinal Chemistry; **2** (1994) S. 433-437

Nakamura, K., Kitano, K., Matsuda, T., Ohno, A.: *Asymmetric Reduction of Ketones by the Acetone Powder of Geotrichum candidum*; Tetrahedron Letters; **37** (1996) S. 1629-1632

Nakamura, K., Matsuda, T.: *Asymmetric Reduction by the Acetone Powder of Geotrichum candidum*; Journal of Organic Chemistry; **63** (1998) S. 8957-8964

Nakamura, K., Fuji, M., Ida, Y.: *Asymmetric reduction of ketones by Geotrichum candidum in the presence of Amberlite XAD, a solid organic solvent*; Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1; (2000) S. 3205-3211

Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T.: *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts*; Tetrahedron: Asymmetry; **13** (2003) S. 2659-2681

Nikolova, P., Ward, O. P.: *Biotransformation of benzaldehyde to benzyl alcohol by whole cells and cell extracts of baker's yeast in two-phase systems*; Biocatalysis in Non-Conventional Media, ed. by J. Tramper et al.; (1992) S. 776-673

North, M.: *Baker's Yeast Reduction of β -Keto Esters in Petrol*; Tetrahedron Letters; **37** (1996) S. 1699-1702

Ogawa, J., Shimizu, S.: *Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods*; Trends in Biotechnology; **17** (1999) S. 13-20

Oguni, N., Ohkawa, Y.: *Complete stereoselective synthesis of chiral intermediates for thienamycin and related antibiotics*; Journal of the Chemical Society, Chemical Communications; **23** (1988) S. 1376-1377

Patel, R. N., McNamee, C. G., Banerjee, A., Howell, J. M., Robinson, R. S., Szarka, L.: *Stereoselective reduction of β -keto esters by *Geotrichum candidum**; Journal of Enzyme and Microbial Biotechnology; **14** (1992) S. 731-738

Pavlov, V. A., Starodubtseva, E. V., Vinogradov, M. G., Ferapontov, V. A., Malyshev, O. R., Heise, G. L.: *Enantioselective hydrogenation of β -keto esters catalyzed by chiral binaphthylbisphosphine ruthenium complexes*; Russian Chemical Bulletin; **49** (2000) S. 725-728

Pereira, R. S.: *The Use of Baker's Yeast in the Generation of Asymmetric Centers to Produce Chiral Drugs and Other Compounds*; Critical Reviews in Biotechnology; **18** (1998) S. 25-64

Rasor, J. P., Voss, E.: *Enzyme-catalysed processes in pharmaceutical industry*; Applied Catalysis A: General; **221** (2001) S. 145-158

Raj, A. E., Kumar, H. S. S., Kumar, S. U., Misra, M. C., Ghildyal, N. P., Karanth, N. G.: *High-Cell-Density Fermentation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Using Glycerol*; Biotechnology Progress; **18** (2002) S. 1130-1132

Rodríguez, S., Kayser, M., Steward, J. D.: *Improving the Stereoselectivity of Bakers' Yeast Reductions by Genetic Engineering*; Organic Letters; **1** (1999) S. 1153-1155

Rodríguez, S., Kayser, M. M., Steward, J. D.: *Highly Stereoselective Reagents for β -Keto Ester Reductions by Genetic Engineering of Baker's Yeast*; Journal of the American Chemical Society; **123** (2001) S. 1547-1556

Rotthaus, O., Krüger, D., Demuth, M. Schaffner, K.: *Reductions of Keto Esters with Baker's Yeast in Organic Solvents - A Comparison with the Results in Water*; Tetrahedron; **53** (1997) S. 935-938

Roughan, P. G.: *Stromal concentration of coenzyme A and its esters are insufficient to account for rates of chloroplast fatty acid synthesis: evidence for substrate channelling within the chloroplast fatty acid synthase*; Biochemical Journal; **327** (1997) S. 267-273

Rozell, J. D.: *Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities*; Bioorganic & Medicinal Chemistry; **7** (1999) S. 2253-2261

Salter, G. J.; Kell, D. B.: *Solvent Selection for Whole Cell Biotransformations in Organic Media*; Critical Reviews in Biotechnology; **15** (1995) S. 139-177

Sekhar, B. N., Bhat, S. G.: *Preparation of detergent permeabilized baker's yeast whole cell catalase*; Process Biochemistry; **34** (1999) S. 349-354

Shieh, W.-R., Gopalan, A. S., Sih, C. J.: *Stereochemical Control of Yeast Reductions. 5. Characterization of the Oxidoreductases Involved in the Reduction of β -Keto Esters*; Journal of the American Chemical Society; **107** (1985) S. 2993-2994

Shimizu, S., Kataoka, M., Kita, K.: *Stereoselective Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-Oxobutanoate by a Microbial Aldehyde Reductase in an Organic Solvent-Water Biphasic System*; Applied and Environmental Microbiology; **56** (1990) S. 2374-2377

Shimizu, S., Kataoka, M., Katoh, M., Morikawa, T., Miyoshi, T., Yamada, H.: *Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases*; Journal of Molecular Catalysis B; **5** (1998) S. 321-325

Spiliotis, V., Papahatjis, D., Ragoussis, N.: *Enhanced Optical Purity of 3-Hydroxyesters Obtained by Baker's Yeast Reduction of 3-Ketoesters*; Tetrahedron Letters; **31** (1990) S. 1615-1616

Srebnik, M., Ramachandran, P. V., Brown, H. C.: *Chiral Synthesis via Organoboranes: 18. Selective Reductions. 43. Diisopinocampheylchloroborane as an Excellent Chiral Reducing Reagent for the Synthesis of Halo Alcohols of High Enantiomeric Purity. A Highly Enantioselective Synthesis of Both Optical Isomers of Tomoxetine, Fluoxetine and Nisoxetine*; Journal of Organic Chemistry; **53** (1988) S. 2916-2920

Steward J. D.: *Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems*; Current Opinion in Biotechnology; **11** (2000) S. 363-358

Stinson, S. C.: *Chiral Drugs*; Chemical Engineering News; **78** (2000) S. 55

Sybesma, W. F. H., Straathof, A. J. J., Jongejan, J. A.: *Reductions of 3-oxo esters by Baker's Yeast: Current Status*; Biocatalysis and Biotransformation; **1** (1998) S. 95-134

Thomas, K. C., Hynes, S. H., Ingeldew, W. M.: *Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in Saccharomyces cerevisiae during fermentation of high concentration of carbohydrates*; Biotechnology Letters; **18** (1996) S. 1165-1168

Ushio, K., Hada, J., Tanaka, Y., Ebara, K.: *Allyl bromide, a powerful inhibitor against R-enzyme activities in Bakers' yeast reduction of ethyl 3-oxoalkanoates*; Enzyme and Microbial Technology; **15** (1993) S. 222-228

van Dijken, J. P., Bauer, H., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J. M., Gancedo, M. L.: *An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four Saccharomyces cerevisiae strains*; Enzyme and Microbial Technology; **26** (2000) S. 706-714

van Hoek, P., Hulster, E., van Dijken, J. P., Pronk, T.: *Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast*; Biotechnology and Bioengineering; **68** (2000) S. 517-523

Walker, G. M.: *Yeast Physiology and Biotechnology*; Wiley New York 1999

Wanner, P.: *Enantioselective Biotransformationen mit Hefe (Saccharomyces cerevisiae) und Charakterisierung beteiligter Enzyme*; (1996) Dissertation TU Berlin

Wenz, P., Schwank, S., Hoja, U. Schüller, H. J.: *A downstream regulatory element located within the coding sequence mediates autoregulated expression of the yeast fatty acid synthase gene FAS2 by the FAS1 gene product*; Nucleic Acid Research; **29** (2001) S. 4625-4632

Weuster-Botz, D.: *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*; Schriftenreihe des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences; Band 2 (1999)

Weuster-Botz, D.: *Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search?*; Journal of Bioscience and Bioengineering; **90** (2002) S. 473-483

Wich, G., Pfaller, R., Reutter-Maier; (2001); persönliche Mitteilung

Yadav, J. S., Nanda, S., Reddy, T., Rao, A. B.: *Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root*; Journal of Organic Chemistry; **67** (2002) S. 3900-3903

Yamamoto, H., Kimoto, N., Matsuyama, A., Kabayashi, Y.: *Purification and Properties of a Carbonyl Reductase Useful for Production of Ethyl (S)-4-Chloro-hydroxybutanoate from *Kluyveromyces lactis**; Bioscience, Biotechnology and Bioengineering; **66** (2002) S. 1775-1778

Yamamoto, H., Matsuyama, A., Kobayashi, Y.: *Synthesis of ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *fabG*-homologes*; Applied Microbiology and Biotechnology; **61** (2003) S. 133-139

Zaks, A.: *Industrial Biocatalysis*; Current Opinion in Chemical Biology; **5** (2001) S. 130-136

Zhou, B., Gopalan, A. S., VanMiddlesworth, F., Shieh, W.-R., Sih, C. J.: *Stereochemical Control of Yeast Reductions. I. Asymmetric Synthesis of L-Carnitin*; Journal of the American Chemical Society; **105** (1983) S. 5925-5926

Zhou, G., Kresta, S. M.: *Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank*; Chemical Engineering Science; **53** (1998) S. 2063-2079

10.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
a	Spezifische Phasengrenzfläche	m ⁻¹
a, b, c	Anpassungsparameter	
A	Fläche	m ²
A	Ausbeute	%
BSA	Bovines Serum Albumin	
BTM	Biotrockenmasse	g
CPR	Kohlendioxidbildungsrate	mol L ⁻¹ h ⁻¹
c ₁ -c ₃	Konstanten	
c _x	Konzentration der Biomasse	g L ⁻¹
C	Konzentration	mol L ⁻¹
CR	Carbonylreduktase	
d _i	Tropfendurchmesser	m
d ₃₂	Sauterdurchmesser	m
d _{max}	größter stabiler Durchmesser	m
d	Rührerdurchmesser	m
EA	Enzymaktivität	U
EE	Enantiomerenüberschuss	%
F	Korrekturfaktor bei der Bestimmung der Grenzflächenspannung	
F _{ein}	Zulaufstrom beim Zulaufreaktor	g L ⁻¹ h ⁻¹
Fr	Froude-Zahl $Fr = n^2 d/g$	
g	Erdbeschleunigung	9,81 m s ⁻²
GDH	Glukosedehydrogenase	
H	Hefeextrakt (in Beschreibung für Medienzusammensetzung)	
k	Verteilungskoeffizient organisch-wässrige Phase	
k	Korrekturfaktor für Viskositätsbestimmung	
k _i	Konstante der Enzyminaktivierung	h ⁻¹
K _{cat}		s ⁻¹
K _m	Monod-Konstante	mmol L ⁻¹
LogP	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im Octanol-Wasser System	

m	Gewicht	g
m_s	Erhaltungsstoffwechsel der Zellen	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
M	Mineralmedium (in Beschreibung für Medienzusammensetzung)	
n_i	Anzahl	
n	Stoffmenge	mol
n	Rührerdrehzahl	s^{-1}
nb	Nicht bekannt (Daten standen nicht zu Verfügung)	
Ne	Newton-Zahl $Ne = P/n^3 d^5 \rho$	
OUR	Sauerstoffaufnahme	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
P	Leistungseintrag	$\text{kg m}^2 \text{s}^{-3}$
P	Pepton (in Beschreibung für Medienzusammensetzung)	
PBK	Produktbildungskapazität	mmol g^{-1}
q	Gasdurchsatz	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
q_p	Spezifische Produktbildungsrate	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_s	Spezifische Substrataufnahmerate	$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
Q	Gasdurchsatzkennzahl $Q = q/nd^3$	
$Q_x(d)$	Verteilungssumme	
$q_x(d_i)$	Verteilungsdichte	
RQ	Respiratorischer Quotient	
Re	Reynoldszahl $= nd^2/\mu$	
RZA	Raumzeitausbeute	$\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
S	Selektivität	%
t	Zeit	h
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	h
t_D	Verdoppelungszeit	h
U	Umsatz	%
V	Volumen	m^3
V_i	Viskositätszahl $Vi = \mu_d/(\rho_d \sigma)^{0,5}$	
VE-Wasser	Voll-entsalztes Wasser	
vvm	Auf das Reaktorvolumen bezogene Begasungsrate	$\text{L L}^{-1} \text{min}^{-1}$
We	Weber-Zahl $We = n^2 D^3 \rho_d / \sigma$	
$Y_{X/S}$	Ertragskoeffizient	$\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Substrat}}$

Griechische Symbole

α	Phasenverhältnis organische/wässrige Phase	
ε	Molarer Extinktionskoeffizient	$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
η	Kinematische Viskosität	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$

φ_V	Volumenanteil dispersen Phase	
μ	Wachstumsrate	h^{-1}
μ_c, μ_d	Dynamische Viskosität der kontinuierlichen/dispersen Phase	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
ρ	Dichte	kg m^{-3}
σ	Grenzflächenspannung	N m^{-1}
σ^*	Scheinbare Grenzflächenspannung (Wert des Tensidometers)	N m^{-1}

Indizes

BTM	Biotrockenmasse
c	Kontinuierliche Phase
d	Disperse Phase
in	Im Zulauf in den Reaktor
P	Produkt
out	Im Abgas vom Reaktor
R	Reaktionsvolumen
S	Substrat
spez	spezifisch
vol	Auf das Volumen bezogen (volumetrisch)
X	Biomasse

10.3 Substrate und Produkte

Tabelle 10.3.1: Ausgewählte physikalische Eigenschaften der untersuchten Ketoester und der korrespondierenden Alkohole; nb: nicht bekannt; die Daten sind den Sicherheitsdatenblättern entnommen;

Substrate	4CI-ACE	EBA
Summenformel	$\text{C}_6\text{H}_9\text{ClO}_3$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$
CAS-Nr.	638-07-3	94-02-0
Name	Ethyl-4-Chloracetoacetat; 4-Chlor-Acetessigsäureethylester; Ethyl- 4-Chloro-oxobutanoate;	Ethylbenzoylacetat; Benzoylessigsäureethylester; Ethyl 3-oxo-3-phenylpropanoate
Reinheit der eingesetzten Stoffe	> 98 % (Merck/VWR)	> 93 % (Merck/VWR)
Molmasse	$164,59 \text{ g mol}^{-1}$	$192,22 \text{ g mol}^{-1}$
pH-Wert	2,8 (10 g L^{-1} in H_2O)	nb
dynamische Viskosität η	4,72 mPa s	8,07 mPa s
kinematische Viskosität ν	$3,90 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}$	$7,26 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}$
Siedepunkt	220 °C	265 - 270 °C (Zersetzung)

Zündtemperatur	320 °C	375 °C
Flammpunkt	106 °C	140 °C
Dampfdruck (20 °C)	0,1 hPa	nb
Dichte	1,21 g mL ⁻¹	1,117 g mL ⁻¹
Löslichkeit in Wasser	47,0 g L ⁻¹	2,6 g L ⁻¹
Löslichkeit in Ethanol	nb	löslich
Löslichkeit in org. Lösungsmitteln	löslich	löslich
LogP	0,05	1,9

Produkte	R/S-CHBE	R/S-HPPE
Summenformel	C ₆ H ₁₀ ClO ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
CAS-Nr.	86728-85-0 (S) 90866-33-4 (R)	33401-74-0 (S) 72656-47-4 (R)
Name	(S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester; (-)-Ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate; Ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate	(S)-3-Hydroxy-3-Phenylpropionsäureethylester; (+)-Ethyl (S)-3-hydroxy-3-phenylpropanoate;
Reinheit	> 97 % (Sigma-Aldrich)	> 99 % (Fluka)
Molmasse	166,6	194,2
Dichte	1,187 g mL ⁻¹	1,119 g mL ⁻¹
Löslichkeit in Wasser	125 g L ⁻¹	12,4 g L ⁻¹
Löslichkeit in Ethanol	nb	nb
Löslichkeit in org. Lösungsmitteln	Löslich	Löslich
LogP	nb	nb

10.3.1 Physikalische Eigenschaften der verwendeten organischen Lösungsmittel und Alkohole

In Tabelle 10.3.2 sind die physikalischen Eigenschaften der untersuchten Alkohole und organische Lösungsmittel zusammengefasst.

Tabelle 10.3.2: Physikalische Daten der untersuchten Lösungsmittel; die Daten sind den Sicherheitsdatenblättern (Merck/VWR) entnommen

Lösungsmittel	LogP	Löslichkeit in Wasser	
		g L ⁻¹	% [v/v]
Benzol	2,7	1,8	0,2
n-Decan	6,0	Unlöslich	Unlöslich
Ethanol	-0,32	Löslich	Löslich
Ethylacetat	0,73	85,3	9,5
n-Hexan	4,1	0,01	0,002
2-Hexanol	2,0	5,9	0,7
Methanol	-0,74	Löslich	Löslich
MTBE	1,06	26	3,4
n-Butylacetat	1,8	Unlöslich	Unlöslich
1-Octanol	2,8	0,3	0,04
Petrolether	1,1	0,01	0,002
2-Propanol	0,05	Löslich	Löslich
Toluol	2,7	0,5	0,06
Xylol	3,1	0,2	0,02

10.3.2 Tenside

Die Eigenschaften von Tensiden werden hauptsächlich durch zwei Größen charakterisiert, die kritische Micellenkonzentration (CMC) und den HLB-Wert. Der CMC-Wert gibt die Konzentration an, ab der das eingesetzte Tensid Micellen bildet. Der HLB-Wert (Hydrophilic Lipophilic Balance) charakterisiert das Verhältnis des lipophilen und des hydrophilen Molekülanteils. Er wurde für nichtionische Tenside eingeführt und kann Werte zwischen 0 und 20 annehmen. Bei einem HLB-Wert über 10 spricht man von wasserlöslichen Emulgatoren, die Öl-in-Wasser-Emulsionen ausbilden. Bei einem HLB-Wert unter 10 handelt es sich um sogenannte öllösliche Emulgatoren, die Wasser-in-Öl Emulsionen ausbilden.

Tabelle 10.3.3: Physikalische Eigenschaften der eingesetzten nichtionischen Tenside; Die Daten wurden zusammengestellt aus den Datenblättern von Uniquema; Airproducts; Merck/VWR; Sigma-Aldrich;

Trivialname	Name	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]	CMC [%]	HLB [mmol L ⁻¹]
Brij 30	Polyoxyethylene (4) lauryl ether	320		9,8
Brij 35	Polyoxyethylene (23) lauryl ether	900	0,006	16,9
Brij 52	Polyoxyethylene (2) cetyl ether	300		5,2
Brij 56	Polyoxyethylene (10) cetyl ether	682	0,0001	12,9
Brij 58	Polyoxyethylene (20) cetyl ether	1122	0,0005	15,7
Myrj 45	Polyoxyethylene (8) stearate	nb		11,1
Myrj 52	Polyoxyethylene (20) stearate	1700		16,9
Myrj 59	Polyoxyethylene (100) stearate	4500		18,9
Pluronic F68	Polyethylenglycol-polypropylenglycol-Copolymer	6350	0,034	29
Pluronic L64	Polypropylenglycol:Polyethylenglycol 6:4	3000		15,0
Span 20	Sorbitan-monodecanoat	375		8,5
Span 40	Sorbitan-monopalmitat	430		6,7
Span 60	Sorbitan-monostearat	460		5,7
Span 80	(Z)-Sorbitan-mono-9-octadecanoate	460		4,3
Span 85	(Z,Z,Z)-Sorbitan-tri-9-octadecanoate	1010		1,8
Sucrose Palmitat-Stearat 15	nb	nb		nb
Surfynol 104	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyne-4,7-diol	226,2		nb
Surfynol 61	3,5-Dimethyl-1-Hexyn-3-ol	126,4		nb
Triton WR 1339	Tyloxapol	Nb		nb
Triton X-405	nb	nb		nb
Triton X-100	PEG (9-10)p-t-octylphenol	628	0,019	13,5
Tween 60	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate	1300		14,9
Tween 61	Polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate	600		9,6
Tween 65	Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate	1000		10,5
Tween 80	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate	1310	0,0016	15,0
Tween 85	Polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate	1300		11,0

10.3.3 Sonstige Chemikalien

Tabelle 10.3.4: Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Gehalt [%] lt. Hersteller	Qualität	Bezugsquelle
Aceton	> 99	z. S.	Roth
Acetophenon	≥ 98	z. S.	Merck/VWR
Adenin	≥ 99		Biochemika
Agar-Agar			Roth
Allylalkohol		z. S.	Merck/VWR
p-Aminobenzoesäure	≥ 99	z. S.	Merck
Ammoniak	≥ 25	reinst	Roth
Benzol		z. S.	Merck/VWR
BSA (Bovines Serum Albumin)			Sigma-Aldrich
Butanol	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
n-Butylacetat	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
D-(+)-Biotin	98,5-100,5		Merck/VWR
Calciumchlorid-Dihydrat	99,5-103,3	p. A.	Merck/VWR
4Cl-Acetessigsäureethylester	≥ 98	z. S.	Merck/VWR
4Cl-Acetophenon	≥ 98	z. S.	Merck/VWR
1-Buten-3-ol	> 95	z. S.	Merck/VWR
Calcium-D(+)-pantothenat	98-101	z. S.	Roth
Citronensäure-Monohydrat	≥ 99,5	z. S.	Roth
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	99,0-102	p. A.	Merck/VWR
Corn Steep Liquor			Sigma-Aldrich
2-Cyclohexen-1-ol		z. S.	Merck/VWR
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
n-Decan	> 99	z. S.	Merck/VWR
Diethylether	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
Essigsäure	≥ 99,8	p. A.	Merck/VWR
Ethanol	≥ 99,8	p. A.	Neolab-Migge
Ethylacetat	≥ 99,8	p. A.	Neolab-Migge
Ethylbenzoylacetat	93	z. S.	Merck/VWR
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	≥ 99		Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose-Monohydrat		biochem. Zwecke	Merck/VWR
Glycerin	87	reinst	Merck/VWR
Harnstoff	≥ 99,5	p. A.	Roth
Hefeextrakt		Für die Mikrobiologie	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	98-100,5	reinst	Merck/VWR

Di-Kaliumhydrogenphosphat	≥ 99	reinst	Merck/VWR
n-Hexan	96	z. S.	Merck/VWR
1-Hexanol	> 98	s. S.	Merck/VWR
Kaliumbromid			Merck/VWR
Kaliumchlorid	> 99,5		Merck/VWR
Di-Kaliumhydrogenphosphat	98-100,5		Roth
Kaliumsulfat	≥ 99	p. A.	Merck/VWR
S-(+)-Lysinhydrochlorid	≥ 99	p. S.	Merck/VWR
Magnesiumchlorid	> 98		Merck/VWR
Magnesiumsulfat	≥ 98	p. A.	Merck/VWR
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	99-101,0	p. A.	Merck/VWR
Myoinositol			Calbiochem
Methanol	≥ 99,5		Merck/VWR
Methylacrylat	≥ 99		Merck/VWR
Methylvinylketon			Merck/VWR
MTBE	≥ 99,5		Merck/VWR
Natriumchlorid	≥ 99		Merck/VWR
Natrium-Dihydrogenphosphat	≥ 99	z. S.	Merck/VWR
Natriummolybdat-Dihydrat	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
Natriumsulfat	≥ 99	z. S.	Merck/VWR
NAD	97		Sigma-Aldrich
NADP	≥ 95		Calbiochem
NADPH	≥ 97		Calbiochem
Nikotinsäure			Sigma-Aldrich
Octanol		z. S.	Merck/VWR
Ortho-Phosphorsäure	85-88	reinst	Merck/VWR
Pepton aus Casein			Roth
2-Propanol	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR
2-Propin-1-ol	≥ 99	z. S.	Merck/VWR
Pyridoxol Hydrochlorid	99,7		Calbiochem
Petrolether (Siedepunkt 50 – 70 °C)		p. A.	Merck/VWR
D(+)-Saccharose	≥ 99,5	p. A.	Roth
Schwefelsäure	95-97	p. A.	Merck/VWR
Struktol J673			Schill & Seilacher
Thiamin-Hydrochlorid			Sigma-Aldrich
Tenside (Tabelle 10.3.3)			Serva
Triton X-100		reinst	Roth
Toluol		z. S.	Merck/VWR
S-(-)-Tryptophan	≥ 99	z. S.	Merck/VWR
Xylol		z. S.	Merck/VWR
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids			Difco

Yeast Nitrogen Base Dehydrated			Difco
Zinksulfat-Heptahydrat	≥ 99,5	p. A.	Merck/VWR

10.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der Ganzzellbiotransformation von β -Ketoestern mit <i>S. cerevisiae</i>	8
Abbildung 3.1.2: Generierung von NADPH über den Hexosemonophosphatweg (Pentosephosphatweg) in <i>S. cerevisiae</i>	10
Abbildung 3.2.1: Struktur von Atorvastatin	11
Abbildung 3.2.2: Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4Cl-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE)	12
Abbildung 3.2.3: Hydrolyse von 4Cl-ACE in <i>S. cerevisiae</i>	16
Abbildung 3.2.4: Reduktive Dehalogenierung von 4Cl-ACE in <i>S. cerevisiae</i>	17
Abbildung 3.3.1: Struktur von Fluoxetin (R = 4-CF ₃), Tomoxetin (R = 2-CH ₃) und Nisoxetin (R = 2-OCH ₃).....	18
Abbildung 3.3.2: Racematspaltung mit einer Lipase aus <i>P. cepacia</i> zur Herstellung chiraler Intermediate für die Fluoxetin-Synthese	18
Abbildung 3.3.3: Reduktion von Ethylbenzoylacetat (EBA) zu (S)-3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)	19
Abbildung 3.4.1: Eingesetzte rekombinante Biokatalysatoren	22
Abbildung 3.9.1: Abbauwege von Pyruvat in <i>S. cerevisiae</i>	27
Abbildung 3.10.1: Wachstumskurve in einer Satzkultur	28
Abbildung 4.6.1: Aufbau des Bioreaktors zur Anzucht von Zellen im 5 L-Maßstab	46
Abbildung 4.7.1: Mikrotiterplattenschüttler mit Deepwell Mikrotiterplatte für parallel durchgeführte Parameterstudien mit 0,5 mL Reaktionsvolumen; Thermomixer zur Bestimmung der Gesamtaktivität	49
Abbildung 4.7.2: Inkubationsschrank mit Kühl- und Heizfunktion und Mikrodosiersystem DASGIP FedBatch Pro	51
Abbildung 4.8.1: Versuchsanordnung bei Optimierungsversuchen in pH-kontrollierten 20 mL Ansätzen	53
Abbildung 4.12.1: Funktionsweise der 3D-ORM Sonde zur Tropfengrößenbestimmung	60
Abbildung 4.12.2: Rührkesselreaktor KLF 2000 mit eingesetzter 3D-ORM Sonde zur Bestimmung der Tropfengrößenverteilung und für Versuche zur Maßstabsvergrößerung	61
Abbildung 4.13.1: Beziehung zwischen OD ₆₀₀ und Biotrockenmasse (in g L ⁻¹) für <i>S. cerevisiae</i> aus vier unabhängigen Experimenten	62
Abbildung 5.1.1: Einfluss der Konzentration von Maisquellwasser (CSL) bei Schüttelkolbenansätzen auf die Produktbildungskapazität PBK und den Enantiomerenüberschuss EE mit 10 g L ⁻¹ Glukose	69

Abbildung 5.1.2: Ergebnis der Medienoptimierung: Einfluss unterschiedlicher Anzuchtbedingungen auf die OD_{600} und den Enantiomerenüberschuss in Biotransformationsexperimenten im 0,5 mL Maßstab	72
Abbildung 5.1.3: Verlauf der Zellanzucht im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit $MH_{20}P_{20}T$ Medium im 5 Liter Maßstab	76
Abbildung 5.2.1: Verlauf der S-CHBE-Konzentration und des Enantiomerenüberschusses in Satzversuchen mit frischen Zellen ($28 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, schwarz) und 5 Wochen alten Zellen ($60 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$, grau); gestrichelte Linien: Enantiomerenüberschuss	80
Abbildung 5.2.2: Inaktivierungskinetiken des Biokatalysators nach unterschiedlicher Lagerungsdauer bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$; zum Vergleich sind Wildtypzellen dargestellt	80
Abbildung 5.2.3: pH-Einfluss auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Zweiphasensystemen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat	82
Abbildung 5.2.4: Einfluss der Anfangskonzentration von 4Cl-ACE auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss gerührten 20 mL-Ansätzen	83
Abbildung 5.2.5: Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in gerührten Ansätzen	84
Abbildung 5.2.6: Verlauf der S-CHBE-Konzentration in Abhängigkeit von der 4Cl-ACE-Konzentration in zwei unabhängigen Experimenten im 0,5 mL-Maßstab	86
Abbildung 5.2.7: Einfluss von NAD und NADP auf die S-CHBE-Konzentration	87
Abbildung 5.2.8: Einfluss der Glukose-Konzentration ($0,2$ bis $2,0 \text{ mol L}^{-1}$) und Natriumchloridkonzentration ($0,0$ bis $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) auf die Umsetzung von 4Cl-ACE	89
Abbildung 5.2.10: Einfluss nichtionischer Tenside (1 %) auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen	90
Abbildung 5.2.11: Einfluss von Triton X-100 auf die Umsetzung von 4Cl-ACE in Experimenten mit 0,5 mL Reaktionsvolumen	91
Abbildung 5.2.12: Einfluss von 0,5 % v/v Triton X-100 und 7,5 % v/v n-Butylacetat auf die S-CHBE-Konzentration mit permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen in gerührten Ansätzen	92
Abbildung 5.2.13: Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren auf den Enantiomerenüberschuss in Zweiphasensystemen mit n-Butylacetat abhängig von der 4Cl-ACE-Konzentration	93
Abbildung 5.2.14: Einfluss der Vorinkubationsdauer bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in 1 mL Ansätzen	96
Abbildung 5.3.1: Änderung des Enantiomerenüberschusses und der S-CHBE Ausbeute bezogen auf den Referenzansatz	103
Abbildung 5.3.2: Verteilung der Konzentrationsniveaus der untersuchten Medienkomponenten in der „Box-Plot“ Darstellung	104
Abbildung 5.3.3: Verlauf der S-CHBE-Konzentration im Ansatz mit optimiertem Reaktionsmedium und im Standardmedium	109
Abbildung 5.4.1: Verlauf der S-CHBE-Konzentration (bezogen auf den Gesamtansatz) im Rührkesselreaktor (Dreifachbestimmung) und im 150 mL Referenzansatz (Einfachbestimmung)	112
Abbildung 5.4.2: Verlauf der Aktivitäten der Carbonylreduktase CR und der Glukosedehydrogenase GDH im Rührkesselreaktor	113

Abbildung 5.4.3: Inaktivierungskinetiken nach einer Reaktion 1. Ordnung.....	114
Abbildung 5.4.4 Herstellung von S-CHBE im Rührkesselreaktor bei vollständigem Umsatz	116
Abbildung 5.4.5: GC-Chromatogramme der Umsetzung von 4Cl-ACE im Rührkesselreaktor; Nebenproduktpeaks sind Verunreinigungen im Substrat	117
Abbildung 5.5.1: Einfluss von n-Butylacetat auf den Verlauf der Enzymaktivitäten im Zellpellet und katalytischen Gesamtaktivität	121
Abbildung 5.5.2: Relative Änderung der Proteinkonzentration, Enzymaktivitäten und der katalytischen Gesamtaktivität in Ein- und Zweiphasensystemen mit 10 % v/v n-Butylacetat mit komplexen Medienkomponenten nach 20 h Inkubationszeit.....	122
Abbildung 5.5.3: Einfluss von Triton X-100 (5 % v/v) und n-Butylacetat (10 %v/v) auf die intrazelluläre Proteinkonzentration, Enzymaktivitäten und die katalytische Gesamtaktivität (S- CHBE-Konzentration) nach 20 h Inkubationsdauer.....	124
Abbildung 5.6.1:Tropfengrößenverteilung in einem Zweiphasensystem mit n-Butylacetat/12,4 % v/v 4Cl-ACE bei einem Phasenverhältnis von $\alpha = 0,5$	131
Abbildung 5.6.2: Sauterdurchmesser d_{32} für Systeme mit reinem n-Butylacetat und n-Butylacetat/4Cl-ACE in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl; dargestellt sind Messergebnisse und aus den Modellvorstellungen berechneten Sauterdurchmesser	132
Abbildung 6.1.1: S-HPPE-Konzentration in Abhängigkeit von der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration und der Reaktionsdauer in gerührten 20 mL-Ansätzen ohne pH- Regelung unter Standardbedingungen.....	134
Abbildung 6.1.2: Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel und Alkohole auf die Umsetzung von EBA in gerührten 20 mL-Ansätzen	136
Abbildung 6.2.1: Reaktionsverlauf der Umsetzung von Ethylbenzoylacetat zu S-HPPE.....	138
Abbildung 6.2.2: GC-Chromatogramme der Umsetzung von EBA im Rührkesselreaktor	139
Abbildung 7.1.1: Einfluss der 4Cl-ACE-Konzentrationen auf die Produktkonzentration und den Enantiomerenüberschuss nach 4 h Reaktionsdauer in 0,5 mL-Ansätzen bei unvollständiger Umsetzung	142
Abbildung 7.1.2: Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die S-CHBE-Konzentration und Enantiomerenüberschuss	142
Abbildung 7.1.3: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in gerührten Ansätzen mit <i>P. pastoris</i>	143
Abbildung 7.1.4: Einfluss unterschiedlicher NAD und NADP-Konzentrationen auf die S-CHBE- Konzentration und den Enantiomerenüberschuss Experimenten im 0,5 mL Maßstab	144
Abbildung 7.1.5: Einfluss der 4Cl-ACE-Konzentration auf die S-CHBE-Konzentration und den Enantiomerenüberschuss in 1 mL Kleinansätzen.....	145
Abbildung 7.1.6: Einfluss der Kaliumphosphatpuffer-Konzentration auf die Umsetzung von 4Cl-ACE mit <i>P. pastoris</i>	146
Abbildung 7.1.7: Einfluss verschiedener Reaktionsmedien auf die S-CHBE-Konzentration bei der Reduktion von 4Cl-ACE mit <i>P. pastoris</i> in pH-geregelten Ansätzen	147
Abbildung 7.1.8: Konzentrationsverlauf von 4Cl-ACE, S-CHBE und R-CHBE im doppelten Zulaufverfahren <i>P. pastoris</i>	148

Abbildung 8.1.1: Ergebnisse der stereoselektiven Reduktion von 4Cl-ACE und EBA mit Wildtyp und rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> und rekombinanten <i>P. pastoris</i>	151
--	-----

10.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.1: Chirale Pharmaka und Nebenwirkung des unerwünschten Enantiomers.....	1
Tabelle 3.1.1: Beispiele für β -Ketoester, die von <i>S. cerevisiae</i> reduziert werden	6
Tabelle 3.1.2: Beispiele für aromatische Ketone, die von <i>S. cerevisiae</i> reduziert werden (.....	7
Tabelle 3.1.3: Beispiele für Hydroxyketone, die von <i>S. cerevisiae</i> reduziert werden	7
Tabelle 3.1.4: Chirale Intermediate für pharmazeutische Produkte und Pheromone, die durch Ganzzellbiotransformation aus Ketonen mit <i>S. cerevisiae</i> gewonnen werden können (Auswahl)	8
Tabelle 3.1.5: Eigenschaften bekannter β -Ketoester-Reduktasen aus <i>S. cerevisiae</i> , die 4Cl-ACE umsetzen können	9
Tabelle 3.2.1: Organismen, die 4Cl-ACE zu S-CHBE reduzieren können (Auswahl).....	12
Tabelle 3.2.2: Organismen, die 4Cl-ACE zu R-CHBE reduzieren können (Auswahl)	12
Tabelle 3.3.1: Organismen, die EBA zu S-HPPE reduzieren können.....	19
Tabelle 3.3.2: Einfluss der Substratstruktur auf die Umsetzung mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in Petrolether	20
Tabelle 3.4.1: Kinetische Daten der eingesetzten Carbonylreduktasen	21
Tabelle 3.4.2: Substrate der Fettsäuresynthese (Auswahl)	21
Tabelle 3.5.1: Vor- und Nachteile zweiphasiger Bioprozesse.....	22
Tabelle 3.5.2: Ganzzellbiotransformationen mit <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i> in Zweiphasensystemen	23
Tabelle 3.8.1: Industriell eingesetzte enantioselektive Reduktionen von Ketoestern	26
Tabelle 4.12.1: Verwendete Kapillaren und Korrekturfaktoren zur Viskositätsmessung	61
Tabelle 4.12.2: Experimentell bestimmte Stoffdaten der untersuchten Zweiphasensysteme bei Umgebungsdruck, T = 25 °C	61
Tabelle 5.1.1: Eingesetzte Komplexmedien in Schüttelkolbenkulturen von <i>S. cerevisiae</i> und die erreichte OD ₆₀₀ als Maß für die Biotrockenmasse	75
Tabelle 5.1.2: Einfluss der Medienzusammensetzung auf die OD ₆₀₀ , den Enantiomerenüberschuss und die Produktbildungskapazität in Schüttelkolbenkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	76
Tabelle 5.1.3: Ergebnisse aus Versuchen im Rührkesselreaktor im Zulaufverfahren mit unterschiedlichen Medien	80
Tabelle 5.2.1: Einfluss der Lagerungsdauer der Biokatalysatoren bei -20 °C auf die Umsetzung unter Standardbedingungen mit 7,5 % v/v n-Butylacetat und 170 mmol L ⁻¹ 4Cl-ACE	82
Tabelle 5.3.1: Variablen mit Einfluss auf die Umsetzung von 4Cl-ACE mit <i>S. cerevisiae</i>	104

Tabelle 5.3.2: Variablenraum für die Optimierung, die Zusammensetzung des Referenzmediums und die Zusammensetzung des optimierten Mediums	105
Tabelle 5.3.3: Einfluss von Zellalter und Reaktionsmedium auf die Umsetzung anhand beispielhaft ausgewählter Biotransformationen	108
Tabelle 5.3.4: Einfluss von 1-Buten-3-ol auf den Enantiomerenüberschuss in Ansätzen mit optimiertem Reaktionsmedium	110
Tabelle 5.3.5: Einfluss des optimierten Mediums auf ausgewählte Größen in Umsetzungsversuchen	111
Tabelle 5.4.1: Optimiertes Reaktionsmedium und Reaktionsmedium für den Rührkesselreaktor-Versuch	118
Tabelle 5.4.2: Ergebnisse der Umsetzung von 4Cl-ACE im Rührkesselreaktor	118
Tabelle 5.5.1: Biokatalysatorstabilität in Ein- und Zweiphasensystemen nach 24 h Inkubationszeit in Standardpuffer ohne Substrat	123
Tabelle 5.5.2: Einfluss von komplexen Nährmedien in Ein- und Zweiphasensystemen auf die Zellstabilität in gerührten Ansätzen ohne Substratzugabe	126
Tabelle 5.5.3: Einfluss von Triton X-100 in Ein- und Zweiphasensystemen auf die Zellstabilität in gerührten Ansätzen ohne Substratzugabe	127
Tabelle 5.5.4: Einfluss unterschiedlicher Cofaktorkonzentrationen auf den Reaktionsverlauf in gerührten 20 mL-Ansätzen mit optimiertem Medium	128
Tabelle 6.2.1: Ergebnisse der Umsetzung von EBA im Rührkesselreaktor bei einer Biokatalysatorkonzentration von 60 g L^{-1} und einer EBA-Startkonzentration von 55 mmol L^{-1} bei 48 h Reaktionsdauer	138
Tabelle 6.3.1: Vergleich der Herstellung von S-CHBE und S-HPPE im Rührkesselreaktor mit rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 7,0	140
Tabelle 7.1.1: Reduktion von 4Cl-ACE mit rekombinanten <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i> unter jeweils optimierten Reaktionsbedingungen	150
Tabelle 10.5.1: Physikalische Daten der untersuchten Lösungsmittel	172
Tabelle 10.5.2: Physikalische Eigenschaften der eingesetzten nichtionischen Tenside	173
Tabelle 10.5.3: Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Chemikalien	174